

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE  
SCIENTIFIQUE



UNIVERSITÉ FRÈRES MENTOURI CONSTANTINE 1  
INSTITUT DE LA NUTRITION, DE L'ALIMENTATION  
ET DES TECHNOLOGIES AGRO-ALIMENTAIRES  
(I.N.A.T.A.A.)



Département : Biotechnologies

N° d'ordre :39/DS/2022

N° de série :01/IN/2022

## Thèse de Doctorat 3<sup>ème</sup> cycle

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Biotechnologie

Thème

---

***Smen/Dhan*, beurre fermenté traditionnel : 1. Enquête sur les méthodes de préparation et de consommation actuelles en Algérie; 2. Identification du microbiote autochtone par la culture dépendante et la culture indépendante; 3. Caractérisation des composés aromatiques volatils**

---

Présentée par :

**BOUSSEKINE Rania**

Soutenu le : 09/06/2022

Devant le jury composé de :

<b>Présidente :</b>	<b>BENATALLAH Leila</b>	Professeur, I.N.A.T.A.A., Université des Frères Mentouri Constantine 1
<b>Rapporteur :</b>	<b>BARKAT Malika</b>	Professeur, I.N.A.T.A.A., Université des Frères Mentouri Constantine 1
<b>Invité :</b>	<b>BEKHOUCHE Farida</b>	Professeur, I.N.A.T.A.A., Université des Frères Mentouri Constantine 1
<b>Co- encadrant</b>	<b>MOUNIER Jérôme</b>	Professeur, Université de Bretagne Occidentale. France
<b>Examineurs</b>	<b>ARHAB Rabah</b>	Professeur, Université Larbi Ben M'hidi Oum El Bouaghi
	<b>YAHIAOUI Bilal</b>	Maître de Conférences A, Université Ferhat Abbas Sétif 1
	<b>ZERIZER Habiba</b>	Maître de Conférences A., I.N.A.T.A.A., Université des Frères Mentouri Constantine 1

## Remerciements

Je remercie Allah, qui m'a donné la force et la patience pour suivre ce chemin et pour sa promesse : avec la peine vient le soulagement.

Mes sincères gratitudee à **mes parents**, sans eux je ne suis jamais arrivée à cette étape. Ce travail est le fruit de leurs sacrifices ; chers parents merci énormément pour vos efforts et votre amour. Tous les mots ne suffiraient pas....

J'adresse mes sincères gratitudee, à ma directrice de la thèse, le **Professeur Farida BEKHOUCHE**, INATAA, Université Frères Mentouri Constantine 1, pour la proposition de la thématique, sa disponibilité, ses conseils, son aide durant mon parcours doctorale et même en période des vacances ; je la remercie également pour sa sincérité, sa compréhension et ses grandes qualités scientifiques et humaines.

Je tiens à exprimer mes remerciements les plus sincères :

A monsieur le **Professeur Jérôme MOUNIER** Co-encadrant de ma thèse, ESIAB. Université de Bretagne Occidentale (France), pour son accueil chaleureux, sa disponibilité, ses précieux conseils, ainsi de m'avoir initié les techniques et les logiciels de biologie moléculaire qui m'ont permis de mener à bien cette thèse ;

A madame le Professeur **Malika BARKAT**, INATAA, Université Frères Mentouri Constantine 1, qui en tant que ma tutrice de thèse, pour sa disponibilité, sa gentillesse ainsi pour tout l'aide qu'elle a apporté à ma thèse.

Au Professeur **Emmanuel COTON** directeur du Laboratoire Universitaire de Biodiversité et Ecologie Microbienne (LUBEM), qui m'a permis de réaliser mes stages dans son laboratoire ;

A Madame **Stella DEBEATS**, Technicienne de recherche au sein du LUBEM pour son assistance à ma formation en biologie moléculaire, sa disponibilité, son écoute et sa gentillesse. Mes remerciements vont également à Madame **Monika Coton** Maître de Conférences-HDR, Université de Bretagne Occidentale Brest, pour sa disponibilité durant mon séjour au LUBEM, ses conseils et son aide scientifique.

J'exprime aussi mes vifs remerciements au **Professeur Leila BENATALLAH**, INATAA, Université Frères Mentouri Constantine 1, d'avoir accepté de présider le jury.

Je tiens également à remercier tous les examinateurs du jury d'avoir accepté d'évaluer mon travail et de m'honorer par leurs participations :

Monsieur le **Professeur Rabah ARHAB**, Université Larbi Ben M'hidi Oum El Bouaghi ;

Monsieur **Bilal YAHIAOUI**, Maître de Conférences A., Université Ferhat Abbas Sétif 1 ;  
**Madame Habiba ZERIZER**, Maître de Conférences A., Université des Frères Mentouri  
Constantine 1,

Mes remerciements vont également aux personnes qui m'ont aidé à réaliser l'enquête sur le terrain, et me faciliter l'accès aux informations nécessaires :

Mes collègues doctorants : **Loubna DJOUZA**, **Yakoub YAHI**, **Salim MEDDOUR**, **Hadda GUEHEF**, Université Kasdi Merbah Ouargla, pour leurs aides, leurs disponibilités et leurs accompagnements dans les zones rurales de la région de Ouargla ;

La population enquêtée notamment celles de la wilaya de Ouargla, pour leurs contributions à ce travail, leurs accueils chaleureux et leurs générosités ;

Les ménages qui nous ont fourni gratuitement les échantillons de *Smen/Dhan* ;

Le laitier de la région de Sétif, qui nous a permis d'accéder à sa laiterie et d'utiliser son matériel, ainsi pour sa contribution à la préparation de l'échantillon de beurre.

Je suis très reconnaissante envers le personnel du Laboratoire BIOQUAL, notamment Madame **Oulaya GHENAY**, Ingénieur au sein du BIOQUAL, pour son aide, sa gentillesse et sa disponibilité.

Mes collègues doctorantes de l'INATAA : **Wissem BOUTANA**, **Kaouther SAHLI**, **Sana MANSOURI** et **Fatima-Zohra MAKHLOUF**, pour leurs bonnes humeurs, leurs soutiens et leurs aides scientifiques.

Je tiens à remercier : **Narimane ZAABAR** et **Yasmina REGUIG**, pour leur accompagnement durant mon séjour à Brest, leur soutien, présence, bonne humeur et l'encouragement qu'on m'a accordé.

J'exprime également mes vifs remerciements aux personnels de l'ESIAB et LUBEM, pour leurs accueils chaleureux, leurs bonnes humeurs, leurs gentillesse, et leurs aides : **Marie-Hélène THOMAS**, **Sylvie TREGUER**, **Audrey PAWTOWSKI**, **Christophe LE MEUR**, **Marielle LE GUEN** ;

Le doctorant **Vincent VISCONTI** pour sa gentillesse, sa bonne humeur, son aide et sa disponibilité (tu étais le meilleur collègue de bureau) ;

Et également aux doctorants : **Océane SAVARAY**, **Mélanie CHOTARD**, **Bastien COCHEREAU** et **Franky NODEM**, pour leurs esprits d'équipes et leurs aides scientifiques.

Un remerciement particulier à mon très cher époux qui a toujours été là pour moi, surtout dans les moments difficiles : ta présence, ton soutien, ta patience et tes sacrifices m'ont

accompagné jusqu'à la fin de la thèse. Je te dois mes sincères respects et ma profonde reconnaissance.

*Une chose est sûre ; c'est que le bon Dieu  
récompense l'être humain pour son travail bien  
fait*

# Tables des matières

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations

<b>Introduction générale</b> .....	1
<b>Synthèse bibliographique</b> .....	5
<b>I. Fermentation empirique des produits alimentaires traditionnels</b> .....	6
I.1. Introduction.....	6
I.2. Fermentation des aliments .....	6
I.3. Importance des aliments fermentés .....	7
I.4. Produits laitiers fermentés .....	7
I.4.1. <i>Raib</i> .....	8
I.4.2. Beurre traditionnel ( <i>Zebda</i> ).....	9
I.4.3. <i>Smen/Dhan</i> .....	11
I.4.4. <i>Smen</i> et produits similaires à travers le monde .....	13
<b>II. Microflore du lait et des produits laitiers</b> .....	16
II.1. Microflore du lait et activité métabolique.....	16
II.2. Microflore des produits laitiers .....	18
II.2.1. Microbiologie <i>du Raib</i> .....	18
II.2.2. Microbiologie du beurre.....	18
II.2.3. Microbiologie du <i>Smen/Dhan</i> .....	19
II.3. Bactéries lactiques et importance des bactéries lactiques dans la fermentation laitière...	20
II.4. Levures .....	23
<b>III. Méthodes d'identification des communautés microbiennes</b> .....	24
III.1. Techniques de culture-dépendantes.....	25
III.1.1. Isolement et identification phénotypique des microorganismes.....	25
III.1.2. Identification génotypique.....	26
III.2. Techniques de culture-indépendantes.....	30
III.2.1. Evolution des technologies de séquençage de nouvelle génération.....	31
III.2.2. Séquençage de seconde génération.....	31
III.2.3. Traitement bioinformatique des données.....	36
III.2.4. Mesure de la biodiversité microbienne.....	38
<b>Etude expérimentale</b> .....	41
<b>Chapitre I. Beurre traditionnel, <i>Smen/Dhan</i>, investigation, production et consommation actuelles en Algérie</b> .....	42
1. Introduction.....	43
2. Matériel et méthodes.....	43
2.1. Déroulement de l'enquête.....	43
2.2. Collection des données .....	44
2.3. Contenu du questionnaire .....	44
2.4. Difficultés rencontrées au cours de l'enquête.....	45
2.5. Analyse statistique.....	45
3. Résultats.....	46
3.1. Caractéristiques de la population étudiée et lien avec la préparation du <i>Smen/Dhan</i> .....	46
3.2. Place du produit dans la culture locale.....	46
3.3. Procédés traditionnels de préparation de <i>Smen/Dhan</i> .....	47
3.3.1. Matière première utilisée.....	48
3.3.2. Coagulation du lait.....	48

3.3.3. Préparation du beurre.....	48
3.3.4. Préparation du <i>Smen/Dhan</i> .....	49
3.4. Conditionnement, maturation et stockage.....	52
3.5 Consommation de <i>Smen/Dhan</i> .....	53
4. Discussion.....	53
5. Conclusion.....	55
<b>Chapitre II. Analyse physicochimique et microbiologique des échantillons de <i>Smen/Dhan</i> collectés auprès des ménages et ceux prélevés durant sa préparation traditionnelle</b> .....	56
1. Introduction.....	57
2. Matériel et méthodes.....	57
2.1. Echantillonnage.....	57
2.1.1. Echantillons collectés auprès des ménages.....	57
2.1.2. Echantillons prélevés durant la préparation traditionnelle du <i>Smen/Dhan</i> .....	58
2.2. Caractérisation des paramètres physicochimiques.....	60
2.2.1. pH.....	60
2.2.2. Humidité.....	60
2.2.3. Indice d'acide.....	61
2.2.4. Taux de sel.....	61
2.2.5. Acidité Dornic (°D).....	61
2.3. Analyse microbiologique.....	62
2.3.1. Préparation des échantillons .....	62
2.3.2. Evaluation de la qualité hygiénique et sanitaire .....	62
2.3.3. Dénombrement et isolement des bactéries lactiques et des levures.....	65
3. Résultats.....	67
3.1. Caractérisation physicochimique et évaluation de la qualité hygiénique des échantillons collectés auprès des ménages.....	67
3.1.1. Physicochimie.....	67
3.1.2. Qualité sanitaire et hygiénique.....	67
3.1.3. Dénombrement et isolement des bactéries lactiques et des levures.....	69
3.2. Caractérisation physicochimique et évaluation de la qualité hygiénique des échantillons prélevés au cours de la préparation du <i>Smen</i> .....	70
3.2.1. Physicochimie.....	70
3.2.2. Evaluation de la qualité hygiénique et dynamique des BL et des levures.....	70
4. Discussion.....	73
5. Conclusion.....	74
<b>Chapitre III. Identification de la biodiversité des échantillons de <i>Smen/Dhan</i> collectés et ceux prélevés durant la préparation traditionnelle, par l'application des techniques de culture-dépendantes et indépendantes</b> .....	75
1. Introduction.....	76
2. Matériel et Méthodes.....	76
2.1. Echantillons étudiés.....	76
2.2. Diversité des BL et des levures par les techniques de culture dépendantes.....	77
2.3. Identification de la diversité microbienne par la technique de culture indépendante (metabarcoding).....	82
2.4. Analyse bioinformatique et phylogénétique.....	85
2.5. Biodiversité et analyse statistique.....	86
3. Résultats.....	87
3.1. Diversité microbienne des échantillons de <i>Smen/Dhan</i> collectés.....	87

