

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



جامعة الإخوة منتوري قسنطينة I
Frères Mentouri Constantine I University
Université Frères Mentouri Constantine I

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie Appliquée

كلية علوم الطبيعة والحياة
قسم البيولوجيا التطبيقية

Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie
Filière : Sciences biologiques
Spécialité : Bioindustrie, Analyse et Contrôle

N° d'ordre :
N° de série :

Intitulé :

Étude de la production des arômes par voie microbienne

Présenté par : **LAOUBI Menal**
BENSOUICI Lamia

Le 00/06/2022

Jury d'évaluation :

Encadreur : Mr KACEM CHAOUICHE Norednine (Prof - UFM, Constantine 1)
Examineur 1 : Mme BENCHIHEUB Meriem (MCB - UFM, Constantine 1)
Examineur 2 : Mme BOUCHEDJA Naila (MCA - UFM, Constantine 1)
Tutrices : Mme GARES Maroua (Doctorante – UFM, Constantine 1)
Mme ALLOUN wiem (Doctorante – UFM, Constantine 1)

Année universitaire 2021 - 2022

Remerciements

On remercie dieu le tout puissant de nous avoir donné la santé et la volonté d'entamer et de terminer ce mémoire.

Tout d'abord, on tient à remercier Monsieur Noredine KACEM CHAUCHE notre chef de Département et notre encadrant pour son aide, sa patience, son soutien, ses précieux conseils, ses encouragements et ses critiques constructives qui nous ont permis de réaliser ce travail, et aussi pour son accueil au sein du laboratoire de Mycologie, de Biotechnologies et de l'Activité Microbienne (LaMyBAM), Université des Frères Mentouri, Constantine1).

Notre remerciement s'adresse à toute l'équipe du laboratoire, Maroua Gares, Wiem Alloun et Mehdi Mansour, pour leur excellent accueil, encouragement, leurs précieux conseils et leur assistance durant toute la période du travail.

Notre remerciement s'adresse également à tous nos professeurs pour leurs générosités et la grande patience dont ils ont su faire preuve malgré leurs charges académiques et professionnelles.

Dédicaces

*Je Dédie ce travail à notre chef de département **Monsieur Noredine KACEM CHAUCHE** pour les encouragements qu'il n'a cessés de nous apporter tout au long de notre scolarité.*

*A mes chers parents **LAOUBI ABDELHAMID ET DJAMILA**, pour tous leurs sacrifices, leur amour, leur tendresse, leur soutien et leurs prières tout au long de mes études.*

*A ma chère amie et binôme **Bensouici Lamia***

*A mes chères sœurs **Khadija, Bouteina, Houda, Khaoula et Sana**, pour leurs encouragements permanents, et leur soutien moral.*

*A mes chers frères **Nazim sofiane et lokmane** pour leur appui et leur encouragement.*

*A toute ma famille pour leur soutien tout au long de mon parcours universitaire,
Que ce travail soit l'accomplissement de vos vœux tant allégués, et le fruit de votre soutien
infaillible,
Merci d'être toujours là pour moi.*

Menal

Dédicaces

Je dédie ce travail

*A mon très cher père **BENSOUICI Lamri** paix a son âme. Grâce à toi papa j'ai appris le sens du travail et de la responsabilité, tu étais un homme de principe, un homme très intelligent et modeste, Ce travail est le fruit de tous les sacrifices que tu as déployés pour mon éducation et ma formation. Aucune dédicace ne saurait exprimer mes respects, ma reconnaissance et mon profond amour Que Dieu t'accorde la paix éternelle et t'accueille dans son vaste paradis.*

À ma maman, source inépuisable de tendresse, de patience et de sacrifice, elle qu'elle m'a doté d'une éducation digne, son amour a fait de moi ce que je suis aujourd'hui.

A mon frère Hamza, mes sœurs Naziha et Manel, à mon amie et binôme Laoubi Menal, à ma cousine Nada, je vous aime.

Lamia

Résumé :

Le but de ce travail est de tester la capacité de deux souches de levures, *Geotrichum candidum* et *Yarrowia lipolytica*, à produire des arômes sur milieux semi-solides, en valorisant des sous-produits et des substrats d'origine agro-alimentaire (chapelure, son de blé, paille de blé, caroubier, flacons d'avoines, et le riz). Et ainsi sur milieux liquides (caillé et lactosérum) en présence ou absence de précurseur. En premier lieu des tests enzymatiques ont été effectués pour les deux souches, afin de vérifier leurs aptitudes à dégrader les substrats solides. Au cours de la première fermentation en milieux semi-solides, aucune production d'arôme n'a été aperçue. Par contre, lors de la deuxième fermentation en milieux liquides, il y'avait une production d'arôme de fromage. L'association de ces deux levures en présence de précurseur était le choix le plus convenable pour une production optimale des arômes.

Mots clés :

Geotrichum candidum, *Yarrowia lipolytica*, production des arômes, fermentation semi-solide, fermentation liquide.

Abstract:

The aim of this research study is to test the ability of two yeast strains, *Geotrichum candidum* and *Yarrowia lipolytica*, to produce aromas on semi-solid media, by valorizing by-products and agro-food substrates (breadcrumbs, wheat bran, wheat straw, carob, oat flakes, and rice). And so on liquid media (milk curd and whey) in the presence and absence of precursor. First, enzymatic tests were performed for both strains to verify their ability to degrade solid substrates. During the first fermentation in semi-solid media, no aroma production was observed. Whereas, during the second fermentation in liquid media, cheese aroma was produced. The combination of the both yeasts in the presence of precursor was the most suitable choice for an optimal aroma production.

Keywords:

Geotrichum candidum, *Yarrowia lipolytica*, aroma production, semi-solid fermentation, liquid fermentation.

ملخص:

الهدف من هذا العمل هو اختبار قدرة سلالتين من الخميرة، *Geotrichum candidum* و *Yarrowia lipolytica*،

على إنتاج المنكهات على وسائط شبه صلبة، باستخدام المنتجات الثانوية ذات الأصل الغذائي الزراعي (فئات الخبز، نخالة القمح، قش القمح، الخروب، دوارق الشوفان والأرز). و أيضا على الوسائط السائلة (الختارة ومصل اللبن) في وجود أو عدم وجود معزز. أو ، تم إجراء الاختبارات الأنزيمية على السلالتين للتحقق من قدرتها على تحليل الركائز الصلبة. خلال التخمير الأول في الأوساط شبه الصلبة، لم يلاحظ إنتاج رائحة، من ناحية أخرى، أثناء التخمير الثاني في الوسط السائل كان هناك إنتاج لرائحة الجبن. كان الجمع بين هاتين الخمائر في وجود معزز هو الخيار الأنسب لإنتاج الروائح بشكل مثالي.

كلمات البحث:

Geotrichum candidum، *Yarrowia lipolytica*، إنتاج الرائحة، التخمير شبه الصلب، التخمير السائل

Liste des figures

Figure 1 : Procédés biotechnologique pour la production d'arômes.....	21
Figure 2 : Aspect des souches de <i>Geotrichum candidum</i> sur milieu sur milieu gélosé YEG après 4 jours de croissance à 25 °C dans l'obscurité.....	27
Figure 3 : Microculture de <i>G. candidum</i> à 25 °C après 17h sur milieu d'extrait de malt...	28
Figure 4 : Microscopie électronique à balayage de milieu contenant <i>G. candidum</i>	28
Figure 5 . Morphologie de <i>Y. lipolytica</i> lors d'une culture A : accumulation lipidique, B : phase exponentielle, C : conditions semi-anoxiques.....	35
Figure 6 : Conservation des souches <i>G. candidum</i> et <i>Y. lipolytica</i> sur gélose inclinée.....	39
Figure 7 : Microscope Optique	40
Figure 8 : Les milieux de fermentation semi-solides	44
Figure 9 : Les milieux de fermentation liquide dans l'incubateur agité	46
Figure 10 : Aspect macroscopique de la souche <i>Geotrichum candidum</i> sur milieu PDA....	48
Figure 11 : Aspect macroscopique de la souche <i>Yarrowia lipolytica</i> sur milieu YPG.....	48
Figure 12 : Aspect microscopique de la souche <i>Geotrichum candidum</i> sur milieu PDA...	49
Figure 13 : Aspect microscopique de la souche <i>Yarrowia lipolytica</i> sur milieu YPG.....	49
Figure 14 : Observation de <i>Yarrowia lipolytica</i> sous microscope optique dans les conditions de stresse.....	54

Liste des tableaux

Tableau 1 : classification des composés aromatiques	19
Tableau 2 : les arômes produits par voie végétale	22
Tableau3 : les arômes produits par voie microbienne	24
Tableau 4 : Nomenclature actuelle des Galactomyces candidus / Geotrichum candidum	25
Tableau 5 : Activité physiologique décrivant l'espèce Geotrichum candidum.....	29
Tableau 6 : Classification scientifique de Yarrowia	33
Tableau 7 : Les matrices solides et leurs compositions	42
Tableau 8 : Composition de milieux de fermentation liquide	46
Tableau 9 : Description des colonies des souches cultivées su PDA et YPG.....	48
Tableau 10 : Étude microscopique des souches utilisées.....	49
Tableau 11 : Résultats des tests de mise en évidence des activités enzymatiques.....	49
Tableau 12 : La mise en évidence de l'activité enzymatique de la souche Geotrichum Candidum.....	50
Tableau 13 : La mise en évidence de l'activité enzymatique de la souche Yarrowia lipolytica.....	51
Tableau 14 : Présence ou absence de production d'arôme dans les milieux de fermentation semi-solides par les souches Geotrichum candidum et yarrowia lipolytica.....	53
Tableau 15 : Résultats de milieux de fermentation liquides	55

Liste d'abréviations

FMSS fermentation en milieux semi-solides

FML fermentation en milieux liquides

PDA Potato- Dextrose- Agar

pH Potentiel Hydrogène

YPGA Yeast-Peptone- Glucose-Agar

CMC carboxyméthylcellulose

rpm Rotation par minute

M gramme/mol

MO microorganismes

tr/min tour par minute

MTN méthionine

CSV composés soufrés volatils

Aw l'activité de l'eau

Table des matières :

INTRODUCTION	14
1- LES AROMES	17
1.1- Généralité.....	17
1.2- Définition des arômes	17
1.3- Nature chimique des corps odorants	18
1.4- Utilisation des arômes	19
1.5- Classification du composé aromatique	19
1.6- Procédés biotechnologique pour la production d'arômes	20
1.6.1- Production d'arôme par voie végétale	22
1.6.2- Production d'arôme par voie microbienne.....	23
2- Généralité sur les levures	25
2.1- <i>Geotrichum candidum</i>	25
2.1.1-Taxinomie	25
2.1.2-Répartition.....	26
2.1.3- Caractéristiques intrinsèques générales	26
2.1.4- Morphologie et activité physiologique	26
2.1.5- Protéolyse et catabolisme des acides aminés	31
2.1.6- Lipolyse et catabolisme des acides gras	32
2.1.7- Usage commercial de <i>G. candidum</i>	32
2.2- <i>Yarrowia lipolytica</i>	33
2.2.1- Taxinomie et origine	33
2.2.2-Répartition.....	34
2.2.3- Caractéristiques intrinsèques générales	34
2.2.4- la morphologie de <i>Yarrowia lipolytica</i>	34
2.2.5- Activité physiologique	35
2.2.6-Usage commercial de <i>Yarrowia lipolytica</i>	35
3- Matériel et méthodes	38
3.1- Matériel biologique	38
3.2- Réactivation de la souche.....	38

3.3- Conservation de la souche	38
3.4- Caractères cultureux et morphologiques de la souche.....	39
3.4.1- Observation macroscopique.....	39
3.4.2- Observation microscopique	39
3.5- Mise en évidence des activités enzymatiques	40
3.5.1- La recherche de l'activité protéolytique (hydrolyse des protéines).....	40
3.5.2- La recherche de l'activité cellulolytique (Hydrolyse de la cellulose)	41
3.5.3- La recherche de l'activité xylanolytique (hémicellulosique).....	41
3.5.4- La recherche de l'activité amylolytique.....	41
3.6- Fermentation	41
3.6.1- Fermentation en milieux semi-solides	42
3.6.1.1- Matrices solides	42
3.6.1.2- Préparation de l'inoculum.....	43
3.6.1.3- Comptage de cellules	43
3.6.1.4- Milieux de fermentation.....	43
3.6.1.5- Inoculation et incubation.....	44
3.6.2- Fermentation en milieux liquides	44
3.6.2.1-Pré-culture.....	44
3.6.2.2- milieux de fermentation	45
3.6.2.3- Inoculation et incubation.....	45
4-Résultats et discussions.....	48
4.1 Caractères cultureux et morphologiques des souches	48
4.1.1- Aspect macroscopique	48
4.1.2- Aspect microscopique.....	48
4.2- Mise en évidence de l'activité enzymatique	49
4.3- Résultats de la Fermentation	52
4.3.1- Fermentation en milieux semi-solide.....	52
4.3.2- Fermentation en milieux liquides	54
5- Conclusion et perspectives	57
6- Références bibliographiques	59
Annexes	72

INTRODUCTION

INTRODUCTION :

La production des arômes représente une partie importante du secteur agroalimentaire, mais aussi des secteurs cosmétiques, chimiques et pharmaceutiques (**Verma et al ., 2021**). Leur marché est en plein croissance afin de répondre aux attentes des consommateurs qui sont de plus en plus attentifs à leur santé et à la composition de leurs aliments.

Les arômes peuvent être produits par trois méthodes principales ; la synthèse chimique, l'extraction à partir de sources naturelles ex. des matières premières végétales ou animales (fraise, café, vanille), et la voie biotechnologique (**Tripti, 2021**). En effet, les arômes obtenus par méthode biotechnologique sont appelés bio-arômes. Dans la production des bio-arômes, des méthodes microbiologiques, enzymatiques et de culture tissulaire sont utilisées. Des travaux scientifiques récents portent sur l'optimisation des bioprocédés, en particulier la bioconversion, qui est l'outil de base dans la production de bio-arômes (**Ludmila et al., 2008**).

La biotechnologie propose des méthodes de production de bio-aromes en utilisant des cellules, des tissus d'origine végétale et le plus souvent des microorganismes par deux approches ; la première approche est la bio production, cette technique consiste à utiliser les microorganismes pour produire les arômes par fermentation à partir d'un substrat contenant les éléments de base nécessaires à la synthèse des composés. La deuxième approche est la bioconversion, qui consiste à valoriser des résidus agro-industriels et des substrats complexes et peu coûteux (**Try, 2018**).

