

République Algérienne Démocratique et Populaire

**Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université A. MIRA-BEJAIA**

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Microbiologie
Spécialité : Microbiologie Appliquée



Réf :

Mémoire de fin de Cycle
En vue de l'obtention du diplôme
Master
Thème

***Recherche de nouvelles souches de levures :
isolement, criblage et évaluation du potentiel
probiotique***

Présenté par :

ADJOU Souad et AIT BESSAI Yamina

Soutenu le : 02/07/2025

Devant le jury composé de :

M. BARACHE Nacim	MCA	Promoteur
M. ZEGHBIB Walid	MAB	Co-promoteur
Mme BENDALI Farida	Professeur	Examinatrice
Mme BENSIDHOUM Leila	MCA	Présidente

Année universitaire : 2024/2025

Dédicaces

Grâce à Dieu, Le Très-Haut, qui m'a guidé et soutenu

Je dédie ce modeste travail à

À mes chers parents, qui ont toujours été présents à mes côtés et m'ont soutenu tout au long de ces longues années d'études. Qu'ils trouvent ici l'expression sincère de ma profonde reconnaissance pour tous les sacrifices consentis, les efforts déployés et les moyens engagés afin de me permettre de réussir. Leur amour, leur patience et leur foi en moi ont été le fondement de cette réussite.

À mes précieux frères, mes bras droits Moussa, Haroun et Mouloud mes confidents et ma force.

À toute ma grande et merveilleuse famille, mes cousines et mes cousins dont l'affection et le soutien m'ont toujours porté.

A tous mes adorable amies, Sirem, Maria et Messaade

A ma binôme Yamina

À tous ceux qui ont été à mes côtés,

Je vous dédie ce mémoire, en témoignage de ma gratitude éternelle. Que cette dédicace soit le reflet de ma reconnaissance infinie envers vous tous.

Avec tout mon amour et ma profonde gratitude,

Souad

Dédicaces

*Avant tout, je remercie le Dieu le tout puissant de m'avoir
donné le courage et la volonté pour réaliser ce modeste travail
que je dédie :*

*A mes chers parents pour leur amour, leur encouragement et
leur sacrifice.*

*A mes sœurs et mon frère pour leur soutien et la confiance qu'ils
m'ont accordée*

*A tous mes amies qui ont contribué de près ou de loin à la
réussite de ce travail.*

A ma binôme Souad pour son aide et sa présence quotidienne.

*Et à une personne qui m'est chère, pour sa compréhension, sa
présence discrète et son soutien silencieux mais précieux.*

*A mon encadrant Mr BARACHE pour son sérieux, son travail
et son dévouement à faire de ce travail, une magnifique
expérience.*

Yamina

Remerciements

Au terme de ce travail, nous exprimons tout d'abord notre profonde gratitude et nos louanges à Allah, Le Très Miséricordieux, Le Tout-Puissant, pour nous avoir accordé la chance, la force dans les moments de doute, la clarté d'esprit dans les instants décisifs, le courage, la patience, et la santé pour la réalisation de ce modeste travail.

Nous adressons en premier lieu nos remerciements les plus sincères à notre promoteur, Monsieur BARACHE Nacim, pour son encadrement rigoureux, sa disponibilité constante, ses conseils avisés. Sa rigueur scientifique et ses encouragements inlassables ont été d'un précieux soutien tout au long de ce travail.

Nous exprimons également notre vive gratitude à notre co-encadrant, Monsieur ZEGHBIB Walid, pour la pertinence de ses orientations, la qualité de ses remarques et son implication, qui ont grandement facilité l'avancement de ce travail.

Nos remerciements les plus sincères vont également à Monsieur BOUDJOUAN Fares, dont la disponibilité constante, l'écoute attentive, la bienveillance et les conseils éclairés tout au long de ce travail ont largement contribué à la qualité scientifique et humaine de ce mémoire.

Nous exprimons également notre profonde gratitude à Madame OUARABI Liza pour son aide précieuse, ses conseils avisés, le temps généreusement consacré, la clarté de ses explications et la bienveillance dont elle a fait preuve tout au long de la réalisation de ce travail.

Nos remerciements vont également aux membres de jury, à Madame la Présidente, Mme BENSIDHOUM Leila, et à Madame l'Examinatrice, Mme BENDALI Farida, pour avoir accepté d'évaluer ce travail et pour le temps et l'attention consacrés à la lecture et à l'évaluation de ce mémoire.

Nos pensées les plus reconnaissantes vont aussi à nos familles respectives pour leur amour inconditionnel et leur soutien moral

Enfin, nous tenons à remercier du fond du cœur nos amis, nos camarades de promotion et toutes les personnes qui ont contribué à faire de cette aventure une expérience académique inoubliable.

À vous toutes et tous, nous disons simplement et sincèrement : merci !

Sommaire

LISTE DES ABREVIATIONS

LISTE DES FIGURES

INTRODUCTION	1
RECHERCHE BIBLIOGRAPHIQUE	
I. levures	3
I.1. Aperçu sur les levures.....	3
I.2. Structure cellulaire de levures.....	3
I.3. Exigences nutritives des levures	3
I.4. Source d'isolement des levures.....	4
I.5. Métabolisme des levures.....	4
I.6. Reproduction de levures	4
I.6.1. Bourgeonnement	4
I.6.2. Fission	5
I.6.3. Reproduction sexuée	5
II. Probiotiques	5
II.1. Définition des probiotiques.....	5
II.2. Critères de sélection des souches probiotiques.....	6
II.3. Principaux microorganismes probiotiques.....	6
II.4. Propriétés et applications de levures probiotiques.....	6
III. Lait maternel	7
III.1. Composition microbiologique	7
III.2. Composition chimique du lait maternel humain.....	8
IV. Legmi	8
IV.1. Composition biochimique.....	8
IV.2. Composition microbiologique	9
IV.3. Méthode de récolte de sève de palmier.....	9

MATERIEL ET METHODES.....
I. Prélèvement et isolement de levures	10
II. Sélection et purification des isolats	10
III. Criblage et évaluation du potentiel probiotique.....	11
III.1. Revivification des isolats	11
III.2. Critères d'innocuité	11
III.2.1. Test de filamentation	11
III.2.2. Test d'hémolyse.....	11
IV. Critères technologiques	12
IV.1. Test d'activité amylolytique	12
IV.2. Test d'activité protéolytique	12
V. Propriété du surface	12
V.1. Test d'autoagrégation	12
V.2. Test d'hydrophobicité	13
V.3. Test d'adhésion et formation de biofilm.....	13
VI. Activité antimicrobienne	14
VI.1. Standardisation des souches cibles	14
VI.2. Test des spots	14
VI.3. Test des puits	14
VI.4. Activité antimicrobienne sur microplaque à 96 puits	15
VII.Sélection des candidats à potentiel probiotique parmi les isolats de levures étudiés.....	15
VIII.Activité antioxydante.....	16
VIII.1. Préparation des cellules intactes	16
VIII.2. Test de réduction de fer (FRAP)	16
VIII.3. Test du réduction de radical libre (ABTS)	16
VIII.4. Test d'inhibition d'oxyde nitrique (NO)	17
IX. Activité inhibitrice de l'α amylase	17
RESULTATS ET DESCUSSION.....
I. Isolement de levures	18

II. Critère d'innocuité	19
II.1. Test d'activité hémolytique	19
II.2. Test de filamentation	20
III. Critères technologiques	21
III.1. Test d'activité amylolytique	21
III.2. Test d'activité protéolytique	21
IV. Propriété du surface.....	22
IV.1. Test d'autoagrégation et hydrophobicité	22
IV.2. Test de formation de biofilm	24
V. Activité antimicrobienne.....	26
V.1. Test de spots.....	26
V.2. Test des puits	26
V.3. Test d'inhibition sur microplaque a 96 puits	27
VI. Résultats de l'analyse en composant principal (ACP) des paramètres étudiés.....	28
VII. Propriétés probiotiques	29
VII.1. Activité antioxydante.....	29
VII.2. Activité inhibitrice de l' α amylase	32
CONCLUSION.....	33

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ANNEXES

Liste des abréviations

C: Candida

E: Escherichia

S: Saccharomyces

rpm : routeur par minute

g : gravité

LMH : Lait Maternel Humain

VPA : Vin de palm (A)

VPB : Vin de palme (B)

ACP : Analyse en composant principal

pH : potentiel d'Hydrogène

FRAP: The ferric reducing antioxidant power

ABTS: 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)

NO: oxide nitrique

FAO: Food and Agriculture Organization

Liste des figures

Figure 1. Aspect macroscopique des levures dans les échantillons de lait maternel..	18
Figure 2 . Résultats du test d'hémolyse des isolats de levures	20
Figure 3. Image optique a grossissement $\times 40$ de l'aspect cellulaire des isolats	20
Figure 4. Pourcentage d'autoagrégation et d'hydrophobicité des 7 isolats issus de lait maternel....	23
Figure 5. Pourcentage d'autoagrégation après 2 et 4 h d'incubation et d'hydrophobicité des 16 isolats issus de legmi VPA.	24
Figure 6. Pourcentage d'autoagrégation et d'hydrophobicité des 16 isolats issus de legmi VPB....	24
Figure 7. Adhésion des 40 isolats de levures sur microplaque à 96 puits	25
Figure 8. Croissance des isolats et de la souche cible sur gélose Mueller Hinton	26
Figure 9. Pourcentage d'inhibition de <i>Candida albicans</i> ATCC 10231	28
Figure 10. Analyse en composante principale (ACP)	29
Figure 11. Taux de piégeage du radical libre (FRAP)	30
Figure 12 . Pourcentage d'inhibition de (NO).	31
Figure 13. Pourcentage d'inhibition des radicaux libres (ABTS).	31

Introduction

Chaque jour, les humains sont exposés à un grand nombre d'agents pathogènes, en particulier des bactéries (Suvarna et al., 2018). Dans des conditions normales, les microorganismes intestinaux coexistent de manière symbiotique avec l'hôte, maintiennent un équilibre dynamique et jouent des rôles majeurs dans le métabolisme, la nutrition, la protection et la régulation immunitaire. Cependant, la présence de microorganismes pathogènes ou même de certaines espèces commensales peut perturber cet équilibre, favorisant ainsi l'apparition de maladies gastro-intestinales et extra-intestinales (Zhang et al., 2023).

Au cours des dernières décennies, les probiotiques ont suscité un intérêt croissant en raison de leur potentiel à améliorer la santé et voire à traiter certaines maladies (Gul et Durante-Mangoni, 2024). Ces derniers sont des micro-organismes vivants qui confèrent des bénéfices pour la santé de l'hôte lorsqu'ils sont administrés à une charge adéquate (Plaza-Diaz et al., 2019). En particulier, ils contribuent à rétablir l'équilibre du microbiote intestinal et à améliorer la santé du système digestif (Tullio, 2024).

Jusqu'à présent, la conception d'aliments contenant des probiotiques s'est concentrée principalement sur les lactobacilles et les bifidobactéries (Rima et al., 2012), tandis que les levures à potentiel probiotique ont été peu explorées. Pourtant, certaines espèces de levures sont déjà reconnues comme GRAS (Generally Recognized As Safe) et dans la liste QPS (Qualified Presumption of Safety), en raison de leur richesse nutritionnelle, de leur résistance à l'acidité gastrique et aux sels biliaires, de leurs propriétés antibactériennes, de leur tolérance aux antibiotiques, de leur capacité à moduler le système immunitaire, à assimiler le cholestérol et à améliorer le statut antioxydant (Suvarna et al., 2018). À ce jour, *Saccharomyces boulardii* demeure la seule levure commercialisée en tant que probiotique pour l'usage humain (Suvarna et al., 2018). Par ailleurs, la majorité des souches probiotiques actuellement étudiées et utilisées proviennent du tractus gastro-intestinal humain sain ou de produits laitiers (Garcia et al., 2016).

Aujourd'hui, due à la demande croissante en aliments probiotiques, l'identification de sources alternatives et de cultures probiotiques est devenue un domaine de recherche essentiel (Devecioglu et al., 2025). En outre, l'exploration des levures à potentiel probiotique ouvre la voie à de nouveaux produits aux propriétés fonctionnelles innovantes, distinctes de celles des probiotiques bactériens actuellement disponibles sur le marché (Tullio, 2024).

La présente étude contribue à la connaissance scientifique en examinant des sources d'isolément de probiotiques non conventionnelles, en explorant des échantillons issus du lait maternel et d'une boisson fermentée, le legmi (vin de palme), qui vise principalement à répondre à

la question suivante : ces sources non conventionnelles peuvent-elles constituer de bonnes sources pour l'isolement de nouvelles souches de levures présentant des propriétés probiotiques ?

Les principaux objectifs de ce travail sont :

- Isolement, dans un premier temps, de souches de levures à partir de lait maternel et de legmi (vin de palme)
- Sélection, Criblage et Evaluation du potentiel probiotique

Pour ce faire, et afin de mieux cerner le contexte de cette étude, une synthèse bibliographique relative au sujet a été réalisée, offrant un aperçu général sur les levures, les probiotiques, ainsi que sur les sources non conventionnelles étudiées. Par la suite, la méthodologie adoptée sera présentée en détail, suivie de la discussion des résultats obtenus. Enfin, les conclusions tirées de cette étude seront exposées, accompagnées des perspectives pour de futurs travaux.

*Recherche
bibliographique*

I. levures

I.1. Aperçu sur les levures

La première observation microscopique des levures a été réalisée en 1680 par Antonie van Leeuwenhoek (**Türker, 2014**). Les levures sont des microorganismes eucaryotes hétérotrophes appartenant au règne des fungi. Elles peuvent exister sous une forme unicellulaire ellipsoïde ou sous la forme de cellules allongées reliées en filaments, formant un pseudomycélium (**Kopecká et al., 2012**). Généralement, elles se caractérisent par la présence d'une membrane nucléaire ainsi que de parois cellulaires bien définies (**Shurson, 2018**). Leurs cellules peuvent présenter différentes formes, comme la forme sphérique, cylindrique ou ovale (**Huang et Tang, 2007**), et elles sont soit aérobies strictes, soit anaérobies facultatives (**Featherstone, 2015**).

Sur le plan taxonomique, les levures appartiennent à deux grands phyla : les Ascomycota et les Basidiomycota (**Liu et al., 2023**). Leur reproduction peut se faire de manière asexuée, par bourgeonnement ou fission, ou bien de manière sexuée, par la formation de spores (**Mohd Azhar et al., 2017**). En ce qui concerne leur habitat, les levures sont des microorganismes ubiquitaires qui se retrouvent dans une grande variété d'environnements : terrestres et aquatiques (**Chavez et al., 2024**).

I.2. Structure cellulaire de levures

Les cellules de levure peuvent avoir une longueur allant de 2 à 3 μm et atteindre jusqu'à 20 à 50 μm , avec un diamètre variant de 1 à 10 μm . La paroi cellulaire des levures représente une structure complexe et rigide, dont l'épaisseur varie entre 100 et 200 nm (**Walker, 2009**) ; elle est principalement composée de polysaccharides tels que les β -glucanes, la chitine et les mannoprotéines, qui assurent sa rigidité et son épaisseur (**de Macêdo et al., 2024**).

Les cellules de levure sont constituées d'un cytosquelette, d'un noyau et de divers organites sous-cellulaires tels que le réticulum endoplasmique (RE), l'appareil de Golgi, les mitochondries et les microcorps (peroxysomes, glyoxysomes) (**Van Der Klei et al., 2011**). De plus, elles ont une membrane et du cytoplasme (**Tofalo et Suzzi, 2016**).

I.3. Exigences nutritives des levures

Les cellules de levure préfèrent du consommer du glucose ou du fructose par rapport à d'autres mono-, di- et trisaccharides (**Broach, 2012**). Pour assurer leur croissance, elles nécessitent un milieu contenant une source d'azote (comme les sels d'ammonium, les nitrates ou les acides aminés), de faibles concentrations de minéraux essentiels (potassium, magnésium et le calcium), ainsi que des vitamines indispensables telles que la biotine et la thiamine (**Hatoum et al., 2012**).

I.4. Source d'isolement des levures

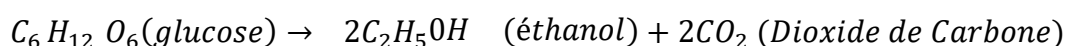
Les levures sont répandues dans les milieux naturels et se trouvent notamment dans la flore microbienne normale de l'Homme, sur les particules aériennes, dans les aliments et sur les végétaux (Hatoum et al., 2012). Elles sont également présentes dans les exsudats de feuilles, les racines, les fleurs, les fruits et les troncs d'arbres, ainsi que dans le sol, les eaux marines et les eaux de rivière (Starmer et Lachance, 2011).

I.5. Métabolisme des levures

Les levures ont la capacité d'utiliser deux voies différentes pour générer de l'adénosine triphosphate (ATP) ; la respiration et la fermentation. Ces deux processus débutent par la glycolyse (García et al., 2016), qui métabolise le glucose en pyruvate, en utilisant l'énergie libre pour générer de l'ATP et les électrons libérés pour réduire le nicotinamide adénine dinucléotide (NAD) en NADH (Overal et al., 2018).

En présence d'oxygène, les levures réalisent une respiration, produisant du dioxyde de carbone, de l'ATP et de l'eau (Lin et al., 2012) ; dans ce processus, le pyruvate est complètement oxydé en CO₂ par le cycle de l'acide tricarboxylique et la phosphorylation oxydative et entraîne un rendement élevé en ATP, environ 18 ATP par glucose. En revanche, en l'absence d'oxygène, les levures réalisent une fermentation. Elle transforme le pyruvate en éthanol par le pyruvate décarboxylase et l'alcool déshydrogénase, ce qui entraîne un rendement en ATP plus faible (2 ATP par glucose) (Pfeiffer et Morley, 2014). Par ailleurs, *Saccharomyces cerevisiae* est capable de fermenter le glucose même en conditions totalement aérobies (Rintala et al., 2011).

L'équation chimique schématisée pour la voie de fermentation est la suivante (Maicas, 2020):



I.6. Reproduction de levures

I.6.1. Bourgeonnement

Dans des conditions de croissance favorables, les cellules de levures haploïdes ou diploïdes se multiplient par la formation d'un petit bourgeon par croissance polarisée à partir d'un site particulier à la surface de la cellule mère ; ce bourgeon reste attaché à la cellule mère par un col, qui se détache ensuite grâce à un ensemble d'enzymes responsables du remodelage de la paroi cellulaire (Wedlich-Soldner et Li, 2008), le terme « levure bourgeonnante » provient justement de cette caractéristique unique de la division cellulaire, qui distingue *S. cerevisiae* de la levure de fission (Duina et al., 2014). Par ailleurs, les cellules filles et les cellules mères sont génétiquement

identiques, mais le bourgeon formé est plus petit que la cellule mère, il doit atteindre une taille suffisante pour commencer à bourgeonner à son tour (**Colman-Lerner et al., 2001**) et cela à partir d'un nouveau site qui est opposé à son site de naissance (**Y. Wang et al., 2017**).

I.6.2. Fission

La croissance des cellules de levures par fission se fait de manière longitudinale, dans laquelle les cellules de levures de forme cylindrique s'allongent vers leur axe le plus long. Pendant la croissance, la paroi de la cellule mère se divise au centre pour former deux nouvelles parois cellulaires rigides, produisant ainsi deux cellules filles de taille égale (**Almonacid et Paoletti, 2010**). Parmi les levures qui se divisent par fission, *Schizosaccharomyces pombe* est celle qui est largement étudiée (**Osiewacz, 2002**).