3.1.1. Bactéries lactiques et levures identifiées par les techniques de culture dépendantes.....	87
3.1.2. Diversité microbienne identifiée par les techniques de cultures indépendante.....	92
3.2. Diversité microbienne des échantillons prélevés durant la préparation du <i>Smen</i> .....	99
3.2.1. Bactéries lactiques et des levures identifiées par les techniques de cultures dépendante.....	99
3.2.2. Diversité microbienne identifiées par les techniques de culture indépendantes.....	104
4. Discussion.....	111
5. Conclusion.....	116
<b>Chapitre IV. Analyse des composés volatils par espace de tête chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (HS-GC/MS).....</b>	<b>117</b>
1. Introduction.....	118
2. Matériel et méthodes.....	118
2.1. Préparation des échantillons.....	118
2.2. Extraction des composés volatils.....	119
2.3. Analyse des composés volatils par HS-GC-MS.....	119
2.4. Traitement des données et identification des composés volatils.....	120
2.5. Analyse statistique.....	120
2.6. Analyse des corrélations entre les composés volatils et le microbiote autochtone de <i>Smen/Dhan</i> .....	120
3. Résultats.....	121
3.1. Profile en composés volatils des échantillons de <i>Smen/Dhan</i> et de beurre frais.....	121
3.2. Analyse statistique des données obtenues sur les 15 échantillons de smen collectés.....	125
3.2.1. Analyse en composantes principales des données.....	125
3.2.2. Classification hiérarchique des données sous forme d'une carte thermique.....	126
3.3. Analyse statistique des données obtenues pour le beurre frais et au cours la maturation du <i>Smen/Dhan</i> .....	128
3.3.1. Analyse en composantes principales des données.....	128
3.3.2. Classification hiérarchique des données sous forme d'une carte thermique.....	130
3.3.3. Recherche des corrélations entre les composés volatils et le microbiote autochtone de <i>Smen</i> .....	132
4. Discussion.....	135
5. Conclusion.....	139
<b>Conclusion générale et perspectives.....</b>	<b>140</b>
<b>Références bibliographiques.....</b>	<b>142</b>
<b>Publications et communications Scientifiques.....</b>	<b>158</b>
<b>Annexes.....</b>	<b>I-XXVII</b>
<b>Résumés</b>	

## Liste des figures

<b>Figure 1.</b> Différentes étapes de préparation de certains produits laitiers traditionnels en Algérie et au Maghreb .....	8
<b>Figure 2.</b> Lipolyse et catabolisme des acides gras libres .....	13
<b>Figure 3.</b> Schéma représentant le mécanisme de production d'arôme du beurre clarifié....	14
<b>Figure 4.</b> Origine du flux microbien du lait dans les lieux de productions laitières.....	17
<b>Figure 5.</b> Voies fermentaires de la dégradation du glucose.....	22
<b>Figure 6.</b> Modèle du métabolisme protéolytique et lipolytique des bactéries lactiques .....	22
<b>Figure 7.</b> Techniques d'identifications des communautés microbiennes selon les approches de culture-dépendantes et de culture-indépendantes.....	24
<b>Figure 8. A :</b> Schéma de l'ADNr 16S des procaryotes représentant les 9 régions variables et les régions conservées.....	28
<b>Figure 9. A:</b> Principe du séquençage selon la technique de Sanger; <b>B:</b> Profil de migration après électrophorèse capillaire .....	29
<b>Figure 10.</b> Principales étapes communes de séquençage de deuxième génération .....	32
<b>Figure 11.</b> Schémas représentatifs des différentes étapes du pyroséquençage selon la technologie ROCHE 454 GS FLX .....	33
<b>Figure 12.</b> Schéma représentant les cycles de séquençage de la technologie SOLID.....	34
<b>Figure 13.</b> Schéma représentant l'approche de séquençage par Technologie Illumina .....	36
<b>Figure 14.</b> Carte géographique des régions où l'enquête s'est déroulée.....	44
<b>Figure 15.</b> Différents outils utilisés pour le barattage du <i>Raib</i> (a : Chekoua traditionnelle en peau de chèvre, b1 et b2 : baratte traditionnelle en bois, c : baratte électrique).....	49
<b>Figure 16.</b> Diagramme des deux méthodes utilisées par les ménages (A) et illustrations correspondantes aux étapes des préparations traditionnelles du <i>Smen/Dhan</i> (B).....	52
<b>Figure 17.</b> Etapes de préparation traditionnelle du <i>Smen/Dhan</i> .....	60
<b>Figure 18.</b> Aspect macroscopique et microscopique de quelques isolats de BL sur gélose MRS, des échantillons de <i>Smen</i> collectés.....	69
<b>Figure 19.</b> Aspect macroscopique et microscopique de quelques isolats de levures sur gélose SAB, des échantillons S2 et S3 .....	69
<b>Figure 20.</b> Dénombrements microbiens (UFC/g ou/mL) dans les échantillons prélevés durant la préparation du <i>Smen</i> .....	71
<b>Figure 21.</b> Aspect macroscopique et microscopique de quelques isolats de BL sur gélose MRS, obtenus de quelques échantillons prélevés au cours de la préparation du <i>Smen</i> .....	72
<b>Figure 22.</b> Aspect macroscopique et microscopique de quelques isolats de levures sur gélose SAB, obtenus de quelques échantillons prélevés au cours de la préparation du <i>Smen</i> .....	72
<b>Figure 23.</b> Plan présentant les points de prélèvements des échantillons, durant la préparation traditionnelle de <i>Smen/Dhan</i> .....	77
<b>Figure 24.</b> Protocole d'extraction de l'ADN des isolats de BL et de levures.....	78
<b>Figure 25.</b> Profils électrophorétiques de certains isolats de BL résultant de la RAPD-PCR en utilisant l'amorce M13.....	87
<b>Figure 26.</b> Dendrogrammes (A et B) des résultats de la RAPD-PCR des BL isolées des échantillons de <i>Smen/Dhan</i> collectés. contrôles.....	88
<b>Figure 27.</b> Dendrogramme du résultat de la RAPD-PCR des levures isolées des échantillons collectés (Echantillons S2 et S3), .....	89
<b>Figure 28.</b> Produits d'amplification PCR des gène de l'ARNr 16S (A) et D1-D2 de l'ARN 26S (B) de quelques souches sur gel d'agarose à 0,8 % (m/v).....	90

<b>Figure 29.</b> Diversité des bactéries lactiques dans les échantillons de <i>Smen</i> collectés par l'application des techniques de culture dépendantes.....	91
<b>Figure 30.</b> Diversité des levures identifiées dans les échantillons de <i>Smen</i> collectés par l'application des techniques de culture dépendantes.....	92
<b>Figure 31.</b> Diversité des espèces bactériennes des échantillons de <i>Smen/Dhan</i> collectés et identifiées par métabarcoding.....	94
<b>Figure 32.</b> Analyse des coordonnées principales (PCoA) basée sur la distance de Bray-Curtis pour les données métabarcoding de la région V3-V4 de l'ARNr16S des échantillons de <i>Smen</i> collectés.....	95
<b>Figure 33.</b> Taxons bactériens représentatifs de chaque échantillon de <i>Smen</i> collecté, selon le test LEfSE au niveau d'OTUs, genres et espèces, sur la base des données de séquençage du métabarcoding V3-V4.....	95
<b>Figure 34.</b> Diversité des espèces fongiques des échantillons de <i>Smen/Dhan</i> collectés et identifiées par métabarcoding de la région ITS2.....	98
<b>Figure 35.</b> Analyse des coordonnées principales (PCoA) basée sur la distance de Bray-Curtis pour les données métabarcoding de la région ITS2 des échantillons de <i>Smen</i> collectés.....	99
<b>Figure 36.</b> Taxons fongiques représentatifs selon le test LEfSE, sur la base des données de séquençage du métabarcoding ITS2, des échantillons de <i>Smen</i> collectés.....	99
<b>Figure 37.</b> Dendrogrammes du résultat de la RAPD-PCR en utilisant l'amorce M13 des BL isolés.....	100
<b>Figure 38.</b> Dendrogramme (A et B) du résultat de la RAPD-PCR des levures isolées en utilisant l'amorce M13.....	101
<b>Figure 39.</b> Diversité des bactéries lactiques des échantillons prélevés durant la préparation du <i>Smen/Dhan</i> par l'application des techniques de culture dépendantes.....	102
<b>Figure 40.</b> Diversité bactérienne des échantillons prélevés durant la préparation du <i>Smen/Dhan</i> par métabarcoding des régions V3-V4 de l'ARNr16S.....	104
<b>Figure 41.</b> Diversité bactérienne des échantillons prélevés durant la préparation du <i>Smen/Dhan</i> par métabarcoding des régions V3-V4 de l'ARNr16S.....	108
<b>Figure 42.</b> Diversité fongique des échantillons prélevés durant la préparation du <i>Smen/Dhan</i> par métabarcoding de la région ITS2 de l'ARNr 26S.....	111
<b>Figure 43.</b> Cartes des facteurs individuels (A) et variables (B) de l'analyse en composantes principales de 81 composés aromatiques volatils, des 15 échantillons collectés de <i>Smen/Dhan</i> .....	126
<b>Figure 44.</b> Représentation de la carte thermique de l'abondance des substances volatiles dans les différents échantillons. Le regroupement hiérarchique a été effectué en utilisant la liaison de Ward et la distance euclidienne. ....	128
<b>Figure 45.</b> Cartes des facteurs individuels (A) et variables (B) de l'analyse en composantes principales de 81 composés aromatiques volatils identifiés au cours de la maturation du <i>Smen/Dhan</i> .....	130
<b>Figure 46.</b> Représentation de la carte thermique de la dynamique des composés volatils au cours de la maturation du <i>Smen</i> . Le regroupement hiérarchique a été effectué en utilisant la liaison de Ward et la distance euclidienne.....	132
<b>Figure 47.</b> Matrice de corrélation de Spearman entre la diversité microbienne et les composés volatils identifiés au cours de la maturation du <i>Smen</i> .....	134