Plusieurs microorganismes ont été étudiés ou utilisés dans la production des arômes en particulier les levures. Ces microorganismes sont des acteurs essentiels intervenant dans divers domaines grâce à leurs propriétés physiologiques très caractéristiques. *Yarrowia lipolytica* et *Geotrichum candidum* sont reconnue pour leur capacité à synthétiser des composés aromatiques par bio production. En effet, la levure *Y. lipolytica* a une grande importance économique liée à sa capacité à : dégrader des lipides et des alcanes lors du traitement des déchets d'huileries, dépolluer des hydrocarbures, produire des composés d'intérêt pharmaceutique et industriel et

également la biotransformation de lipides en composés d'arômes (**Waché et al., 2001**). D'autre part, la levure *G. candidum*, qui est un champignon aux propriétés aromatiques, a été souvent utilisée pour l'affinage commercial du fromage. Ce microorganisme a une activité lipolytique très élevée. Certaines souches peuvent produire dans le bouillon de culture une odeur fruitée, due à la production d'esters et d'alcools (**Mdaini et al., 2006**). La production des arômes par ce type de levures est bien connue en fermentation en milieu liquide mais en fermentation en milieu solide, elle n'a pas encore été étudiée.

De ce fait, les principaux objectifs du présent travail sont :

- L'identification macroscopique et microscopique des souches de levures utilisées ;
- Mise en évidence des activités hydrolytiques extracellulaires (protéase, amylase, cellulase, hémicellulase, lipase) sur milieux gélosés spécifiques ;
- Prospection de la production d'arôme par *Geotrichum candidum* GEO17 et *Yarrowia lipolytica* sur différents milieux de fermentation ;
- Prospection de la production d'arôme par *G. candidum* GEO17 et *Y. lipolytica* sur différents milieux fromagers liquides.

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

1- LES AROMES :

1.1- Généralité :

Lors de la consommation d'un aliment, on reçoit une information d'ensemble des sensations enregistrées aux niveaux gustatif, olfactif et tactile (en anglais, cette information est désignée par le concept "Flavour"). Pour percevoir l'aliment par le goût ou les récepteurs olfactifs, des composants d'arôme et de goût doivent être libérés dans la salive, ce qui dépend de la composition et de la structure de la matrice alimentaire et du comportement masticatoire (**Werner et al., 2010**). Les composés aromatiques doivent alors être transportés de la cavité buccale à la cavité nasale (**Guichard et Salles, 2016**). Ainsi, ce sont les arômes rétro nasaux qui se conjuguent aux signaux gustatifs pour donner naissance aux saveurs.

D'une manière générale, les substances gustatives ne sont pas volatiles à la température ambiante. De ce fait, elles sont uniquement perceptibles par les papilles gustatives. En tant que substances gustatives, les combinaisons acides, sucrées, amères et salées sont très importantes. L'expression "arôme", tout comme l'expression "substances gustatives", est utilisée sans jugement de valeur car la même combinaison peut, dans un aliment, participer à la formation d'odeurs et de goûts typiques, et dans un autre contribuer à un défaut d'odeur ou de goût (off-flavour).

1.2- Définition des arômes :

On peut définir l'arôme d'un aliment comme l'ensemble des substances qui sont présentes au moment de la consommation et qui peuvent passer dans le torrent gazeux pour créer des sensations olfactives (**Rocha, 2022**) ;

- le terme arôme est réservé à l'usage alimentaire ;
- les substances ainsi nommées ont une nature chimique ;
- l'arôme est le plus souvent le résultat d'un mélange de nombreuses molécules qui doivent avoir pour caractéristique :
 - de changer d'état en passant d'un milieu le plus souvent aqueux à une phase gaz ;
 - de pouvoir atteindre l'organe olfactif à travers le mucus nasal ;

- de réagir avec les membranes réceptrices de l'organe sensoriel (**Sowndhararajan et Kim, 2016**).

Suivant les substances et les agents aromatisants utilisés lors de la fabrication des arômes, il existe trois types d'arômes : naturel, synthétique, et semi-synthétique.

Les arômes naturels sont extraits de plantes, d'herbes et d'épices, d'animaux, ou de fermentations microbiennes. Certains de ces composés aromatiques sont des produits de dégradation catabolique dérivés de métabolites primaires tels que les lipides acylés et les acides aminés, d'autres sont des «produits secondaires», tels que les phénylpropanoïdes et les monoterpènes (**Croteau et Karp, 1994**). Par contre, les arômes synthétiques sont chimiquement similaires aux arômes naturels, facilement disponibles et moins chers, fabriqué avec des matières premières synthétiques. En outre, les arômes semi-synthétiques sont les substances aromatisantes obtenues par synthèse ou isolées par des procédés chimiques, la composition chimique de ces derniers est identique à celle de leurs homologues naturels, et ces agents aromatisants ne peuvent contenir aucune substance aromatisante artificielle.

1.3- Nature chimique des corps odorants :

Les composés odorants ou arômes, sont des molécules organiques de faible poids moléculaire ($M < 400$ Daltons), dont la tension de vapeur sous pression atmosphérique est suffisamment élevée, pour qu'elles se trouvent en partie à l'état vapeur dans l'atmosphère, et puissent au contact de la muqueuse olfactive provoquer un stimulus. Ces constituants appartiennent à différentes classes de la chimie organique : hydrocarbures (généralement de nature terpénique), alcools, ether-oxydes, aldéhydes, cétones, esters, amines, amides et divers hétérocycles (**Kabbaj, 1997**).

Un arôme naturel représente pondéralement une partie minime du produit alimentaire dans lequel il se trouve (**Jaubert, 1983**). Selon **Richard (1992)**, la note aromatique d'un produit alimentaire est parfois due à un seul composé ; tel que le menthol de la menthe, le cuminaldéhyde du cumin et l'oct-1-én-3-ol des champignons.

1.4- Utilisation des arômes :

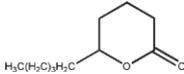
Les arômes jouent un rôle important dans la qualité des aliments, le consommateur attend d'un aliment, en plus d'une qualité irréprochable, un arôme et un goût attrayant. La plupart des aliments produits industriellement pourraient difficilement être élaborés sans l'adjonction d'arômes appropriés. Par ailleurs, l'arôme est utilisé pour compenser des pertes survenues au cours du procédé de traitement de l'aliment, c'est cette nécessité qui a conduit au développement de l'industrie aromatique afin de pourvoir aux besoins en arômes des industriels de l'alimentaire (Calín-Sánchez et Carbonell-Barrachina, 2021).

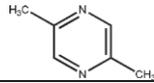
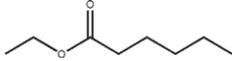
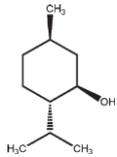
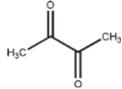
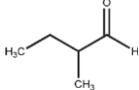
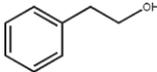
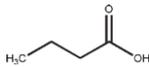
Conformément au règlement (CE) No. 1334/2008 du Parlement européen et du Conseil du 16 décembre 2008, « Les arômes sont utilisés pour améliorer ou modifier l'odeur et/ou le goût des aliments au profit du consommateur. Les arômes et ingrédients alimentaires ayant des propriétés préférentielles ne devraient être utilisés que s'ils remplissent les critères fixés dans le présent règlement. Ils doivent être sans danger lorsqu'ils sont utilisés, et certains arômes doivent donc faire l'objet d'une évaluation des risques avant d'être autorisés dans les aliments » (European Parliament, Council of the European Union, 2008).

1.5- Classification du composé aromatique :

Les composés d'arôme sont des molécules volatiles, cette caractérisation implique que celle-ci soient de faible masse molaire et avec, majoritairement, une masse molaire inférieure à 400g/mol. Les arômes sont en général classés suivant la classe de composés organique à laquelle ils appartiennent (tableau 1). Une très grande variété de classes organique est en fait représentée dans les composés d'arôme, depuis les hydrocarbures les plus simples jusqu'à des composés polyfonctionnels et/ou hétérocycliques assez complexes (Genot et al., 2012).

Tableau 1 : Classification des composés aromatiques

Classe	Exemple	Structure	Saveur	Référence
Lactones	δ-décalactone		Fruité	(Dastager, 2009)
Pyrazines	2,5-diméthyl		Noisette	(Sharma et

	pyrazine			al., 2020)
Esters	Hexanoate d'éthyle		L'Anis	(Sharma et al., 2020)
Terpènes	Menthol		Saveur de menthe	(Caputi et Aprea, 2011)
Cétones	Diacétyl		Saveur de beurre	(Dastager, 2009)
Aldéhydes	2-méthylbutanal		Saveur chocolatée	(Smit et al., 2002)
Alcools	Alcool phényléthylique		Rose	(Hanán et al., 2019)
Les acides gras	acide butyrique		Saveur de beurre	(Smit et al., 2002)

1.6- Procédés biotechnologique pour la production d'arômes :

Pendant longtemps, les extraits de plantes ont été la plus grande source naturelle d'additifs aromatiques pour l'industrie alimentaire. Néanmoins, l'extraction à partir de plantes est sensible aux aspects écologiques, sociaux et politiques (**Christaki et al., 2012**). La production d'arômes via des procédés biotechnologiques est apparue comme une alternative prometteuse pour surmonter les problèmes liés à ceux issus des plantes ou de la synthèse chimique (figure 1).

Une alternative est offerte par l'adoption de méthodes biotechnologiques en utilisant les micro-organismes (**Braga et al., 2018**). Les arômes obtenus par cette voie bénéficient du label naturel. Les micro-organismes peuvent donc être employés soit dans :

- les bioconversions : méthodes par lesquelles des micro-organismes ou des enzymes spécifiques produisent des molécules difficiles à synthétiser chimiquement. Il est à noter que l'emploi de l'enzyme est toujours préféré à celui du micro-organisme qui peut être à l'origine de réactions non désirées.
- la biosynthèse de composés d'arôme : biosynthèse de métabolites, à partir de substrats élémentaires carbonés et azotés.
- la production de préparations aromatiques ; il s'agit de préparations aromatisantes contenant un mélange de molécules odorantes. Malheureusement l'optimisation de ce procédé reste difficile (**Kabbaj, 1997**)

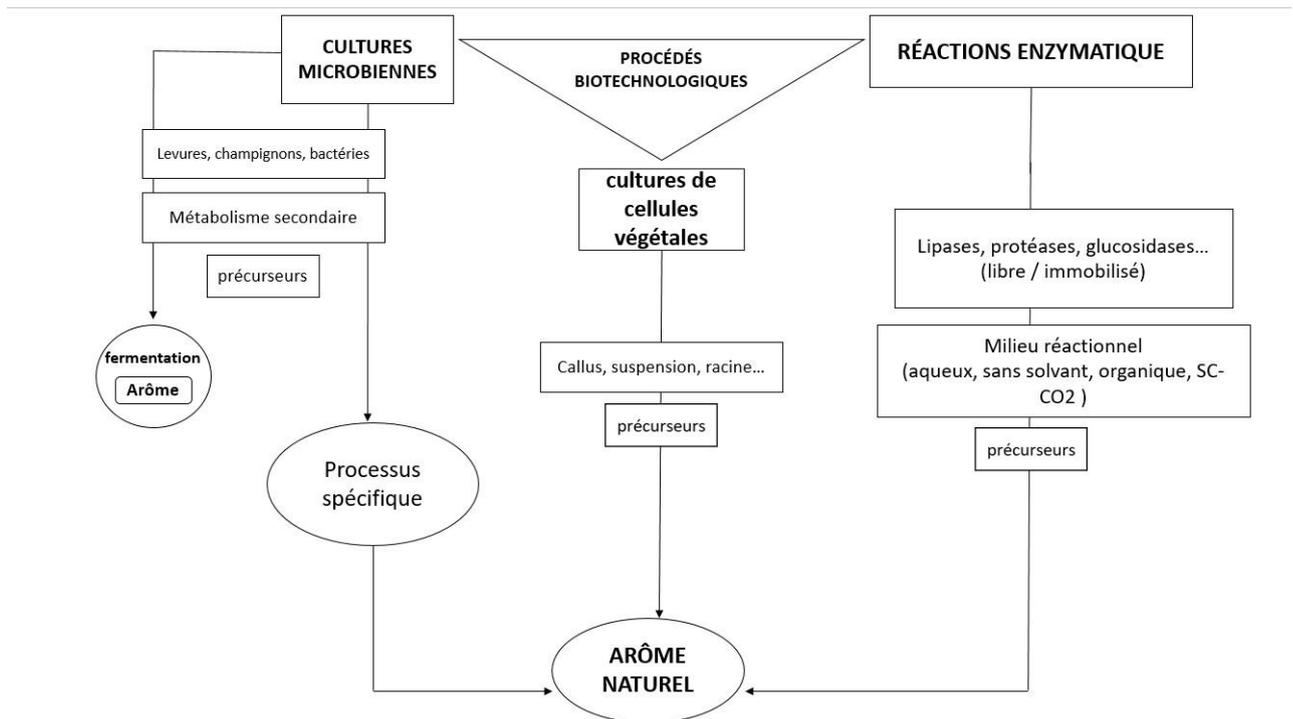


Figure 1: Procédés biotechnologique pour la production d’arômes (Longo et Sanromán, 2006).

1.6.1- Production d’arôme par voie végétale :

La production d’arômes par voie végétale est une méthode viable pour produire un large éventail de saveurs et d’arômes caractéristiques de leur origine végétale (tableau 2), Ces arômes, comme la vanille et le cacao, sont des métabolites secondaires qui ont été proposés comme cibles possibles pour l’utilisation industrielle des cultures cellulaires végétales (Scragg, 1997). Cette approche est basée sur la capacité biochimique et génétique unique, et la totipotence des cellules végétales. Chaque cellule d’une culture végétale contient l’information génétique nécessaire pour produire de nombreux composants chimiques qui constituent une saveur naturelle, l’alimentation intermédiaire de la voie biosynthétique peut améliorer la production de métabolites aromatiques par biotransformation de précurseurs (Longo et Sanromán, 2006).