I.6.3. Reproduction sexuée

La fusion se fait lorsque deux cellules haploïdes de types d'accouplement opposés se fusionnent pour former une cellule diploïde, d'abord par contact entre leurs parois cellulaires, puis par la fusion de leurs membranes plasmatiques, et se termine par la fusion des noyaux (la caryogamie). En cas de carence en nutriments, les cellules diploïdes sporulent, générant quatre spores haploïdes. Ces spores germent et produisent des cellules haploïdes qui, par bourgeonnement, peuvent se jumeler pour restaurer l'état diploïde (**Knop, 2011**). Ainsi, par ce mécanisme, les cellules haploïdes de *S. cerevisiae* peuvent devenir des cellules diploïdes (**Harari et al., 2018**).

II. Probiotiques

II.1. Définition des probiotiques

Le terme « probiotique » a été utilisé pour la première fois en 1953 par Werner Kollath (**Latif et al., 2023**). L'origine de ce mot vient du grec, où « pro » signifie bénéfique et « bios » signifie vie (**Butt et al., 2021**). Alors que les probiotiques peuvent être définis comme des composants alimentaires qui favorisent la croissance des microorganismes bénéfiques dans l'intestin (**Sarita et al., 2025**), selon la définition de l'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO) et de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), les probiotiques sont « des microorganismes vivants qui, lorsqu'ils sont administrés à des quantités adéquates, exercent une action bénéfique sur la santé de l'hôte » (**Hill et al., 2014**).

II.2. Critères de sélection des souches probiotiques

Un micro-organisme probiotique doit répondre à plusieurs critères pour être considéré comme un candidat probiotique. Ces propriétés sont spécifiques à une souche, et non à une espèce ou à un genre (Alkalbani et al., 2022).

Avant l'utilisation de toute souche microbienne en tant que probiotique, il est essentiel d'évaluer ses critères de sécurité et de fonctionnalité (Sarita et al., 2025). Les recommandations actuelles soulignent l'importance de vérifier l'absence de facteurs de virulence, d'infectiosité, de toxicité, ainsi que de gènes de résistance aux antibiotiques transmissibles pour assurer l'innocuité du probiotique (de Melo Pereira et al., 2018). Les critères fonctionnels incluent la capacité de survie dans les sites corporels pertinents, l'adhésion aux cellules épithéliales intestinales, l'interaction avec les cellules immunitaires humaines, la résistance aux conditions gastro-intestinales (enzymes digestives, bile, acidité), ainsi que l'activité antimicrobienne (Binda et al., 2020). En outre, les effets bénéfiques potentiels tels que les propriétés anticancéreuses, antidépressives, anxiolytiques, anti-obésités, antidiabétiques, immunostimulantes et hypocholestérolémiantes sont de plus en plus considérés comme des critères importants dans la sélection des souches probiotiques (de Melo Pereira et al., 2018).

II.3. Principaux microorganismes probiotiques

Les probiotiques les plus connus appartiennent au groupe des lactobacilles, et aux genres *Bifidobacterium*, *Bacillus*, *Streptococcus*, *Enterococcus* et *Saccharomyces* (Sarita et al., 2025). *Saccharomyces cerevisiae var boulardii* est la seule levure commercialisée comme probiotique pour l'Homme (Suvarna et al., 2018). Récemment, de nouvelles souches de levures présentant un potentiel probiotique ont été isolées, notamment *Kluyveromyces marxianus var. lactis* et *K. marxianus var. fragilis* et d'autres levures non-*Saccharomyces* telles que *Debaryomyces hansenii*, *Pichia guilliermondii* et *Candida norvegica* ont montré également un potentiel probiotique intéressant (Staniszewski et Kordowska-Wiater, 2021).

II.4. Propriétés et applications de levures probiotiques

Les levures probiotiques exercent leurs effets bénéfiques grâce à plusieurs mécanismes tels que la modulation du microbiote intestinal, par l'antagonisme direct contre les agents pathogènes, et indirect comme l'adhésion au mucus, la modulation immunitaire et les effets topiques sur le tractus gastro-intestinal (Staniszewski et Kordowska-Wiater, 2021). Les levures probiotiques jouent un rôle dans la régulation de l'immunité intestinale non seulement elles inhibent les bactéries pathogènes, mais aussi elles stimulent la libération de cytokines et d'autres agents immunitaires,

tels que l'interleukine (IL)-10 et l'interféron (IFN)- γ , qui renforcent le système de défense du corps humain contre les agents pathogènes (Tullio et al., 2024). En effet, des études ont attesté leur utilisation en biothérapie pour leurs effets anticancéreux, pour traiter les problèmes digestifs, et contribuent aussi à améliorer la santé métabolique, notamment la gestion du diabète et réduisent le stress oxydatif (Moonsamy et al., 2024 ; Tamang et Lama, 2022).

Par conséquent, les levures probiotiques sont utilisées dans plusieurs domaines notamment alimentaires et médicaux. Elles sont intégrées dans des aliments fonctionnels, dont les produits laitiers comme le yaourt, le fromage, le kéfir et le koumis, qui constituent un milieu propice à leur intégration. Ces produits, en plus de leur valeur nutritive, améliorent la santé intestinale, par exemple les levures probiotiques peuvent améliorer la concentration de protéines, de vitamines (telles que la vitamine B12) et de minéraux (tels que le calcium et le magnésium), favorisant ainsi une absorption plus efficace des nutriments (Hatoum et al., 2012).

III. Lait maternel

Le lait maternel humain (LMH) est un fluide physiologique complexe (Ojo-Okunola et al., 2018). Universellement, il est considéré comme la source de nutrition optimale pour presque tous les nourrissons en bonne santé (Hunt et al., 2011); sa composition évolue avec le temps pour s'adapter aux besoins changeants de l'enfant (Ares Segura et al., 2016), il est riche en lipides et en glucides et également en microorganismes (Christian et al., 2021).

Le LMH est couramment classé en colostrum et lait mature. Le colostrum est le premier lait produit, il se diffère du lait maternel mature par sa composition. Il présente une faible teneur en lactose et en lipides comparé au lait mature (Andreas et al., 2015), il est produit en faibles quantités, mais il est riche en composants immunologiques tels que l'IgA sécrétoire (Ballard et Morrow, 2013), sa forte teneur en β -carotène lui confère une couleur jaune foncé. Après 14 jours, le lait est considéré comme mature (Talbert et Townsend, 2025).

III.1. Composition microbiologique

La flore du lait maternel humain est très diversifiée (Boix-Amorós et al., 2017). Il contient une grande variété de microorganismes, incluant des bactéries, des champignons, mais aussi des archées des virus et des protozoaires, formant un écosystème complexe (Jiménez et al., 2015).

Avant les années 2000, le lait maternel humain était considéré comme stérile. Cependant, en 2003, Martín et al.(2003), ont décrit la présence de bactéries commensales et probiotiques dans le LMH (Ojo-Okunola et al., 2018). En effet, des chercheurs ont confirmé la présence du genre *Bifidobacterium*, des bactéries appartenant au groupe des lactobacilles (Ge et al., 2024) et des

espèces appartenant aux genres *Staphylococcus*, *Acinetobacter*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc*, *Weissella* et *Pseudomonas* (Fernández et al., 2020; Witkowska-Zimny et Kaminska-El-Hassan, 2017). La présence de levures a également été mise en évidence, principalement des genres comme *Saccharomyces*, *Malassezia*, *Alternaria*, *Rhodotorula* et *Candida* spp. (Notarbartolo et al., 2022).

III.2. Composition chimique du lait maternel humain

Le lait humain possède une composition chimique unique, constitué d'environ 87 % d'eau, de 3,8 % de graisses, de 0,2 % de minéraux et d'environ 1,0 % de protéines. Il contient également 7 % de lactose, qui fournit environ 40 % de l'énergie totale du lait humain (Guo, 2014). Ces nutriments proviennent de l'alimentation maternelle, des réserves de la mère et de la synthèse dans les lactocytes (Ballard et Morrow, 2013).

Le pH du lait maternel mature varie entre 7 et 7,5 à température ambiante, avec une légère diminution au cours de la lactation en raison des changements dans sa composition. Sa couleur est généralement blanche, mais elle peut varier en fonction des aliments ou des médicaments pris par la mère (Meng et al., 2021).

IV. Legmi

Le vin de palme est une boisson traditionnelle (Nwaiwu et al., 2016) fabriquée à partir de la sève de divers palmiers (Onyeukwu et al., 2024) comme le palmier à huile (*Elaeis guineensis*), le palmier dattier (*Phoenix dactylifera*), le palmier kithul (*Caryota urens*), le palmier nipa (*Nypa fruticans*), le palmier raphia (*Raphia hookeri*) et le cocotier (*Cocos nucifera*) (Stringini et al., 2009). Il est issu de la fermentation spontanée de la sève de palmier par des microorganismes naturellement présents (Sumerta et al., 2025). Cette fermentation comprend 3 étapes : Une fermentation lactique, une fermentation alcoolique par des levures qui sont responsables de la transformation de la sève en alcool et enfin une fermentation acétique (Nwaiwu et al., 2016). Et grâce à ce processus de fermentation, la sève devient alcoolisée et prête à être consommée.

En ce qui concerne la boisson du Legmi issue de la sève de dattier, elle peut être consommée avant ou après la fermentation selon l'appréciation du consommateur.

IV.1. Composition biochimique

Le vin de palme se compose de différents constituants biochimiques, notamment les sucres tels que le maltose et le saccharose, les protéines, les acides aminés, les lipides, les minéraux et les oligoéléments. La quantité en maltose est de 0,10 mg/100, et celle de saccharose est de 8,74 mg/100

et environ 39,09 mg/100 des protéines, 59,63 mg/100 des lipides, et 62,65 mg/100 d'acides aminés libres et de 3,40g/100 de l'éthanol. On trouve aussi des éléments essentiels comme le magnésium le zinc et le phosphore (Ezeagu et al., 2003). Il contient également des polyphénols, acides gras a chaîne courtes, du potassium du Fer ainsi que des acides organiques tels que l'acide lactique, acétique et les esters qui influencent son goût (Oluwole et al., 2023). Son pH varie entre 4,5 et 6 (Chandrasekhar et al., 2012).

IV.2. Composition microbiologique

La flore microbienne du legmi fermentée constitue majoritairement de levures, de bactéries lactiques et de bactéries acétiques. Parmi les levures, les 2 espèces les plus dominantes sont *Saccharomyces cerevisiae* et *Schizosaccharomyce spombe* (Odunfa et Oyewole, 1998). Tandis que, *Kloeckera*, *Pichia*, *Candida* et *Endomycopsis* sont moins présentés. Quant aux bactéries, le vin de palme contient également des espèces appartiennent à divers genres tels que *Acetobacter*, *Sarcina*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Bacillus*, *Zymomonas*, *Brevibacterium*, *Micrococcus*, *Serratia*, *Corynebacterium*, *Pediococcus* et *Klebsiella* et le groupe de Lactobacilles (Okafor, 1978).

IV.3. Méthode de récolte de sève de palmier

La sève de palmier est obtenue à partir de l'arbre grâce à un processus appelé Gemmage (*Tapping*) permettant l'écoulement de la sève (Atputharajah et al., 1986). On distingue deux méthodes de récolte de la sève du palmier, la 1^{ère} est la méthode non-destructive, en incisant la zone située juste au-dessus de l'inflorescence, elle implique de grimper au sommet du palmier pour couper l'extrémité de l'inflorescence, permettant ainsi à la sève de s'écouler progressivement sans abattre l'arbre (Santiago-Urbina et al., 2014), tandis que la 2^{ème} méthode est destructive, elle consiste à perforer le méristème apical du palmier abattu, afin de récolter la sève dans un récipient (Djeni et al., 2020).

Matériel et Méthodes

Ce travail a été réalisé à l'université de Béjaïa au sein du laboratoire de biotechnologie, durant la période allant du 17 février 2025 au 3 juin 2025.

Le principal objectif de cette étude est la recherche de nouvelles souches de levures à potentiel probiotique.

I. Prélèvement et isolement de levures

L'isolement des souches de levures a été réalisé à partir de 5 échantillons, répartis en trois échantillons de lait maternel et deux échantillons de legmi (vin de palme).

Les trois échantillons de lait maternel ont été récupérés à partir de trois femmes différentes, l'un provient d'une mère allaitant un nourrisson de six mois codé (Er3), tandis que les deux autres proviennent de mères allaitant des enfants âgés de deux ans codés (L2 et F1). Les prélèvements ont été réalisés dans des conditions stériles. Les échantillons de legmi, quant à eux, ont été collectés par notre promoteur dans une palmeraie de la région d'Oued Souf. Ils ont été transportés dans une glacière jusqu'à Béjaïa, puis conservés au réfrigérateur à 4 °C pendant une durée de 15 jours avant d'être soumis à l'isolement. Ces échantillons ont été codés respectivement VPA et VPB.

Les levures ont été isolées à partir de trois échantillons de lait maternel. Pour chaque échantillon, 100 µL ont été ensemencés en surface sur gélose Sabouraud additionnée de chloramphénicol (Equiprolab, Algérie) à l'aide d'un râteau étaleur stérile. En parallèle, 200 µL de chaque échantillon ont été ensemencés en masse dans le même milieu, puis les boîtes de Petri ont été incubées à 37 °C pendant 48 h.

Également un volume d'un millilitre a été prélevé à partir des échantillons VPA et VPB de legmi, puis transféré dans 9 millilitres d'eau physiologique stérile, homogénéisé à l'aide d'un vortex, ensuite une série de dilutions décimales successives, allant de 10^{-1} à 10^{-3} , ont été réalisées. Pour chaque dilution, 100 µL ont été ensemencés en surface sur milieu Sabouraud additionné de chloramphénicol, et les boîtes de Petri ont été incubées à 37 °C pendant 48 h.

II. Sélection et purification des isolats

La sélection des colonies de levures a été effectuée par une observation macroscopique, en retenant celles présentant des variations morphologiques distinctes en termes de taille, de forme, d'aspect et de couleur, suivi d'une coloration au bleu de méthylène et d'une observation des cellules sous microscope optique à un grossissement $G \times 100$.

Les colonies de levures présélectionnées ont été transférées dans des tubes Eppendorf contenant 1 mL de bouillon nutritif (BN), puis incubées à 37 °C pendant 24 h. Après incubation, un prélèvement de chaque culture a été réalisé et ensemencé par stries sur milieu Sabouraud additionné

de chloramphénicol, les boîtes de Petri ont ensuite été incubées à 37 °C pendant 48 heures. Pour s'assurer de l'obtention d'isolats purs, plusieurs repiquages successifs ont été effectués (bouillon ↔ gélose) et la pureté a été vérifiée par une coloration simple au bleu de méthylène, suivie d'une observation microscopique.

Les isolats purifiés ont été ensemencés dans des tubes Falcon contenant 10 mL de BN (gélose ↔ bouillon) au bout de 24h d'incubation à 37°C, les isolats sont ensuite conservés au réfrigérateur à 4°C.

III. Criblage et évaluation du potentiel probiotique

III.1. Revivification des isolats

À partir des cultures conservées à 4 °C, un prélèvement a été effectué et ensemencé dans des tubes Eppendorf contenant 1 mL de bouillon nutritif (BN), puis incubé pendant 24 h à 37 °C afin de réactiver les cellules. Après incubation, un nouveau prélèvement a été réalisé et ensemencé en stries sur un milieu Sabouraud. Les boîtes de Petri ont ensuite été incubées à 37 °C pendant 48 h.

III.2. Critères d'innocuité

III.2.1. Test de filamentation

Ce test permet une identification rapide de l'espèce *Candida albicans*, caractérisée par sa capacité à former des structures filamenteuses appelées tubes germinatifs. Ce test a été réalisé selon la méthode décrite par **Koneman et al. (2006)** et **Larone (2011)**, avec quelques modifications.

Une colonie fraîche a été prélevée et suspendue dans un tube Eppendorf stérile contenant 1 mL de sérum sanguin humain. La suspension a été bien homogénéisée à l'aide d'un vortex, puis incubée à 37 °C pendant 3 h. Après incubation. Un prélèvement à l'état frais a été préparé en déposant une goutte de la suspension sur une lame suivie du lugol. Ensuite, la lame a été recouverte d'une lamelle, et l'observation microscopique a été effectuée à un grossissement ×40.

Le test est considéré comme positif si on observe des tubes germinatifs émergeant directement de la cellule mère, sans constriction à la base, ce qui est caractéristique de *Candida albicans*.

III.2.2. Test d'hémolyse

L'activité hémolytique des isolats de levures a été déterminée par la méthode décrite par **Fernández-Pacheco et al. (2021)**. Pour ce faire, des cultures de 18 h des isolats ont été préparées.

Ensuite, 5µL de ces cultures ont été déposées en spots sur des boîtes contenant la gélose Columbia (Equiprolab, Algérie) additionnée de 5% (v/v) du sang humain (O⁺). Un contrôle positif (T+) a été réalisé en utilisant la souche de référence *Staphylococcus aureus* ATCC 25933, et puis les boîtes de Petri ont été incubées à 37°C pendant 24h à 48h. Après incubation, l'apparition d'une zone claire autour du spot indique une hémolyse β, une zone verdâtre correspond à une hémolyse α, tandis que l'absence de zone traduit une hémolyse γ.

IV. Critères technologiques

IV.1. Test d'activité amylolytique

L'activité amylolytique des isolats de levures a été évaluée selon la méthode décrite par **Silaban et al. (2020)** avec quelques modifications, des cultures de 18 h ont été préparées dans du bouillon Sabouraud. Un volume de 5 µL de chaque culture a été déposé en spot sur un milieu à base de gélose nutritive additionné de 2% de l'amidon. Les boîtes de Pétri ont été incubées à 37 °C pendant 7 jours. Après incubation, les boîtes ont été recouvertes d'une solution de lugol afin de révéler la présence d'amidon non dégradé. La formation d'un halo clair autour des colonies témoigne d'une activité amylolytique, indiquant la dégradation de l'amidon par les enzymes produites par les levures.

IV.2. Test d'activité protéolytique

Pour évaluer la capacité des isolats de levure à dégrader les protéines, notamment la caséine du lait, un test d'activité protéolytique décrit par **de Albuquerque et al. (2018)** a été réalisé sur une gélose nutritive additionnée de 20% d'un lait écrémé. Après avoir préparé une culture de 18h des isolats, un volume de 5 µL de chaque culture a été ajouté sous forme d'un spot sur la gélose suivi d'une incubation à 37°C et une lecture est effectuée après 24 et 48h. La présence d'une activité protéolytique est confirmée par la présence d'un halo clair autour du spot.