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1.</b> Composition physicochimique moyenne du <i>Raib</i> .....	9
<b>Tableau 2.</b> Teneur moyenne de différents composants du beurre .....	10
<b>Tableau 3.</b> Composition chimique du <i>Smen</i> et du beurre fermier frais .....	12
<b>Tableau 4.</b> Composition en acides gras du <i>Smen</i> , exprimée en % en poids des acides totaux.....	12
<b>Tableau 5.</b> Beurre traditionnel fermenté préparé à travers le monde .....	15
<b>Tableau 6.</b> Caractéristiques des différentes techniques du séquençage de deuxième génération.....	36
<b>Tableau 7.</b> Structure sociodémographique des 880 personnes enquêtées.....	46
<b>Tableau 8.</b> Répartition de la population enquêtée selon la connaissance, la fabrication, la consommation et l'achat de <i>Smen/Dhan</i> dans différentes régions d'Algérie.....	47
<b>Tableau 9.</b> Principales caractéristiques des échantillons de <i>Smen/Dhan</i> collectés auprès des ménages résidant dans 7 wilayas.....	58
<b>Tableau 10.</b> Propriétés physicochimiques et dénombrement des différents groupes microbiens (UFC/g) dans les échantillons de <i>Smen/Dhan</i> collectés auprès des ménages.....	68
<b>Tableau 11.</b> Caractéristiques physicochimiques des échantillons prélevés au cours de la préparation du <i>Smen</i> .....	70
<b>Tableau 12.</b> Composition du milieu réactionnel de la PCR-RAPD.....	79
<b>Tableau 13.</b> Composition du milieu réactionnel de la PCR de l'ARN16S.....	80
<b>Tableau 14.</b> Composition du milieu réactionnel de la PCR des régions D1/D2 de l'ARNr26S.....	81
<b>Tableau 15.</b> Composition du milieu réactionnel de la PCR des régions V3-V4 de l'ARNr16S.....	84
<b>Tableau 16.</b> Composition du milieu réactionnel de la PCR ITS2.....	85
<b>Tableau 17.</b> Indices d'alpha-diversité des communautés bactériennes des échantillons de <i>Smen</i> collectés.....	93
<b>Tableau 18.</b> Indices d'alpha-diversité des communautés fongiques des échantillons de <i>Smen</i> collectés.....	97
<b>Tableau 19.</b> Indices d'alpha-diversité des communautés bactériennes des échantillons prélevés durant la préparation du <i>Smen/Dhan</i> .....	106
<b>Tableau 20.</b> Indices d'alpha-diversité des communautés fongiques des échantillons prélevés durant la préparation du <i>Smen/Dhan</i> .....	109
<b>Tableau 21.</b> Composés organique volatils identifiés dans les échantillons collectés de <i>Smen</i> .....	122

## Liste des abréviations

**°C:** Degré Celsius

**ACP:** Analyse en Composantes Principales

**ADN:** Acide désoxyribonucléique

**ARN:** Acide ribonucléique

**ATP:** Adenosine triphosphate

**Aw:** Activity water

**BL:** Bactéries lactiques

**CCD:** Charge Coupled Device

**COV:** Composés Organique Volatils

**DA:** Dinar Algérien

**DNase:** Désoxyribonucléase

**DDGE:** Denaturing Gradient Gel Electrophoresis

**EDTA:** Éthylène Diamine Tétra-Acétique

**FROGS:** Find, Rapidly, OTUs with Galaxy Solution

**Gb:** Gigabase

**GRAS:** Generally Recognized As Safe

**HCl:** Acide Chlorhydrique

**Hz:** hertz

**MRS:** de Man Rogosa and Sharpe

**NGS:** Next Generation Sequencing

**nm:** Nanomètre

**NSLAB:** Non-Starter Lactic Acid Bacteria

**OTU:** Operational Taxonomic Unit (Unité Taxonomique Opérationnelle)

**pb:** paires de bases

**PCA:** Plate count agar

**PCoA:** Principal Coordonate Analysis (Analyse en coordonnées principales)

**PCR:** Polymerase Chain Reaction

**RAPD:** Random Amplified Polymorphic DNA (Amplification aléatoire d'ADN polymorphe)

**SSCP:** Single Strand Conformation Polymorphism

**TTGE:** Temporal Temperature Gradient Gel Electrophoresis

**VBNC:** Viable but non-cultivable cells (Cellules Viables Non Cultivables)

# *Introduction générale*

Les aliments traditionnels fermentés ont été consommés depuis l'antiquité et constituent toujours une part importante de la culture culinaire de nombreuses populations à travers le monde et en particulier dans les pays en voie de développement. (Humblot et Guyot, 2008 ; El Sheikha et Hu, 2018 ; Owusu-Kwarteng *et al.*, 2020). La fermentation alimentaire traditionnelle est un savoir-faire artisanal qui est développé et transmis à travers les générations, afin de conserver les aliments et améliorer leurs valeurs nutritionnelles et prolonger la durée de conservation des matières premières (Blandino *et al.*, 2003 ; Shoustra *et al.*, 2013).

Il est bien connu que la fermentation des aliments inclue une large gamme de processus microbiologique et enzymatique (Giraffa, 2004). Plusieurs études ont montré que la microflore autochtone contenue naturellement dans les aliments, participent potentiellement dans les transformations technologiques et organoleptiques. Sa biodiversité évolue en fonction de l'environnement et son adaptation aux conditions de la fermentation (Guessas *et al.*, 2012 ; Valence et Thierry 2015 ; Merabti *et al.*, 2015). La compréhension de la diversité microbienne des aliments aiderait à orienter la qualité de la fermentation et permettrait la création de starters pour une fermentation des aliments contrôlées (Diaz *et al.*, 2019).

La préparation traditionnelle de nombreux aliments fermentés locaux reste un savoir-faire spécifique à chaque région. Ces aliments sont souvent produits au sein des ménages ou dans des petites entreprises de type artisanales. Ils sont élaborés à partir d'une variété de matières premières locales d'origine végétale et/ou animale ; donnant naissance à une grande diversité de produits qui doivent avoir un intérêt scientifique particulier avec l'objectif de mieux les connaître, maîtriser leurs qualités sanitaires et hygiéniques et enfin identifier le microbiote autochtone et les composés organoleptiques. Leur développement implique aussi de développer des connaissances sur le patrimoine culturel qu'ils représentent ainsi que sur le savoir-faire associé à leur production.

Les produits laitiers fermentés sont très populaires et appréciés par le consommateur vu leurs simples formulations. Le lait représente un milieu très favorable à la croissance de plusieurs groupes de microorganismes ; sa richesse en nutriments, micronutriments et son pH neutre le rend très périssable surtout dans un environnement chaud et en absence de la chaîne du froid. Pour cette raison plusieurs méthodes ont été développées pour le conserver plus longtemps sous des formes plus stable (Hutkins, 2006 ; Abd-El Salam et Benkerroum, 2006 ; Puniya, 2015).

En Algérie une grande variété de produits laitiers fermentés sont préparés traditionnellement, ces produits font partie de l'héritage algérien et ont une grande importance

culturelle, médicinale et économique. Parmi ces préparations, le *Smen/Dhan* est un beurre fermenté naturellement obtenu avec du beurre fermier (non pasteurisé), dont la fermentation peut durer de quelques mois jusqu'à plusieurs années, en fonction de la température, de l'humidité et du lieu de stockage (Kacem et Karam, 2006 ; Guessas *et al.*, 2012). C'est un produit du terroir et non labellisé en Algérie. Il est fabriqué au niveau des ménages selon un savoir-faire transmis par les générations. Le *Smen/Dhan* est très apprécié par le consommateur algérien pour ses qualités gustatives (riche en arôme) et agrmente les plats traditionnels, également il est exploité en médecine traditionnelle (Sakili et Issoual, 2003). Le *Smen/Dhan* est fabriqué selon un procédé traditionnel qui reste inexploité au niveau artisanal et industriel et est loin d'être parfaitement connu. Une meilleure connaissance de ce produit tant sur l'aspect savoir-faire, technologique, physico-chimique que microbiologique présente donc un intérêt scientifique pour une meilleure maîtrise de ses qualités sanitaires et organoleptiques mais aussi à terme pour sa valorisation avec le label type appellation d'origine contrôlée (AOC) et le développement de sa production à une échelle artisanale voire industrielle.

Plusieurs études ont caractérisé ce produit sur l'aspect microbiologique et physicochimique (El Marrakchi *et al.*, 1987 ; Triqui et Guth, 2001 ; Bensalah *et al.*, 2011 ; Guessas *et al.*, 2012 ; Iradukunda *et al.*, 2018 ; Labtar *et al.*, 2019 ; Sarhir *et al.*, 2020). Cependant aucune étude n'a traité de façon approfondie la diversité microbienne en couplant les deux techniques de culture dépendantes et de culture indépendantes ; leurs applications vont permettre de comprendre la dynamique des microorganismes autochtones et d'identifier ceux impliqués dans le processus de la fermentation et l'obtention du produit fini.

La présente étude s'inscrit dans le cadre d'un projet Européen ProMedFoods : « Promotion of local Mediterranean fermented foods through a better knowledge and management of microbial resources ». Par conséquent les objectifs de ce travail sont :

- Une meilleure connaissance des pratiques ancestrales associées à la préparation du *Smen/Dhan* via notamment la localisation des zones productrices et la description du processus de préparation spécifique à chaque région ;
- Caractérisation physico-chimique et évaluation de la qualité sanitaire et hygiénique de ce produit ;
- Identification moléculaire de la diversité taxonomique et la dynamique microbienne associée à la fabrication du *Smen* ;
- Caractérisation des composés organiques volatils responsables des arômes.

La présente étude est articulée autour de deux volets qui sont structurés chacun en plusieurs parties. Le premier volet consiste en une synthèse bibliographique qui comprend trois parties ; la première partie décrit l'importance des aliments traditionnels et les types des produits laitiers et particulièrement *Smen/Dhan* Algérien. La deuxième et la troisième partie sont consacrées, respectivement, au microbiote des aliments laitiers fermentés et aux méthodes moléculaires de caractérisation des communautés microbiennes dans les différentes matrices alimentaires.

Le second volet est une étude expérimentale qui est présentée en quatre chapitres :

- Le chapitre 1 : concerne une investigation de *Smen/Dhan* sur le terrain par le biais d'une enquête auprès de 880 ménages au niveau 7 wilayas d'Algérie ;
- Le chapitre 2 comporte la présentation des échantillons de smen de cette étude, des analyses microbiologiques classiques et physicochimiques effectuées ;
- Le chapitre 3 se rapporte à l'identification moléculaire de la biodiversité microbienne par l'application des techniques de culture dépendantes et indépendantes ;
- Enfin, le chapitre 4 concerne l'analyse des composés aromatiques volatils des différents échantillons de *Smen* par espace de tête-chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrophotométrie de masse (HS-GC-MS).

# *Synthèse bibliographique*

## **I. Fermentation empirique des produits alimentaires traditionnels**

### **I.1. Introduction**

Depuis l'antiquité, les aliments traditionnels qui sont liés à un territoire ou un lieu d'origine particulier, contribuent aux apports énergétiques et nutritionnels des populations à travers le monde. Leur préparation est réalisée au sein des ménages selon un savoir-faire traditionnel transmis à travers des générations ; avec différentes méthodes d'utilisations (salage, fumage et séchage, saumurage) et dont le processus de la fermentation est directement intégré pour obtenir un produit fini (Blandino *et al.*, 2003 ; Pieniak *et al.*, 2009 ; Shoustra *et al.*, 2014). Les aliments traditionnels fermentés représentent l'une des composantes les plus importantes de la culture culinaire humaine avec un tiers de l'alimentation mondiale (El Sheikha et Hu, 2020). Ils se définissent comme des aliments avec une identité culturelle spécifique et qui se différencient par des aspects texturaux et organoleptiques particuliers en fonction des caractéristiques microbiologiques, biochimiques et physico-chimiques qui leur ont été attribués (Pieniak *et al.*, 2009 ; Behera *et al.*, 2018 ; Loratal *et al.*, 2020).