Tableau 2: Les arômes produits par voie végétale

Produits	Les espèces végétales	Références
2,3-butanedione, (E,Z)-2,6-nonadienal et	<i>Agastache rugosa</i>	(Kim et al., 2001)

(E,Z)-2,6-nonadien-1-ol		
Arôme de pomme	<i>Malus silvestris</i>	(Drawert et al., 1984)
Acide cinnamique	<i>Nicotiana tabacum</i>	
Caryophyllène	<i>Lindera strychnifolia</i>	
Arôme de basmati	<i>Oryza sativa</i>	(Suvarnalatha et al., 1994)
Arôme de cacao	<i>Theobromo cacao</i>	(Townesley., 1972)
Flavanol	<i>Polygonum hydropiper</i>	(Nakao et al., 1999)
Ail	<i>Allium sativum</i>	(Ohsumi et al., 1993)
Monoterpènes	<i>Perilla frutescens</i>	(Nabeta et al., 1983)
Oignon	<i>Allium cepa</i>	(Prince et al., 1997)
Triterpénoides	<i>Glycyrrhiza glabra</i> <i>glandulifera</i>	Ayabe et al., 1990)
Vanilline	<i>Vanilla planifolia</i>	(Dörnenburg et Knorr., 1996)

1.6.2- Production d'arôme par voie microbienne :

Les micro-organismes ont, historiquement, joué un rôle essentiel dans l'élaboration des composants aromatiques des différents aliments. Des produits tels que le vin, le vinaigre, la bière, les légumes fermentés, le lait, le soja et la viande ont été conservés, modifiés et aromatisés à partir de souches microbiennes. Les micro-organismes peuvent synthétiser des arômes en tant que métabolites secondaires lors de la fermentation sur des nutriments tels que les sucres et les acides aminés. Des cultures microbiennes peuvent être utilisées pour produire des composés aromatiques (tableau 3), soit spécifiquement pour une application en tant qu'additifs alimentaires, soit in situ dans le cadre de processus de fermentation alimentaire (**Longo et Sanromán, 2006**)

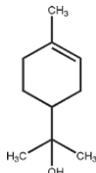
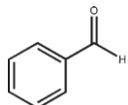
Les micro-organismes producteurs d'arômes sont omniprésents dans la nature, comme un arôme terreux du sol après la première pluie, l'odeur piquante d'une pièce humide et une odeur désagréable d'abattoir, tout cela à cause de micro-organismes omniprésents. Le premier composé aromatique, le benzaldéhyde, a été identifié comme ayant une saveur caractéristique

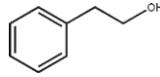
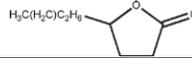
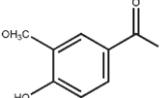
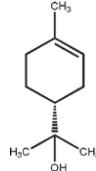
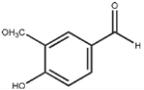
d'amande (**Krings et Berger, 1998**). L'un des concepts de la production d'arômes microbiens a été donné par **Omelianski en 1923**. Ce travail expliquait la formation de produits aromatiques agréables par l'action de micro-organismes dans certains aliments. Cela explique également le caractère changeant des micro-organismes producteurs d'arôme qui dépend d'un substrat, du temps d'incubation et de la température.

La plupart des micro-organismes produisent des composés volatils aromatiques pendant la phase stationnaire de la fermentation, ainsi les composés aromatiques sont classés comme métabolite secondaire. Les chercheurs ont constaté que la plupart des espèces fongiques produisent des arômes naturels par voie de novo (la synthèse de substances à partir de molécules élémentaires simples (sucres, acides aminés, sels azotés, minéraux))(**Braga et al., 2018 ; Priyanka et Vijay, 2019**).

Un large éventail d'espèces fongiques produit des bio-saveurs par biotransformation, des levures et des moisissures, comme le genre *Geotrichum*, produisent divers métabolites secondaires y compris les arômes, qui donnent un fort arôme fruité prononcé d'ananas. Aussi, les chercheurs ont observé d'autres champignons tel que *Ceratocystis moniliformis*, qui avait le potentiel de synthétiser plusieurs composés aromatiques tels que l'acétate d'isobutyle, l'acétate d'isoamyle, l'acétate de propyle, le géraniol et le citronellol (**Longo et Sanroman, 2006**).

Tableau 3 : Les arômes produits par voie microbienne

Substrat	Microorganisme	Produit	Structure chimique	Arôme	Référence
Limonéne	<i>Sphingobium</i> sp.	α -terpinéol		Odeur de lilas	(Molina et al., 2019)
L-phénylalanine	<i>Ischnoderma benzoinum</i> CBS 311.29	Benzaldéhyde		Arôme d'amande amère	(Fabre et al., 1996)

alcool cinnamylique	<i>Colletotrichum acutatum</i>	2-phényl éthanol		Odeur de rose	(Velasco et al., 2010)
L'acide oléique	<i>Micrococcus luteus</i>	γ -dodécalactone		Arôme de pêche et fraise	(Boratynski et al., 2020)
Acide férulique	<i>Pycnopus cinnabarinus</i>	Vanilline		Arôme de vanille	(Tilay et al., 2010)
R-(+)-limonène	<i>Fusarium oxysporum</i>	R-(+)- α -terpinéol		Odeur de lilas	(J. M. R et al., 2005)
Isoeugénol	<i>Bacillus pumilus</i>	Vanilline		Arôme de vanille	(Xu et al., 2007)

2- Généralité sur les levures :

Les levures sont des acteurs essentiels intervenant dans divers domaines du à leur intérêt, un grand nombre de levures utilisées en biotechnologie, a été obtenu à partir d'habitats naturels ou elles ont développé une faculté d'adaptation grâce à leurs propriétés physiologiques. L'ingénierie de ces levures a donc trouvé dans l'industrie un champ d'application pour produire divers métabolites comme les arômes.

2.1- *Geotrichum candidum* :

2.1.1-Taxinomie :

Identifiée pour la première fois par Link en 1809 à partir d'un échantillon de sol, l'espèce *G. candidum* a ensuite été isolée de la surface d'un lait et identifiée en 1850 par Fresenius (Wouters et al., 2002). *G. candidum* a été nommée de multiples façons, les synonymes les plus

communément utilisés étant *Oidium lactis* (Wouters et al., 2002) ou *Oospora lactis* (de Hoog et al., 2004). L'appellation *Geotrichum candidum* désigne la forme anamorphe (asexuée) de l'espèce, cette dernière se retrouvant en grande abondance dans la nature, alors que l'appellation *Galactomyces candidus* désigne la forme téléomorphe (sexuée) de l'espèce, celle-ci étant présente en bien plus faible abondance (de Hoog et al., 2004). Les formes asexuée et sexuée descendent chacune du règne des Fungi, sous le phylum des *Ascomyta*, la classe des *Hemiascomycetes* et l'ordre des *Saccharomycetales* (Tableau 4), mais diffèrent par leur famille, respectivement celle des *Candidaceae* (Eliskases-Lechner et al., 2011) et celle des *Dipodascaceae* (Pottier et al., 2008). Le genre *Geotrichum* est de fait composé de 22 espèces, celles-ci étant relativement éloignées phylogénétiquement (Eliskases-Lechner et al., 2011).

Tableau 4 : Nomenclature actuelle des *Galactomyces candidus* / *Geotrichum candidum*.

Etat téléomorphe		Etat anamorphe
	Phylum	<i>Ascomycota</i>
	Classe	<i>Hemiascomycetes</i>
	Ordre	<i>Saccharomycetales</i>
<i>Dipodascaceae</i>	Famille	<i>Candidaceae</i>
<i>Galactomyces</i>	Genre	<i>Geotrichum</i>
<i>Gal.Candidus</i>	Espèce	<i>G.candidum</i>

tat téléomorphe = forme sexuée, état anamorphe = forme asexuée (Pottier et al., 2008)

2.1.2-Répartition :

G. candidum est une espèce ubiquitaire se retrouvant dans l'eau, le sol, l'air, les céréales, le riz, le maïs et les fruits très mûrs (raisins, agrumes, tomates, bananes, concombres etc.). Ainsi, on peut retrouver cette espèce naturellement dans le lait et dans les produits laitiers (souvent ajouté comme agent d'affinage) (Boutrou et al., 2005 ; Eliskases et al., 2011 ; de Hoog et al., 2011 ; Thornton et al., 2010).

2.1.3- Caractéristiques intrinsèques générales :

G. candidum forme une colonie en présence d'oxygène (Eliskases et al., 2011) à croissance rapide à 25 °C (Eliskases-Lechner, 2002) avec un pH optimal de 5,0–5,5 (Boutrou et Gueguen, 2005), pouvant atteindre 5 à 6 cm de diamètre en 5 jours sur de la gélose de Sabouraud ou PDA. Au microscope, la croissance est caractérisée par la production d'hyphes ramifiés de manière dichotomique.

Sa croissance peut être favorisée par le D-glucose, le D-mannose, le D-xylose, le L-sorbose, le D-fructose, le D-galactose, le saccharose, le D-mannitol, le sorbitol, l'éthanol et le glycérol. Ainsi dans des milieux sans vitamines (Thornton et al., 2010). Par contre, elle est très peu tolérante au sel, sa croissance étant affectée à partir de 1-2 % de NaCl et inhibée à une concentration de 5-6 % (Eliskases et al., 2011). Enfin, *G. candidum* est une espèce qui tolère facilement de faibles concentrations en O₂ et de hautes concentrations en CO₂ (Desmaures, 2014)

2.1.4- Morphologie et activité physiologique :

G. candidum se caractérise par le phénomène de dimorphisme, c'est-à-dire le passage du stade de moisissure à celui de levure. Deux morphologies distinctes : le premier morphotype (Figure 2A) réfère à une souche de couleur crème, à l'aspect levuriforme. Cette forme se développe à une température optimale située entre 22 et 25°C, avec une croissance plus réduite à 30°C. À production abondante d'arthrospores, donnant peu de mycélium ; plutôt acidifiantes, à activité protéolytique faible (Desmaures, 2014). Le second morphotype (Figure 2B) réfère à des souches bien blanches, plus ou moins feutrées, à température optimale plus élevée (25- 30°C), à croissance plus faible à 22°C, produisant en milieux liquides des mycéliums plus importants que les souches du type 1 ; plutôt alcalinisantes, à activité protéolytique plus marquée (Desmaures, 2014). Certaines souches peuvent présenter des morphologies intermédiaires entre les deux précédentes (Desmaures, 2014).

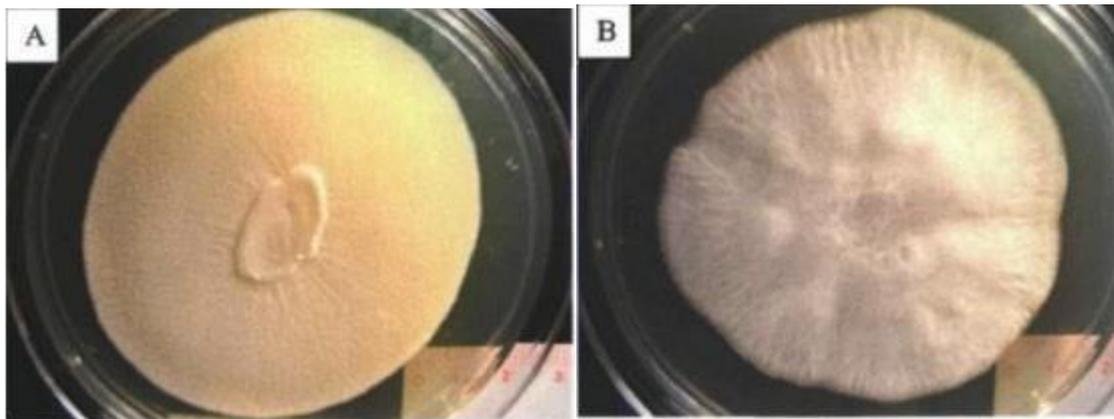


Figure 2 : Aspect des souches de *Geotrichum candidum* sur milieu gélosé YEG après 4 jours de croissance à 25 °C dans l'obscurité (Alper, 2013).

Les hyphes développés dans les colonies de *G. candidum* sont dichotomiquement ramifiées alors que les arthrospores sont formées suite à la rupture des hyphes (Figure 3), et non dû au bourgeonnement des cellules, comme c'est le cas pour plusieurs espèces de levures (Eliskases et al., 2011). Les arthrospores peuvent avoir une forme cylindrique, ellipsoïdale ou en forme de tonneau (Figure 4), et peuvent avoir des tailles très variables selon le morphotype identifié, soit de 2-6 x 3-25 µm (Eliskases et al., 2011).

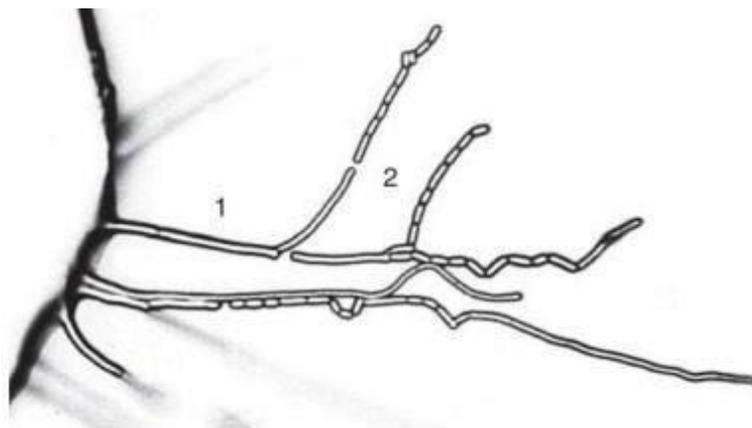
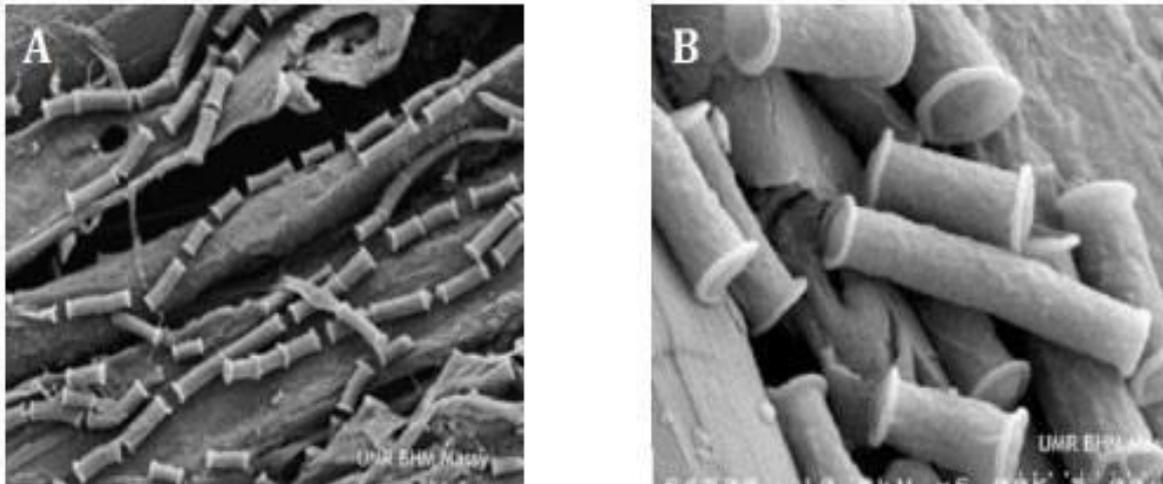


Figure 3 : Microculture de *G. candidum* à 25 °C après 17h sur milieu d'extrait de malt.

[1] Hyphes végétatives légèrement segmentées ; [2] Hyphes sporulées correspondant aux futures arthrospores (Eliskases et al., 2011).