V. Propriétés du surfaces

V.1. Test d'autoagrégation

Ce test a été réalisé selon la méthode décrite par **Kos et al. (2003)** avec quelques modifications. Des cultures de 18h ont été réalisées, à partir desquelles les cellules des isolats ont été récupérées par centrifugeuse (centurioniscientificK3, USA) à 4000 g pendant 10 min à 4°C. Ensuite, le culot cellulaire a été lavé une fois avec 1 mL d'eau physiologique, puis remis en suspension dans 9 mL de la même solution suivie d'une homogénéisation à l'aide d'un vortex. 1 mL

de chaque suspension a été prélevé, et l'absorbance initiale (A0) a été mesurée à 630 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (BIOTECH ENGINEERING, UK). Au final, l'autoagrégation a ensuite été déterminée après 2 h et 4 h d'incubation à 37 °C, le pourcentage d'autoagrégation a été calculé selon l'équation suivante :

$$\text{Auto agrégation (\%)} = 1 - \frac{At}{A0} \times 100$$

At : absorbance à temps 2h, 4h

A0 : l'absorbance à temps 0h

V.2. Test d'hydrophobicité

L'hydrophobicité des isolats de levures a été évaluée selon le protocole de **Rosenberg et al. (1980)**. Une culture de 18 h a été préparée, puis centrifugée à 4000 g pendant 10 minutes à 4 °C. Le culot cellulaire obtenu a été lavé avec 1 mL d'eau physiologique, puis resuspendu dans 4 mL de la même solution. La suspension a été homogénéisée, puis 1 mL a été prélevé pour mesurer la densité optique initiale à 630 nm (temps 0 h). Ensuite, 1 mL de xylène a été ajouté aux 3 mL restants de la suspension, et le mélange a été vortexé pendant 1 minute et 30 secondes. Une incubation à 37 °C a été réalisée pendant 15 minutes, suivie d'une nouvelle mesure de la densité optique de la phase aqueuse. La formule suivante a ensuite été utilisée pour calculer le pourcentage d'hydrophobicité.

$$\text{Hydrophobicité (\%)} = 1 - \frac{At}{A0} \times 100$$

V.3. Test d'adhésion et formation de biofilm

Un test d'adhésion sur microplaque en polystyrène à 96 puits a été réalisé afin d'évaluer la capacité des isolats de levures à adhérer et à former un biofilm, selon la méthode décrite par **O'Toole et Kolter (1998)**, avec quelques modifications. Une culture de levure de 18 h a été transférée dans chaque puits à raison de 50 µL, complétée par 150 µL de bouillon Sabouraud. Les puits témoins ont été remplis uniquement avec 200 µL de ce même bouillon. La microplaque a ensuite été incubée à 37 °C pendant 24 h. Après incubation, les puits ont été vidés et lavés deux fois avec 200 µL d'eau physiologique stérile afin d'éliminer les cellules non adhérentes. Les cellules restantes ont été mis en contact pendant 15 minutes avec 200 µL d'éthanol à 96 % dans le but de les fixer. Les puits ont ensuite été colorés avec 100 µL de cristal violet à 0,1 %, sous agitation (150 rpm) pendant 20 minutes à température ambiante (20–25 °C), suivie de deux lavages avec 200 µL d'eau physiologique. Enfin, 200 µL d'éthanol à 96 % ont été ajoutés pour solubiliser le colorant, et l'absorbance a été mesurée à 630 nm à l'aide d'un lecteur de microplaque (BioTek, USA). L'absorbance des puits non ensemencés (Ac) a été utilisée comme témoin négatif. Selon **Stepanović et al. (2000)** les isolats de levures ont été devisés en 4 résultats possibles :

$A \leq A_c$, non adhérent (-)

$4A_c \geq A \geq 2A_c$, faiblement adhérent (+)

$4A_c \geq A \geq 2A_c$ modérément adhérent (++)

$A > 4A_c$ fortement adhérent (+++)

VI. Activité antimicrobienne

VI.1. Standardisation des souches cibles

Les souches cibles d'*Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25933, *Candida albicans* ATCC 10231 ont été cultivées dans 10 mL de BN et incubées à 37°C pendant 18h. Après incubation, une série de dilutions décimales a été réalisée dans 9 mL d'eau physiologique à 0,9% et la densité optique des souches cibles a été mesurée à 630 nm par spectrophotomètre et ajustée à une charge de 10^7 UFC/mL.

VI.2. Test des spots

L'activité antimicrobienne de 40 isolats de levures a été testée contre trois souches pathogènes de référence : *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* et *Candida albicans*, selon la méthode des spots décrite par **Ceugniet et al. (2017)**, avec quelques modifications. Une culture de 18 h des trois microorganismes cibles (*E.coli*, *S.aureus* et *C.albicans*) a été réalisée dans 10 mL BN. Simultanément, 1 mL de bouillon Sabouraud a été mis en contact avec une colonie de la même taille de chacun des 40 isolats de levures dans des Eppendorf, pour une incubation de 18 h. Les cultures des cibles ont été diluées de manière à obtenir une concentration finale comprise entre 10^6 et 10^7 UFC/mL et ensemencées sur gélose Muller-Hinton. Ensuite, 5 μ L de chaque culture de levure ont été déposés en spot sur les milieux ensemencés, puis les boîtes ont été incubées à 37 °C pendant 24 heures. L'activité antimicrobienne a été évaluée après incubation : elle est considérée positive en cas d'apparition d'une zone d'inhibition autour des spots.

VI.3. Test des puits

Le test des puits a été réalisé selon la méthode décrite par **Staniszewski et Kordowska-Wiater, (2024)**, avec quelques modifications, afin d'évaluer la capacité des isolats de levures à inhiber la croissance des souches cibles : *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 et *Candida albicans* ATCC 10231. Des cultures de 18 h et de 48 h des isolats de levures ont été préparées dans des tubes Eppendorf contenant 1 mL de bouillon Sabouraud. Les souches cibles ont été standardisées dans du bouillon nutritif à une concentration comprise entre 10^6 et 10^7 UFC/mL, puis ensemencées en surface sur des géloses Mueller-Hinton. Des puits ont ensuite

été creusés dans la gélose. Chaque puit a été rempli avec 50 μ L de la suspension de levures préparée précédemment. Les boîtes ont été incubées à 37 °C pendant 24 h. L'activité antimicrobienne a été évaluée par l'observation de zones d'inhibition autour des puits.

Afin d'étudier l'effet antimicrobien des cellules mortes, les isolats de levures ont été cultivés pendant 48 heures dans des tubes Eppendorf contenant 1 mL de bouillon Sabouraud. Après incubation, les cultures de levures ont été centrifugées à 14 000 rpm pendant 10 minutes à température ambiante pour récupérer les culots cellulaires, qui ont ensuite été lavés à l'eau physiologique et séchés à 50 °C. Le culot sec a été resuspendu dans de l'eau physiologique. Cette suspension a ensuite été divisée en deux fractions : l'une a été chauffée à 80 °C pendant 15 minutes, tandis que l'autre a été laissée à température ambiante. L'activité antimicrobienne de chaque fraction a été testée à l'aide du test des puits, en déposant 50 μ L par puits.

VI.4. Activité antimicrobienne sur microplaque à 96 puits

L'activité antimicrobienne des isolats de levures en microplaque a été évaluée selon la méthode décrite par **Ait Ouali et al. (2014)**, avec quelques modifications. Les isolats de levures ont été cultivés pendant 48 heures dans du bouillon Sabouraud, puis le surnageant a été récupéré par centrifugation à 14 000 rpm pendant 10 minutes à température ambiante. Parallèlement, des cultures de 18 h des souches cibles (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* et *Candida albicans*) ont été ajustés à une charge finale équivalente à 10⁶ UFC/mL. Pour le test, 70 μ L de surnageant de levure et 30 μ L de suspension de la souche cible ont été ajoutés à chaque puits d'une microplaque 96 puits, préalablement remplis avec 100 μ L du bouillon trypticase soja (TSB). Des contrôles positifs (30 μ L de souche cible + 100 μ L de TSB + 70 μ L de bouillon Sabouraud) et des contrôles négatifs (200 μ L de TSB seul) ont été inclus. Les microplaques ont ensuite été incubées à 37 °C pendant 24 h. Après incubation, la croissance des souches cibles a été évaluée par observation visuelle et par mesure de l'absorbance à 630 nm à l'aide d'un lecteur de microplaque (BioTek, USA). Une diminution de la turbidité par rapport au contrôle positif indiquait une activité antimicrobienne du surnageant testé.

VII. Sélection des candidats à potentiel probiotique parmi les isolats de levures étudiés

Les résultats enregistrés pour le test d'innocuité, propriété de surface, activité antimicrobienne ont été utilisés pour la sélection des meilleurs candidats probiotiques pour la suite des tests à l'aide de l'analyse en composante principale (ACP) en utilisant le logiciel FactoMineR. L'analyse en composantes principales a été effectuée à l'aide de la version R 3.5.2 (www.r-project.org, *R foundation for statistical computing*).

VIII. Activité antioxydante

VIII.1. Préparation des cellules intactes

Des cultures de 48 heures d'isolats de levures ont été préparées dans des tubes Eppendorf contenant 1 mL de bouillon Sabouraud. Le culot cellulaire a été récupéré par centrifugation à 14 000 rpm pendant 10 minutes à température ambiante, puis lavé une fois avec 1 mL de solution physiologique stérile à 0,9 %. Les cellules ont ensuite été resuspendues dans 1 mL d'eau distillée stérile et homogénéisées à l'aide d'un vortex.

VIII.2. Test de réduction de fer (FRAP)

Le test FRAP a été réalisé selon la méthode décrite par **Benzie et Strain, (1999)**. Un volume de 50 μL de suspension cellulaire a été mélangé avec 950 μL de la solution FRAP, composée d'acétate de sodium (300 mM, pH 3,6), de TPTZ (10 mM) et de chlorure ferrique ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 20 mM), dans un rapport volumique de 10:1:1 (v/v/v). Le mélange réactionnel a été incubé à 37 °C pendant 30 minutes à l'obscurité, puis centrifugé à 14 000 rpm pendant 1 minute à température ambiante. Un blanc a été préparé avec 50 μL d'eau distillée et 950 μL de solution FRAP.

L'absorbance des échantillons et du blanc a été mesurée à 593 nm. Les résultats ont été exprimés en microgrammes d'équivalent Trolox par millilitre d'extrait ($\mu\text{g TE/mL}$), en se basant sur une courbe standard de Trolox définie par l'équation suivante : $y = 10,276x + 0,005$ ($R^2 = 0,9998$), où y représente l'absorbance et x la concentration en $\mu\text{g/mL}$.

VIII.3. Test du réduction de radical libre (ABTS)

Pour évaluer le pouvoir antioxydant des isolats de levures, un test de piégeage du radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$ a été réalisé selon la méthode décrite par **Re et al.(1999)**, avec quelques modifications. La solution d' $\text{ABTS}^{\bullet+}$ a été préparée en mélangeant du réactif ABTS (7 mM) avec une solution de persulfate de potassium (2,4 mM) dans un rapport volumique de 1:1 (v/v). Le mélange a été agité puis incubé à l'obscurité pendant 12 à 16 heures à température ambiante. La solution ainsi obtenue a ensuite été diluée avec de l'éthanol pour atteindre une absorbance de $0,700 \pm 0,001$ à 734 nm. Pour le test, 1 mL de cette solution a été ajoutée à 100 μL d'une culture de 48 h de chaque isolat de levure (n° 4, 12, 26 et 29), avec trois répétitions par souche. Le mélange a été incubé à l'obscurité pendant 7 minutes. Trois tubes contenant 100 μL d'eau distillée et 1 mL de solution ABTS ont été utilisés comme témoins, tandis qu'un blanc a été préparé avec 100 μL d'eau distillée et 1 mL

d'éthanol. L'absorbance finale a été mesurée à 734 nm. Le pouvoir antioxydant a été exprimé en pourcentage d'inhibition du radical ABTS^{•+} selon la formule suivante :

$$\text{Activité inhibitrice d'ABTS (\%)} = \frac{(\text{absorbance du témoin} - \text{absorbance de l'échantillon})}{\text{absorbance du témoin}} \times 100$$

VIII.4. Test d'inhibition d'oxyde nitrique (NO)

L'évaluation de l'activité antioxydante a été réalisée selon la méthode décrite par **Lopez et al. (2012)**. Pour le test, Un volume de 450 μL de la suspension des isolats a été mélangé avec 450 μL de solution SNP (6 mg/mL) dans un tampon phosphate (KH_2PO_4) à 100 mM, pH 7), homogénéisé et incubé pendant 60 min à température ambiante sous lumière. Après l'incubation, 450 μL de la solution de Griess a été rajouté au mélange, vortexer et laisser 10 mn à l'obscurité à une température ambiante. Ensuite le mélange obtenu a été centrifugé à 14 000 rpm pendant 1 mn à température ambiante, un control (450 μL l'eau distillée +450 μL SNP +450 μL Griess), un blanc (450 μL l'eau distillée +450 μL SNP +450 μL acide phosphorique) et un blanc d'échantillon (450 μL extrait +450 μL SNP +450 μL tampon) ont été inclus, l'absorbance a été mesurée à 562 nm et le pourcentage de piégeage a été calculé selon la formule suivante :

$$\text{Activité inhibitrice (\%)} = \frac{(\text{absorbance du contrôle} - \text{absorbance de l'échantillon})}{\text{absorbance du contrôle}} \times 100$$

IX. Activité inhibitrice de l' α amylase

L'activité inhibitrice des isolats de levures vis-à-vis de l'enzyme α -amylase a été évaluée selon la méthode décrite par **Miller (1959)**, avec quelques modifications. Quatre isolats de levures ont été testés, chacun avec cinq répétitions, accompagnés de deux blancs échantillons par isolat. Un témoin négatif (sans inhibiteur) a également été inclus avec cinq répétitions et deux blancs. Un contrôle positif a été réalisé à l'aide de l'acarbose 1% (m/v), également avec cinq répétitions et deux blancs. Pour chaque test, 200 μL de l'extrait de levure ont été mélangés avec 200 μL d'une solution d'amidon à 1% (m/v) (préparée à raison de 0,25 g d'amidon dissous dans 25 mL de tampon phosphate). Le mélange a été incubé à 37 °C pendant 10 minutes. Ensuite, 200 μL d'une solution d' α -amylase (10 mg/mL dans le même tampon) ont été ajoutés à tous les tubes, à l'exception des blancs où 200 μL de tampon phosphate ont été ajoutés. Une seconde incubation de 10 minutes à 37 °C a ensuite été réalisée.

Après incubation, 400 μL de réactif DNS (3,5-dinitrosalicylique) ont été ajoutés dans chaque tube. Les tubes ont été placés dans un bain-marie à 100 °C pendant 5 minutes, puis laissés à refroidir à température ambiante. Après refroidissement, les mélanges ont été centrifugés à 14 000 rpm pendant 1 minute. Le surnageant a ensuite été dilué avec 800 μL d'eau distillée. L'absorbance a été mesurée à 540nm et les résultats ont été exprimés en pourcentage selon la formule suivante :

$$\text{Activité inhibitrice (\%)} = \frac{(\text{absorbance du contrôle} - \text{absorbance de l'échantillon})}{\text{absorbance du contrôle}} \times 100$$

Résultats

Et

Discussion

I. Isolement de levures

Après observation macroscopique et microscopique, au total ,40 isolats ont été obtenus à partir de deux échantillons, le lait maternel et legmi (vin de palm) sur la gélose Sabouraud additionnée de chloramphénicol. Parmi ces isolats, sept ont été obtenu à partir d'échantillon lait maternel (ER3) tandis que les deux autres (L2 et F1) n'ont présenté aucune croissance ni en surface ni en masse, comme illustré dans **la figure 1**, concernant le legmi 16 isolats ont été obtenus à partir d'échantillon VPA et 17 isolats à partir d'échantillon VPB, au totale 33 isolats.

Les résultats obtenus indiquent une diversité fongique plus élevée dans le légmi, probablement liée à sa nature fermentée et à sa richesse en sucres, favorisant ainsi la prolifération des levures (**Ege et al., 2023**). Par ailleurs, la présence de levures dans le lait maternel concorde avec les résultats rapportés par **Boix-Amorós et al. (2019)**, qui ont confirmé la présence de levures dans le lait maternel grâce à diverses techniques, incluant microscopie, culture, qPCR et séquençage haut débit du gène 28S de l'ARN ribosomique. En revanche, l'absence des levures dans certains échantillons de lait maternel peut s'expliquer par l'influence du stade de lactation sur la diversité et la richesse microbienne (**Wan et al., 2020**). De nombreuses espèces fongiques peuvent ne pas être détectées par les méthodes de culture standard. De plus, les levures sont présents en beaucoup plus faible quantité en comparaison aux bactéries (**Boix-Amorós et al., 2017**) et peuvent être influencées par l'environnement telles que la saison, des facteurs maternels comme l'atopie et l'exposition précoce aux antibiotiques (**Moossavi et al., 2020**). De plus, la présence de lactoferrine du lait maternel qui possède des effets antifongiques (**Zarban et al., 2009**) et cet effet inhibiteur peut être fongistatique plutôt que fongicide selon **Mete et Andiran, (2016)**.

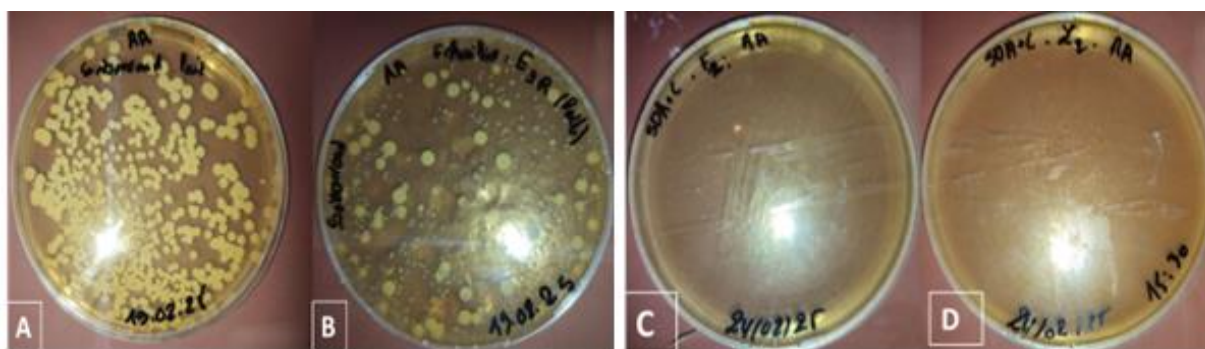


Figure 1. Aspect macroscopique des levures dans les échantillons de lait maternel. (A): échantillon ER3 en surface, (B) : échantillon ER3 en masse, (C) : échantillon F1 en masse, (D) : échantillon L2 en surface.

II. Critère d'innocuité

II.1. Test d'activité hémolytique

Pour évaluer le caractère hémolytique, les 40 isolats de levures ont été testés sur une gélose Columbia (Equiprolab, Algérie) additionnée de 5% (v/v) du sang humain (O⁺). Après incubation aucune activité hémolytique n'a été détectée. L'absence d'un halo clair et vert autour des spots indique une hémolyse de type γ , ce qu'est une condition primordiale sur la sûreté des isolats et l'absence de pathogénicité (FAO/WHO, 2002). En revanche, une zone claire autour du spot du contrôle positif *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 a été observée, indiquant une activité hémolytique de type β , cela peut s'expliquer par la capacité de *Staphylococcus aureus* à produire et à sécréter de plusieurs hémolysines (la bêta-hémolysine) qui sont particulièrement connues pour leur capacité à lyser les globules rouges, et par la production des modulateurs solubles, phénoliques (PSMs) et cytotoxiques (Ridder et al., 2021).