### **I.2. Fermentation des aliments**

L'utilisation de la fermentation par l'homme a débuté de façon empirique, sans avoir la moindre conscience de l'existence et du rôle des microorganismes dans ces transformations. C'est Lavoisier qui au début du 19<sup>ème</sup> siècle décrit la fermentation alcoolique comme « *une division du sucre en alcool et en CO<sub>2</sub>* », mais sans explication mécanistique. En 1787, Adamo Fabbroni introduisit l'hypothèse de la présence d'une substance vivante dans le moût qui a conduit à une fermentation alcoolique. Toutefois en 1865, Pasteur a démontré l'implication des microorganismes et définit la fermentation comme : « *la vie sans air* ». Dès lors, Pasteur a appliqué un chauffage modéré aux matières premières afin d'éviter les défauts de fabrication. Ce traitement a porté son nom « *la pasteurisation* », qui est une étape clé de sécurisation des procédés fermentaires. Au début du 19<sup>ème</sup> siècle des changements radicaux ont été abordés dans le processus de la fermentation avec l'utilisation des ferments et des cultures contrôlées à l'échelle industrielle (Lortal, 2015).

La fermentation alimentaire est une transformation métabolique de substrats (composés organiques) en absence d'oxygène, sous l'action des microorganismes ou des enzymes conduisant à des transformations de la matière première en produit plus simple et stable, c'est une technique ancestrale utilisée par les anciens peuples afin de sécuriser l'approvisionnement en nourriture, en allongeant la durée de conservation des matières premières, d'en améliorer les goûts et les textures et parfois même les rendre simplement comestibles alors qu'elles ne

l'étaient pas avant (Lortal, 2015 ; Behera *et al.*, 2018 ; Lortal *et al.*, 2020). Ils existent deux types de produits fermentés : les produits fermentés naturellement par la flore autochtone présente dans la matière première (fermentation spontanée) ; et ceux obtenus par fermentations contrôlés en utilisant des starters. Sur la base de la matière première utilisée (animale/végétale), les aliments traditionnels fermentés peuvent être classés en : produits laitiers, produits carnés, produits céréaliers, aliments fermentés à base de légumes, poissons et fruits (Tamang, 2010 ; Tamang *et al.*, 2017 ; Lortal *et al.*, 2020).

### **I.3. Importance des aliments fermentés**

Les aliments fermentés ont des particularités uniques, sur le plan microbiologique et biochimique, qui en font réellement une famille d'aliments à part. Au cours de la fermentation, des métabolites spécifiques sont générés par la microflore autochtone, soit par synthèse ou par hydrolyse des composants de la matière première (sucres, protéines, lipides...). L'activité des microorganismes peut également réduire la toxicité de la matière première en dégradant par exemple des composants toxiques et anti-nutritionnels (modification des allergènes). La dégradation des macromolécules engendre la modification du pH, potentiel redox, Aw et la production de certains acides organiques, des composants antimicrobiens conduisant à la conservation et à la prolongation de la durée de vie de la matière première. Ils possèdent des activités antioxydante, antimicrobienne, et peuvent contenir des probiotiques qui préservent la santé gastro-intestinale. Ils peuvent également améliorer la digestibilité de certains glucides, protéines ainsi ils favorisent la biodisponibilité de certaines vitamines et minéraux (El shiekha et Hu, 2018 ; Lortal *et al.*, 2020).

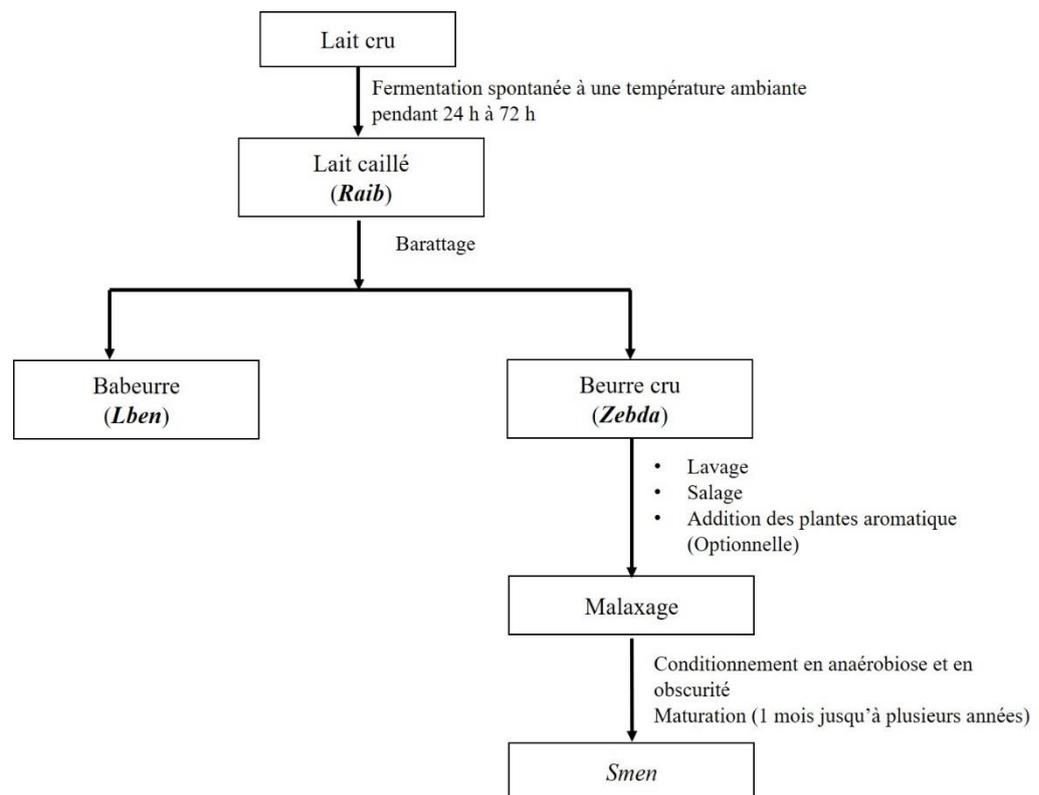
Les techniques de la fermentation indigènes ont permis de créer un catalogue d'aliments fermentés régionaux, avec des caractéristiques uniques. L'acceptabilité de ces aliments par les consommateurs se repose sur les éléments suivants : la détérioration des caractéristiques sensorielles indésirable ; l'ajout de la saveur et de l'odeur ; l'amélioration de la texture ; et la production des couleurs désirables (El shiekha et Hu, 2018).

### **I.4. Produits laitiers fermentés**

La fermentation artisanale, a été initialement utilisée pour l'obtention des produits laitiers fermentés et ensuite s'est étendue aux autres aliments. Le lait, vu sa simple formulation (riche en source de carbone, d'azote, sucres, vitamines, minéraux etc..), constitue un milieu favorable à la croissance de la majorité des microorganismes. Il est difficile de maintenir le lait à son état frais, dans les environnements chauds et en absence du matériel de refroidissement (Hutkins, 2006 ; Zagorec *et al.*, 2012 ; Puniya, 2015). De ce fait, plusieurs techniques ont été

développées afin de le transformer sous une forme qui permet de le conserver plus longtemps. Les produits laitiers préparés traditionnellement donnent des produits avec des saveurs typiques et des qualités nutritionnelles de plus en plus recherchées par le consommateur (Leksir et Chemmam, 2015 ; Derouiche *et al.*, 2016 ; Leksir *et al.*, 2019).

En Algérie et dans le Maghreb en général, la consommation du lait et des produits laitiers occupe une place importante dans la ration alimentaire. Parmi, les produits laitiers les plus consommés nous citons : *Raib* (lait fermenté), *Lben* (babeurre), *zebda* (beurre cru), *Smen* ou *Dhan* (beurre rance), et autres variétés de fromages (Leksir et Chemmam, 2015).



**Figure 1.** Différentes étapes de préparation de certains produits laitiers traditionnels en Algérie et au Maghreb (Benkerroum et Tamime, 2004).

#### I.4.1. *Raib*

*Raib* est un produit laitier fermenté populaire préparé par fermentation spontanée du lait. Il est produit et consommé largement dans de nombreux pays méditerranéens et subsahariens (Algérie, Maroc, Tunisie, Soudan, Egypte). Le lait cru de vache, de chèvre ou de brebis ou de buffle (Egypte) est fermenté spontanément à une température ambiante pendant 24 h jusqu'à 72h, suite à l'action des microorganismes indigènes qui favorisent la diminution du pH et la coagulation des protéines du lait. *Raib* est généralement consommé tel qu'il est, comme une boisson fraîche ou accompagné avec certains plats traditionnels, tels que le *couscous*. Il est

considéré comme un co-produit pour la production d'autres produits laitiers traditionnels (Mechai et Kirane 2008 ; Abdelgawad *et al.*, 2010 ; Bendimerad *et al.*, 2012 ; Samet-Bali *et al.*, 2016, Lekcir *et al.*, 2019).

Certaines études ont rapporté que le *Raib* est un produit à valeur nutritionnelle importante (Tableau 1) et considéré également comme un produit probiotique qui contient des bactéries vivantes bénéfiques à la santé (Benkrroum et Tamime, 2004 ; Samet-Bali et Attia, 2012 ; Debbabi *et al.*, 2018).

**Tableau 1.** Composition physicochimique moyenne du *Raib* (Samet-Bali *et al.*, 2012).

Paramètres	<i>Raib</i> (g/kg)
Matière sèche	115,28 ± 0,31
Azote total	32,81 ± 0,45
Caséines	26,11 ± 0,61
Graisse	34,10 ± 0,66
Lactose	30,60 ± 0,38
Cendre	7,87 ± 0,05
Acide lactique	6,44 ± 0,11
Composés volatils	Valeurs (mg/L)
Ethanol	866,87 ± 18,36
Acétaldéhyde	38,05 ± 3,35
Diacetyl	43,62 ± 5,73
Acétoïne	762,40 ± 33,24
<b>pH</b>	4,45 ± 0,04

#### I.4.2. Beurre traditionnel (*Zebda*)

Le beurre est la matière grasse du lait (Luquet et Corrieu, 2005) ; sa préparation traditionnelle est effectuée par barattage du *Raib*. Le processus du barattage consiste à séparer les particules de la matière grasse, par des mouvements mécaniques afin de permettre l'agglomération de la matière grasse. Traditionnellement le barattage est réalisé dans un sac en peau (chèvre, brebis), appelé *Chekoua* en Algérie et en pays de Maghreb ; *Kerbah* en Egypte ; cependant, en Turquie, ils utilisent un tonneau en bois rotatif appelé *Yayik*. Actuellement ces outils traditionnels, sont progressivement remplacés par des barattes électriques. Le barattage peut durer de 45 min jusqu'à 60 min. A la fin, deux phases apparaissent, l'une est liquide, appelé Babeurre (*Lben*) et l'autre est solide, appelé le beurre (*zebda*). Les grains de beurre qui flottent à la surface du mélange sont retirés à l'aide d'une cuillère ou d'une louche perforée puis lavés plusieurs fois afin de se débarrasser des traces du *Lben*, qui favorise l'altération du beurre (Benkerroum et Tamim, 2004 ; Ozcan *et al.*, 2016).

Le beurre représente une source importante d'énergie, il est largement utilisé dans la cuisine, il possède également des propriétés médicinales et laxatives, comme il peut être utilisé

en cosmétique (huile capillaire), même pour atténuer les maux de la tête (Berhe *et al.*, 2013 ; Gemechu et Talo, 2017).