A : *G. candidum* (cylindre) et bactéries sur la surface d'une étagère en bois d'une laiterie x1300, B : *G. candidum* et bactéries sur la surface d'un fromage de chèvre x6000

Figure 4 : Microscopie électronique à balayage de milieu contenant *G. candidum* (Mariani et al., 2007 ; Mariani et al., 2011).

Les différentes morphologies identifiées pour les souches de *G. candidum* ont déjà été associées avec leurs activités métaboliques. Les souches levuriformes ont démontré de faibles activités alcalinisantes et protéolytiques, alors que des souches filamenteuses, dont la croissance mycélienne est souvent plus prononcée, ont démontré des activités alcalinisantes et protéolytiques plus élevées (Gueguen et Jacquet, 1982).

La résistance des souches au froid a été associée à leur caractère morphologique. Les souches de type levuriforme seraient plus résistantes à des conditions à basses températures du fait qu'elles produisent moins d'hyphes (Eliskases al., 2011). Sachant qu'en industrie alimentaire les ferments sont utilisés sous forme congelée ou lyophilisée, cette caractéristique pourrait devenir un critère intéressant pour orienter le mode de sélection des souches ou du moins en tenir compte lors du traitement de congélation. L'activité physiologique des souches est associée à leurs capacités de fermentation et de croissance sous différentes conditions, démontre également une certaine diversité. L'activité physiologique de l'espèce *G. candidum* a été réalisée par de Hoog et al.,(2011) pour permettre une meilleure identification de cette espèce (de Hoog et al., 2011) (Tableau 5).

Il existe une diversité selon la morphologie des souches de *G. candidum* et leur activité physiologique, cela complique leur identification précise au niveau de l'espèce, nécessitant des tests complémentaires faisant appel à la biologie moléculaire (Gente et al., 2008 ; Lopandic et al., 2006.)

Tableau 5 : Activité physiologique décrivant l'espèce *Geotrichum candidum* (de Hoog et al., 2011).

Fermentation			
Glucose	v	Lactose	-
Galactose	-, vw	Raffinose	-
Sucrose	-	Trehalose	-
Maltose	-		
Croissance en milieu liquide			
Glucose	+	D-Ribose	-
Inuline	-	Méthanol	-
Sucrose	-	Éthanol	+
Raffinose	-	Glycérol	+
Mélibiose	-	Érythritol	-
Galactose	+	Ribitol	v
Lactose	-	Galactitol	-
Tréhalose	-	D-Mannitol	+
Maltose	-	D-Glucitol	+
Mélézitose	-	<i>myo</i> -Inositol	-

Méthyl- α -D-glucoside	-	DL-Lactate	+
Amidon soluble	-	Succinate	+
Cellobiose		Citrate	v
Salicine	-	D-Gluconate	-
L-Sorbose	+	D-Glucosamine	-
L-Rhamnose	-	<i>N</i> -Acétyl-D-Glucosamine	n
D-Xylose	+	Hexadécane	n
L-Arabinose	-	Nitrate	-
D-Arabinose	-	Sans vitamine	+
Tests de croissance additionnels			
Arbutine	-	35 °C	+
Xylitol	-	37 °C	v
D-Glucono-1,5-lactone	+	40 °C	-

+ = positif ; - = négatif ; v = variable ; w = weakly positive (faiblement positif) ; n = no data. Tableau tiré intégralement de de Hoog et Smith (**de Hoog et al., 2011**).

2.1.5- Protéolyse et catabolisme des acides aminés :

On peut définir l'activité protéolytique de *G. Candidum* comme étant l'hydrolyse des protéines et des peptides en acides aminés (Upadhyay et al.,2004), elle joue un rôle majeur dans le développement des saveurs du fromage en générant de courts peptides ainsi que des acides aminés libres qui seront éventuellement transformés en composés d'arômes (Upadhyay et al., 2004).

Elle se varie d'une souche à une autre en raison de sa morphologie, son origine (industrielle ou indigène), ou pour d'autres raisons non identifiés (Eliskases et al., 2011).

Cette activité peut être mesurée de différentes façons, par l'évaluation du niveau d'activité des enzymes (protéases) intra- et extracellulaires, ou par l'évaluation physico-chimique de la dégradation des protéines au cours du temps (dosage des peptides et/ou acides aminés libres).

Les protéinases des souches de *G. candidum* sont reconnues pour hydrolyser les caséines β et α_{s1} à des valeurs optimales de pH entre 5,5 et 6,0 (Eliskases et al., 2011).

Lors de phase de protéolyse, les aminopeptidases et les carboxypeptidases des souches de *G. candidum* dégradent les peptides de grands et moyens poids moléculaires en des peptides de plus petits poids moléculaires et en acides aminés libres, ceux-ci constituant d'importants précurseurs de composés aromatiques (Boutrou et al., 2005 ; Gente et al., 2008 ; Molimard et al., 2006).

Parmi les acides aminés libres produits par activité peptidolytique, l'acide aminé L-méthionine est le plus important de tous (Molimard et al., 2006). Ce composé est précurseur de nombreux composés soufrés volatils (CSV) responsables des arômes, le métabolisme d'autres acides aminés peut également mener à la production d'ammoniac et à celle de plusieurs composés aromatiques d'importance (Molimard et Spinnler, 1996). En effet, l'acide glutamique, l'acide aspartique, la leucine, la phénylalanine, la glutamine, l'alanine, la valine, l'isoleucine, l'arginine, la cystéine, la sérine et la thréonine sont tous des acides aminés pouvant être catabolisés par *G. candidum* (Castellote et al., 2015).

2.1.6- Lipolyse et catabolisme des acides gras :

Elles sont utilisées pour enrichir certaines huiles en acides gras polyinsaturés ou encore en acide linoléique conjugué, les lipases de *G. candidum* sont également grandement utilisées pour l'hydrolyse des lipides et la production de composés aromatiques dans les aliments, notamment les fromages (**Maldonado et al., 2017**). Comme pour l'activité protéolytique, l'activité lipolytique de *G. candidum* est spécifique à chaque souche (**Eliskases-Lechner et al., 2011**).

Les lipases de certaines souches de *G. candidum* ont ainsi démontré une spécificité pour l'hydrolyse des triacylglycérols présentant des acides gras insaturés à longue chaîne avec un double lien en position *cis*-9, notamment l'acide oléique (18:1) (**Desmaures, 2014 ; Maldonado et al., 2017**). Certaines souches vont également présenter une spécificité pour d'autres acides gras insaturés en position *cis*-9, tels que l'acide linoléique (18:2) l'acide linoléique (18:3) et l'acide palmitoléique (16:1) (**Eliskases-Lechner et al., 2011 ; Maldonado et al., 2017**), ces acides gras libres sont à eux seuls des composés importants dans le développement de l'arôme, mais ils sont également de précieux précurseurs d'arômes pour les méthylcétones, les alcools, les lactones, les acides et les esters (**Molimard et al., 1996**). La production des composés aromatiques ainsi que sa concentration est fortement dépendante de la souche de *G. candidum* utilisée (**Martin et al., 2001**).

2.1.7- Usage commercial de *G. candidum* :

G. candidum peut être utilisé dans le commerce pour ensemercer des fromages à croûte fleurie, elle colonise presque toute la surface du fromage au début de sa maturation. On le trouve sur les fromages à pâte molle comme le camembert et les fromages à pâte mi-dure tels que le saint-nectaire et le reblochon. Outre ses propriétés utiles pour les industriels laitiers, *G. candidum* a aussi été décrit comme un producteur d'arôme, déjà utilisé pour donner directement une qualité organoleptiques aux produits de fermentation (boisson, fromages, etc.). Il offre maintenant de nouvelles possibilités d'application dans la synthèse des arômes et des enzymes (**Marcellino et al., 2001**).

2.2- *Yarrowia lipolytica* :

La levure *Y. lipolytica* est une levure non pathogène qui se développe à l'état naturel dans les environnements riches en acides gras ou huiles tels que sols pollués, volailles crues, produit

laitiers, sols, les effluents et les matières riches en lipides et en protéines tels que les Yaourts, les fromages et la charcuterie. (Lanciotti et al., 2005 ; Yalcin et Ucar, 2009).

Y. lipolytica présente une importance industrielle grâce à son métabolisme à produire des métabolites tels que des protéines hétérologues (Nicaud et al., 2002), des lipides (Papanikolaou et al., 2003 ; Bankar, Kumar et al. 2009), ou de l'acide citrique (Papanikolaou et al. 2002 ; Moeller et al., 2007) et des composés aromatiques tels que l'arôme d'abricot, Noix de coco ou pêche (Romero-Guido et al., 2010) provenant de la production de γ -decalactone par l'oxydation de l'acide de ricin (Pagot et al., 1998).

2.2.1- Taxinomie et origine :

Y. lipolytica fut isolée premièrement dans les années 1940 par Diddens et Lodder, c'est un ascomycète de la famille des *Saccharomycetaceae* (sous famille des *Saccharomycetoideae*). Cette levure a été renommée de *Mycotorula* vers *Monilia*, *Torula*, puis *Pseudomonilia*, *Protéomyces*, puis *Azymoprocandida*, *Candida*, *Endomycopsis*, *Torulopsis*, *Saccharomycopsis* (Yarrow, 1972) et elle a été classé comme une espèce du genre *Candida* car aucun stade sexué n'a été observé *Candida* jusqu'à l'identification d'une forme parfaite à la fin des années 60 (Wickerham et al., 1970).

La classification hiérarchique de *Yarrowia lipolytica* est décrite dans le tableau suivant

Tableau 6 : Classification scientifique de *Yarrowia* (Van der Walt et Von Arx, 1980)

Règne	<i>Fungi</i>
Division	<i>Ascomycota</i>
Classe	<i>Saccharomycetes</i>
Ordre	<i>Saccharomycetales</i>
Famille	<i>Dipodascaceae</i>
Genre	<i>Yarrowia</i>

2.2.2-Répartition :

Y. lipolytica a été isolé à divers endroits (par exemple, résidus de fibre de maïs broyés ou égout de Paris). Souvent, ces environnements contiennent un excès de lipides, qui peuvent être

efficacement utilisés par *Y. lipolytica* comme source de carbone et d'énergie. *Y. lipolytica* est strictement aérobic (Nicaud, 2012).

2.2.3- Caractéristiques intrinsèques générales :

Y. lipolytica présente un métabolisme aérobic strict. C'est une levure mésophile qui croît entre 10 et 30°C et qui n'est pas capable de croître à 37°C (Kreger van Rij, 1984). Elle est reconnue comme un Organisme GRAS (Generally Recognized As Safe) par le FDA (American Food and Drug Administration) pour l'utilisation industrielle alimentaire et pharmaceutique. C'est une levure dimorphique qui forme des cellules bourgeonnantes, des hyphes ou des pseudos hyphes en fonction du milieu de culture, qui peuvent présenter une longueur de 3 à 5 µm et un largeur de plusieurs Millimètres sous la forme de mycélium, dépendant de la souche utilisée. L'étape de croissance peut néanmoins présenter un comportement intermédiaire (Kawasse et al., 2003).

La morphologie de *Y. lipolytica* est déterminée par des conditions environnementales tels que la source azotée, la source carbonée, le pH, la température, etc.. (RuizHerrera et Sentandreu, 2002 ; Facanha et al., 2007), ainsi que par la génétique de la souche (Richard et al., 2001), mais ces conditions varient en milieu liquide ou solide (Barth et Gaillardin, 1997).

2.2.4- la morphologie de *Yarrowia lipolytica* :

Chez *Y. lipolytica*, les hyphes peuvent présenter une longueur de 3 à 5 µm et une largeur de plusieurs millimètres sous la forme de mycélium, dépendant de la souche utilisée, les cellules apicales excèdent les 100 µm de largeur, tant que leurs segments mesurent entre 50-70 µm. L'étape de croissance peut néanmoins présenter un comportement intermédiaire (Kawasse et al., 2003).

Y. lipolytica, étant une levure aérobic stricte, n'est pas capable de croître dans de conditions anoxiques ou anaérobies, ces derniers entraînent une formation d'hyphes extrêmement longs dans le milieu de culture liquide ou solide (Figure 5) (Zinjarde et al., 1998 ; Ruiz-Herrera et Sentandreu, 2002). Des conditions de stress thermique et oxydative occasionnent aussi une formation des hyphes chez *Y. lipolytica* (Kawasse et al., 2003) résultant en une augmentation jusqu'à 25 % d'élongation par rapport aux cellules non stressées (Ruiz-Herrera et Sentandreu, 2002).

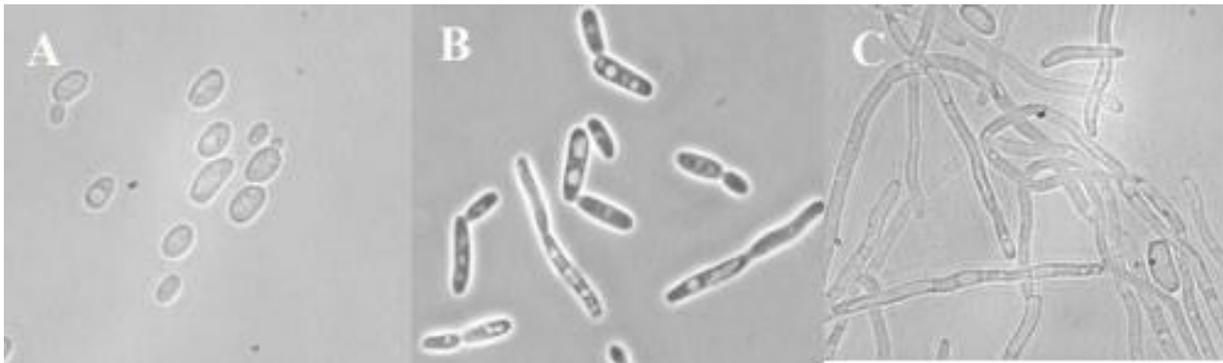


Figure 5 : Morphologie de *Y. lipolytica* lors d'une culture A : accumulation lipidique, B : phase exponentielle, C : conditions semi-anoxiques (Zinjarde et al., 1998 ; Ruiz-Herrera et Sentandreu, 2002)

2.2.5- Activité physiologique :

Yarrowia lipolytica est capable de dégrader :

- Différents hexoses tels que le glucose, le fructose et le mannose (Moeller et al., 2007 ; Lazar et al., 2011) néanmoins elle n'est pas capable de dégrader le saccharose (PereiraMeirelles et al., 1997) grâce à la présence des hexokinases et glucokinases (Hirai et al., 1976).
- Des acides organiques tels que l'acétate, lactate, propionate, malate, succinate ou citrate (Venter et al., 2004 ; Mansour et al., 2008).
- Les substrats hydrophobes tels que les alcanes, les paraffines, les acides gras ou les lipides (Crolla et Kennedy, 2001 ; Fukui et al., 2009).