Par ailleurs, une observation complémentaire a révélé une différence de croissance entre les isolats issus du legmi et ceux provenant du lait maternel, seuls les isolats de levure d'origine lactée (isolats 1, 2, 3, 4, 21, 22 et 23) ont montré une croissance, tandis que les autres n'ont présenté aucune croissance comme illustré dans la **figure 2**. Cela pourrait s'expliquer par la présence naturelle des levures dans le lait maternel (Boix-Amorós et al., 2019), l'absorption des acides aminés à partir du sang artériel de la femelle allaitante constitue la source principale des protéines et des métabolites azotés bioactifs présents dans le lait. La formation de polypeptides à partir des AA est régulée non seulement par les hormones et par le débit sanguin à travers la glande mammaire en lactation, mais aussi par les concentrations en AA, lipides, glucose, vitamines et minéraux dans le plasma maternel (Rezaei et al., 2016). Ces résultats pourraient suggérer que les nutriments présents dans le lait maternel proviennent de sang maternel sont reconnus par les levures.

Des conclusions similaires ont été rapportées par Mogmenga et al. (2023) qui ont trouvé une absence d'activité hémolytique chez les levures isolées à partir d'une bière traditionnelle fermentée (Rabilé) produit en Burkina Faso, les mêmes résultats ont été rapportés par Kanak et Öztürk Yılmaz, (2025) qui ont isolé des levures probiotiques à partir des produits laitiers tels que le kéfir, yaourt et le fromage, qui ont montré l'absence de l'activité hémolytique chez les isolats. Également Bitew et al. (2024) ont montré l'absence d'activité hémolytique des levures isolées à partir d'une boisson fermentée traditionnelle éthiopienne, ce qui constitue un critère important de sécurité dans la sélection de souches à potentiel probiotique.

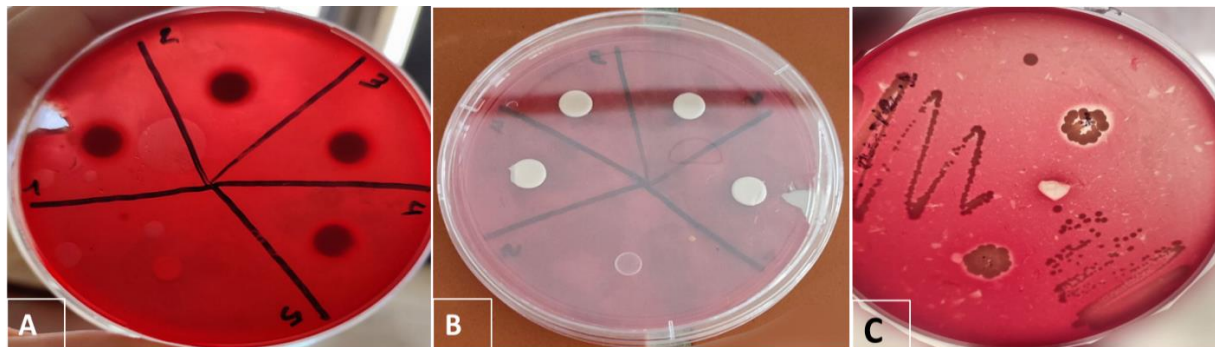


Figure 2 . Résultats du test d'hémolyse des isolats de levures ; boîte (A) : isolats n° (1, 2, 3, 4) issues de lait maternel, n°5 isolat issu de legmi, boîte (B) : boîte A inversé ; boîte (C) : contrôle positif *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

II.2. Test de filamentation

Le test de filamentation a été réalisé sur les 40 isolats de levures afin de déterminer l'appartenance à l'espèce *Candida albicans*, qui est une levure pathogène opportuniste responsable d'infections sanguines et tissulaires. En situation de stress, elle subit un processus de filamentation, passant de la forme de levure commensale à celle d'hyphes virulentes, la libération de la toxine peptidique candidalysine et la formation de biofilms adhérents contribuent à la pathogénicité de l'espèce (Tosiano et al., 2025). Ce changement morphologique est déclenché par des signaux de l'environnement humain, tels que la température à 37 °C, la présence de sérum, le CO₂, l'O₂ et un pH neutre (Sudbery, 2011).

Parmi les 40 isolats testés, seuls les isolats numérotés 5, 7 et 11, issus du legmi, ont présenté une capacité de formation de tubes germinatifs comme illustré dans la figure 3, suggérant un potentiel de pouvoir pathogène. Ces résultats sont cohérents avec ceux rapportés par Egue et al. (2018), qui ont également identifié *Candida albicans* dans des boissons fermentées traditionnelles telles que le vin de palme et le tchapalo (bière de sorgho). En revanche, l'absence de *Candida albicans* dans les échantillons de lait maternel pourrait s'expliquer par la richesse de ce dernier en facteurs antimicrobiens. En particulier, la lactoferrine qui est connue par sa capacité à inhiber la croissance de *Candida albicans* (Morrill et al., 2003).

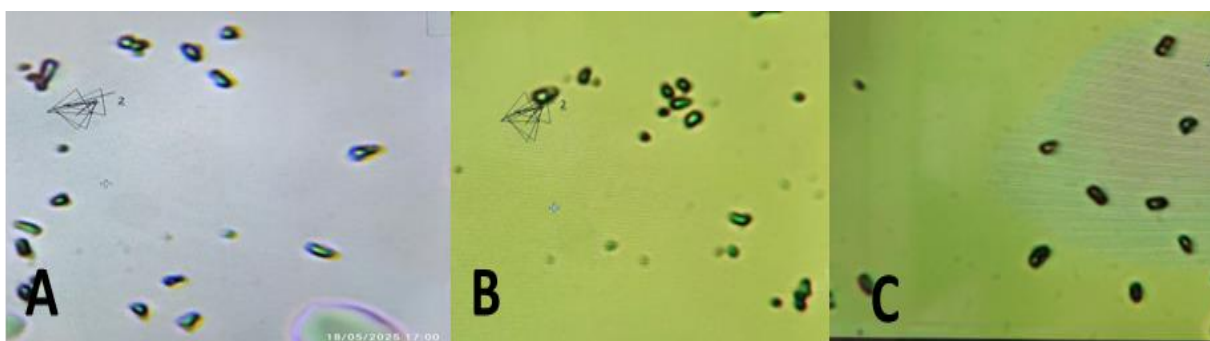


Figure 3. Image optique à grossissement $\times 40$ de l'aspect cellulaire des isolats 5 7 et 11 après incubation 3 heures dans du sérum humain. (A) : isolats 7, (B) : isolats 11 ; (C) : isolats 5

III. Critères technologiques

III.1. Test d'activité amylolytique

Les α -amylases sont des enzymes qui catalysent l'hydrolyse des liaisons α -1,4-glycosidiques internes de l'amidon, produisant des composés de faible poids moléculaire tels que le glucose, le maltose et le maltotriose (**de Souza et de Oliveira Magalhães, 2010**). Les résultats obtenus pour ce test réalisé sur une gélose nutritive additionnée de 2% d'amidon montrent une absence totale des halos de clarification autour des spots après incubation et coloration au lugol, ce qui indique l'absence de l'activité amylolytique chez les 40 isolats. Selon **Sukmawati et al., (2020)**, l'absence de zones claires est liée à la réaction de l'iode avec l'amidon non hydrolysé restant dans le milieu, traduisant l'incapacité des isolats à dégrader l'amidon. Cette absence d'activité peut s'expliquer par l'absence des gènes codant pour l'amylase ou par une inhibition génique induite par la présence de glucose dans le milieu (**Silaban et al., 2020**). Par ailleurs, ces résultats diffèrent de ceux rapportés par **Chidimma Osilo et al. (2023)**, qui ont observé une activité amylolytique significative chez certaines levures indigènes isolées du vin de palme provenant du palmier à huile.

Par ailleurs, l'absence d'activité amylolytique chez les isolats étudiés pourrait présenter un intérêt nutritionnel potentiel, notamment pour les personnes atteintes d'hyperglycémie ou à risque de diabète de type 2. En effet, selon **Knez et al. (2023)**, l'enzyme α -amylase joue un rôle clé dans la dégradation de l'amidon en sucres simples rapidement absorbables, favorisant ainsi une élévation rapide de la glycémie postprandiale.

III.2. Test d'activité protéolytique

Les 40 isolats de levures ensemencées sur milieu GNO additionnée de lait écrémé liquide n'ont montré aucune activité protéolytique, ce qui traduit par l'absence d'un halo clair autour des spots. Ces résultats sont contradictoires à ceux observés par **Moradi et al. (2018)**, qui ont mis en évidence des souches de *Sacharomyces* et *Kluveromyces* isolées à partir des fruits sucrés et produits laitiers, présentant des zones claires autour des colonies, indiquant une activité. Par contre, une autre étude menée par (**wang et al., 2024**) ont montré l'absence de l'activité protéolytique chez les 15 isolats de levures issues d'une boisson fermentée (kombucha).

L'absence de l'activité chez nos isolats est un bon signe de sécurité car elle exprime un faible potentiel de dégradation des protéines de l'hôte. Selon **Fernández-Pacheco et al. (2021)**, la production des protéases à forte concentration peut augmenter la capacité de certains microorganismes à coloniser et à pénétrer les tissus de l'hôte, entraînant ainsi des lésions tissulaires par rupture des membranes des cellules épithéliales.

IV. Propriété de surface

IV.1. Test d'autoagrégation et hydrophobicité

L'adhésion cellulaire est une caractéristique importante des probiotiques, elle est souvent évaluée en combinant l'hydrophobicité de la surface et l'autoagrégation (**Hariwal, 2024**). Trois phénotypes d'autoagrégation ont été identifiés : les souches fortement autoagrégatives Agg⁺, qui s'agrègent immédiatement en formant un précipité et laissant une solution claire ; les souches non autoagrégatives Agg⁻, qui produisent une turbidité constante ; et les souches mixtes Agg^{+/-}, qui présentent à la fois un précipité et une turbidité persistante. De manière générale, la capacité d'agrégation est corrélée aux propriétés d'adhérence cellulaire, les souches probiotiques ayant tendance à présenter des niveaux d'autoagrégation plus élevés que les souches pathogènes (**Balakrishna, 2013**). Par ailleurs, selon **Tchamani Piame et al. (2022)**, l'autoagrégation est considérée comme forte lorsque son pourcentage dépasse 80 %. Concernant l'hydrophobicité de surface, **Fernández-Pacheco, Rosa et al. (2021)** précisent que les levures hydrophobes sont capables de retenir le xylène, un composé apolaire, traduisant une faible absorbance. À l'inverse, les levures hydrophiles libèrent le xylène dans le milieu, ce qui se traduit par une absorbance élevée.

Les résultats illustrés dans **la figure 4** montrent que le pourcentage d'autoagrégation des isolats de levures issus du lait maternel varie de 8,54 % à 47,6 % après 2 heures d'incubation, puis de 37,5 % à 50,22 % après 4 heures, indiquant une augmentation de la capacité d'autoagrégation avec le temps. Par ailleurs, les isolats présentent un taux d'hydrophobicité compris entre 52,2 % et 88,64 %, indiquant une forte affinité pour les surfaces hydrophobes, ce qui peut favoriser leur adhésion aux cellules hôtes. Les isolats présentant de faibles valeurs d'hydrophobicité peuvent avoir une faible capacité d'adhésion (**Sourabh et al., 2012**). Les résultats obtenus ont montré une variation des taux d'hydrophobicité entre les souches, probablement en raison de l'âge des micro-organismes ou des protéines associées à la surface propres à chaque souche (**Wang et al., 2024**).

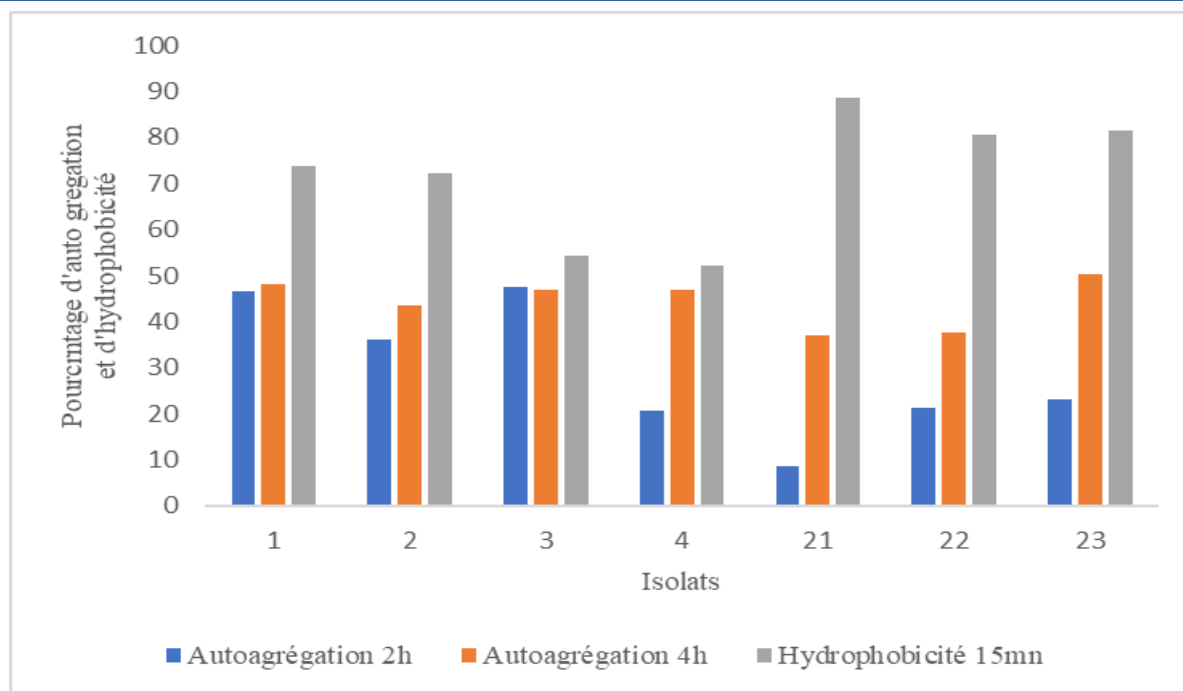


Figure 4. Pourcentage d'autoagrégation et d'hydrophobicité des 7 isolats issus de lait maternel après 2 et 4 h d'incubation.

Pour les isolats issus de legmi le pourcentage d'autoagrégation de 31 isolats de levures varie de 11,09% à 66,8% après 2 heures d'incubation, puis de 13,09% à 69,96% après 4 heures, indiquant également une amélioration du pourcentage d'autoagrégation avec la période d'incubation. Par ailleurs, les isolats présentent un taux d'hydrophobicité compris entre 13,15% et 85,56%, indiquant une forte affinité pour les surfaces hydrophobes. Des conclusions similaires ont été rapportées par **Bitew et al. (2024)**, qui ont observé des niveaux élevés d'autoagrégation (de 80,7 % à 86 %) et une hydrophobicité notable (de 61,3 % à 68,7 %) chez des isolats de levures issus de boissons fermentées traditionnelles éthiopiennes (le Tella et le Tej). Ces propriétés suggèrent un fort potentiel d'adhésion et de colonisation des muqueuses. Tandis que les deux isolats 30 et 32 ont présenté une réduction dans le pourcentage d'autoagrégation après 4h allant de 18,26% après 2h et à 13,46% après 4h et de 63,84% à 46,93% après 4h, respectivement et un taux hydrophobicité significative de 43,13% et 79,22% respectivement, comme illustré dans **les figures 5 et 6**. Ces résultats ont été confirmés par des expériences répétées. Ce phénomène peut être justifié par le fait que la floculation représente un équilibre dynamique entre cellules floculées et libres, pouvant être perturbé par l'environnement. En effet, un pH bas ou l'agitation peuvent inhiber temporairement la floculation en affaiblissant les interactions cellule-cellule comme le décrivent (**Stratford et al., 1988**).

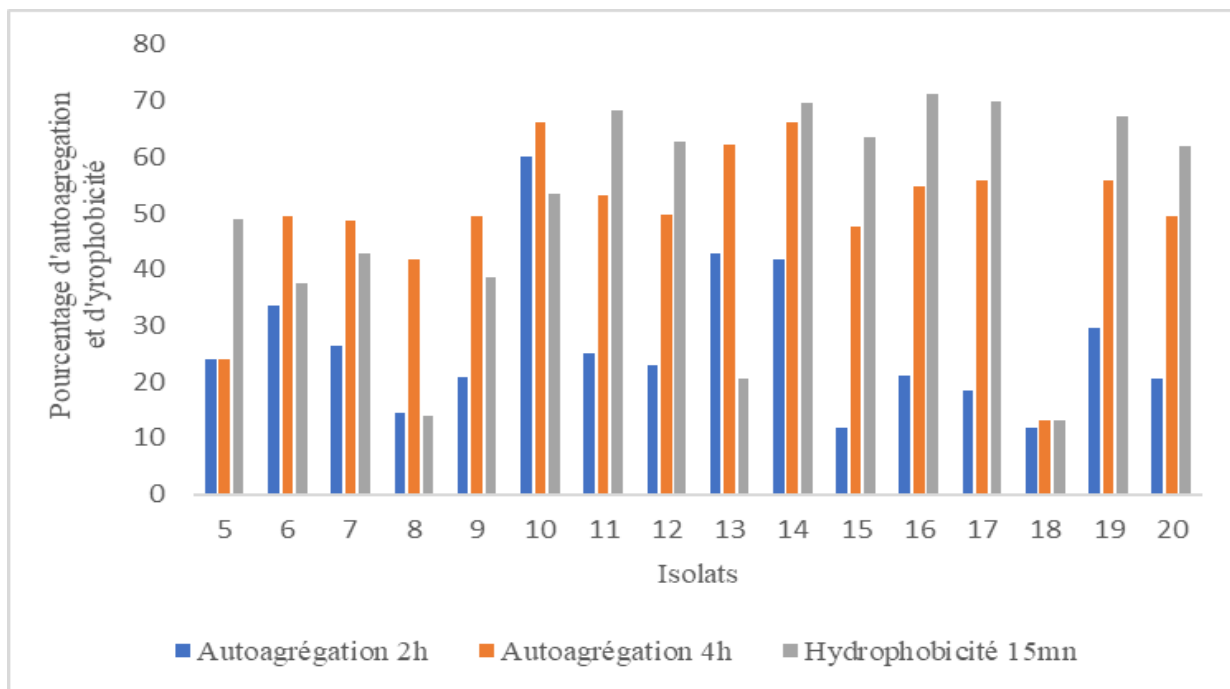


Figure 5. Pourcentage d'autoagrégation après 2 et 4 h d'incubation et d'hydrophobicité des 16 isolats issus de legmi VPA.