### **Composition du beurre**

Le beurre est considéré comme un aliment énergétique riche en matière grasse, il contient environ 82% de la matière grasse laitière (acides gras et glycérol). Les acides gras sont répartis en : 63% d'acides gras saturés (palmitique, myristique, butyrique), 26% d'acides gras monoinsaturés (oléique) et 3,7% d'acides gras polyinsaturés (acide linoléique). Ces acides gras sont indispensables à la croissance et au bon fonctionnement du cerveau et du système nerveux central. Il contient également 0,1% des glucides, 0,9% des protéines, 2,1% des cendres et 15,9% d'eau. Le beurre représente une bonne source de vitamines et de  $\beta$ -carotène, il constitue la source alimentaire naturelle la plus riche en vitamine A. Sur le plan énergétique, la consommation de 50 g du beurre peut satisfaire chez l'adulte 15% des besoins caloriques et en outre de 20 à 50% en vitamine A et 15 à 20% des besoins en vitamine D (FAO, 1995 ; Angers, 2010 ; Kwak *et al.*, 2013).

**Tableau 2.** Teneur moyenne de différents composants du beurre (FAO, 1995).

<b>Composants</b>	<b>Unités</b>	<b>Beurre</b>
Protéines	g	7
Glucides	g	7
Minéraux	g	1,2
Lipides	g	832
Calcium	g	0,16
Phosphore	g	0,2
Sodium	g	0,06
Potassium	g	0,2
Magnésium	mg	0,02
Zinc	mg	2,0
Manganèse	mg	0,4
Fer	mg	0,9
Cuivre	mg	0,15
Fluor	mg	1,3
Iode	mg	1,3
Chrome	mg	0,15
Sélénium	$\mu$ g	3,0

### I.4.3. *Smen/Dhan*

C'est un beurre fermenté préparé par des méthodes empiriques, à partir du beurre fermier (non pasteurisé), dont la fermentation peut durer de quelques mois jusqu'à plusieurs années, en fonction de la température, de l'humidité et du lieu de stockage (Kacem et Karam, 2006 ; Guessas *et al.*, 2012). Il pourra être défini comme, un beurre rance, obtenu suite d'un salage du beurre cru (8% à 10%) et mûri dans des conditions anaérobies (Benkerroum *et al.*, 2013). *Smen/Dhan* est très apprécié par le consommateur pour ses qualités gustatives (riche en arôme), il est utilisé pour agrémenter certains plats traditionnels et exploitée en médecine traditionnelle (Sakili et Issoual, 2003 ; Iradukunda, *et al.*, 2018, Boussekine *et al.*, 2020).

Le surplus du beurre est transformé en *Smen* pour le préserver à long terme. Le beurre cru est lavé plusieurs fois afin de se débarrasser des traces de *Lben* résiduel qui provoque l'altération durant la période de la maturation et ensuite salé avec (8 à 10 g de sel/100 g de beurre) et conditionné dans un pot, qui est entièrement rempli et bien compacté afin d'éviter l'entrée d'air. Le récipient est ensuite conservé dans un endroit frais (15-18°C) en obscurité, pendant 3 à 6 mois (Benkerroum et Tamime, 2004).

#### *Composition chimique du Smen*

En termes de composition (Tableaux 3) le *Smen* a des valeurs d'humidité faibles et un pH acide et des concentrations élevées en acides gras et en NaCl. Au cours de la maturation, le beurre salé subit des changements physicochimiques et microbiologiques conduisant à sa transformation en *Smen* (riche en arôme). La lipolyse, est considérée comme le principal mécanisme du processus de la maturation, elle peut résulter principalement par des lipases microbiennes entraînant des modifications majeures sur le goût, l'arôme et les caractéristiques rhéologiques de *Smen* (Benkerroum et Tamime, 2004). La dégradation de la matière grasse conduit à une augmentation progressive des acides gras libres : les acides gras à courte chaîne (C<sub>4</sub>-C<sub>10</sub>) sont libérés préférentiellement, en particulier l'acide butyrique, suivi des acides gras insaturés avec une attaque plus rapide de l'acide oléique (C<sub>18:1</sub>). Les acides gras saturés sont libérés en dernier (C<sub>12</sub>-C<sub>20</sub>). Au sein de cette fraction, les acides myristique et palmitique dominent (El Marrakchi *et al.*, 1986 ; Benkerroum et Tamime, 2004). Précédemment, il a été considéré que les acides gras à courtes chaînes (acides butanoïque et hexanoïque) sont les clés odorantes de la saveur traditionnelle du *Smen* (Triqui et Guth, 2001), cependant des études récentes ont montré que d'autres composés peuvent être également impliqués y compris : les acides carboxyliques, les esters, les cétones, les composés azotés et les terpènes. Parmi ces composés, le butanoate d'éthyle, le lactate d'éthyle, l'hexanoate d'éthyle, l'acide butanoïque et l'acide hexanoïque représentant les principaux odorants puissants de *Smen*,

avec respectivement : des odeurs fruitées de rose, de lactosérum crémeux, de fruits mûrs, de fromage affiné et de beurre rance/savonneux (Iradukunda *et al.*, 2018 ; Sarhir *et al.*, 2020).

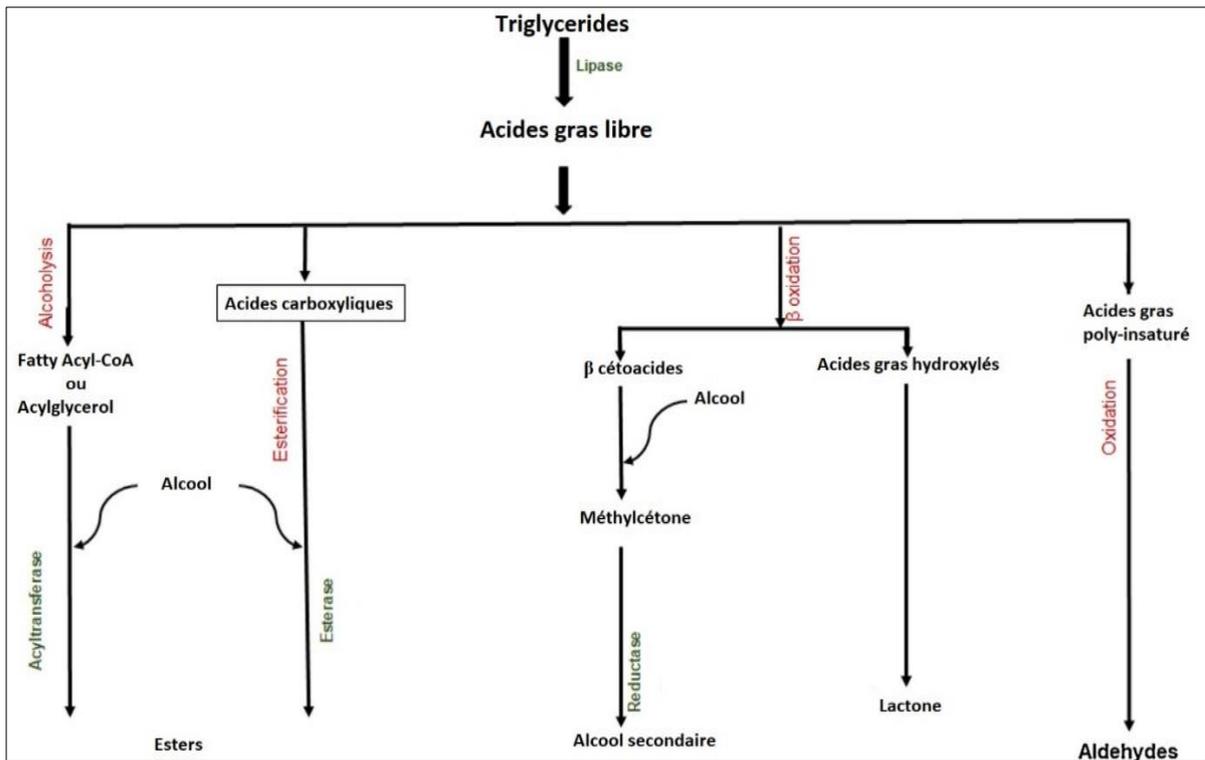
**Tableau 3.** Composition chimique du *Smen* et du beurre fermier frais (El Marrakchi *et al.*, 1986).

Composants	<i>Smen</i> <sup>1</sup>	Beurre fermier frais
Matière grasse totale <sup>+</sup>	81,34	73,69
Eau <sup>+</sup>	13,7	23,3
Extrait sec non gras <sup>+</sup>	4,96	3,01
Chlorure de sodium <sup>+</sup>	1,5	0,01
Chlorure de sodium <sup>++</sup>	8,0	0,036
Lactose <sup>++</sup>	1,22	3,48
Protéines <sup>++</sup>	3,25	5,60
Insaponifiable <sup>+++</sup>	0,33	0,30
Stérols :		
En % de l'insaponifiable	47,03	42,22
En % M.G.T.	0,15	0,12
Indice d'acide	52,34	2,37
Indice de peroxyde (meq/kg)	3,67	0,53

<sup>1</sup> : moyenne des essais ; + : exprimé en % du smen ; ++ : exprimé en % du non gras ; +++ : exprimé en % de la matière grasse totale (M.G.T.).

**Tableau 4.** Composition en acides gras du *Smen*, exprimée en % en poids des acides totaux (El Marrakchi *et al.*, 1986).

	Acides gras totaux				Acides gras libres			
	<i>Smen</i>		Beurre salé	Beurre fermier frais	<i>Smen</i>		Beurre salé	Beurre fermier frais
	X	Valeurs extrêmes			X	Valeurs extrêmes		
C <sub>4</sub> : 0	2,43	0,8-3,7	2,9	2,9	0,45	0,2-1,6	0,3	0,3
C <sub>6</sub> : 0	1,75	0,8-2,2	1,9	1,9	0,85	0,2-5,0	0,3	0,4
C <sub>8</sub> : 0	1,16	0,6-1,8	1,5	1,5	1,15	0,2-5,0	0,5	0,7
C <sub>10</sub> : 0	2,82	2,4-3,8	2,8	2,7	3,47	1,6-9,0	1,8	2,5
C <sub>10</sub> : 1	0,21	0,1-0,4	0,3	0,2	0,30	T-0,9	0,2	0,2
C <sub>12</sub> : 0	3,27	2,9-4,6	4,0	2,9	3,60	1,8-8,7	3,3	2,7
C <sub>14</sub> : 0	10,95	7,9-14,1	13,3	11,5	10,5	5,3-16,6	10,8	9,8
C <sub>14</sub> : 1	1,38	0,6-2,6	2,2	1,6	1,88	0,4-4,8	1,6	1,6
C <sub>15</sub> : 0	1,2	0,8-1,8	1,3	1,4	1,27	0,6-2,7	1,4	0,9
	28,40	24,5-30,3	26,5	30,7	25,89	16,6-32,4	30,1	19,6
C <sub>16</sub> : 0	1,82	0,9-2,4	0,8	2,2	4,40	1,7-14,5	2,6	2,0
C <sub>16</sub> : 1	12,90	8,7-15,9	13,5	14,7	11,95	3,8-24,5	14,8	18,1
C <sub>18</sub> : 0	27,77	21,9-32,2	25,1	22,5	29,03	16,3-43,1	28,1	31,9
C <sub>18</sub> : 1	2,92	0,9-6,2	1,4	2,2	2,90	T-5,5	2,2	4,2
C <sub>18</sub> : 2	1,86	0,7-3,6	2,1	1,3	2,41	T-4,1	1,7	3,7
C <sub>20</sub> : 0+ C <sub>18</sub> : 3								