2.2.6-Usage commercial de *Yarrowia lipolytica*

Dans le cadre de production des substances d'intérêt à travers d'un procédé physique, microbien ou enzymatique et comme tous les levures productrices d'arôme, *Yarrowia lipolytica* peut produire des composés aromatiques tels que l'arôme d'abricot, noix de coco ou pêche (Romero-Guido et al., 2010). Elle a un effet positif dans les profils volatils et propriétés sensorielles des saucisses séchées fermentées (Lucci et al., 2007 ; Treichel et al., 2010) ou dans le fromage Cantal (De Freitas et al., 2009) ou Feta (Bintsis et Robinson, 2004).

Elle a été utilisée pour produire des protéines à grande échelle à partir d'algues obtenues de cultures à hautes densités cellulaires (**Barth et Gaillardin., 1997**) incluant la production d'un substitut du beurre de cacao pour l'industrie alimentaire (**Papanikolaou et al., 2003**).

Matériel et méthodes

3- Matériel et méthodes :

La présente étude a été réalisée au niveau du laboratoire de Mycologie, de Biotechnologies et de l'Activité Microbienne (LaMyBAM), Université des Frères Mentouri, Constantine 1.

3.1- Matériel biologique :

La levure *Yarrowia lipolytica* a été fournie par le docteur BOUCHEDJA Naila (laboratoire d'INATAA Université Mentouri de Constantine).

La levure *Geotrichum candidum* (GEO17) a été fournie par la laiterie Safilait (Ali Mendjli n°134 Z.A.M (Zone d'Activité Multiple 25016)) sous forme lyophilisée.

3.2- Réactivation de la souche :

La levure *Yarrowia lipolytica* a été réactivée en boîte de Pétri sur milieu YPGA et incubée à 28° C pendant 48h.

La levure *Geotrichum candidum* obtenu sous forme lyophilisé a été réhydraté et réactivée en boîte de Pétri sur milieu PDA et incubée à 28° C pendant 48h.

3.3- Conservation de la souche :

Pour effectuer le reste du travail. La méthode de conservation des souches fongiques la plus utilisée et la plus simple consiste à repiquer les souches en tube sur gélose inclinées comme PDA, YPDA (figure 6). Les cultures obtenues sont par la suite incubées à 28° C pendant 3 à 4 jours pour permettre une croissance maximale puis stockées à 4°C (Karen et al., 2004).



Figure 6 : Conservation des souches *G. candidum* et *Y. lipolytica* sur gélose inclinée

3.4- Caractères cultureux et morphologiques de la souche :

3.4.1- Observation macroscopique :

L'étude de l'aspect macroscopique consiste en une observation à l'œil nu des différents caractères phénotypiques des souches tels que la taille, la texture, la couleur de la colonie et la vitesse de développement sur des milieux de culture riches et appropriés pour le développement des levures (Senanayake et al., 2020). Dans le présent travail, le milieu Yeast-Peptone-Glucose-Agar (YPGA) a été utilisé pour la souche *Y. lipolytica* et le milieu Potato-dextrose-agar (PDA) pour la souche de *G. candidum* ont été utilisés pour effectuer cette observation.

3.4.2- Observation microscopique :

L'observation microscopique des souches *G. candidum* et *Y. lipolytica* va permettre de visualiser la forme des cellules, leur arrangements ainsi que leur bourgeonnements. Cette observation a été faite à l'aide d'un microscope optique au grossissement X40.

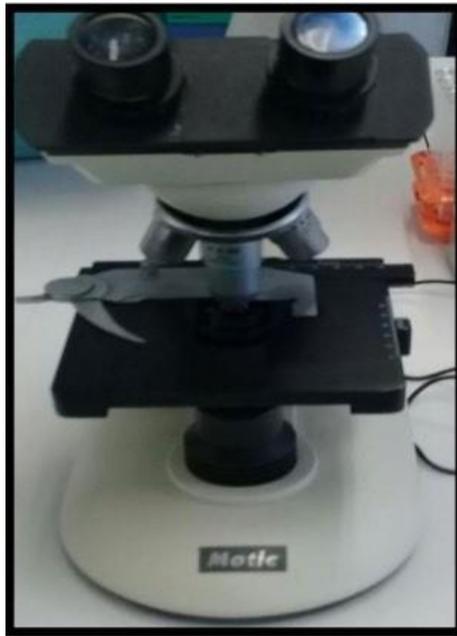


Figure 7 : Microscope Optique

3.5- Mise en évidence des activités enzymatiques :

Afin de mettre en évidence les capacités hydrolytiques extracellulaires des souches étudiées, diverses activités enzymatiques ont été recherchées :

3.5.1- La recherche de l'activité protéolytique (hydrolyse des protéines) :

La gélose au lait (lait à 20% d'agar) est utilisée pour la mise en évidence de la présence d'une activité protéolytique chez les souches fongiques (Clarke et Steel, 1966). L'ensemencement se fait par touche centrale et l'incubation est effectuée à 30°C durant 3 à 5 jours. La gélose au lait est choisie pour ses avantages tels que la simplicité dans la préparation, la richesse en protéines et son faible coût.

La dégradation de la caséine du lait se caractérise par l'observation visuelle et directe d'une zone claire et transparente autour de la colonie (Harrigan et Mccance, 1976).

L'activité est significative si le diamètre de la zone de lyse est supérieur ou égale à 3mm. Les diamètres des colonies et des zones d'hydrolyse sont quotidiennement mesurés (généralement trois jours pour les levures).

3.5.2- La recherche de l'activité cellulolytique (Hydrolyse de la cellulose) :

Le milieu carboxyméthylcellulose agar (CMC) (Annexe 5) est utilisé pour la mise en évidence de l'activité cellulolytique chez les souches testées (**Korish, 2003**). Les boîtes sont incubées à 30°C durant 3 à 5 jours.

Après croissance, les boîtes sont colorées avec une solution au rouge Congo (0.1%). Ce dernier se fixe sélectivement sur les polymères de cellulose. Après 30 minutes de réaction à température ambiante, les boîtes sont lavées avec une solution de NaCl (1M) pendant une heure. Le « rouge Congo » permet la mise en évidence de l'activité cellulolytique par l'apparition de zones claires autour des colonies productrices de cellulase (**Korish, 2003**).

3.5.3- La recherche de l'activité xylanolytique (hémicellulosique) :

Afin de détecter l'activité xylanolytique directement sur milieu solide, la souche a été repiquée sur le milieu à base de xylane de maïs (1%) (Annexe 6) (**Olaoluwa et al., 2018**), après 5 jours d'incubation à 30°C l'activité a été révélée par le colorant rouge Congo, suivi du lavage des boîtes gélosées avec du NaCl (1 M).

3.5.4- La recherche de l'activité amylolytique :

Le milieu amidon-caseine-agar (Annexe 3) est utilisé pour la mise en évidence de l'activité amylolytique. L'ensemencement se fait par touche centrale et l'incubation est effectuée à 30°C durant 3 à 5 jours.

Après croissance, les boîtes sont inondées avec une solution au Lugol. Après 30 minutes de réaction à température ambiante, les boîtes sont lavées avec une solution de NaCl (1M) pendant une heure. La dégradation de l'Amidon est révélée par la présence d'un Halo jaune autour de la colonie (**Abe et al., 2015**).

3.6- Fermentation :

La fermentation est une technique de conversion biologique de substrats complexes en composés simples par divers microorganismes. Ces composés sont appelés métabolites comme ; les antibiotiques, les peptides, les enzymes, les acides, etc (**Subramaniyam et Vimala, 2012**).

Dans le présent travail, deux tests ont été effectués en utilisant deux types de fermentation : fermentation en milieux semi-solide (FMSS) et une fermentation en milieux liquides (FML).

3.6.1- Fermentation en milieux semi-solides :

Premier essai sur la valorisation d'origine agro-alimentaire.

3.6.1.1- Matrices solides :

Afin d'adapter la FMSS, différentes matrices solides sont utilisées : la chapelure, le son de blé, la paille de blé, le riz, les flacons d'avoines, le caroubier.

En FMSS, les matrices solides utilisées servent de substrats, si ceux-ci ont des propriétés permettant la croissance microbienne, ou des supports si les substrats utilisés ne sont pas solides ou ont une structure inadaptée à la croissance. Une certaine quantité d'eau est nécessaire pour donner des conditions favorables à la croissance des microorganismes sur le substrat.

Tableau 7 : Les matrices solides et leurs compositions

Matrices solides	Composition
la chapelure	Riche en protéines, matières grasses et des sucres assimilables par les levures.
le son de blé	Ce produit est obtenu au cours des opérations de transformation du blé en farine blanche destinée à l'alimentation humaine. Constituants majoritaires : les hémicelluloses après l'amidon et la cellulose.
la paille de blé	Ce produit est obtenue lors de la récolte, elle est coupée et rejetée au champ. Elle est très riche en cellulose.
le riz	Le riz blanc est une des céréales les plus pauvres en protéines mais très riche en amidon
les flacons d'avoines	L'avoine est cultivée comme céréale à paille riche en protéines, cellulose et surtout l'amidon

le caroubier	Constitué de sucres, cellulose, hémicellulose, tanins, protéines et une teneur très élevée en fibre.
--------------	--

3.6.1.2- Préparation de l'inoculum :

Une suspension cellulaire a été préparée à partir d'une culture de 2 jours sur un milieu PDA à 28°C et de 2 jours sur un milieu YPG à 28°C, pour les souches *G. candidum* et *Y. lipolytica* respectivement. Des colonies pures ont été récoltées dans des tubes contenant de l'eau physiologique stériles pour être utilisées comme inoculum.

3.6.1.3- Comptage de cellules :

Le comptage ou la numération cellulaire est la détermination du nombre des cellules contenues dans un volume précis d'un milieu liquide. Pour ce faire ; 0.1ml de la solution cellulaire obtenue précédemment, a été déposé sur le quadrillage de la cellule de comptage Malassez. Ensuite, le comptage a été effectué selon la formule ci-dessous, puis, la concentration appropriée a été ajusté.

Nombre de cellule dans un volume donné : $N = \frac{n}{V}$

Dont : N : nombre de cellules par litres

n : nombre de cellules comptées

V : volume de comptage

Si la solution a été diluée, la formule est la suivante, sachant que f est le facteur de dilution :

$$N = \frac{n}{V} * ff$$

3.6.1.4- Milieux de fermentation :

Une journée avant l'expérience. Les sacs contenant les matrices solides ont été placés à une température ambiante (environ 22°C) pour décongélation.

Les milieux de fermentation contenant 35 % de matrices solides et 65 % d'eau distillée ont été préparés et homogénéisés à l'aide d'un mélangeur électrique. Et ensuite stérilisés avant d'effectuer l'inoculation.

3.6.1.5- Inoculation et incubation :

Les six flacons préparés ont été inoculés par 1 ml de suspension cellulaire (10^6 cellule/ml), et incubés dans un incubateur agité (KS 4000 i control) à 28°C sous une agitation de 150 rpm.



Figure 8 : Les milieux de fermentation semi-solides.

3.6.2- Fermentation en milieux liquides :

Des fermentations submergées des levures sélectionnées ont été réalisées en utilisant un milieu liquide. Ces expériences ont été effectuées afin de tester la capacité de ces souches levuriennes à se développer dans un milieu submergé et à produire des arômes.

3.6.2.1-Pré-culture :

La première pré-culture (P1) a été réalisée dans un flacon de 250 ml contenant 100 ml de bouillon de dextrose de pomme de terre (pH $5,0 \pm 0,1$), inoculé avec une suspension de *G. candidum* (1

% v/v). Ensuite, la pré-culture a été incubée pendant 48 à 72 h à 28 °C sous agitation (150 tr/min).

La deuxième pré-culture (P2) a été ainsi réalisée dans un flacon de 250 ml contenant 100 ml de bouillon de levure peptone dextrose adénine (pH $5,0 \pm 0,1$), inoculé avec une suspension de *Y. lipolytica* (1 % v/v). Cette dernière a été incubée pendant 48 à 72 h à 28 °C sous agitation (150 tr/min).

3.6.2.2- milieux de fermentation :

Deux milieux laitiers ont été utilisés pour la fermentation : le caillé et le lactosérum. En présence ou absence de l'acide aminé Méthionine comme précurseur favorisant la production d'arôme.

Les milieux de fermentation contenant 35 % de caillé / lactosérum et 65 % d'eau distillée, ont été homogénéisés à l'aide d'un mélangeur électrique. Le pH du milieu a été ajusté à $4,86 \pm 0,05$ avec du NaOH 2 N stérile. Ensuite, les milieux ont été pasteurisés au bain-marie à 60°C pendant 90 min. Ce traitement thermique modéré a été choisi pour éliminer la flore lactique présente dans le caillé sans générer de composés susceptibles d'apporter de l'arôme. Toutes les manipulations ont été réalisées sous flux laminaire avec de la verrerie stérile.

3.6.2.3- Inoculation et incubation :

Les huit flacons préparés (tableau 8) ont été inoculés par 1 ml de pré-culture (10^6 cellule/ml), ensuite incubés dans un incubateur agité à 28°C sous une agitation de 150 rpm.