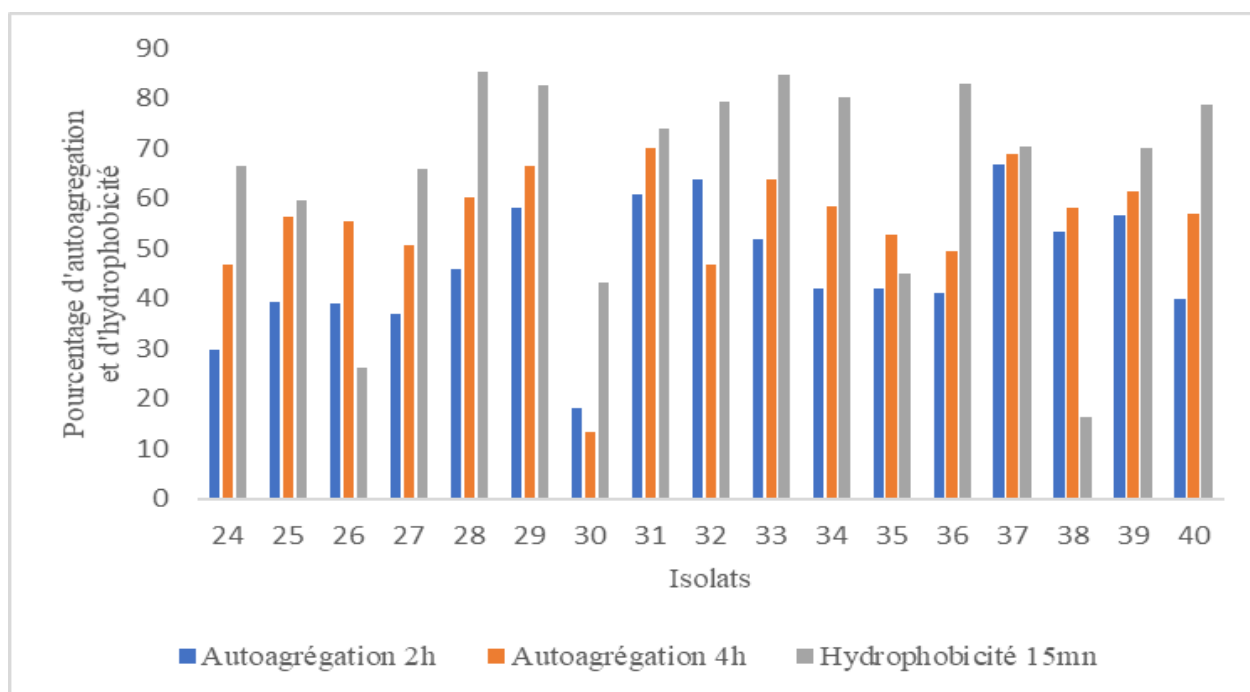


Figure 6. Pourcentage d'autoagrégation après 2 et 4 h d'incubation et d'hydrophobicité des 16 isolats issus de legmi VPB.

IV.2. Test de formation de biofilm

Une évaluation précise de l'adhésivité est un critère nécessaire pour la sélection de nouvelles souches probiotiques **Kizerwetter-Świda et Binek, (2006)**. Cette étude est basée sur la capacité des isolats de levures à adhérer et à former un biofilm. Selon la méthode de **Stepanović et al.(2000)** qui a classé les résultats obtenus en fonction de l'absorbance (A) et de l'absorbance de contrôle (AC), la

valeur de l'absorbance du témoin était de 0,08266. Les résultats obtenus montrent une forte capacité d'adhésion de 38 isolats issus du lait maternel et du Legmi. Ces derniers ont été classés comme fortement adhérents (+++), avec des absorbances supérieures à celle du témoin, cette forte adhésion peut s'expliquer par le fait que les gènes d'adhésions sont activés par divers déclencheurs environnementaux tels que le changement de pH (Verstrepen et Klis, 2006), tandis que seuls deux isolats 21 et 23 ont été classés comme modérément adhérents (++) , comme illustré dans la figure 7.

La formation de biofilm dépend de plusieurs facteurs comme la disponibilité des nutriments, les variations de pH et la température (Speranza et al., 2020), nos résultats sont contradictoires avec les observations de Kanak et Öztürk Yılmaz (2025), qui ont évalué la capacité de former un biofilm des levures isolées à partir des produits laitiers. Contrairement à nos résultats, ils ont observé qu'aucun de ces isolats n'a montré une forte adhésion au biofilm, seul 13,04% des souches présentaient une adhésion modérée.

D'autres soulignent que la capacité des microorganismes à adhérer aux cellules épithéliales et aux surfaces muqueuses est un critère fondamental de la sélection des souches probiotiques Ogunremi et al. (2015). Et la capacité limitée des levures à former des biofilms est due à leur faible capacité de produire des exopolysaccharides (EPS), qui est ce dernier joue un rôle structurel dans le développement des biofilms microbiens (Sheppard et Howell, 2016).

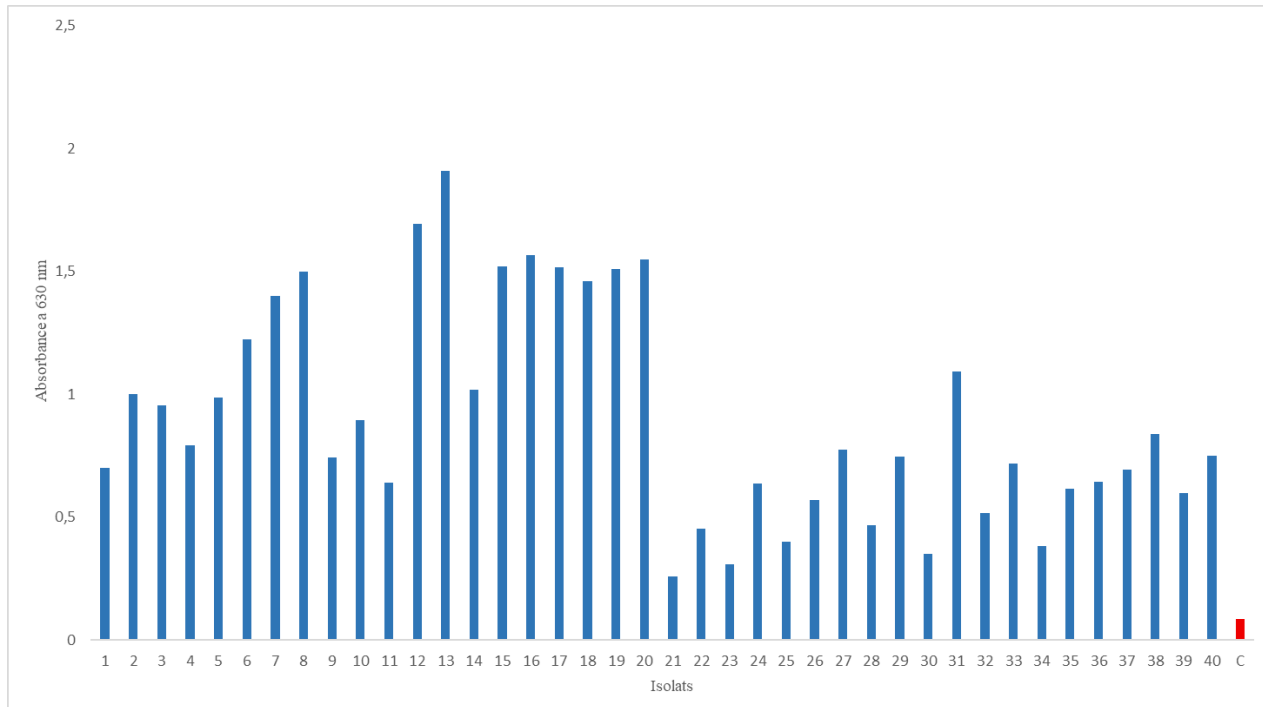


Figure 7. Adhésion des 40 isolats de levures sur microplaque à 96 puits en polystyrène mesurée à une DO de 630nm ; (C) contrôle (bouillon TSB stérile).

V. Activité antimicrobienne

V.1. Test de spots

Il existe plusieurs mécanismes par lesquels les levures peuvent agir contre les bactéries pathogènes tels que la compétition pour les nutriments et l'espace, les variations de pH de l'environnement, la production de forte concentration d'éthanol et la libération des composés bioactifs tels que les mycocines (Pais et al., 2020). L'activité antimicrobienne des 40 isolats de levures issus de lait maternel et de legmi a été testée contre trois souches pathogènes de référence : *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25933 et *Candida albicans* ATCC 10231. Après l'incubation, aucune zone d'inhibition n'a été détectée autour des spots, par contre 3 cas de croissance ont été observés à partir de ce test : Le premier cas dans lequel la levure n'a pas pu croître, le deuxième cas où la cible et la levure ont poussé, et le dernier cas où la levure a poussé mais la cible n'a pas poussé sur son spot comme illustré dans la figure 8. Cela explique une absence d'activité antimicrobienne contre ces trois cibles pathogènes. Contrairement aux résultats rapportés par Alkalbani et al. (2022) qui ont isolé des levures probiotiques à partir des produits laitiers alimentaires, présentant une forte activité antibactérienne contre les cibles pathogènes (*Escherichia coli* O157 :H7, *Staphylococcus aureus*).



Figure 8. Croissance des isolats de levures et de la souche cible sur gélose Mueller Hinton

V.2. Test des puits

Dans ce test, les 40 isolats ont été évalués pour leur activité antimicrobienne à l'égard des cibles testées précédemment. Les résultats ont révélé qu'aucun des isolats issus du lait maternel et du legmi n'a présenté d'effet antibactérien détectable, même lorsque les levures étaient inactivées (cellules mortes). Cela peut être dû à la technique utilisée, d'après Hossain, (2024), le test de diffusion sur agar peut présenter des limites dans l'évaluation de l'efficacité de certains agents

antimicrobiens, en particulier ceux qui sont volatils ou thermolabiles ou taille de la zone d'inhibition et peut être influencée par des facteurs tels que la température, l'humidité et le pH, qui affectent la vitesse de diffusion du composé testé dans la gélose. Par ailleurs, les résultats de l'absence de l'activité antagoniste des isolats issus de vin de palme sont contrastés avec les observations de l'étude menée par **Satyalakshmi et al. (2018)**, qui ont rapporté une activité antimicrobienne significative de souches de levures isolées du vin de palme, avec un diamètre de zone d'inhibition atteignant 26 mm contre *Staphylococcus aureus*.

V.3. Test d'inhibition sur microplaque 96 puits

Parmi les 40 isolats analysés, 20 isolats ont montré une capacité à inhiber la croissance de la souche cible *Candida albicans* sur microplaque, dont 4 isolats issus du lait maternel et 16 isolats provenant du vin de palme. L'isolat n°4, issu du lait maternel, a présenté l'activité inhibitrice la plus élevée contre *C. albicans*, avec un taux d'inhibition atteignant 62 %, comme illustré dans **la figure 9**. Concernant *Staphylococcus aureus*, un seul isolat, le n°26, a montré une activité antimicrobienne, avec un pourcentage d'inhibition de 56,37 %. Tandis qu'aucune activité inhibitrice n'a été observée contre *Escherichia coli* pour l'ensemble des isolats testés.

Le surnageant de culture contient les métabolites produits par les levures, qui peuvent avoir des propriétés antibactériennes (**Rodríguez Machado et al., 2024**), la présence d'effet antimicrobien contre *C.albicans* pourrait s'expliquer par la nature des composés antimicrobiens produits, notamment des protéines telles que les zymocines et les mycocines, qui sont généralement plus actives contre les levures (**Tullio, 2024**), la production des glycoprotéines ou des protéines extracellulaires capables d'inhiber les fonctions de la membrane cellulaire chez des levures pathogènes sensibles ou d'autres micro-organismes, la compétition pour les nutriments présents dans l'environnement et la production des caroténoïdes (**Georgescu et al., 2024**).

Dans notre étude, l'activité antimicrobienne n'a été détectée que par la méthode sur microplaque en milieu liquide, tandis que la technique des puits sur gélose n'a révélé aucune zone d'inhibition. Cette différence peut s'expliquer selon **Sultanbawa et al. (2009)** par la plus grande sensibilité de la méthode en milieu liquide, qui favorise une interaction optimale entre les substances testées (dans notre cas les surnageants) et les bactéries cibles contrairement à la technique des puits sur gélose où la diffusion limitée des composés peut masquer cette activité.

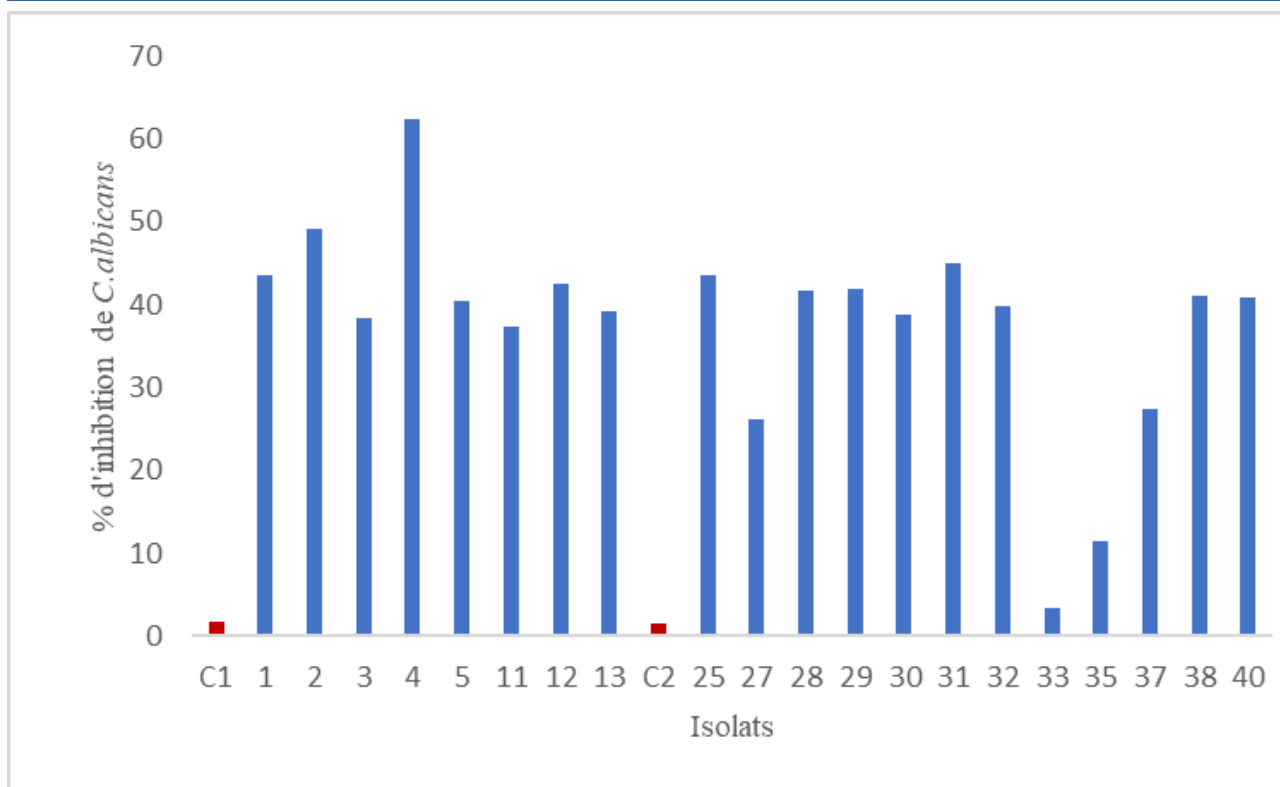


Figure 9. Pourcentage d’inhibition de *Candida albicans* ATCC 10231. (c) : Contrôle (*C.albicans*+ bouillon Sabouraud stérile)

VI. Résultats de l’analyse en composant principal (ACP) des paramètres étudiés

Les résultats de l'ACP réalisée sur les 40 isolats de levures avec 14 variables montrent que les deux dimensions les plus représentatives sont Dim 1 (27,69 %) et Dim 2 (26,43 %) dans la variance totale soit un cumul de 54,53% indiquant une bonne projection des données dans le plan factoriel. Cette ACP a été construite à partir de plusieurs variables qui ont le plus contribué à la construction et à la projection des levures sur les deux dimensions sont : autoagrégation 2h, autoagrégation 4h, adhésion biofilm, l’hydrophobicité, spot *S.aureus*, spot *C.albicans*, pourcentage d’inhibition *S aureus*, pourcentage d’inhibition *C.albicans*, comme illustré dans **le Tableau I (Annexe2)**.

La carte factorielle a mis en évidence une répartition structurée des isolats en quatre clusters. Le premier cluster est composé de 3 isolats, ce sont ceux qui ont les plus faibles scores. Le 2^{ème} cluster regroupe la majorité des isolats qui partagent des capacités et des propriétés similaires. Le 3^{ème} cluster regroupe 7 isolats et concernant le dernier cluster, contient uniquement un seul isolat, ce qui signifie que ce dernier présente une ou plusieurs propriétés uniques comme illustré dans **la figure 10**.

Le résultat de ACP a permis de sélectionner quatre isolats (4 ; 12 ; 2 et 29) représentatifs de chaque cluster selon les résultats obtenus, qui peuvent être des candidats à potentiel probiotique.

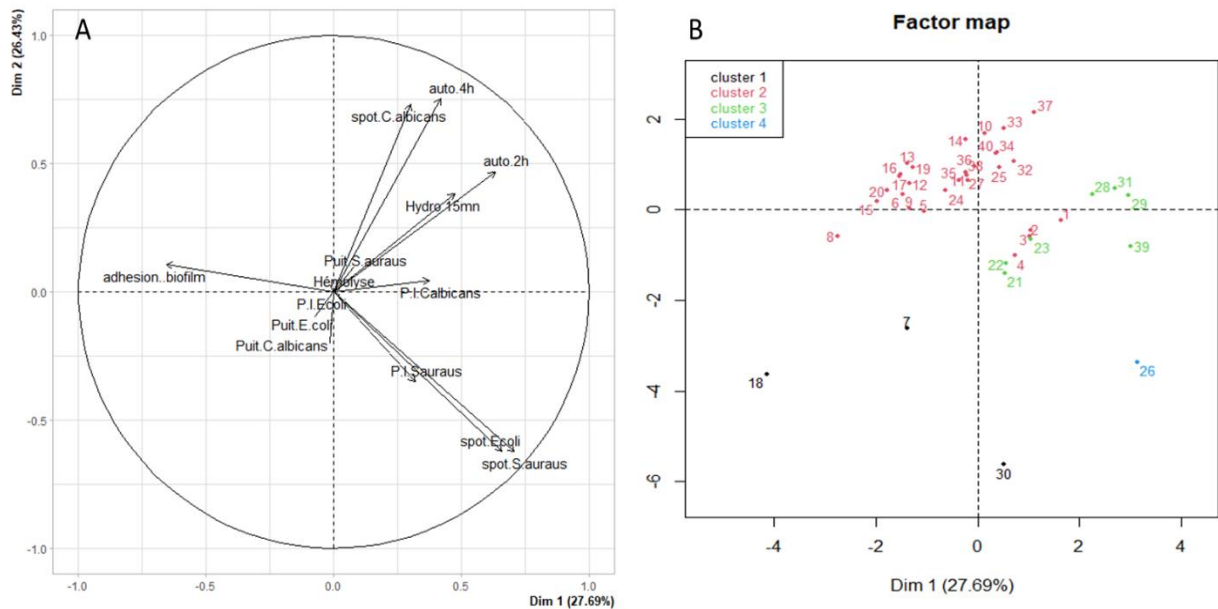


Figure 10. Analyse en composante principale (ACP) basée sur les propriétés probiotiques des 40 isolats issus de lait maternel et de legmi réalisée sur FactoMineR. (A) Projection des 14 variables dans l'espace bidimensionnel de Dim 1 et Dim 2. 1). (B) Projection des 40 isolats dans l'espace bidimensionnel de Dim 1 et Dim 2.