**Figure 2.** Lipolyse et catabolisme des acides gras libres (Sarhir *et al.*, 2020).

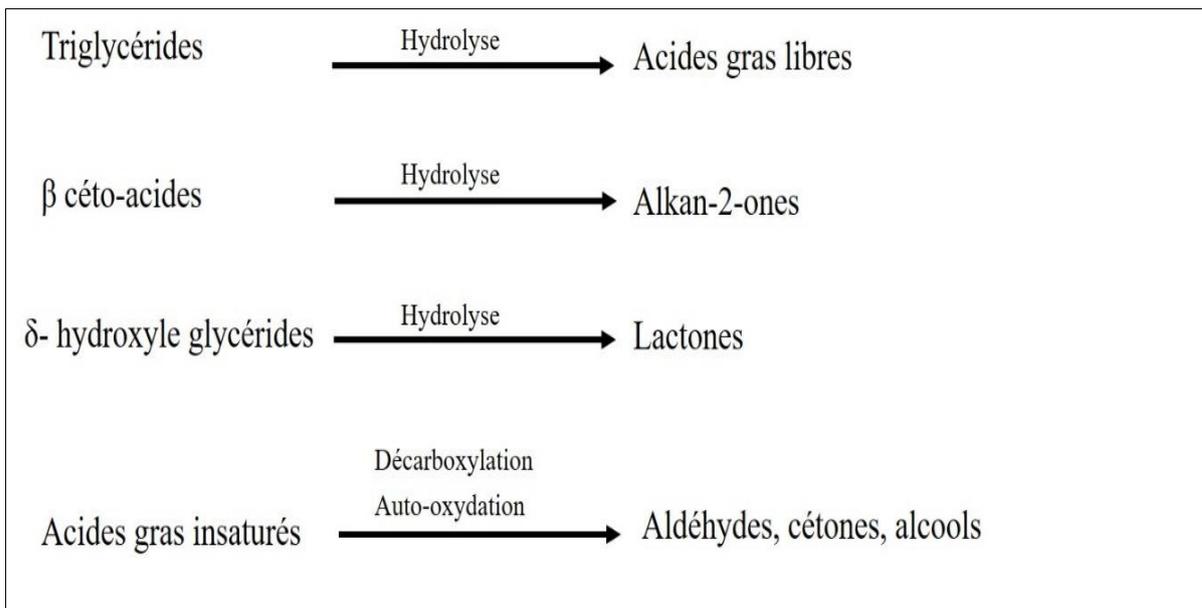
#### I.4.4. *Smen* et produits similaires à travers le monde

Plusieurs méthodes de préservation traditionnelles du beurre ont été développées à travers le monde, ces techniques ont par principe de réduire l'humidité et de diminuer l'acidité du beurre.

##### a. *Conservation par traitement thermique*

Le principe de cette technique consiste à éliminer l'eau et les autres constituants solides non gras et de conserver la matière grasse uniquement ; c'est une méthode de préservation utilisée largement dans plusieurs pays. En Algérie, l'appellation *Smen* ou *Dhan* est dédiée au beurre mature provenant du lait de vache, de chèvre ou de brebis, par contre *Shmen* a pour origine le lait de chamelle, le *Ghee* est produit en Ethiopie et en Inde, *Samn* en Tunisie, *Samna* en Egypte et *Samin* en Soudan. Ces produits sont fabriqués selon des méthodes indigènes, les étapes de la préparation sont identiques dans tous les pays, cependant la différence entre ces méthodes demeure dans la durée et la température de chauffage utilisée ainsi que l'agent de clarification utilisé. Le procédé de préparation consiste à faire fondre le beurre (50°C/60°C : *Shmen* ; 100°C : *Samna* ; 110°C/120°C *Ghee*), avec une agitation continue. A l'ébullition, certains composés peuvent être ajoutés : la semoule, des dattes ou un morceau de pain ; ces ingrédients vont absorber l'humidité et entraîner les impuretés. Le mélange est ensuite filtré et conservé pour des utilisations ultérieures (Sserunjogi *et al.*, 1998 ; Kacem et karam, 2006 ;

Samet-bali *et al.*, 2009 ; Dhurvey *et al.*, 2012 ; Gemechu et Tola, 2017 ; Chaudhary *et al.*, 2019 ; Boussekine *et al.*, 2020). Le beurre clarifié possède 96% de la matière grasse, 0,3% d'humidité et 0,3% d'acides gras libres (exprimée en acide butyrique) et une valeur d'indice de peroxyde inférieure à 1,0. Au cours du traitement thermique du beurre, des composés aromatiques sont générés par l'interaction des produits de dégradation des protéines, du lactose, des minéraux et éventuellement par la dégradation des acides gras libres et les métabolites générés par la fermentation microbienne (Sserunjogi *et al.*, 1998 ; Ray, 2019). Le mécanisme de génération des arômes du beurre clarifié est illustré dans la figure 3.



**Figure 3.** Schéma représentant le mécanisme de production d'arôme du beurre clarifié (Ray, 2019).

#### ***b. Conservation par assaisonnement de différents ingrédients***

En Ethiopie, la conservation du beurre par assaisonnement est considérée comme une méthode ancestrale : un mélange d'épices est mixé avec le beurre : de Curcuma (*Curcuma domestica*, d'Ajowan) ou Thym indien (*Trachyspermum ammi*), de fenugrec (*Trigonella foenum-graecum*). Le beurre épicé peut être utilisé pour la consommation domestique ou pour la vente. La durée de conservation est estimée à 12 semaines (Gemechu et Tola, 2017).

**Tableau 5.** Beurre traditionnel fermenté préparé à travers le monde.

<b>Pays</b>	<b>Nom</b>	<b>Références</b>
<b>Salage du beurre</b>		
Algérie	<i>Dhan ; Smen</i>	Guessas <i>et al.</i> , 2012 ; Bensalah <i>et al.</i> , 2011
Maroc	<i>Smen</i>	El Marrakchi <i>et al.</i> , 1988 ; Benkerroum et Tamim, 2004 ; Irdukinda <i>et al.</i> , 2018
<b>Clarification du beurre</b>		
Egypte	<i>Samna</i>	Sserunjogi <i>et al.</i> , 1998
Inde	<i>Ghee</i>	Dhurvey <i>et al.</i> , 2012 ; Chaudhary <i>et al.</i> , 2019 ; Ray, 2019
	<i>Ghruta ; Neyi, nai</i>	Dhurvey <i>et al.</i> , 2012
Tunisie	<i>Samn</i> ou huile de beurre	Samet-Bali <i>et al.</i> , 2012
Ethiopie	<i>Ghee ; Mangor Nigur Kibe</i>	Gemechu et Tola, 2017
Mongolie	<i>Shar tos</i>	Accolas <i>et al.</i> , 1978
Allemagne	Butteroel, butterschamelz, floessbutter	Dhurvey <i>et al.</i> , 2012
Angleterre	Butteroil, butterfat, clarified butter, dehydrated butter, dry butterfat	
Espagne	Mantequilla fundida	
France	Beurre fondu, graisse de beurre	
Italie	Burofuso, burro cotto, burro colato	

## II. Microflore du lait et des produits laitiers

Les produits laitiers traditionnels fermentés constituent une partie importante de l'alimentation quotidienne des populations depuis des millénaires, ils sont de plus en plus recherchés par le consommateur et se caractérisent par la texture, la saveur, la qualité de la composition en nutriments et surtout par le type de microbiote indigène actif dans leurs matrices (Derouiche *et al.*, 2016). La microflore du lait joue un rôle important dans la digestion de ces constituants en augmentant leurs biodisponibilités et contribue à la formation de composés aromatiques souhaitables et de biomolécules nobles tels que : les substances antibactériennes, les acides organiques essentiels, les vitamines etc... (Mayo *et al.*, 2010 ; Abd El Gawad *et al.*, 2010). Par conséquent, l'étude de la biodiversité microbienne des produits laitiers traditionnels fermentés permet l'identification des espèces intéressantes pour la création des starters utiles pour l'industrie laitière.

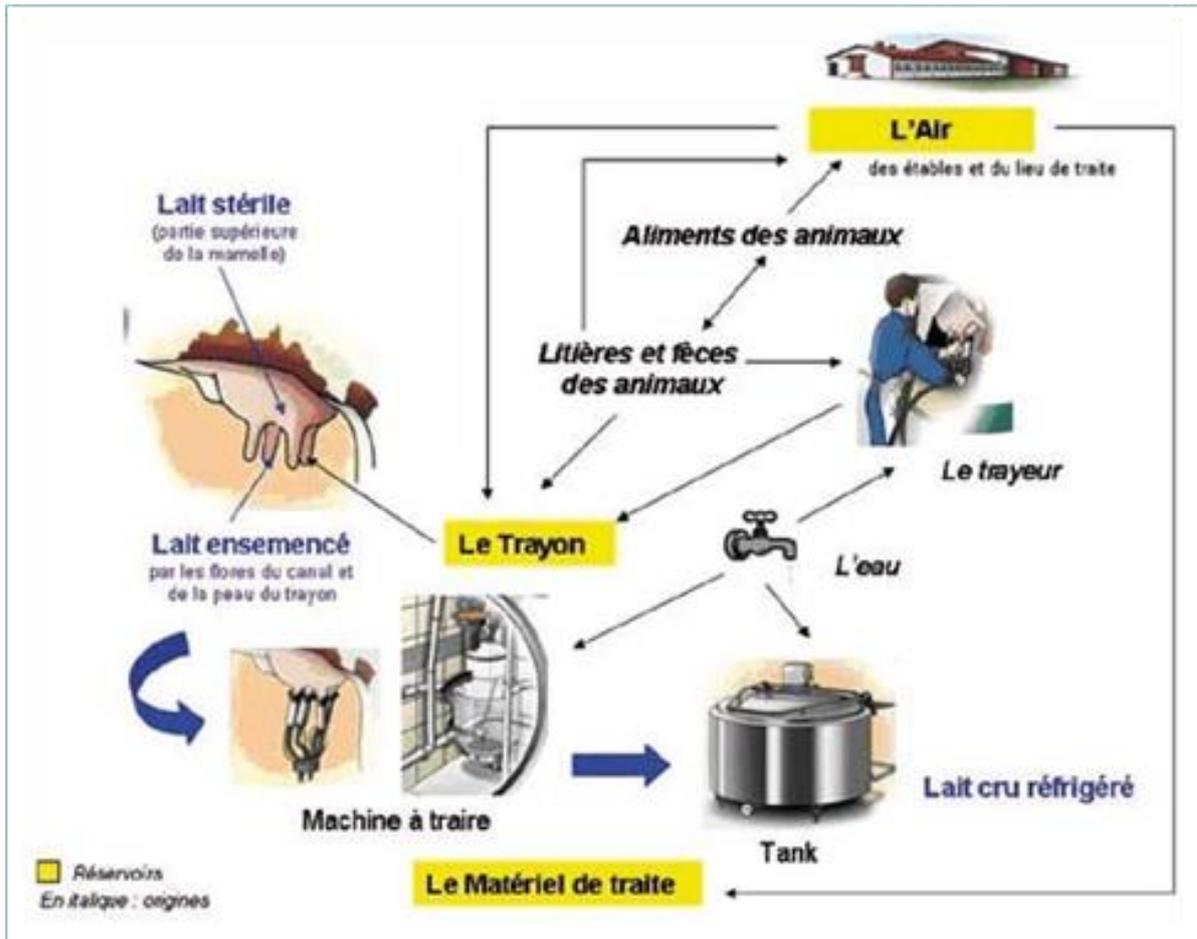
### II.1. Microflore du lait et activité métabolique

Le lait est un aliment très riche en nutriments (protéines, sucres, lipides, sels minéraux, vitamines etc...), possède un pH proche de la neutralité (pH : 6,6) et très riche en eau (90%). Ces paramètres sont très favorables au développement de nombreuses espèces de microorganismes incluant les bactéries, les levures et les champignons filamenteux. Il est très vite contaminé à la sortie du trayon par une importante diversité microbienne (pathogènes, d'altération et aussi flore "utile"), provenant majoritairement de l'environnement (Valence-Bertel, 2015). Le lait qui sort du pis de la vache est pratiquement stérile, la flore indigène constitue l'ensemble des microorganismes retrouvés à la sortie du pis, elle est en relation étroite avec la race de l'animal, l'alimentation, et d'autres facteurs. Il s'agit essentiellement de microcoques (30-90%), streptocoques, lactocoques ( $\leq 10\%$ ) et lactobacilles (10-30%) (Lapointe-Vignola, 2002).