Tableau 8 : Composition de milieux de fermentation liquide

Milieu de fermentation	Précurseur (méthionine)	Inoculation
Caillé	+	(P1)
	+	(P2)
	-	(P1)
	-	(P2)
	+	(P1) + (P2)
	-	(P1) + (P2)
Lactosérum	-	(P1)
	-	(P2)

(+) : L'ajout de méthionine ; (-) : L'absence de méthionine

(P1) : Pré-culture de de la souche *G. candidum* ;

(P2) : Pré-culture de la souche *Y. lipolytica*



Figure 9 : Les milieux de fermentation liquide dans l'incubateur agité

Résultats et discussions

4- Résultats et discussions :

4.1 Caractères culturels et morphologiques des souches :

4.1.1- Aspect macroscopique :

La caractérisation phénotypique des colonies (figure 10 et 11) correspondantes aux différentes souches levuriennes utilisées dans le présent travail, concernant l'aspect de la surface, la forme, l'élévation, le contour, la couleur, l'opacité, etc., est résumée dans le tableau (tableau 9):

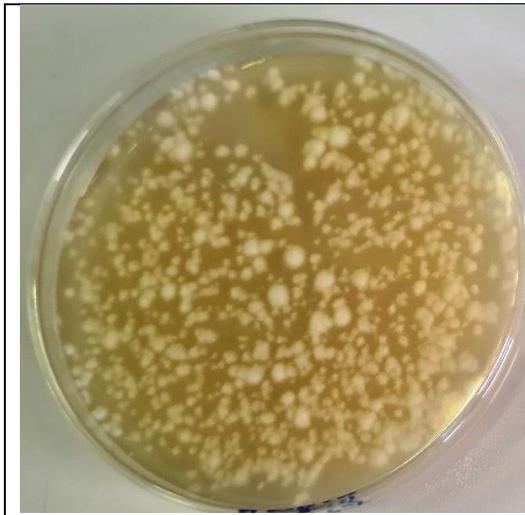


Figure 10 : Aspect macroscopique de la souche *Geotricum candidum* sur milieu PDA



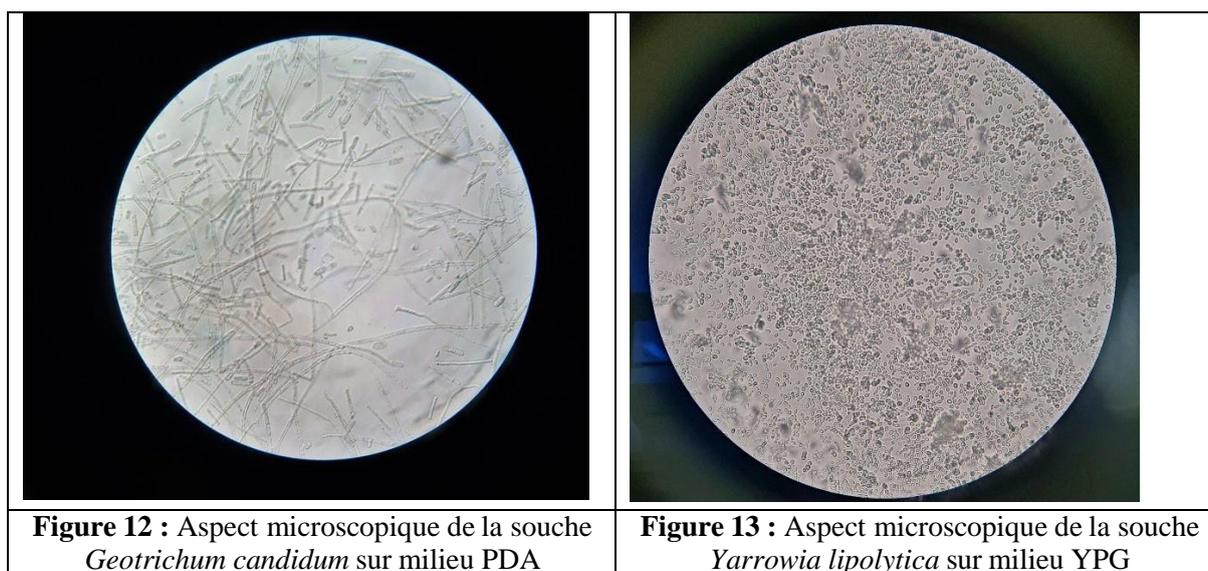
Figure 11 : Aspect macroscopique de la souche *Yarrowia lipolytica* sur milieu YPG

Tableau 9 : Description des colonies des souches cultivées su PDA et YPG.

Souche	Taille	Forme	Contour	Surface	Opacité	Élévation	Couleur	Consistance
<i>G. candidum</i>	2mm	Ronde	Régulier	Rugueuse	Opaque	Concave	Blanche	Visqueuse
<i>Y. lipolytica</i>	1mm	Tapi	Irrégulier	lisse	Opaque	Concave	Crémeuse	Visqueuse

4.1.2- Aspect microscopique :

L'observation microscopique des souches (figure 12 et 13) a permis de définir leurs forme et leurs arrangement (rectangulaire, sphérique, ronde), leur mode de division (bourgeonnement, scissiparité, bourgeonnement bipolaire), ainsi que leurs tailles cellulaires (petite, moyenne, grande).



Les résultats sont notés dans le tableau ci-dessous.

Tableau 10 : Étude microscopique des souches utilisées

	Forme de l'arrangement	Taille cellulaire	Type de division
<i>G. candidum</i>	Ellipsoïdales	Moyennes	par septation
<i>Y. lipolytica</i>	Ovales	Petites	

4.2- Mise en évidence de l'activité enzymatique :

Les résultats des tests enzymatiques des souches *G. candidum* et *Y. lipolytica* réalisés dans le présent travail sont présentés dans le tableau suivant :

Tableau 11 : Résultats des tests de mise en évidence des activités enzymatiques

	A. Amylolytique	A. Cellulolytique	A. Protéolytique	A. Xylanolytique
<i>G. candidum</i>	+	+	-	-
<i>Y. lipolytica</i>	-	-	-	-

(+) : présence d'activité ; (-) : absence d'activité

La souche *G. candidum* a montré une activité amylolytique et cellulolytique importante dû à sa morphologie et sa capacité de croître dans des milieux riches en cellulose et amidon (tableau 12), en revanche, aucune activité xylanolytique et protéolytique n'a été observée. En contrepartie, les résultats des tests enzymatiques réalisés sur la souche *Y. lipolytica* n'ont montré aucun résultat positif (tableau 13).

Tableau 12 : La mise en évidence de l'activité enzymatique de la souche *Geotrichum Candidum*

L'activité enzymatique	Interprétation	Résultats
<p>L'activité protéolytique</p>	<p>L'absence d'une zone claire et transparente autour de la colonie indique qu'il n'y avait pas une dégradation de la caséine du lait</p>	
<p>L'activité cellulolytique</p>	<p>L'apparition de zone claire autour de colonie indique qu'il y'avait une fixation sélective sur les polymères de cellulose, cela indique une activité cellulase importante autours de la colonie</p>	
<p>L'activité xylanolytique</p>	<p>L'absence d'une zone claire et transparente autour de la colonie indique qu'il n'y avait pas une dégradation de xylan</p>	

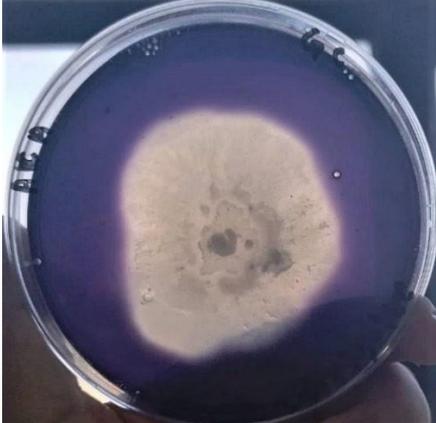
<p>L'activité amylolytique</p>	<p>La présence d'un Halo jaune autour de la colonie indique qu'il y'avait une dégradation de l'Amidon</p>	
---------------------------------------	---	--

Tableau 13 : La mise en évidence de l'activité enzymatique de la souche *Yarrowia lipolytica*

L'activité enzymatique	Interprétation	Résultats
<p>L'activité protéolytique</p>	<p>L'absence d'une zone claire et transparente autour de la colonie indique qu'il n'y avait pas une dégradation de la caséine du lait</p>	
<p>L'activité cellulolytique</p>	<p>L'absence de zone claire autour de la colonie indique qu'il n'y avait pas une fixation sélective sur les polymères de cellulose</p>	

<p>L'activité xylanolytique</p>	<p>L'absence d'une zone claire et transparente autour de la colonie indique qu'il n'y avait pas une dégradation de xylan</p>	
<p>L'activité amylolytique</p>	<p>L'absence d'un Halo jaune autour de la colonie indique qu'il n'y avait pas une dégradation de l'Amidon</p>	

4.3- Résultats de la Fermentation :

4.3.1- Fermentation en milieux semi-solide :

Les milieux de fermentation ont été préparés en mélangeant 35 % de sous-produits et 65 % d'eau. Cette concentration permet d'incorporer le maximum de sous-produits tout en conservant un milieu suffisamment liquide pour permettre une bonne agitation.

Une fois la fermentation terminée après 48 heures, l'arôme global des ferments était évalué par odorat (tableau 14).

Après seulement 24h d'incubation, les souches *G. candidum* et *Y. lipolytica* ont envahi le milieu de fermentation à base de chapelure. D'après la recherche menée par **Daigle et al., (1999)**, la souche *G. candidum* ATCC 62217 s'est avéré être un agent potentiel pour la valorisation des sous-produits de panification et a formé des composés aromatiques fruités (ananas) sur des déchets de pain fermentés (35 % de mie de pain blanc et 65 % d'eau). D'autre part, un développement moins important a été observé dans les milieux à base d'avoine et de riz ; la souche *G. candidum* a bel et bien utilisé la cellulose l'amidon comme une source de carbone et d'énergie pour son développement, et ce, est confirmé par les tests enzymatiques effectués précédemment (tableau 12).

En ce qui concerne la levure *Y. lipolytica*, il n'y avait pas un développement visuel dans les milieux de cultures semi solide, néanmoins, nous avons observé une formation d'hyphes extrêmement longs sous

microscope (figure 14) qui réfère à une forme de stressé causé par des conditions environnementales défavorables ; tels que l'absence des sources de carbones ou azotes etc.

Par ailleurs, aucun développement n'a été observé dans les milieux de fermentation à base de son de blé, la paille de blé et le caroubier. Ce qui laisse à penser que la souche n'était pas capable d'hydrolyser les polymères de cellulose et hémicellulose malgré son résultat positif sur milieu gélosé.

En effet, les principaux facteurs qui affectent la biosynthèse des composés aromatiques dans les fermentations solide ou semi-solide peuvent être divisés en trois groupes principaux : (1) les facteurs biologiques par ex. la composition de la matrice solide le choix de micro-organismes et la concentration de l'inoculum. (2) les facteurs physico-chimiques comme le taux d'humidité, l'activité de l'eau (A_w), le pH, la température et l'aération et la taille des particules ; une teneur élevée en humidité entraîne généralement une diminution de la porosité de la matrice solide, qui diminue la pénétration de l'oxygène. Cela pourrait stimuler la contamination bactérienne (Try, 2019). À l'opposé, une faible teneur en humidité peut entraîner une mauvaise croissance microbienne en raison d'une mauvaise accessibilité aux nutriments (Pandey 2003). Et (3) les facteurs mécaniques comme l'agitation.

Selon nos résultats la souche *G. candidum* (GEO17), qui est une souche commerciale utilisée en fromagerie, n'a pas la capacité de dégrader les polymères en monomères et d'assimiler et d'utiliser les sucres et les acides organiques pour produire des arômes fruités. D'après Daigle (1998), plusieurs souches sauvages de *G. candidum* isolées à partir de la microflore provenant d'exsudats d'arbres, sol etc. produisent des arômes fruités. En revanche, et selon le même auteur, les souches utilisées en fromagerie n'avaient pas cette capacité de produire les arômes. Nos résultats supportent cette hypothèse.

Pour cette raison, nous nous sommes intéressés en deuxième lieu par la production en milieux liquides (milieux laitiers), en testant des cultures combinés en présence ou absence de précurseurs.

Tableau 14 : Présence ou absence de production d'arôme dans les milieux de fermentation semi-solides par les souches *Geotrichum candidum* et *yarrowia lipolytica*.

Milieux de fermentation	<i>G. candidum</i>	<i>Y. lipolytica</i>
Chapelure	-	-
Le Riz	-	-
Le son de blé	-	-
La paille de blé	-	-
Les flacons d'avoines	-	-
Le caroubier	-	-

(+) : Présence ; (-) : Absence.



Figure 14 : Observation de *Yarrowia lipolytica* sous microscope optique dans les conditions de stress.

4.3.2- Fermentation en milieux liquides :

Les résultats présentés dans le tableau (15) sont obtenus après 72 heures de fermentation. Les ferments produits par les deux souches présentent une odeur agréable et intense.

La production d'arôme dans les milieux de fermentation à base de caillé, s'est manifestée avec différentes intensités d'odeur. En effet, le milieu inoculé avec la souche *Y. lipolytica* en présence de méthionine comme précurseur, et les milieux inoculés avec les deux souches, en présence ou absence de précurseur, ont indiqué une production d'arômes très intense.

Par contre, une odeur désagréable qui est peut-être dû à une contamination, a été perçue dans le milieu de fermentation à base de lactosérum inoculé avec la souche *G. candidum*.

D'après la recherche menée par **Cholet et al., 2008**, *Y. lipolytica* est l'une des levures les plus fréquemment isolées de la surface des fromages affinés. Cette levure est capable de convertir la L-méthionine en divers composés soufrés volatils (CSV) qui peuvent contribuer aux saveurs typiques de plusieurs fromages. En effet, sa capacité de dégrader la L-méthionine et la production des composés soufrés n'est pas associée à la présence ou l'absence de ce précurseur. La présence de *G. candidum* dans les fromages mène à la libération des enzymes comme les lipases et les protéases. L'activité de ces derniers permet de dégrader les peptides de grands poids moléculaires en acides aminés libres, ceux-ci constituant des précurseurs importants pour la production de composés aromatiques. Selon la même étude, *G. candidum* possède un fort potentiel à dégrader la L-méthionine. Suite à cette dégradation des composés tels que le MTL, le sulfure de diméthyle, le disulfure de diméthyle, le trisulfure de diméthyle sont alors produits (**Boutrou et al., 2005**)

En outre, et d'après **Martin et al., (2001)**, dans l'industrie laitière, lorsque que l'on fait entrer *G. candidum* et *Y. lipolytica* dans la flore de production des fromages, ces derniers se distinguent particulièrement par leur forte intensité aromatique et leurs notes de Munster et d'ammoniac. En effet, l'association des deux levures augmente la production de sulfure de diméthyle qui est un composé soufré servant, en très faible quantité, à donner du goût à l'aliment (**Morel, 2013**). En effet, *G. candidum* libère différents enzymes comme les lipases et les protéases. L'activité de ces dernières libère des acides gras et des peptides pouvant être métabolisés par les autres populations microbiennes, et qui, par la suite contribuent au développement des saveurs et des autres qualités du fromage (**Demarigny et al., 2000**).

Selon nos résultats, Nous avons pu détecter une production intense d'arôme de fromage dans tous les milieux de fermentation contenant le caillé lactique même en absence de précurseur, ce qui supporte les recherche des auteurs précédents.

En effet, la production des arômes était plus intense en présence de méthionine, ce qui prouve l'influence du précurseur dans l'augmentation de la biosynthèse du composé soufré. L'association de *G. candidum* et *Y. lipolytica* en présence de précurseur s'avère être le choix le plus adéquat pour une production optimale des arômes.

Tableau 15 : Résultats de milieux de fermentation liquides

Milieu de fermentation	Précurseur (méthionine)	Résultats
Caillé YL	+	+++
Caillé YL	-	++
Caillé GC	+	+
Caillé GC	-	+
Caillé YL+GC	+	++++
Caillé YL +GC	-	+++
Lactosérum GC	-	*
Lactosérum YL	-	-

(+) : Peu intense ; (++) : Intense ; (+++) : Très intense ; (-) : Absence ; (*) : Pourriture

Conclusion et perspectives

5- Conclusion et perspectives

Ce mémoire avait pour but de tester la capacité de deux souches de levures *Geotrichum Candidum* et *Yarrowia lipolytica* à produire des arômes sur milieux semi-solides, en valorisant des sous-produits et des substrats d'origine agro-alimentaire, ainsi sur des milieux liquides à base de produits laitiers.