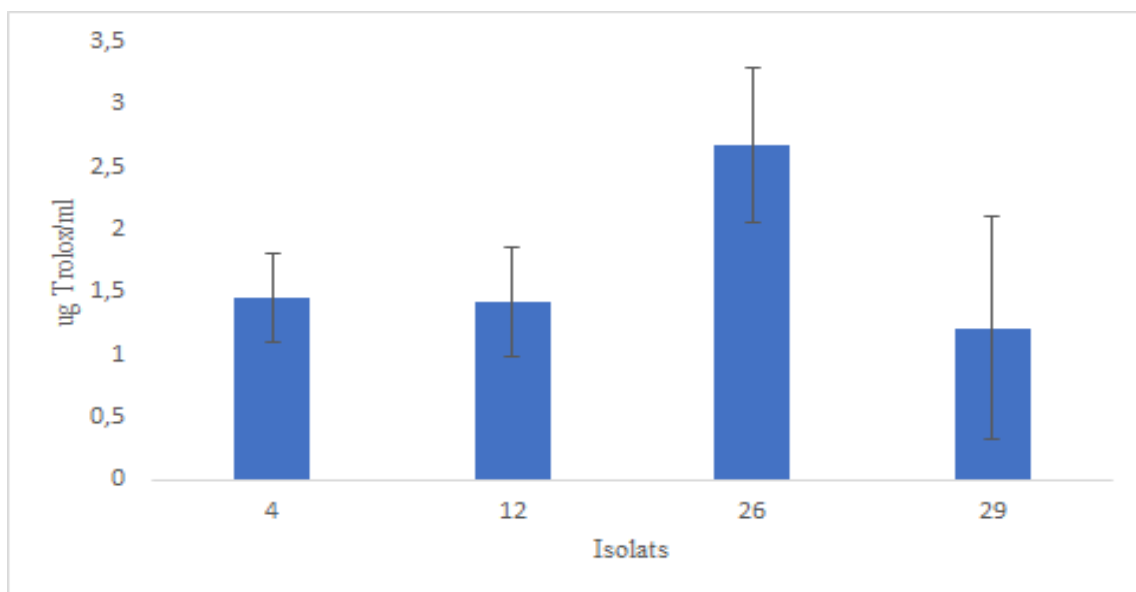
VII. Propriétés probiotiques

VII.1. Activité antioxydante

Le stress oxydatif résulte du déséquilibre entre la formation des radicaux libres et leur capacité de piégeage qui joue un rôle dans la cause plusieurs maladies comme les ulcères gastriques. Ces radicaux libres endommagent les tissus gastriques, les membranes et les macromolécules telles que les protéines, les lipides, les glucides et les acides nucléiques (**Ermis et al., 2023**). Les antioxydants sont connus pour leurs rôles de protéger la santé humaine contre les dommages causés par les radicaux libres (**Escobar-Beiza et al., 2023**). Les cellules de levure ont été rapportées dans plusieurs études grâce à leurs capacités antioxydantes naturelles ; les cellules de levure intactes présentaient une capacité antioxydante plus élevée que les extraits cellulaires. Une explication possible serait la teneur élevée en (1→3)-β-D-glucane et autres β-glucanes présents dans la paroi cellulaire des levures, ainsi que la présence d'enzymes antioxydantes telles que la catalase, la superoxyde dismutase et le glutathion peroxydase (**Mogmenga et al., 2023**). **Gil-Rodríguez et al. (2015)** ont classé les levures en cinq groupes en fonction des pourcentages d'activité antioxydante : très faible (< 20 %), faible (20–30 %), bonne (30–40 %), très bonne (40–50 %) et excellente (> 50 %).

À propos du test FRAP qui est basé sur le transfert d'électron (ET) des échantillons, l'activité antioxydante mesure la capacité des antioxydants à réduire le complexe ferrique (Fe^{3+}) -TPTZ en un complexe ferreux (Fe^{2+}) -TPTZ de couleur bleu intense. Dans un milieu acide, les résultats sont

exprimés en équivalents Fe^{2+} ou en comparaison à un antioxydant de référence, tel que le Trolox (Zhong et Shahidi, 2015). L'activité de réduction des cellules intactes des quatre isolats (n°4, 12, 26 et 29) a révélé des capacités antioxydantes variables, exprimées en équivalents Trolox ($\mu\text{g}/\text{mL}$). L'isolat n°26 a montré la plus forte activité antioxydante avec une valeur de 2,676 μg ETrolox/mL. Les isolats n°4 (1,460 μg ETrolox/mL) et n°12 (1,427 μg ETrolox/mL) présentent des niveaux d'activité modérés, tandis que l'isolat n°29 affiche la plus faible capacité réductrice, avec seulement 1,216 μg ETrolox/mL (figure 11). Ces résultats contrastent avec ceux rapportés par Barache et al. (2024) qui ont observé une faible activité antioxydante chez des levures isolées à



partir de fruits de grenades et de figes fraîches.

Figure 11. Taux de piégeage du radical libre (FRAP) par les cellules intactes de 4 isolats (4 ; 12 ; 26 ; 29).

La capacité d'inhibition de la production de NO varie selon les isolats étudiés comme c'est illustré dans la figure 12. Parmi les quatre isolats, l'isolat n°4 se distingue par une activité inhibitrice élevée, atteignant 73,39 %. En comparaison aux autres isolats, dont les valeurs sont comprises 38,46 % et 44,30 %, indiquant une activité inhibitrice modérée, mais néanmoins importante. La forte activité d'inhibition pourrait être attribuée à la présence de vitamines C et E, ainsi qu'à des enzymes telles que le superoxyde dismutase, la catalase et la glutathion peroxydase. Ces composés sont reconnus pour leur rôle dans la protection contre les effets potentiellement nocifs du stress oxydatif (Xavier et al., 2011). La production de β -carotène, de torulène, de torularhodine et d'astaxanthine par les cellules de levure a un effet sur la réduction du stress oxydatif (Georgescu et al., 2024).

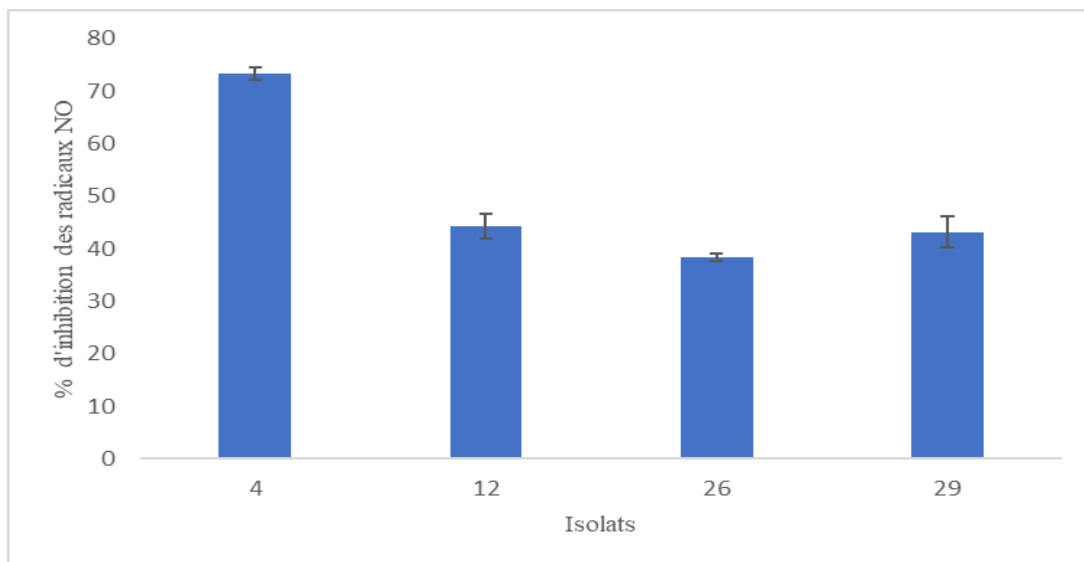


Figure 12 . Pourcentage d'inhibition de NO par les cellules intactes de 4isolats (4 ;12 ;26 ;29).

Le test de ABTS est utilisé pour évaluer le pouvoir antioxydant d'une substance *in vitro*, il réagit avec $K_2S_2O_8$ pour former $ABTS^{*+}$ qui est un radical stable avec une couleur bleu-vert (Abduxukur et al.,2023). D'après (la figure 13), le pouvoir antioxydant le plus élevé est enregistré pour l'isolat 26 issu du Legmi (42,98%) ; les 2 autres isolats 12 et 29 possèdent une activité antioxydante avec des valeurs de 31,07% et 36,12% respectivement, en comparant avec l'isolat 4 d'origine lactée qui a présenté une faible activité antioxydante (21,82%). Par ailleurs des études ont montré que les levures produisent diverses enzymes pendant la fermentation qui jouent un rôle dans l'expression d'une forte activité antioxydante (Ghosh et al., 2015). En effet des échantillons qui possèdent une activité antioxydante grâce à un piégeage des molécules réactives directement ou à la modulation de leur production, cequi présente un intérêt majeur pour améliorer la santé humain (Zeghibib et al., 2022).

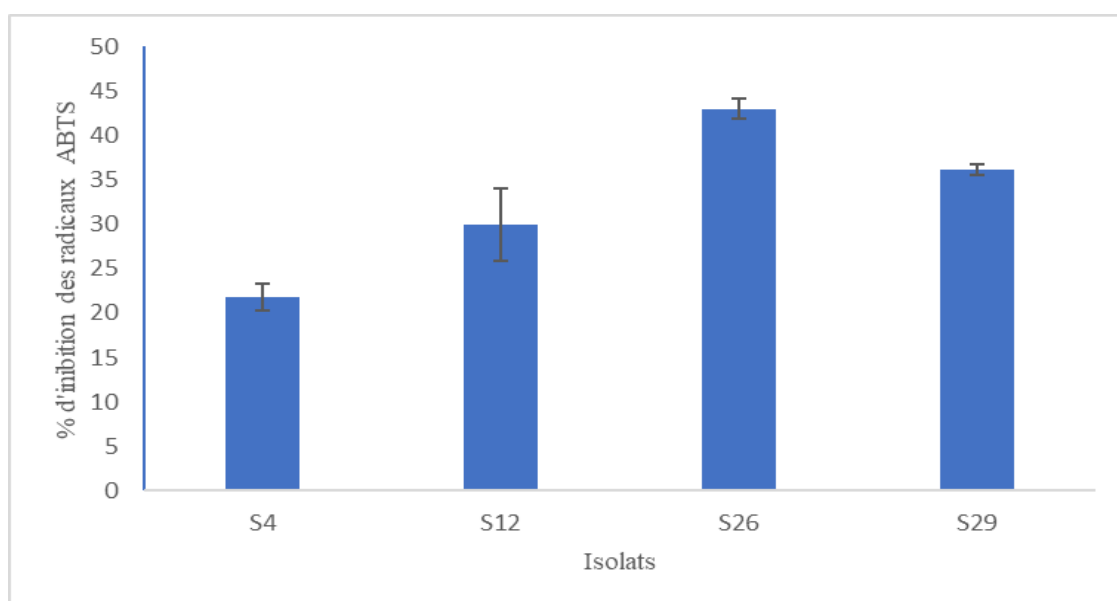


Figure 13. Pourcentage d'inhibition des radicaux libres (ABTS) par les cellules intactes de 4 isolas (4 ;12 ;26 ;29).

VII.2. Activité inhibitrice de l' α amylase

Parmi les 4 isolats de levures sélectionnés (4, 12, 26, 29) aucune n'a montré une activité inhibitrice vis-à-vis de l'enzyme α amylase, tandis que le témoin positif (l'acarbose 1 mg/ mL) a montré une inhibition de 44%. Par conséquent, les isolats ne possèdent pas la propriété de la régulation du taux de la glycémie. Contrairement aux résultats observés par **Barache et al. (2024)** dans lequel ils ont isolé des levures probiotiques à partir des fruits. *Kluveromyces marxianus* GBC2, *S cerevisiae* FBZK et *S cerevisia* FBK9 ont montré une forte inhibition de α amylase atteignant un pourcentage d'inhibition de 73%.

Conclusion

Ce travail avait comme objectif l'isolement et la caractérisation de nouvelles souches de levures à potentiel probiotique, à partir de deux sources non conventionnelles à savoir le lait maternel et le Legmi, une boisson fermentée récoltée dans la région d'Oued Souf. L'approche adoptée a consisté à une série d'étapes incluant la sélection des sources, l'isolement des levures, leur criblage et l'évaluation de leurs propriétés probiotiques.

Au total, 40 isolats de levures ont été obtenus, dont 7 à partir d'échantillons de lait maternel et 33 à partir du Legmi. Tous les isolats ont été soumis à une évaluation de leur innocuité. Aucun isolat n'a présenté d'activité hémolytique, protéolytique ou amylolytique. Toutefois, trois isolats issus du Legmi ont été présomptivement identifiés comme étant *Candida albicans* suite au test de filamentation, ce qui exclut leur usage probiotique potentiel.

Les isolats ont ensuite été évalués pour leurs propriétés d'adhésion, notamment leur capacité d'autoagrégation, leur hydrophobicité de surface et leur capacité à former un biofilm, des critères clés dans la sélection de souches à potentiel probiotique. Concernant l'activité antimicrobienne, aucun des isolats n'a démontré d'effet inhibiteur direct sur les souches de référence testées (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25933, *Candida albicans* ATCC 10231) sur gélose. Néanmoins, des activités antimicrobiennes détectables ont été observées sur microplaque en milieu liquide contre *Candida albicans* et *Staphylococcus aureus*.

Une analyse en composantes principales (ACP) a permis de sélectionner quatre isolats parmi les 40 isolats testés comme les plus prometteurs pour évaluer leurs effets bénéfiques, notamment leurs activités antioxydantes et antidiabétiques. Les quatre isolats sélectionnés ont montré une activité antioxydante importante. En particulier, l'isolat 26, issu du Legmi. Par ailleurs, un isolat issu du lait maternel a démontré une forte activité de réduction des radicaux NO. En revanche, aucun des isolats sélectionnés n'a présenté d'activité inhibitrice vis-à-vis de l'enzyme α -amylase.

Bien que cette étude ait généré une quantité significative de résultats, plusieurs points nécessitent encore un approfondissement. Il est essentiel de poursuivre les investigations afin de renforcer les connaissances actuelles, d'assurer une application concrète des isolats sélectionnés, et de mieux évaluer leur potentiel probiotique, en explorant la possibilité de :

- Élargir l'échantillonnage en augmentant le nombre d'échantillons de legmi et de lait maternel afin d'améliorer la diversité microbienne étudiée.
- Intégrer des échantillons et des prélèvements issus de différentes régions pour mieux caractériser la variabilité des souches de levures.
- L'identification moléculaire précise des souches à l'aide de techniques telles que le séquençage de l'ADNr 28S ou par spectrométrie de masse de type MALDI-TOF.

- Évaluer la tolérance des souches aux conditions gastro-intestinales simulées (acidité, sels biliaires).
- Étudier l'interaction des souches avec les cellules épithéliales intestinales afin d'évaluer leur capacité d'adhésion.
- Étudier des fonctions probiotiques complémentaires, notamment l'effet anti - hypercholestérolémies.

Références

Bibliographiques

A

- Abduxukur, D., Tursuntay, A., Zhu, X., Wang, X., & Rahman, N.** (2023). Antioxidant Capacity of Lactic Acid Bacteria and Yeasts from Xinjiang Traditional Fermented Dairy Products. *Fermentation*, 9(7), 639. <https://doi.org/10.3390/fermentation9070639>
- Ait Ouali, F., Al Kassaa, I., Cudennec, B., Abdallah, M., Bendali, F., Sadoun, D., et al.** (2014). Identification of lactobacilli with inhibitory effect on biofilm formation by pathogenic bacteria on stainless steel surfaces. *International Journal of Food Microbiology* 191, 116–124. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2014.09.011
- Alkalbani, N. S., Osaili, T. M., Al-Nabulsi, A. A., Olaimat, A. N., Liu, S.-Q., Shah, N. P., Apostolopoulos, V., & Ayyash, M. M.** (2022). Assessment of Yeasts as Potential Probiotics : A Review of Gastrointestinal Tract Conditions and Investigation Methods. *Journal of Fungi*, 8(4), 365. <https://doi.org/10.3390/jof8040365>
- Almonacid, M., & Paoletti, A.** (2010). Mechanisms controlling division-plane positioning. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 21(9), 874-880. <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2010.08.006>
- Andreas, N. J., Kampmann, B., & Mehring Le-Doare, K.** (2015). Human breast milk : A review on its composition and bioactivity. *Early Human Development*, 91(11), 629-635. <https://doi.org/10.1016/j.earlhumdev.2015.08.013>
- Ares Segura, S., Arena Ansótegui, J., & Marta Díaz-Gómez, N.** (2016). The importance of maternal nutrition during breastfeeding : Do breastfeeding mothers need nutritional supplements? *Anales de Pediatría (English Edition)*, 84(6), 347.e1-347.e7. <https://doi.org/10.1016/j.anpede.2015.07.035>
- A. Talbert, J., & D. Townsend, S.** (2025). Human milk as a complex natural product. *Natural Product Reports*, 42(2), 406-420. <https://doi.org/10.1039/D4NP00058G>
- Atputharajah, J. D., Widanapathirana, S., & Samarajewa, U.** (1986). Microbiology and biochemistry of natural fermentation of coconut palm sap. *Food Microbiology*, 3(4),273-280. [https://doi.org/10.1016/0740-0020\(86\)90009-2](https://doi.org/10.1016/0740-0020(86)90009-2)

B

- Balakrishna, A.** (2013). In vitro evaluation of adhesion and aggregation abilities of four potential probiotic strains isolated from guppy (*Poecilia reticulata*). *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 56, 793-800. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132013000500010>
- Ballard, O., & Morrow, A. L.** (2013). Human Milk Composition : Nutrients and Bioactive Factors. *Pediatric clinics of North America*, 60(1), 49-74. <https://doi.org/10.1016/j.pcl.2012.10.002>
- Barache, N., Belguesmia, Y., Zeghib, W., Ladjouzi, R., Ouarabi, L., Boudjouan, F., Zidi, G., Bendali, F., & Drider, D.** (2024). Characterization and Biological In Vitro Screening of Probiotic Yeast Strains Isolated from Algerian Fruits. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*. <https://doi.org/10.1007/s12602-024-10389-y>
- Benzie IF, Strain JJ** (1999) Dosage du pouvoir antioxydant/réducteur ferrique : mesure directe de l'activité antioxydante totale des fluides biologiques et version modifiée pour la mesure simultanée du pouvoir antioxydant total et de la concentration en acide ascorbique. *Méthodes Enzymol* 299 : 15–27. [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(99\) 99005-5](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(99) 99005-5)
- Binda, S., Hill, C., Johansen, E., Obis, D., Pot, B., Sanders, M. E., Tremblay, A., & Ouwehand, A. C.** (2020). Criteria to Qualify Microorganisms as “Probiotic” in Foods and Dietary Supplements. *Frontiers in Microbiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01662>
- Bitew, D., Damtew, B., Tesfaye, A., & Andualem, B.** (2024). Isolation of yeast from some Ethiopian traditional fermented beverages and in vitro evaluation for probiotic traits. *Heliyon*, 10(23), e40520. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e40520>
- Boix-Amorós, A., Martínez-Costa, C., Querol, A., Collado, M. C., & Mira, A.** (2017). Multiple Approaches Detect the Presence of Fungi in Human Breastmilk Samples from Healthy Mothers. *Scientific Reports*, 7, 13016. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-13270->
- Boix-Amorós, A., Puente-Sánchez, F., Toit, E. du, Linderborg, K. M., Zhang, Y., Yang, B., Salminen, S., Isolauri, E., Tamames, J., Mira, A., & Collado, M. C.** (2019). Mycobiome Profiles in Breast Milk from Healthy Women Depend on Mode of Delivery, Geographic Location, and Interaction with Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. <https://doi.org/10.1128/AEM.02994-18>
- Broach, J. R.** (2012). Nutritional Control of Growth and Development in Yeast. *Genetics*, 192(1), 73-105. <https://doi.org/10.1534/genetics.111.135731>