La flore de contamination, constitue également l'ensemble des microorganismes ajoutés au lait dès la collecte jusqu'à la consommation et elle se distingue par deux types de flore : flore d'altération et flore pathogène. La flore d'altération est celle qui provoque des défauts sensoriels du goût, d'arôme, d'apparence ou de texture et réduit la durée de la conservation des produits. Les principaux genres identifiés comme flore d'altération dans le lait cru sont : *Pseudomonas sp.*, *Proteus sp.*, *Escherichia coli*, *Enterobacter*, *Bacillus sp.*, *Clostridium sp.*, et certaines levures et moisissures (Lapointe-Vignola, 2002).

L'existence d'une flore pathogène dans le lait, peut avoir plusieurs sources : animal malade, l'environnement, et l'homme. Cette flore peut causer des risques sur la santé des

consommateurs : malaise et des intoxications alimentaires, citant quelques exemples de la flore pathogène du lait : *Salmonella sp.*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, *Bacillus cereus*, *Yersinia enterocolitica*, *Listeria monocytogenes*, *E. coli*, *Campylobacter jejuni*, *Shigella sonnei* et certaines moisissures (Lapointe-Vignola, 2002).



**Figure 4.** Origine du flux microbien du lait dans les lieux de productions laitières (Laithier, 2011).

#### *Activité métabolique de la microflore du lait*

Au cours de sa croissance, la microflore du lait peut exercer différentes activités métaboliques, qui peuvent être positives ou négatives. La première réaction consiste à hydrolyser les carbohydrates du lait et fermenter les sucres générés en composés acides conduisant à l'abaissement du pH et la coagulation des protéines du lait. Au cours de la fermentation certaines levures, transforment les sucres en alcool et en CO<sub>2</sub>, cette transformation conduit à la production d'odeur indésirable dans le lait (odeur levurée ou alcoolisée). D'autres types de microorganismes possèdent des activités protéolytiques et lipolytiques conduisant à l'obtention d'un nombre important de métabolites (acides aminés à courtes ou à longues chaîne, acides gras...). Si ces transformations ne sont pas contrôlées, ils peuvent conduire à des défauts d'odeurs et de textures (goût amer, rance, ...) (Lapointe-Vignola, 2002 ; Mayo *et al.*, 2010).

## II.2. Microflore des produits laitiers

La nature et la charge microbienne des produits laitiers dépend largement des microorganismes présents dans les matières premières, les conditions d'hygiène, l'environnement, le stockage et le matériel utilisé. Les aliments fermentés laitiers abritent divers microorganismes (bactéries lactiques, levures et champignons filamenteux). Parmi ces microorganismes, les bactéries lactiques (BL) jouent un rôle technologique très important, elles acidifient les matières lactières à travers la production d'acide lactique et d'autres métabolites, ce qui permet la transformation du produit au niveau physicochimique et le développement de certaines caractéristiques organoleptiques. Les BL jouent un rôle hygiénique important en abaissant le pH et en sécrétant une variété de composés inhibiteurs tels que les acides organiques, le dioxyde de carbone et le diacétyl, empêchant ainsi le développement de bactéries indésirables ce qui permet d'augmenter la durée de conservation des aliments. Les levures ont également un rôle très important dans la synthèse des composés volatils qui contribuent au développement de la saveur des produits laitiers fermentés (Dortu et thonart, 2009 ; Samet-bali et Attia, 2012 ; Benkerroum *et al.*, 2013).

### II.2.1. Microbiologie du *Raib*

Des études antérieures sur le *Raib* ont montré que de nombreuses espèces de bactéries lactiques mésophiles appartenant aux genres de *Lactobacillus*, *Lactococcus* et *Leuconostoc* contribuent à l'acidification et à la fermentation du lait, elles sont responsables des modifications de sa texture et de ses caractéristiques organoleptiques. D'autres espèces de levures peuvent également participer à sa transformation et sont responsables d'arômes secondaires, surtout les genres *Saccharomyces* et *Candida* (Bendimerad *et al.*, 2012 ; Debbabi *et al.*, 2018). Les laits fermentés obtenus uniquement par la fermentation lactique et l'abaissement du pH, y compris le *Raib*, sont pauvres en termes de qualité hygiénique, vu le nombre élevé de coliformes fécaux et d'entérocoques détectés dans certains cas et qui dépasse  $10^4$  UFC/mL. Ces produits ont une courte durée de conservation (3-10 jours) même lorsqu'ils sont conservés à froid (Benkerroum *et al.*, 2013).

### II.2.2. Microbiologie du beurre

Le beurre peut contenir tous les germes du lait, il contient principalement des bactéries lactiques, d'acidité et d'arôme (*Lactococcus lactis*, *Lactococcus cremoris*, *Lactococcus diacetylactis* et parfois *Leuconostoc*) qui participent à l'élaboration des qualités organoleptiques du beurre (Guiraud, 2003). Cependant, le beurre peut contenir des microorganismes d'altération : de nombreuses souches psychrotrophe de bactéries, de levures et de moisissures

ont été impliquées dans la détérioration et la lipolyse du beurre à des températures inférieures à 5°C et certaines même inférieures à 0°C ; les bactéries lipolytiques détruisent et oxydent la matière grasse et peuvent entraîner le rancissement du beurre ; les bactéries protéolytiques peuvent entraîner la dégradation des protéines et la génération d'un goût amer ; et certaines levures et moisissures peuvent également provoquer des altérations de goût de moisi, d'âcre, de malte et de caramel (Guiraud, 2003 ; Idoui *et al.*, 2010).

### II.2.3. Microbiologie du *Smen/Dhan*

La diversité microbienne du *Smen* peut avoir plusieurs sources, outre les espèces microbiennes issues de la matière première (beurre cru), divers microorganismes peuvent s'installer durant les différentes étapes de sa préparation (lavage, malaxage et conditionnement). Ainsi divers contaminants peuvent avoir lieu, en fonction du niveau d'hygiène adopté tels que la qualité de l'eau de lavage et l'état sanitaire des ustensiles utilisés. *Smen* est un produit exempt aussi bien de germes de contamination fécale que de microorganismes pathogènes (staphylocoques entérotoxinogènes et salmonelles). Cette absence s'explique par les bonnes conditions hygiéniques du milieu et montre que le *Smen*, malgré les nombreuses manipulations que nécessite sa préparation, offre une garantie sanitaire pour le consommateur. Les coliformes ne sont plus isolés dès le 40<sup>ème</sup> jour alors que le nombre des entérocoques diminue. Ces observations confirment les résultats obtenus sur le produit fini. La concentration élevée en sel, et la libération progressive des acides gras libres pourraient défavoriser les conditions optimales à la croissance de la quasi-totalité des microorganismes (Benkerroum et Tamime, 2004).

Les micro-organismes de contaminations du *Smen* sont constitués de flore aérobie mésophile totale et de flore halophile modérée, ils appartiennent, presque tous, au genre *Bacillus* (*Bacillus alvei*, *Bacillus brevis* et *Bacillus firmus*). La prédominance des *Bacillus* s'explique par leur résistance aux effets inhibiteurs du sel et des acides gras libres (El Marrakchi *et al.*, 1988).

Concernant la flore utile qui est responsable de la maturation du *Smen*, certaines espèces de bactéries lactiques (lactobacilles) et des levures pourraient contribuer au développement des caractéristiques organoleptiques finales du produit. Parmi les lactobacilles isolés au cours des premiers mois de la maturation du *Smen* ; les espèces de *Lactobacillus plantarum* et *Lactobacillus casei* sont les plus dominantes, ces dernières ont la capacité de se développer dans des conditions hostiles, et sont dotés d'une large gamme d'enzymes hydrolytiques : des lipases et des protéases (benkerroum et Tamime, 2004). En effet, les levures possèdent une

activité lipolytique importante, les principales espèces rencontrées dans le *Smen* sont : *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia kudriavzevii*, *Saccharomyces sake*, *Kluyveromyces lactis*, *Torulopsis sphaerica*, *debaryomyces hansenii*, *Kluyveromyces bulgaricus*, *Kluyveromyces marxianus*, *Zygosaccharomyces bailii*, *Clavisporalus itaniae* (Ismaili-Alaoui, 1986).

### II.3. Bactéries lactiques et leur importance dans la fermentation laitière

Les bactéries lactiques ont été décrites pour la première fois par Orla-Jensen au début du 19<sup>ème</sup> siècle. Elles ont pour principales caractéristiques d'être des microorganismes Gram positif sous forme de coques ou de bâtonnets, généralement immobiles, asporulés, anaérobies mais aérotolérants et ne possèdent ni catalase (certaines avec une pseudocatalase), ni nitrate réductase, ni cytochrome oxydase. Elles ont besoin de glucides fermentescibles pour leur croissance (Diop *et al.*, 2009) et produisent leur énergie par la métabolisation des sucres. La fermentation est dite homolactique si l'acide lactique est pratiquement le seul produit formé et hétérolactique si d'autres composés sont aussi présents : l'acide acétique, l'éthanol et le CO<sub>2</sub> (Sauer *et al.*, 2008 ; Papagianni, 2012). Les bactéries lactiques sont très fréquentes dans la nature et s'associent à des aliments riches en nutriments et vitamines tels que le lait, les fromages, les viandes, le pain etc... (Leveau et Bouix, 1993 ; Hassan et Frank, 2001).

#### *Importance des bactéries lactiques*

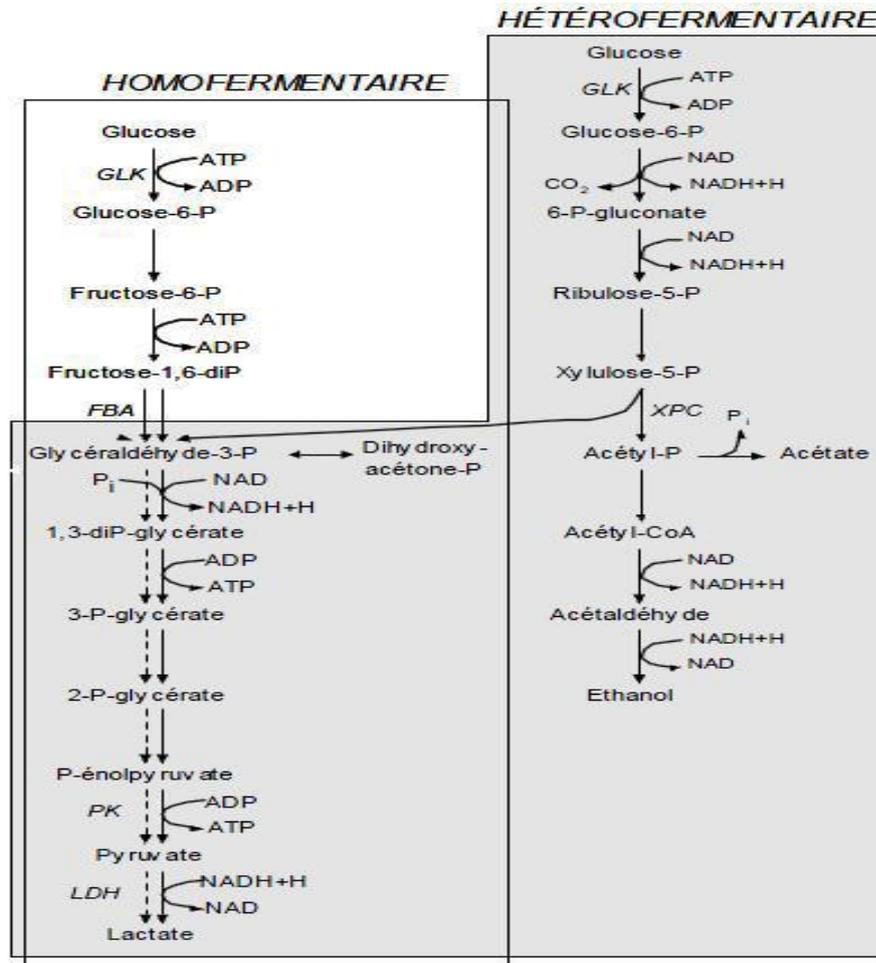
Depuis plus de 4 000 ans, les bactéries lactiques ont été utilisées pour fabriquer un bon nombre de produits fermentés et notamment des produits laitiers. La fermentation confère aux aliments une saveur et une texture particulière. L'évolution des connaissances conduit à la sélection et au développement de nouvelles souches de bactéries lactiques aux propriétés spécifiques (Branger, 2007).