Cette étude se résume dans les points qui suivent :

- Etude macroscopique et microscopique des souches de levures utilisées.
- Mise en évidence des activités hydrolytiques extracellulaires.
- Prospection de la production d'arôme par deux souches de levures sur différents substrats d'origine agro-alimentaire.
- Prospection de la production d'arôme par deux souches de levures sur Différents milieux fromagers liquides.

Certes, les souches levuriennes n'étaient pas capables d'hydrolyser les différents composants des sous-produits agricoles afin de produire les métabolites recherchés. En revanche, la co-culture de *G. candidum* et *Y. lipolytica* en présence de précurseur était d'une efficacité remarquable.

Néanmoins les résultats de ce modeste travail ne constituent qu'une ébauche, plusieurs points constatés nécessitent d'être approfondis :

- Optimisation du milieu de fermentation pour une production optimale d'arôme.
- Recherche d'autres sources de carbone ou d'azote pour une meilleure production d'arômes.
- Analyse des composés d'arôme acides en HPLC et les composés volatiles par CPG-SM pour une meilleure caractérisation des produits de fermentation.

Références bibliographiques

6- Références bibliographiques :

A

Abe, C., Faria, C., de Castro, F., de Souza, S., Santos, F., da Silva, C., ... Barbosa-Tessmann, I. (2015). Fungi Isolated from Maize (*Zea mays* L.) Grains and Production of Associated Enzyme Activities. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(12), 15328–15346.

Ayabe, S., Takano, H., Fujita, T., Furuya, T., Hirota, H., & Takahashi, T. (1990). Triterpenoid biosynthesis in tissue cultures of *Glycyrrhiza glabra* var. *glandulifera*. *Plant Cell Reports*, 9(4).

B

Bankar, A. V., A. R. Kumar and S. S. Zinjarde (2009) Environmental and industrial applications of *Yarrowia lipolytica*, *Applied Microbiology and Biotechnology* 84 (5), 847-865.

Barth, G. and C. Gaillardin (1997) Physiology and genetics of the dimorphic fungus *Yarrowia lipolytica*, *Fems Microbiology Reviews* 19 (4), 219-237

Barth, G. and C. Gaillardin (1997) Physiology and genetics of the dimorphic fungus *Yarrowia lipolytica*, *Fems Microbiology Reviews* 19 (4), 219-237.

Bintsis, T. and R. K. Robinson (2004) A study of the effects of adjunct cultures on the aroma compounds of Feta-type cheese, *Food Chemistry* 88 (3), 435-441.

Boratynski, F., E. Szczepanska, D. D. Simeis, S. Serra, and E. Brenna, (2020). Bacterial biotransformation of oleic acid: New findings on the formation of γ -dodecalactone and 10-ketostearic acid in the culture of *Micrococcus Luteus*,” *Molecules*, vol. 25, no. 13, p. 3024,.

Boutrou R, Gueguen M. (2005). Interests in *Geotrichum candidum* for cheese technology. *International Journal of Food Microbiology* 102:1-20.

Braga, A., Guerreiro, C., & Belo, I. (2018). Generation of Flavors and Fragrances Through Biotransformation and De Novo Synthesis. *Food and Bioprocess Technology*.

Braga, A., Guerreiro, C., & Belo, I. (2018). Generation of Flavors and Fragrances Through Biotransformation and De Novo Synthesis. *Food and Bioprocess Technology*.

C

Calín-Sánchez, Á., & Carbonell-Barrachina, Á. A. (2021). Flavor and Aroma Analysis as a Tool for Quality Control of Foods. *Foods*, 10(2), 224.

Caputi L and E. Aprea, (2011) “Use of terpenoids as natural flavouring compounds in food industry,” *Recent Patents on Food, Nutrition & Agriculture*, vol. 3, no. 1, p. 916,

Castellote J, Fraud S, Irlinger F, Swennen D, Fer F, Bonnarme P, Monnet C. 2015. Investigation of *Geotrichum candidum* gene expression during the ripening of Reblochontype cheese by reverse transcription-quantitative PCR. *International Journal of Food Microbiology* 194:54-61.

Cholet, O., Henaut, A., Hebert, A., & Bonnarme, P. (2008). Transcriptional Analysis of L-Methionine Catabolism in the Cheese-Ripening Yeast *Yarrowia lipolytica* in Relation to Volatile Sulfur Compound Biosynthesis. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(11), 3356–3367.

Christaki, E., Bonos, E., Giannenas, I., & Florou-Paneri, P. (2012). *Aromatic Plants as a Source of Bioactive Compounds. Agriculture*, 2(3), 228–243.

Clarke P.H., Steel K.J. (1966). *Rapide and simple biochemical tests for bacterial identification*. Academic press. London. pp. 111

Coelho M.A.Z., P. F. F. A., I. Belo (2010) *Yarrowia lipolytica*: and industrial workhorse, *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*

Croteau, R., & Karp, F. (1994). Origin of Natural Odorants. *Perfumes*, 101–126.

Romero-Guido, Isabel Belo, Thi Minh Ngoc Ta, Lan Cao-Hoang, Mohamed Alchihab, Nelma Gomes, Philippe Thonart, Jose A. Teixeira, Jacqueline Destain, Yves Waché (2010) Biochemistry of lactone formation in yeast and fungi and its utilisation for the production of flavour and fragrance compounds. *Applied Microbiology and Biotechnology* 89,535–547

D

Daigle Pasca.(1998). *Production de composés aromatiques par Geotrichum candidum à partir de sous-produits de boulangerie*. Université Laval

Daigle, P., Gélinas, P., Leblanc, D., & Morin, A. (1999). *Production of aroma compounds by Geotrichum candidum on waste bread crumb*. *Food Microbiology*, 16(5), 517–522.

Dastager S. G, (2009) “Aroma compounds,” *Biotechnology for Agro-Industrial Residues Utilisation*, pp. 105– 127.

De Freitas, I., PINON, N., MAUBOIS, J., LORTAL, S., & THIERRY, A. (2009). The addition of a cocktail of yeast species to Cantalet cheese changes bacterial survival and enhances aroma compound formation. *International Journal of Food Microbiology*, 129(1), 37–42.

De Hoog GS, Smith MT. (2004) . Ribosomal gene phylogeny and species delimitation in *Geotrichum* and its teleomorphs. *Studies in Mycology*:489-516.

DEMARIGNY, Y., BERGER, C., DESMASURES, N., GUEGUEN, M., & SPINNLER, H. E. (2000). Flavour sulphides are produced from methionine by two different pathways by *Geotrichum candidum*. *Journal of Dairy Research*, 67(3), 371–380.

Desmasures N. (2014). CHEESE | Mold-ripened varieties p409-415. In Tortorello ML (ed), *Encyclopedia of Food Microbiology* 2nd ed. Academic Press, Oxford

Dörnenburg, H., & Knorr, D. (1996). Production of phenolic flavor compounds with cultured cells and tissues of vanilla species. *Food Biotechnology*, 10(1), 75–92.

Drawert, F & Berger, R. G. (1984). Changes in the composition of volatiles by post-harvest application of alcohols to red delicious apples. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 35(12), 1318–1325

E

Eliskases-Lechner F, Guéguen M, Panoff JM. 2011. Yeasts and molds | *Geotrichum candidum*, p 765-771. In Fuquay JW (ed), *Encyclopedia of Dairy Sciences* 2nd ed doi:10.1016/B978-0-12-374407-4.00365-4. Academic Press, San Diego.

Eliskases-Lechner F. (2002). *Geotrichum candidum*, p 1229-1234. In Roginski H (ed), *Encyclopedia of Dairy Sciences*. Elsevier, Oxford.

F

Fabre C. E, P. J. Blanc, and G. Goma, "Production of benzaldehyde by several strains of *Ischnoderma benzoinum*," *Sciences des Aliments*, vol. 16, no. 1, pp. 61–68, 1996.

Fananha, Flávia A. Lobão, Arnaldo R., Lev A. Okorokov, Keilla R. Dutra, Anna L. Okorokova-Façanha. (2007). Aluminum impairs morphogenic transition and stimulates H⁺ transport mediated by the plasma membrane ATPase of *Yarrowia lipolytica*

Fukui, M., S. Shiomi, N. Tanuma, T. Katsuda, N. Shiomi and H. Yamaji (2009) Oil degradation in soil by a hydrocarbon assimilating yeast, *Yarrowia lipolytica*, *Journal of Bioscience and Bioengineering* 108 S93-S94

G

Genot C, C Berton, MH Ropers, D Bertrand, M Viau, (2012) - *Food Chemistry*, - Elsevier.

Gente, S., Pottier, I., Vernoux, J.P., et Gueguen, M. (2008). Safety assessment of dairy microorganisms: *Geotrichum candidum*. *International journal of food microbiology* 126, 327-332.

Gueguen M, Jacquet J. 1982. Études sur les caractères cultureux et la morphologie de *Geotrichum candidum* Link. *Le Lait* 62:625-644.

Guichard E, Salles C. (2016) Retention and release of taste and aroma compound from the food matrix during mastication and ingestion. In: Etievant P, Guichard E, Salles C, Voilley A, editors. *Flavor. From Food to Behaviors, Well-Being, and Health*. Sawston, Cambridge: Woodhead Publishing; 2016. pp. 3-22

H

Harrigan W.F. & McCance M.E. (1976). *Laboratory methods in food and dairy microbiology*. Academic press. London. P. 21-277.

Hirai, M., T. Shiotani, A. Tanaka and S. Fukui (1976) Studies on physiology and metabolism of hydrocarbon-utilizing microorganisms. 11. effects of carbon and nitrogen-sources on levels of several nadp-linked and nad-linked dehydrogenase-activities of hydrocarbonutilizable candida yeast, *Agricultural and Biological Chemistry* 40 (9), 1819-1827.

Hoog et Smith (61) de Hoog GS, Smith MT. 2011. *Galactomyces Redhead & Malloch* (1977), p 413-420. In Kurtzman CP, Fell JW, Boekhout T (ed), *The Yeasts*, 5 ed

J

J. M. R. Marostica and G. M. Pastore, (2007) "Production of R-(+)- α -terpineol by the biotransformation of limonene from orange essential oil, using cassava wastewater as medium," Food Chemistry, vol. 101, no. 1, pp. 345–350,

Jaubert J. N. (1983). Les arômes alimentaires. Que sais-je? (Ed), Les Presses Universitaires, Paris

K

Kabbaj Wafâa, (1997). Physiologie de la croissance et production d'arôme par des cultures mycéliennes de *Pleurotus* et de *Morchella* sur milieu solide. Dijon : ENSBANA, 165 p. multigr. Th. Sci. De l'Alimentation : Biotechnol., Université de Bourgogne.

Karen K. Nakasone, Stephen W. Peterson, Shung-Cchrisg Jong. (2004). Preservation and distribution of fungal cultures. Biodiversity of fungi : inventory and monitoring methods. Amsterdam : Elsevier Academic Press, 2004: Pages 37-47.

Kawasse, F. M., P. F. Amaral, M. H. M. Rocha-Leao, A. L. Amaral, E. C. Ferreira and M. A. Z. Coelho (2003) Morphological analysis of *Yarrowia lipolytica* under stress conditions through image processing, Bioprocess And Biosystems Engineering 25 (6), 371-375.

Kim, T. H., Shin, J. H., Baek, H. H., & Lee, H. J. (2001). Volatile flavour compounds in suspension culture of *Agastache rugosa* Kuntze (Korean mint). Journal of the Science of Food and Agriculture, 81(6), 569–575.

Korish M. (2003). Production, purification, properties and application of the cellulose From a wild type strain of a yeast isolate. Faculty of biology, Johannes gutenberg-University, mainz, germany

Kreger-van Rij NJW. (1984) *The Yeasts: a taxonomic study*. 3rd edn Amsterdam: Elsevier;

Krings, U., & Berger, R. G. (1998). Biotechnological production of flavours and fragrances. Applied Microbiology and Biotechnology, 49(1), 1–8.

L

Lanciotti, R., A. Gianotti, D. Baldi, R. Angrisani, G. Suzzi, D. Mastrocola and M. E. Guerzoni (2005) Use of *Yarrowia lipolytica* strains for the treatment of olive mill wastewater, Bioresource Technology 96 (3), 317-322.

Lazar, Z., E. Walczak and M. Robak (2011) Simultaneous production of citric acid and invertase by *Yarrowia lipolytica* SUC(+) transformants, *Bioresource Technology* 102 (13), 6982- 6989.

Longo MA, Sanromán MA. (2006). Production of food aroma compounds: microbial and enzymatic methodologies *Food Technology and Biotechnology* 44 (3), 335-353, 2006.

Lopandic K, Zelger S, Bánszky LK, Eliskases-Lechner F, Prillinger H. 2006. Identification of yeasts associated with milk products using traditional and molecular techniques. *Food Microbiology* 23:341-350.

Lucci, L., F. Patrignani, N. Belletti, M. Ndagijimana, M. E. Guerzoni, F. Gardini and R. Lanciotti (2007) Role of surface-inoculated *Debaryomyces hansenii* and *Yarrowia lipolytica* strains in dried fermented sausage manufacture. Part 2: Evaluation of their effects on sensory quality and biogenic amine content, *Meat Science* 75 (4), 669-675.

Ludmila Urszula Bogacz-Radomska, Jerzy Pietkiewicz. (2018). Aroma Production and Application in Food Products. *Food additives production*

M

Maldonado R, Lopes D, Aguiar-Oliveira E, Kamimura E, Macedo G. (2017). A review on *Geotrichum* lipases: Production, purification, immobilization and applications. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly* 30:439-454.

Mansour, S., J. M. Beckerich and P. Bonnarme (2008) Lactate and Amino Acid Catabolism in the Cheese-Ripening Yeast *Yarrowia lipolytica*, *Applied and Environmental Microbiology* 74 (21), 6505-6512.

Marcellino, N., Beuvier, E., Grappin, R., Gueguen, M., & Benson, D. R. (2001). Diversity of *Geotrichum candidum* Strains Isolated from Traditional Cheesemaking Fabrications in France. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(10), 4752–4759.

Mariani, C., Briandet, R., Chamba, J.F., Notz, E., Carnet-Pantiez, A., Eyoug, R.N., et Oulahal, N. (2007). Biofilm Ecology of Wooden Shelves Used in Ripening the French Raw Milk Smear Cheese Reblochon de Savoie. *Journal of Dairy Science* 90, 1653-1661

Martin N, Berger C, Le Du C, Spinnler H. 2001. Aroma compound production in cheese curd by coculturing with selected yeast and bacteria. *Journal of Dairy Science* 84:2125-2135.