Butt, U. D., Lin, N., Akhter, N., Siddiqui, T., Li, S., & Wu, B. (2021). Overview of the latest developments in the role of probiotics, prebiotics and synbiotics in shrimp aquaculture. *Fish & Shellfish Immunology*, *114*, 263-281. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2021.05.003>

C

Ceugniz A, Coucheney F, Jacques P et al (2017) Activité anti- Salmonella et tendances probiotiques de *Kluyveromyces marxianus* S-2-05 et *Kluyveromyces lactis* S-3-05 isolés d'un fromage français, Tomme d'Orchies. *Res Microbiol* 168:575–582.<https://doi.org/10.1016/j.resmic.2017.03.004>

Chavez, C. M., Groenewald, M., Hulfachor, A. B., Kpurubu, G., Huerta, R., Hittinger, C. T., & Rokas, A. (2024). The cell morphological diversity of *Saccharomycotina* yeasts. *FEMS Yeast Research*, *24*, foad055. <https://doi.org/10.1093/femsyr/foad055>

Chandrasekhar, K., Sreevani, S., Seshapani, P., & Pramodhakumari, J. (2012). Dept.of Microbiology, S.V.University, Tirupati, A.P, INDIA Email : Pramodakumari@gmail.com

Chidimma Osilo, Chinaza Vivian Okeke, Chioma Peace Onyebuchi, & Nwanneka Nwozor. (2023). Physiochemical properties and Enzymatic profile of indigenous yeast isolated from palm wine in Nigeria. *GSC Biological and Pharmaceutical Sciences*, *24*(1), 055-061. <https://doi.org/10.30574/gscbps.2023.24.1.0267>

Christian, P., Smith, E. R., Lee, S. E., Vargas, A. J., Bremer, A. A., & Raiten, D. J. (2021). The need to study human milk as a biological system. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *113*(5), 1063-1072. <https://doi.org/10.1093/ajcn/nqab075>

Colman-Lerner, A., Chin, T. E., & Brent, R. (2001). Yeast Cbk1 and Mob2 Activate Daughter-Specific Genetic Programs to Induce Asymmetric Cell Fates. *Cell*, *107*(6), 739-750. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00596-7](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00596-7)

D

de Macêdo, L. S., de Pinho, S. S., Silva, A. J. D., de Moura, I. A., Espinoza, B. C. F., da Conceição Viana Invenção, M., Novis, P. V. S., da Gama, M. A. T. M., do Nascimento Carvalho, M., Leal, L. R. S., Cruz, B. I. S., Bandeira, B. M. A., Santos, V. E. P., & de Freitas, A. C. (2024). Understanding yeast shells: Structure, properties and applications. *ADMET and DMPK*, *12*(2), 299-317. <https://doi.org/10.5599/admet.2118>

de Melo Pereira, G. V., de Oliveira Coelho, B., Magalhães Júnior, A. I., Thomaz-Soccol, V., & Soccol, C. R. (2018). How to select a probiotic? A review and update of methods and criteria. *Biotechnology Advances*, 36(8), 2060-2076. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.09.003>

de Souza, P. M., & de Oliveira Magalhães, P. (2010). Application of microbial α -amylase in industry – A review. *Brazilian Journal of Microbiology*, 41(4), 850-861. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822010000400004>

Devecioglu, D., Kuscu, A., & Karbancioglu-Guler, F. (2025). Isolation and Functional Characterization of Yeasts from Fermented Plant Based Products. *Fermentation*, 11(6), Article 6. <https://doi.org/10.3390/fermentation11060305>

Djeni, T. N., Kouame, K. H., Ake, F. D. M., Amoikon, L. S. T., Dje, M. K., & Jeyaram, K.(2020). Microbial Diversity and Metabolite Profiles of Palm Wine Produced From Three Different Palm Tree Species in Côte d'Ivoire. *Scientific Reports*, 10(1), 1715. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-58587-2>

Duina, A. A., Miller, M. E., & Keeney, J. B. (2014). Budding Yeast for Budding Geneticists : A Primer on the *Saccharomyces cerevisiae* Model System. *Genetics*, 197(1), 33-48. <https://doi.org/10.1534/genetics.114.163188>

E

Ege, M. V., Ogu, E. O., & Aniaku, V. O. (2023). FERMENTATION PATTERNS OF PALM WINE YEAST ISOLATE AND INDUSTRIAL YEAST. *Irish International Journal of Engineering and Scientific Studies*, 6(5), Article 5.

Egue, L. A. N., Bouatenin, J.-P. K. M., N'guessan, F. K., & Koussemon-Camara, M. (2018). Virulence factors and determination of antifungal susceptibilities of *Candida* species isolated from palm wine and sorghum beer. *Microbial Pathogenesis*, 124, 5-10. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.08.007>

Ermis, A., Arıtcı Colak, G., Acikel-Elmas, M., Arbak, S., & Kolgazi, M. (2023). Ferulic Acid Treats Gastric Ulcer via Suppressing Oxidative Stress and Inflammation. *Life*, 13(2), 388. <https://doi.org/10.3390/life13020388>

Escobar-Beiza, N., Pérez-Correa, J. R., & Franco, W. (2023). Fermentation of Murta (*Ugni molinae*) Juice : Effect on Antioxidant Activity and Control of Enzymes Associated with

Glucose Assimilation. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(20), 15197. <https://doi.org/10.3390/ijms242015197>

Ezeagu, I. E., Fafunso, M. A., & Ejezie, F. E. (2003). Biochemical constituents of palmwine. *Ecology of Food and Nutrition*, 42(3), 213-222. <https://doi.org/10.1080/03670240390226222>

F

Featherstone, S. (2015). 1—Microbiology of canned foods. In S. Featherstone (Éd.), *A Complete Course in Canning and Related Processes (Fourteenth Edition)* (p. 3-25). Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1016/B978-0-85709-678-4.00001-4>

Fernández, L., Pannaraj, P. S., Rautava, S., & Rodríguez, J. M. (2020). The Microbiota of the Human Mammary Ecosystem. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.586667>

Fernández-Pacheco, P., Rosa, I. Z., Arévalo-Villena, M., Gomes, E., & Pérez, A. B. (2021). Study of potential probiotic and biotechnological properties of non-Saccharomyces yeasts from fruit Brazilian ecosystems. *Brazilian Journal of Microbiology*, 52(4), 2129-2144. <https://doi.org/10.1007/s42770-021-00541-z>

G

García, M., Esteve-Zarzoso, B., Arroyo, T., García, M., Esteve-Zarzoso, B., & Arroyo, T. (2016). Non-Saccharomyces Yeasts : Biotechnological Role for Wine Production. In *Grape and Wine Biotechnology*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/64957>

Ge, H., Zhu, W., Zhang, J., Wang, Z., Shi, H., Sun, J., & Shi, M. (2024). Human milk microbiota and oligosaccharides in colostrum and mature milk : Comparison and correlation. *Frontiers in Nutrition*, 11. <https://doi.org/10.3389/fnut.2024.1512700>

Georgescu, A.-M., Corbu, V. M., & Csutak, O. (2024). Molecular Basis of Yeasts Antimicrobial Activity—Developing Innovative Strategies for Biomedicine and Biocontrol. *Current Issues in Molecular Biology*, 46(5), 4721-4750. <https://doi.org/10.3390/cimb46050285>

Ghosh, S., Chakraborty, R., & Raychaudhuri, U. (2015). Determination of pH-dependent antioxidant activity of palm (*Borassus flabellifer*) polyphenol compounds by photoluminol and DPPH methods : A comparison of redox reaction sensitivity. *3 Biotech*, 5(5), 633-640. <https://doi.org/10.1007/s13205-014-0260-7>

Gil-Rodríguez, A. M., Carrascosa, A. V., & Requena, T. (2015). Yeasts in foods and beverages : In vitro characterisation of probiotic traits. *LWT - Food Science and Technology*, 64(2), 1156-1162. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.07.042>

Gul, S., & Durante-Mangoni, E. (2024). Unraveling the Puzzle : Health Benefits of Probiotics—A Comprehensive Review. *Journal of Clinical Medicine*, 13(5), Article 5. <https://doi.org/10.3390/jcm13051436>

Guo, M. (2014). 2—Chemical composition of human milk. In M. Guo (Éd.), *Human Milk Biochemistry and Infant Formula Manufacturing Technology* (p. 19-32). Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1533/9780857099150.1.19>

H

Harari, Y., Ram, Y., Rappoport, N., Hadany, L., & Kupiec, M. (2018). Spontaneous Changes in Ploidy Are Common in Yeast. *Current Biology*, 28(6), 825-835.e4. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.01.062>

Hariwal, A. (2024). *Autoaggregation, Coaggregation and Hydrophobicity -A Mechanism to Explain Oral Probiotic Function by Isolates from Dairy Source.*

Hatoum, R., Labrie, S., & Fliss, I. (2012). Antimicrobial and probiotic properties of yeasts : From fundamental to novel applications. *Frontiers in Microbiology*, 3, 421. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00421>

Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G. R., Merenstein, D. J., Pot, B., Morelli, L., Canani, R. B., Flint, H. J., Salminen, S., Calder, P. C., & Sanders, M. E. (2014). The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 11(8), 506-514. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2014.66>

Hossain, T. J. (2024). Methods for screening and evaluation of antimicrobial activity : A review of protocols, advantages, and limitations. *European Journal of Microbiology & Immunology*, 14(2), 97. <https://doi.org/10.1556/1886.2024.00035>

Huang, W.-C., & Tang, I.-C. (2007). Bacterial and Yeast Cultures – Process Characteristics, Products, and Applications. In *Bioprocessing for Value-Added Products from Renewable Resources* (p. 185-223). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-044452114-9/50009-8>

Hunt, K. M., Foster, J. A., Forney, L. J., Schütte, U. M. E., Beck, D. L., Abdo, Z., Fox, L. K., Williams, J. E., McGuire, M. K., & McGuire, M. A. (2011). Characterization of the Diversity and Temporal Stability of Bacterial Communities in Human Milk. *PLOS ONE*, 6(6), e21313. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0021313>

J

Jiménez, E., de Andrés, J., Manrique, M., Pareja-Tobes, P., Tobes, R., Martínez-Blanch, J. F., Codoñer, F. M., Ramón, D., Fernández, L., & Rodríguez, J. M. (2015). Metagenomic Analysis of Milk of Healthy and Mastitis-Suffering Women. *Journal of Human Lactation: Official Journal of International Lactation Consultant Association*, 31(3), 406-415. <https://doi.org/10.1177/0890334415585078>

K

Kanak, E. K., & Öztürk Yılmaz, S. (2025). Determination of the Probiotic and Functional Properties of Yeasts Isolated from Different Dairy Products. *Fermentation*, 11(2), 104. <https://doi.org/10.3390/fermentation11020104>

Knez, E., Kadac-Czapska, K., & Grembecka, M. (2023). Effect of Fermentation on the Nutritional Quality of the Selected Vegetables and Legumes and Their Health Effects. *Life*, 13(3), 655. <https://doi.org/10.3390/life13030655>

Knop, M. (2011). Yeast cell morphology and sexual reproduction – A short overview and some considerations. *Comptes Rendus Biologies*, 334(8), 599-606. <https://doi.org/10.1016/j.crv.2011.05.007>

Koneman, E.W., Allen, S.D., Janda, W.M., Schreckenberger, P.C., & Winn, W.C. (2006). *Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology* (6th ed.). Lippincott Williams & Wilkins.

Kopecká, J., Matoulková, D., & Němec, M. (2012). Yeast and its uses. *Kvasny Prumysl*, 58(11-12), 326-335. <https://doi.org/10.18832/kp2012029>

Kos B, Susković J, Vuković S et al (2003) Adhésion et capacité d'agrégation de la souche probiotique *Lactobacillus acidophilus* M92. *J Appl Microbiol* 94 : 981–987. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.01915.x>

L

Larone, D.H. (2011). *Medically Important Fungi: A Guide to Identification* (5th ed.). Washington, DC: ASM Press.

Latif, A., Shehzad, A., Niazi, S., Zahid, A., Ashraf, W., Iqbal, M. W., Rehman, A., Riaz, T., Aadil, R. M., Khan, I. M., Özogul, F., Rocha, J. M., Esatbeyoglu, T., & Korma, S. A. (2023). Probiotics: Mechanism of action, health benefits and their application in food industries. *Frontiers in Microbiology*, *14*, 1216674. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1216674>

Lin, A., Ma, C. J., Remandaban, E. R., Romeyn, J. R., & Wu, V. (2012). The effect of temperature on respiration rate in *Saccharomyces cerevisiae*. Alice Lin, Curtis J. Ma, Earvin R. Remandaban, Jacqueline R. Romeyn, and Vivian Wu. *The Expedition*, *2*. <https://ojs.library.ubc.ca/index.php/expedition/article/view/184155>

Liu, S., Lou, Y., Li, Y., Zhao, Y., Laaksonen, O., Li, P., Zhang, J., Battino, M., Yang, B., & Gu, Q. (2023). Aroma characteristics of volatile compounds brought by variations in microbes in winemaking. *Food Chemistry*, *420*, 136075. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.136075>

Lopes, G., Sousa, C., Silva, L. R., Pinto, E., Andrade, P. B., Bernardo, J., T., Mouga & Valentão, P. (2012). Can phlorotannins purified extracts constitute a novel pharmacological alternative for microbial infections with associated inflammatory conditions?. *PloS one*, *7*(2), e31145.

M

Maicas, S. (2020). The Role of Yeasts in Fermentation Processes. *Microorganisms*, *8*(8), Article 8. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8081142>

Martín, R., Langa, S., Reviriego, C., Jiménez, E., Marín, M. L., Xaus, J., Fernández, L., & Rodríguez, J. M. (2003). Human milk is a source of lactic acid bacteria for the infant gut. *The Journal of Pediatrics*, *143*(6), 754-758. <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2003.09.028>

Meng, F., Uniacke-Lowe, T., Ryan, A. C., & Kelly, A. L. (2021). The composition and physico-chemical properties of human milk: A review. *Trends in Food Science & Technology*, *112*, 608-621. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.03.040>

Mete, E., & Andıran, F. (2016). *In vitro antifungal effect of human milk*.

Mogmenga, I., Somda, M. K., Ouattara, C. A. T., Keita, I., Dabiré, Y., Diguță, C. F., Toma, R. C., Ezeogu, L. I., Ugwuanyi, J. O., Ouattara, A. S., & Matei, F. (2023). Promising Probiotic

Properties of the Yeasts Isolated from Rabilé, a Traditionally Fermented Beer Produced in Burkina Faso. *Microorganisms*, 11(3), 802. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11030802>

Mohd Azhar, S. H., Abdulla, R., Jambo, S. A., Marbawi, H., Gansau, J. A., Mohd Faik, A. A., & Rodrigues, K. F. (2017). Yeasts in sustainable bioethanol production: A review. *Biochemistry and Biophysics Reports*, 10, 52-61. <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2017.03.003>

Moonsamy, G., Roets-Dlamini, Y., Langa, C. N., & Ramchuran, S. O. (2024). Advances in Yeast Probiotic Production and Formulation for Preventative Health. *Microorganisms*, 12(11), 2233. <https://doi.org/10.3390/microorganisms12112233>

Moossavi, S., Fehr, K., Derakhshani, H., Sbihi, H., Robertson, B., Bode, L., Brook, J., Turvey, S. E., Moraes, T. J., Becker, A. B., Mandhane, P. J., Sears, M. R., Khafipour, E., Subbarao, P., & Azad, M. B. (2020). Human milk fungi: Environmental determinants and inter-kingdom associations with milk bacteria in the CHILD Cohort Study. *BMC Microbiology*, 20(1), Article 1. <https://doi.org/10.1186/s12866-020-01829-0>

Morrill, J. F., Pappagianis, D., Heinig, M. J., Lønnerdal, B., & Dewey, K. G. (2003). Detecting *Candida albicans* in Human Milk. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(1), 475-478. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.1.475-478.2003>

Moradi, R., Nosrati, R., Zare, H., Tahmasebi, T., Saderi, H., & Owlia, P. (2018). Screening and characterization of in-vitro probiotic criteria of *Saccharomyces* and *Kluyveromyces* strains.

N

Notarbartolo, V., Giuffrè, M., Montante, C., Corsello, G., & Carta, M. (2022). Composition of Human Breast Milk Microbiota and Its Role in Children's Health. *Pediatric Gastroenterology, Hepatology & Nutrition*, 25(3), 194-210. <https://doi.org/10.5223/pghn.2022.25.3.194>

Nwaiwu, O., Ibekwe, V. I., Amadi, E. S., Udebuani, A. C., Nwanebu, F. C., Oguoma, O. I., & Nnokwe, J. C. (2016). Evaluation of Fermentation Products of Palm Wine Yeasts and Role of *Sacoglottis gabonensis* Supplement on Products Abundance. *Beverages*, 2(2), Article 2. <https://doi.org/10.3390/beverages2020009>

O

Ogunremi, O. R., Sanni, A. I., & Agrawal, R. (2015). Probiotic potentials of yeasts isolated from some cereal-based Nigerian traditional fermented food products. *Journal of Applied Microbiology*, 119(3), 797-808. <https://doi.org/10.1111/jam.12875>

Ojo-Okunola, A., Nicol, M., & du Toit, E. (2018). Human Breast Milk Bacteriome in Health and Disease. *Nutrients*, 10(11), 1643. <https://doi.org/10.3390/nu10111643>

Okafor, N. (1978). Microbiology and Biochemistry of Oil-Palm Wine. In *Advances in Applied Microbiology* (Vol. 24, p. 237-256). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0065-2164\(08\)70642-7](https://doi.org/10.1016/S0065-2164(08)70642-7)

Oluwole, O., Kosoko, S., Familola, O., Ibronke, O., Cheikyoussef, A., Raheem, D., Saraiva, A., & Raposo, A. (2023). Fermented traditional wine from palm trees: Microbial, nutritional attributes and health impacts. *Frontiers in Food Science and Technology*, 3, 1225762. <https://doi.org/10.3389/frfst.2023.1225762>

Osiewacz, H. D. (2002). Genes, mitochondria and aging in filamentous fungi. *Ageing Research Reviews*, 1(3), 425-442. [https://doi.org/10.1016/S1568-1637\(02\)00010-7](https://doi.org/10.1016/S1568-1637(02)00010-7)

Overall, G. B., Teusink, B., Bruggeman, F. J., Hulshof, J., & Planqué, R. (2018). Understanding start-up problems in yeast glycolysis. *Mathematical Biosciences*, 299, 117-126. <https://doi.org/10.1016/j.mbs.2018.03.007>

P

Pais, P., Almeida, V., Yilmaz, M., & Teixeira, M. C. (2020). *Saccharomyces boulardii*: What Makes It Tick as Successful Probiotic? *Journal of Fungi*, 6(2), 78. <https://doi.org/10.3390/jof6020078>

Pfeiffer, T., & Morley, A. (2014). An evolutionary perspective on the Crabtree effect. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 1. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2014.00017>

Plaza-Diaz, J., Ruiz-Ojeda, F. J., Gil-Campos, M., & Gil, A. (2019). Mechanisms of Action of Probiotics. *Advances in Nutrition*, 10, S49-S66. <https://doi.org/10.1093/advances/nmy063>

R

Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9-10), 1231-1237. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3)

Ridder, M. J., Daly, S. M., Hall, P. R., & Bose, J. L. (2021). Quantitative Hemolysis Assays. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 2341, 25-30. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1550-8_4

Rima, H., Steve, L., & Ismail, F. (2012). Antimicrobial and Probiotic Properties of Yeasts : From Fundamental to Novel Applications. *Frontiers in Microbiology*, 3. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00421>

Rintala, E., Jouhten, P., Toivari, M., Wiebe, M. G., Maaheimo, H., Penttilä, M., & Ruohonen, L. (2011). Transcriptional Responses of *Saccharomyces cerevisiae* to Shift from Respiratory and Respirofermentative to Fully Fermentative Metabolism. *OMICS: a Journal of Integrative Biology*, 15(7-8), 461-476. <https://doi.org/10.1089/omi.2010.0082>

Rodríguez Machado, A., Caro, C. M., Hurtado-Murillo, J. J., Gomes Lobo, C. J., Zúñiga, R. N., & Franco, W. (2024). Unconventional Yeasts Isolated from Chilean Honey : A Probiotic and Phenotypic Characterization. *Foods*, 13(10), Article 10. <https://doi.org/10.3390/foods13101582>

Rosenberg, M., Gutnick, D., & Rosenberg, E. (1980). Adherence of bacteria to hydrocarbons : A simple method for measuring cell-surface hydrophobicity. *FEMS Microbiology Letters*, 9(1), 29-33. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1980.tb05599.x>

S

Satyalakshmi, S., Sindhu, B. K., Rani, U. G., Bindu, H. M., & Trishali, K. (2018). Study of microbial and anti-microbial properties of palm wine. *Der Pharmacia Lettre*, 10(10), 1–9. Retrieved from <http://scholarsresearchlibrary.com/archive.html>

Sheppard, D. C., & Howell, P. L. (2016). Biofilm Exopolysaccharides of Pathogenic Fungi : Lessons from Bacteria.

Shurson, G. C. (2018). Yeast and yeast derivatives in feed additives and ingredients : Sources, characteristics, animal responses, and quantification methods. *Animal Feed Science and Technology*, 235, 60-76. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2017.11.010>

Speranza, B., Corbo, M. R., Campaniello, D., Altieri, C., Sinigaglia, M., & Bevilacqua, A. (2020). Biofilm formation by potentially probiotic *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Food Microbiology*, 87, 103393. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.103393>

- Silaban, S., Marika, D. B., & Simorangkir, M.** (2020). Isolation and Characterization of Amylase-Producing Amyolytic Bacteria from Rice Soil Samples. *Journal of Physics: Conference Series*, *1485*(1), 012006. <https://doi.org/10.1088/1742-6596/1485/1/012006>
- Sourabh, A., Kanwar, S. S., & Sharma, O. P.** (2012). *Screening of indigenous yeast isolates obtained from traditional fermented foods of Western Himalayas for probiotic attributes.*
- Staniszewski, A., & Kordowska-Wiater, M.** (2021). Probiotic and Potentially Probiotic Yeasts—Characteristics and Food Application. *Foods*, *10*(6), 1306. <https://doi.org/10.3390/foods10061306>
- Staniszewski, A., Staniszewska, P., & Kordowska-Wiater, M.** (2024). Probiotic Yeasts and How to Find Them—From Spoilage to Probiotic. *Applied Sciences*, *14*(24), Article 24. <https://doi.org/10.3390/app142411698>
- Stratford, M., Coleman, H. P., & Keenan, M. H. J.** (1988). Yeast flocculation: A dynamic equilibrium. *Yeast*, *4*(3), 199-208. <https://doi.org/10.1002/yea.320040305>
- Starmer, W. T., & Lachance, M.-A.** (2011). Chapter 6—Yeast Ecology. In C. P. Kurtzman, J. W. Fell, & T. Boekhout (Éds.), *The Yeasts (Fifth Edition)* (p. 65-83). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-52149-1.00006-9>
- Stepanović, S., Vuković, D., Dakić, I., Savić, B., & Švabić-Vlahović, M.** (2000). A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *Journal of Microbiological Methods*, *40*(2), 175-179. [https://doi.org/10.1016/s0167-7012\(00\)00122-6](https://doi.org/10.1016/s0167-7012(00)00122-6)
- Stringini, M., Comitini, F., Taccari, M., & Ciani, M.** (2009). Yeast diversity during tapping and fermentation of palm wine from Cameroon. *Food Microbiology*, *26*(4), 415-420. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2009.02.006>
- Sukmawati, D., Arman, Z., Sondana, G. A., Fikriyah, N. N., Hasanah, R., Afifah, Z. N., Balqis, M., Enshasy, H. E., Husna, S. N. A., Rahayu, S., Kurniati, T. H., & Puspitaningrum, R.** (2019). Potential amylase-producing yeast isolated from indigenous fermented beverages originating from Bali, Indonesia. *Journal of Physics: Conference Series*, *1402*(5), 055021. <https://doi.org/10.1088/1742-6596/1402/5/055021>
- Sultanbawa, Y., Cusack, A., Currie, M., & Davis, C.** (2009). An Innovative Microplate Assay to Facilitate the Detection of Antimicrobial Activity in Plant Extracts. *Journal of Rapid Methods & Automation in Microbiology*, *17*(4), 519-534. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4581.2009.00187.x>

Sumerta, I. N., Ruan, X., & Howell, K. (2025). The forgotten wine : Understanding palm wine fermentation and composition. *International Journal of Food Microbiology*, 429, 111022. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2024.111022>

Suvarna, S., Dsouza, J., Ragavan, M. L., & Das, N. (2018). Potential probiotic characterization and effect of encapsulation of probiotic yeast strains on survival in simulated gastrointestinal tract condition. *Food Science and Biotechnology*, 27(3), 745-753. <https://doi.org/10.1007/s10068-018-0310-8>

T

Tamang, J. P., & Lama, S. (2022). Probiotic properties of yeasts in traditional fermented foods and beverages. *Journal of Applied Microbiology*, 132(5), 3533-3542. <https://doi.org/10.1111/jam.15467>

Tchamani Piame, L., Kaktcham, P. M., Foko Kouam, E. M., Fotso Techeu, U. D., Ngouénam, R. J., & Zambou Ngoufack, F. (2022). Technological characterisation and probiotic traits of yeasts isolated from Sha'a, a Cameroonian maize-based traditional fermented beverage. *Heliyon*, 8(10), e10850. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e10850>

Tofalo, R., & Suzzi, G. (2016). Yeasts. In *Encyclopedia of Food and Health* (p. 593-599). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00762-5>

Tosiano, M. A., Lanni, F., Mitchell, A. P., & McManus, C. J. (2025). Roles of P-body factors in *Candida albicans* filamentation and stress response. *PLoS Genetics*, 21(3), e1011632. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1011632>

Tullio, V. (2024). Probiotic Yeasts : A Developing Reality? *Journal of Fungi*, 10(7), Article 7. <https://doi.org/10.3390/jof10070489>

Türker, M. (2014). *Yeast Biotechnology : Diversity and Applications*.

V

Verstrepen, K. J., & Klis, F. M. (2006). Flocculation, adhesion and biofilm formation in yeasts. *Molecular Microbiology*, 60(1), 5-15. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05072.x>

Van Der Klei, I., Veenhuis, M., Brul, S., Klis, F. M., De Groot, P. W. J., Müller, W. H., Van Driel, K. G. A., & Boekhout, T. (2011). Cytology, Cell Walls and Septa. In *The Yeasts* (p. 111-128). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-52149-1.00008-2>

W

Walker, G. M. (2009). Yeasts. In *Encyclopedia of Microbiology* (p. 478-491). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-012373944-5.00335-7>

Wan, Y., Jiang, J., Lu, M., Tong, W., Zhou, R., Li, J., Yuan, J., Wang, F., & Li, D. (2020). Human milk microbiota development during lactation and its relation to maternal geographic location and gestational hypertensive status. *Gut Microbes*, *11*(5), 1438-1449. <https://doi.org/10.1080/19490976.2020.1760711>

Wang, B., Rutherford-Markwick, K., Liu, N., Zhang, X.-X., & Mutukumira, A. N. (2024). Evaluation of the probiotic potential of yeast isolated from kombucha in New Zealand. *Current Research in Food Science*, *8*, 100711. <https://doi.org/10.1016/j.crfs.2024.100711>

G. A., & Kolter, R. (1998). Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Molecular Microbiology*, *30*(2), 295-304. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1998.01062.x>

Wedlich-Soldner, R., & Li, R. (2008). Yeast and Fungal Morphogenesis: Evolution of Morphologic Diversity. *Seminars in cell & developmental biology*, *19*(3), 224-233. <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2008.01.003>

Witkowska-Zimny, M., & Kaminska-El-Hassan, E. (2017). Cells of human breast milk. *Cellular & Molecular Biology Letters*, *22*(1), Article 1. <https://doi.org/10.1186/s11658-017-0042-4>

X

Xavier, A. M., Rai, K., & Hegde, A. M. (2011). Total Antioxidant Concentrations of Breastmilk—An Eye-opener to the Negligent. *Journal of Health, Population, and Nutrition*, *29*(6), 605-611. <https://doi.org/10.3329/jhpn.v29i6.9897>

Z

Zeghib, W., Boudjouan, F., Vasconcelos, V., & Lopes, G. (2022). Phenolic Compounds' Occurrence in Opuntia Species and Their Role in the Inflammatory Process: A Review. *Molecules*, 27(15), 4763. <https://doi.org/10.3390/molecules27154763>

Zarban, A., Taheri, F., Chahkandi, T., Sharifzadeh, G., & Khorashadizadeh, M. (2009). Antioxidant and Radical Scavenging Activity of Human Colostrum, Transitional and Mature Milk. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, 45(2), 150-154. <https://doi.org/10.3164/jcbtn.08-233>

Zhang, X., Luo, X., Tian, L., Yue, P., Li, M., Liu, K., Zhu, D., Huang, C., Shi, Q., Yang, L., Xia, Z., Zhao, J., Ma, Z., Li, J., Leung, J. W., Lin, Y., Yuan, J., Meng, W., Li, X., & Chen, Y. (2023). The gut microbiome dysbiosis and regulation by fecal microbiota transplantation: Umbrella review. *Frontiers in Microbiology*, 14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1286429>

Zhong, Y., & Shahidi, F. (2015). Methods for the assessment of antioxidant activity in foods1. In F. Shahidi (Éd.), *Handbook of Antioxidants for Food Preservation* (p. 287-333). Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1016/B978-1-78242-089-7.00012-9>

Annexes

Annexe1 : composition des milieux de culture**Gélose Nutritive**➤ **Composition**

- Peptone de gélatine.....5g/l
- Extrait de viande.....3g/l
- Agar bactériologique.....15g/l

- **Préparation** : Mettre en suspension 23 grammes de milieu dans un litre d'eau distillée. Bien mélanger et dissoudre en chauffant avec une agitation fréquente. Faire bouillir pendant une minute jusqu'à dissolution complète. Répartir dans des récipients appropriés et stériliser à l'autoclave à 121 °C pendant 15 minutes
pH 6,8 à 25C

Mueller Hinton➤ **Composition**

- Peptones.....19,5g/l
- Amidon soluble.....1,5g/l
- Agar.....17g/l

- **Préparation** : Suspender 38 g dans un litre d'eau distillée et chauffer en agitant fréquemment jusqu'à ce que le milieu soit bien homogène. Stériliser à l'autoclave à 121 °C pendant 15 minutes
pH 7,3

Gélose nutritive ordinaire➤ **Composition de milieu**

- Peptone.....3,0g
- Extrait de levures 1,8g
- Extrait de viande 0,6g
- Nacl3,0g
- Agar.....9,0g
- Eau distillé 600ml
- pH final 7,0 ± 0,2

Bouillon nutritif➤ **Composition**

- Tissu animal digéré par pepsine.....5g/l
- Chlorure de sodium5g/l
- Extrait de viande..... 1,5g/l
- Extrait de levure..... 1,5g/l

- **Préparation** : **Dissoudre** 13,0 g dans 1000 ml d'eau distillée. Battre jusqu'à dissolution complète. Stériliser à l'autoclave à 15 pa (121 °C) pendant 15 minutes. Laisser refroidir à température ambiante avant utilisation

pH 7,4 25C°

Bouillon Sabouraud dextrose➤ **Composition**

- Glucose20g/l
- Peptone, spéciale.....10g/l

➤ **Préparation : Dissoudre** 30 g dans 1000 ml d'eau distillée. Faire bouillir pour dissoudre complètement le milieu. Stériliser à l'autoclave à 121 °C (15 psi) pendant 15 minutes. Laisser refroidir à température ambiante avant de distribuer.

➤ pH 5,6 a 25C°

➤

Annexe2 : Résultats de l'ACP

Tableau I Corrélation des variables avec les dimensions de l'ACP récapitulative basée sur les chargements factoriels

Variables	Facteur1	Facteur2
spot <i>E.coli</i>	0,6581	-0,6212
spot <i>S. aureus</i>	0,7071	-0,6219
spot <i>C. albicans</i>	0,3007	0,7315
Puit <i>E. coli</i>	0,0000	0,0000
Puit <i>S. aureus</i>	0,0000	0,0000
Puit <i>C. albicans</i>	0,0000	0,0000
adhésion biofilm	-0,6544	0,1077
auto 2h	0,6323	0,4683
auto 4h	0,4181	0,7538
Hydro 15mn	0,4740	0,3843
Hémolyse	0,0000	0,0000
PI <i>E.coli</i>	0,0000	0,0000
PI <i>S.aureus</i>	0,3183	-0,3489
PI <i>C.albicans</i>	0,3737	0,0445

Résumé

Cette étude a porté sur l'exploration de nouvelles sources non conventionnelles pour l'isolement de levures probiotiques, à savoir le lait maternel et le Legmi, une boisson fermentée de la région d'Oued Souf, dans le but d'identifier des souches à potentiel probiotique et d'évaluer leurs propriétés probiotiques. Au total, 7 isolats sont issus du lait maternel et 33 à partir du Legmi. Tous les isolats ont été considérés comme sûrs sur le plan de l'innocuité, à l'exception de trois isolats issus du Legmi qui ont été identifiés comme *Candida albicans*, ce qui exclut leur utilisation à des fins probiotiques. L'analyse des propriétés probiotiques a révélé des niveaux élevés d'auto-agrégation, d'hydrophobicité et de capacité à former un biofilm, des critères importants pour l'adhésion aux cellules intestinales. L'activité antimicrobienne des isolats a été testée contre trois souches cibles (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25933 et *Candida albicans* ATCC 10231). Aucune activité n'a été détectée par la méthode de diffusion sur gélose. En revanche, des inhibitions significatives contre *C. albicans* et *S. aureus* ont été observées en microplaque. Ce travail a permis d'identifier quatre isolats présentant un potentiel probiotique, qui ont démontré une activité antioxydante significative, reflétant leur aptitude à neutraliser les radicaux libres.

Mots clés : Probiotiques, levures, lait maternel, legmi, effet antioxydant

Agzul

Tazrawt-a tella-d s unadi yef yiwbula imaynuten ur nelli ara d iqburen i uezal n tmezdiyin n tmezdiyin, dya d ayefki n tmettut d Legmi, d tissit yettwaferqen seg temnadit n Oued Souf, s yiswi n ueeyyen n tyawsiwin yesean tazmert n tmezdiyin d uskazal n tyawsiwin-nsent n tmezdiyin. S ujemmal, 7 n yiferdisen ay d-yettwajerrden seg uyrum n tmettut d 33 seg Legmi. Akk izedwan ttwahesben d izewren deg wayen yerzan tayellist, anagar krađ n yizedwan seg Legmi ay yettwassnen d *Candida albicans*, yernu aya yessekcem-d aseqdec-nsen i yiswan n tmezdiyin (probiotiques). Anadi n tyawsiwin n tmezdiyin (probiotiques) yesskanay-d iswiren n tmezdiyin n yiman, n tmezdiyin n waman d tzemmar n usnulfu n tmezdiyin n tmezdiyin, d lqidar yesean azal i uđfar n tmezdiyin n yizuran. Tigawt n tmezdiyin n yiferdisen-a ttwajerrden mgal krađ n tmıdrant n yiswi (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25933 d *Candida albicans* ATCC 10231). Ur d-yettwafk ara kra n uxeddim s tarrayt n usfugel n agar. Maca, ttwahesben-d yihezzen imeqqranen mgal *C. albicans* d *S. aureus* deg yikayaden n tmiqwa n lmikra. Leqdic-a yessken-d 4 n yiferdisen yesean tazmert n tmezdiyin (probiotiques), d ayen ay d-yesskanayen tigawt n tmezdiyin (antioxydants) tameqrant, yerna aya yesskanay-d tazmert-nsen akken ad sneqsen izuran ilellyen.

Awal agejdan: Probiotiques, tamtunt, ayefki n yemma, legmi, adris n ushulfu

Abstract

This study focused on exploring new unconventional sources for the isolation of probiotic yeasts, namely breast milk and Legmi, a fermented beverage from the Oued Souf region, with the aim of identifying strains with probiotic potential and evaluating their probiotic properties. A total of 7 isolates were obtained from breast milk and 33 from Legmi. All isolates were considered safe in terms of safety, except for three isolates from Legmi which were identified as *Candida albicans*, which excludes their use for probiotic purposes. Analysis of probiotic properties revealed high levels of self-aggregation, hydrophobicity and ability to form a biofilm, important criteria for adhesion to intestinal cells. The antimicrobial activity of the isolates was tested against three target strains (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25933 and *Candida albicans* ATCC 10231). No activity was detected by the agar diffusion method. However, significant inhibitions against *C. albicans* and *S. aureus* were observed in microplate assays. This work identified four isolates with probiotic potential, which demonstrated significant antioxidant activity, reflecting their ability to neutralize free radicals.

Keywords: Probiotics, yeasts, breast milk, legmi, antioxidant effect

الملخص

ركزت هذه الدراسة على استكشاف مصادر جديدة غير تقليدية لعزل خمائر البروبيوتيك، وهي حليب الثدي وليجمي، وهو مشروب مخمر من منطقة واد سوف، بهدف تحديد السلالات ذات إمكانات البروبيوتيك وتقييم خصائصها الحيوية. تم الحصول على ما مجموعه 7 عزلات من حليب الثدي و 33 من ليجمي. واعتبرت جميع العزلات آمنة من حيث السلامة، باستثناء ثلاث عزلات من ليجمي التي تم تحديدها على أنها المبيضات البيض، والتي تستبعد استخدامها لأغراض بروبيوتيك. كشف تحليل خصائص البروبيوتيك عن مستويات عالية من التجميع الذاتي، والكراهية للماء والقدرة على تكوين غشاء حيوي، وهي معايير مهمة للاتصاق بالخلايا المعوية. تم اختبار النشاط المضاد للميكروبات للعزلات ضد ثلاث سلالات مستهدفة (الإشريكية القولونية أتسك 25922، المكورات العنقودية الذهبية أتسك 25933 والمبيضات البيض أتسك 10231). لم يتم الكشف عن أي نشاط بواسطة طريقة انتشار آجار. ومع ذلك، لوحظت موانع كبيرة ضد ج.البيض و س. أوربوس في فحوصات الصفيحة الدقيقة. حدد هذا العمل أربع عزلات ذات إمكانات بروبيوتيك، والتي أظهرت نشاطا كبيرا مضادا للأكسدة، مما يعكس قدرتها على تحييد الجذور الحرة.

كلمات البحث: البروبيوتيك، الخمائر، حليب الثدي، ليجمي، تأثير مضاد للأكسدة