Martin, N., Berger, C., Le Du, C., & Spinnler, H. E. (2001). Aroma Compound Production in Cheese Curd by Coculturing with Selected Yeast and Bacteria. *Journal of Dairy Science*, 84(10), 2125–2135.

Mdaini Naziha , Mohamed Gargouri, Mohamed Hammami, Lotfi Monser, Moktar Hamdi. (2008). Production of natural fruity aroma by *Geotrichum candidum*. *Appl Biochem Biotechnol*, 128(3):227-35

Moeller, L., B. Strehlitz, A. Aurich, A. Zehnsdorf and T. Bley (2007) Optimization of citric acid production from glucose by *Yarrowia lipolytica*, *Engineering In Life Sciences* 7 (5), 504-511.

Moeller, L., B. Strehlitz, A. Aurich, A. Zehnsdorf and T. Bley (2007) Optimization of citric acid production from glucose by *Yarrowia lipolytica*, *Engineering In Life Sciences* 7 (5), 504-511

Molimard P, Spinnler HE. 1996. Review: Compounds involved in the flavor of surface mold-ripened cheeses: Origins and properties. *Journal of Dairy Science* 79:169-184.

Molina. G, M. G. Pessôa, J. L. Bicas, P. Fontanille, C. Larroche, and G. M. Pastore, (2019) “Optimization of limonene biotransformation for the production of bulk amounts of α -terpineol,” *Bioresource Technology*, vol. 294, p. 122180,

Morel Guillaume. (2003). *La levure Geotrichum candidum : taxonomie, biodiversité et génome* Sciences. agricoles. Université Paris Sud - Paris XI, 2012. Français.

N

Nabeta, K., Ohnishi, Y., Hirose, T., & Sugisawa, H. (1983). Monoterpene biosynthesis by callus tissues and suspension cells from *Perilla* species. *Phytochemistry*, 22(2), 423–425.

Nakao, M., Ono, K., & Takio, S. (1999). The effect of calcium on flavanol production in cell suspension cultures of *Polygonum hydropiper*. *Plant Cell Reports*, 18(9), 759–763.

Nicaud JM (2012). *Yarrowia lipolytica*. *Yeast* 29(10):409-418

Nicaud, J. M., C. Madzak, P. van den Broek, C. Gysler, P. Duboc, P. Niederberger and C. Gaillardin (2002) Protein expression and secretion in the yeast *Yarrowia lipolytica*, *Fems Yeast Research* 2 (3), 371-379.

O

Ohsumi. C, A. Kojima, K. Hinata, T. Etoh & T. Hayashi (1993). Interspecific hybrid between *Allium cepa* and *Allium sativum*. *Theoretical and Applied Genetics* volume 85, pages969–975

Olaoluwa Oyedeji, Abiodun Iluyomade, Isaiah Egbewumi, Abiodun Odufuwa. (2018). Isolation and Screening of Xylanolytic Fungi from Soil of Botanical Garden: Xylanase Production from *Aspergillus flavus* and *Trichoderma viride*. *Journal of Microbiology Research* p-ISSN: 2166-5885 e-ISSN: 2166-5931 2018; 8(1): 9-18

P

Pagot Y, Le Clainche A, Nicaud J-M, Wache Y, Belin J-M (1998) Peroxisomal β - oxidation activities and γ -decalactone production by the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Appl Microbiol Biotechnol* 49(3):295-300

Pandey, A. (2003). Solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, 13(2-3), 81–84.

Papanikolaou, S., L. Muniglia, I. Chevalot, G. Aggelis and I. Marc (2003) Accumulation of a cocoa-butter-like lipid by *Yarrowia lipolytica* cultivated on agro-industrial residues, *Current Microbiology* 46 (2), 124-130.

Papanikolaou, S., L. Muniglia, I. Chevalot, G. Aggelis and I. Marc (2002) *Yarrowia lipolytica* as a potential producer of citric acid from raw glycérol, *Journal Of Applied Microbiology* 92 (4), 737-744.

Papanikolaou, S., L. Muniglia, I. Chevalot, G. Aggelis and I. Marc (2003) Accumulation of a cocoa-butter-like lipid by *Yarrowia lipolytica* cultivated on agro-industrial residues, *Current Microbiology* 46 (2), 124-130

PereiraMeirelles, F. V., M. H. M. RochaLeao and G. L. S. Anna (1997) A stable lipase from *Candida lipolytica* - Cultivation conditions and crude enzyme characteristics, *Applied Biochemistry And Biotechnology* 63-5 73-85.

Pottier, I., Gente, S., Vernoux, J.P., et Gueguen, M. (2008). Safety assessment of dairy microorganisms: *Geotrichum candidum*. *International journal of food microbiology* 126, 327-332.

Prince, C. L., Shuler, M. L., & Yamada, Y. (1997). Altering Flavor Profiles in Onion (*Allium cepa* L.) Root Cultures Through Directed Biosynthesis. *Biotechnology Progress*, 13(4), 506–510

Priyanka Roy & Vijay Kuma (2019). Production of Bioflavour from Microbial Sources and its health benefits. Department of Basic and Applied Sciences, National Institute of Food Technology Entrepreneurship and Management, Sonipat- 131 028, Haryana, India

R

Regulation (Ec) No. 1334/2008 of The European Parliament and of The Council of 16 December 2008. Retrieved from: July 23, 2018

Richard B., 1992. Connaissance de la nature des arômes alimentaires. In *Les arômes alimentaires*. Collection Sciences & Techniques Alimentaires, (Ed), Multon J. L., Tec & Doc Lavoisier, Paris, p. 22-37.

Richard, M., Quijano, R. R., Bezzate, S., Bordon-Pallier, F., & Gaillardin, C. (2001). Tagging Morphogenetic Genes by Insertional Mutagenesis in the Yeast *Yarrowia lipolytica*. *Journal of Bacteriology*, 183(10), 3098–3107.

Rocha Sílvia M, Carina Pedrosa Costa, and Cátia Martins. (2022). Aroma Clouds of Foods: A Step Forward to Unveil Food Aroma Complexity Using GC × GC

Romero-Guido, Isabel Belo, Thi Minh Ngoc Ta, Lan Cao-Hoang, Mohamed Alchihab, Nelma Gomes, Philippe Thonart, Jose A. Teixeira, Jacqueline Destain, Yves Waché (2010) Biochemistry of lactone formation in yeast and fungi and its utilisation for the production of flavour and fragrance compounds. *Applied Microbiology and Biotechnology* 89,535–547

Ruiz-Herrera J, Sentandreu R (2002) Different effectors of dimorphism in *Yarrowia lipolytica*. *Archi Microbiol* 178(6):477-483

Ruiz-Herrera, J. and R. Sentandreu (2002) Different effectors of dimorphism in *Yarrowia lipolytica*, *Archives Of Microbiology* 178 (6), 477-483

S

Scragg A. H: The Production of Aromas by Plant Cell Cultures. In: *Advances in Biochemical Engineering Biotechnology*, Vol. 55, P. Scheper (Ed.), Springer, Berlin, Germany (1997) pp. 239–263

Senanayake IC, Rathnayaka AR, Marasinghe DS, Calabon MS, Gentekaki E, Lee HB, Hurdeal VG, Pem D, Dissanayake LS, Wijesinghe SN, Bundhun D, Nguyen TT, Goonasekara ID, Abeywickrama PD, Bhunjun CS, Jayawardena RS, Wanasinghe DN³, Jeewon R, Bhat DJ, and Xiang MM. (2020). Morphological approaches in studying fungi: collection, examination, isolation, sporulation and preservation. *Mycosphere* 11(1): 2678–2754

Sharma A, P. Sharma, J. Singh, S. Singh, and L. Nain, “Prospecting the potential of agroresidues as substrate for microbial flavor production,” *Frontiers in Sustainable Food Systems*, vol. 4, no. 18, 2020

Smit G, Wouters JTM, Ayad EHE, Hugenholtz J, (2002). *Microbes from raw milk for fermented dairy*

Sowndhararajan, K., & Kim, S. (2016). Influence of Fragrances on Human Psychophysiological Activity: With Special Reference to Human Electroencephalographic Response. *Scientia Pharmaceutica*, 84(4), 724–751.

Sowndhararajan, K., & Kim, S. (2016). Influence of Fragrances on Human Psychophysiological Activity: With Special Reference to Human Electroencephalographic Response. *Scientia Pharmaceutica*, 84(4), 724–751.

Subramaniam, R. and Vimala, R. (2012) Solid State and Submerged Fermentation for the Production of Bioactive Substances: A Comparative Study. *International Journal of Science and Nature*, 3, 480-486.

Suvarnalatha, G., Narayan, M. S., Ravishankar, G. A., & Venkataraman, L. V. (1994). Flavour production in plant cell cultures of basmati rice (*Oryza sativa* L). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 66(4), 439–442.

T

Thornton CR, Slaughter DC, Davis RM. (2010). Detection of the sour-rot pathogen *Geotrichum candidum* in tomato fruit and juice by using a highly specific monoclonal antibody-based ELISA. *International Journal of Food Microbiology* 143:166-172.

Tilay . A, M. Bule, and U. Annapure, (2010) “Production of bio vanillin by one-step biotransformation using fungus *Pyconoporous cinnabarinus*,” *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 58, no. 7, pp. 4401–4405.

Townsley P. M, (1972). Chocolate from plant cells. *Cans Inst food Sci Technol J* :7 :76-78

Treichel, H., D. de Oliveira, M. A. Mazutti, M. Di Luccio and J. V. Oliveira (2010) A Review on Microbial Lipases Production, *Food and Bioprocess Technology* 3 (2), 182-196

Tripti Malik. (2021). Biotechnological Interventions for Production of Flavour and Fragrance Compounds. *Sustainable Bioeconomy* (pp.131-170)

Try Sophal. (2018). Production d’arômes par fermentation en milieu solide. *Biotechnologies*. Université Bourgogne Franche-Comté. Français.

U

Upadhyaya, V. K., Hans-Israelsenb, P. R., Sousa, M. J., Kelly, A. L., McSweeney, P. L. H. Acceleration of proteolysis during the ripening of Cheddar-type cheese made using a streptokinase-producing *Lactococcus* strain. *J. Dairy Res.*, 73, 70-73 (2006)

V

Van der Walt JP, Von Arx JA (1980) The yeast genus *Yarrowia* gen. nov. *Antonie Van Leeuwenhoek* 46(6):517-521

Velasco B. R, G. J. H. Gil, P. C. M. Garcia, and R. D. L. Durango, “Production of 2-phenyl ethanol in the biotransformation of cinnamyl alcohol by the plant pathogenic fungus *Colletotrichum acutatum*,” *Vitae*, vol. 17, no. 3, pp. 272–280, 2010.

Venter, T., J. L. F. Kock, P. J. Botes, M. S. Smit, A. Hugo and M. Joseph (2004) Acetate enhances citric acid production by *Yarrowia lipolytica* when grown on sunflower oil, *Systematic And Applied Microbiology* 27 (2), 135-138.

Verma DeepakKumar, ShaymaThyab Gddoa Al-Sahlany, AlaaKareem Niamah, MamtaThakur, SmitaSingh, DeepikaBaranwal, Ami R.Patel, GemilangLara Utama, CristobalNoe Aguilar (2021). Recent trends in microbial flavour Compounds: A review on Chemistry, synthesis

mechanism and their application in food Saudi Journal of Biological Sciences Volume 29, Issue 3, March 2022, Pages 1565-1576

W

Waché Y, Aguedo M, Choquet A, Gatfield IL, Nicaud J-M, Belin J-M (2001) Role of β oxidation enzymes in γ -decalactone production by the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Appl Environ Microbiol* 67(12):5700-5704

Werner J. Bauer, Raphaël Badoud, Jürg Löliger, Alain Etournaud. (2010). Science et technologie des aliments - principes de chimie des constituants et de technologie des procédés. PPUR Presses polytechniques

Wickerha.Lj, C. P. Kurtzman and A. I. Herman (1970) SEXUAL REPRODUCTION IN *CANDIDA LIPOLYTICA*, *Science* 167 (3921), 1141-

Wouters JTM, Ayad EHE, Hugenholtz J, Smit G. 2002. Microbes from raw milk for fermented dairy products. *International Dairy Journal* 12:91-109.

X

Xu, P., Hua, D., & Ma, C. (2007). Microbial transformation of propenylbenzenes for natural flavour production. *Trends in Biotechnology*, 25(12), 571–576.

Y

Yalcin, H. T. and F. B. Ucar (2009) Isolation and characterization of cheese spoiler yeast isolated from Turkish white cheeses, *Annals Of Microbiology* 59 (3), 477-483.

Yarrow, D. (1972) 4 New Combinations In Yeasts, *Antonie Van Leeuwenhoek Journal Of Microbiology And Serology* 38 (3), 357

Z

Zinjarde S, Pant A, Deshpande MV (1998) Dimorphic transition in *Yarrowia lipolytica* isolated from oil-polluted sea water. *Mycol Res* 102(5):553-558

Annexes

Annexe 1 : Milieu YPGA

Agar	18g
Extrait de levure	10g
Peptone	10g
Glucose.....	10g
Eau distillée	compléter jusqu'à 1000 ml
pH=7,0	

Annexe 2 : Milieu PDA

Pommes de terre	200g
Glucose.....	20g
Agar	20g
Eau distillée	compléter jusqu'à 1000 ml
pH=7,0	

Annexe 3 : Caséine amidon agar

Amidon.....	1g
Caséine	0,03g
KNO3... ..	2g
K ₂ HPO ₄	0,02g
NaCl	2g
MgSO ₄ .7H ₂ O	2g
CaCO ₃	0,05g
FeSO ₄ .7H ₂	0.01g
Agar	18g
Eau distillée	compléter jusqu'à 1000 ml
pH= 7.3	

Annexe 4 : Gélose au lait

Lait	10ml
Peptone.....	0,5g
Extrait de levure	0,1g
Glucose.....	0,1g
Agar	1,8g

Eau distilléecompléter jusqu'à 100 ml
pH= 7

Annexe 5 : CMC

CMC 1g
NaNO₃... 0,12g
KH₂PO₄... 0,3g
K₂HPO₄... 0,6g
MgSO₄... 0,02g
CaCl₂... 0,005g
MnSO₄... 0,001g
ZnSO₄... 0,0001g
Agar 1,8g
Eau distilléecompléter jusqu'à 100 ml

Annexe 6 : xylane de maïs

Xylan 1g
NaNO₃... 0,12g
KH₂PO₄... 0,3g
K₂HPO₄... 0,6g
MgSO₄... 0,02g
CaCl₂... 0,005g
MnSO₄... 0,001g
ZnSO₄... 0,0001g
Agar 1,8g
Eau distilléecompléter jusqu'à 100 ml

Annexe 7 : Rouge Congo à 0.1%

Rouge Congo 0.1g
Eau distillé..... 100ml