Les bactéries lactiques qui sont pertinentes pour les fermentations alimentaires sont capables de produire des protéinases ou des peptidases hydrolysant en partie les protéines laitières pour trouver les acides aminés dont elles ont besoin pour leur croissance. Les acides aminés peuvent être davantage convertis en composés aromatiques tels que les aldéhydes, les alcools et les esters. Les systèmes protéolytiques permettent non seulement aux bactéries de se développer, mais modifient également les propriétés sensorielles des matrices métabolisées, conférant aux produits alimentaires finaux des propriétés organoleptiques uniques (Antoine 2012 ; Khandelwal *et al.*, 2016). En plus certaines espèces de BL, peuvent avoir des activités lipolytiques grâce à leurs lipase intracellulaire et extracellulaire, transformant ainsi les lipides en acides gras et glycérols. Les lipases peuvent être impliquées dans le développement de la

saveur des produits alimentaires fermentés et peuvent être associées à différents avantages pour la santé de l'être humain (Khandelwal *et al.*, 2016).

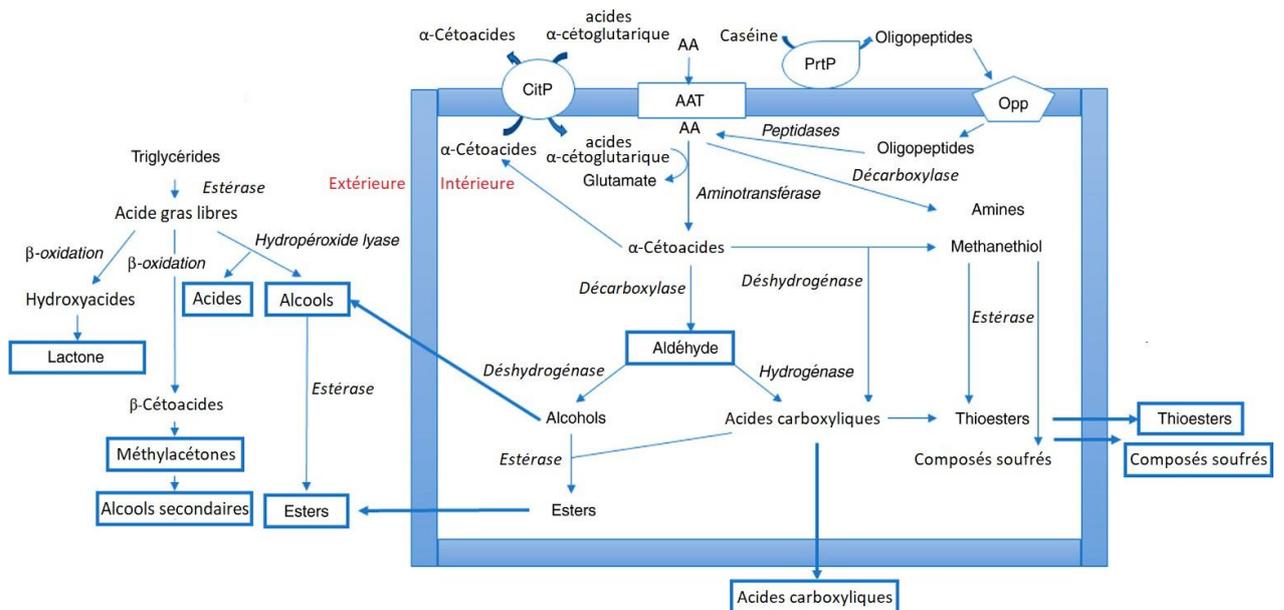
La production d'acide lactique à partir du lactose par les BL, entraîne une acidification qui, selon le produit considéré, a de nombreuses répercussions : coagulation du lait, synérèse des caillés fromagers, saveur acide, inhibition des flores d'altération etc... La fermentation lactique génère un large éventail de composés d'arômes qui contribuent à l'établissement des propriétés organoleptiques, elle génère également des exopolysaccharides qui agissent comme des agents de texture et sont particulièrement recherchés dans certains laits fermentés, ainsi que la production de CO<sub>2</sub> qui contribue à la formation d'ouvertures dans les fromages et au caractère pétillant des laits fermentés (Monnet *et al.*, 2008).

Les fermentations contrôlées sont de plus en plus utilisées par les industries alimentaires. Elles consistent à inoculer la matière première avec un ou plusieurs microorganismes, qu'on appelle ferments ou starters, dans le but d'accélérer le processus de la fermentation et d'apporter des propriétés intéressantes, en excluant tous les autres microorganismes. Contrairement aux fermentations spontanées, dans ce type de fermentation, le microorganisme initiant la fermentation a été volontairement choisi pour conduire la fermentation, la rendant ainsi aisément contrôlable. Dans la plupart des fermentations contrôlées, la matière première est d'abord traitée afin d'éliminer et contrôler la microflore naturelle, ensuite le starter est rajouté pour conduire la fermentation (Fessard, 2017). Selon leurs fonctions principales, les BL ajoutés sont appelés starters (s'ils participent à l'acidification) et cultures secondaires (s'ils participent aux activités de maturation, production de saveur et d'arôme). Les principales espèces impliquées dans l'industrie laitière comme cultures starters sont : *Lactococcus lactis*, *Lactococcus cremoris*, *Leuconostoc spp.*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii subsp. delbrueckii*, *Lactobacillus. delbrueckii subsp. lactis* et *Lactobacillus helveticus*. Outre, les bactéries Starters, une autre série de BL est généralement présente en grand nombre dans certains produits laitiers, appelée non-starter (NSLAB), elle comprend les espèces de : *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus durans*, *Lactobacillus salivarius*. Le rôle de ces bactéries n'est pas bien compris, certains auteurs ont rapporté qu'elles possèdent des activités d'acidification et au même temps jouent un rôle important dans la maturation et le développement d'arômes (Mayo *et al.*, 2010).



**Figure 5.** Voies fermentaires de la dégradation du glucose (Atlan et al., 2008).

[GLK : glucokinase, FBA : fructose-1,6- bisphosphate aldolase, XPC : xylulose-5-phosphate phosphocétolase, PK : pyruvate kinase, LDH : lactate déshydrogénase].



**Figure 6.** Modèle du métabolisme protéolytique et lipolytique des bactéries lactiques (Ouidir, 2019).

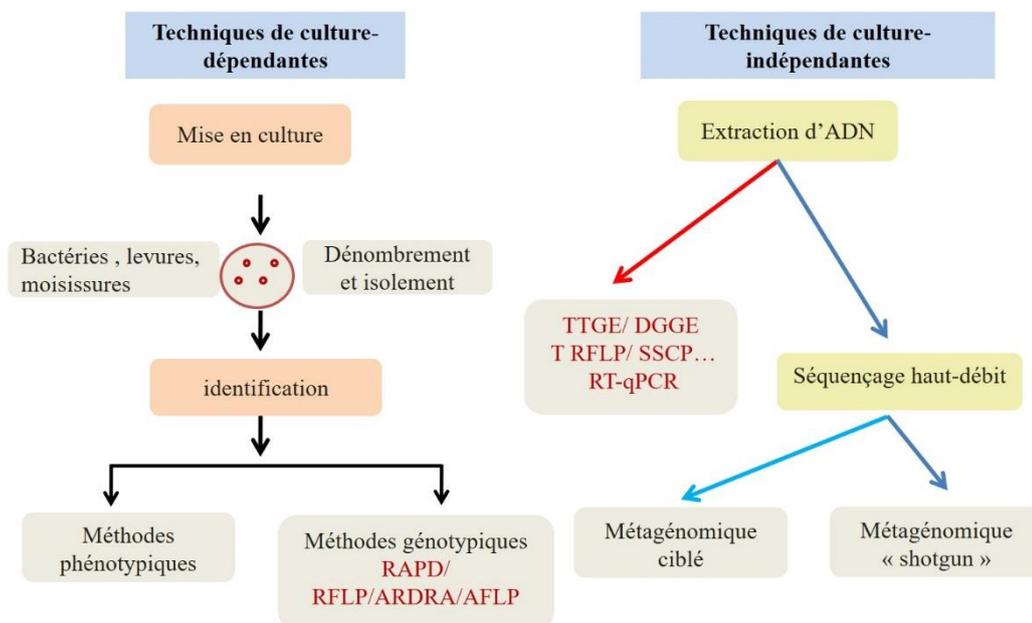
PrtP : Protéinase de paroi, Opp : Système de transport d'oligopeptides, CitP : citrate perméase, AAT : le système de transport des acides aminés, AA : acides aminés.

#### II.4. Levures

Les levures sont des eucaryotes hétérotrophes faisant partie du groupe des champignons, on les distingue par leur caractère unicellulaire et l'absence de vrai mycélium, au moins dans la plus grande partie de leur cycle biologique (Guiraud 2003). Ce sont des microorganismes aérobies, ubiquistes. Elles appartiennent aux phyla des ascomycètes et des basidiomycètes, qui possèdent un potentiel biotechnologique dans l'industrie alimentaire. En effet, elles jouent un rôle important dans la production de certaines acides organiques, d'alcools, de développement de la saveur, d'arôme, de texture, elles participent ainsi que à l'amélioration des propriétés nutritionnels et la réduction des facteurs antinutritionnels et des toxines (Rai *et al.*, 2019). Généralement les produits laitiers représentent un milieu favorable à la croissance de différentes espèces de levures, en raison de leur adaptation dans un substrat riche en protéines, lipides, sucres et acides organiques, ainsi que par leur activité lipolytique et protéolytique et l'assimilation d'une grande variété de substances. Elles sont considérées comme des microorganismes extrémophiles, de ce fait, elles sont capables de se développer à des fortes concentrations en sel, à basses températures, à un pH acide et à faible activité de l'eau (Lopandic., 2006). Les levures sont généralement utilisées comme des starters primaires dans la production de certains fromages, mais dans la plupart des cas, elles sont utilisées comme des cultures secondaires qui facilitent la production de composés aromatiques et la croissance d'autres microorganismes. Les espèces les plus importantes dans les produits laitiers sont : *Debaryomyces hansenii*, *Yarrowia lipolytica*, *Kluyveromyces marxianus*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Galactomyces geotrichum* et *Candida zeylanoides* (Bhalla et Savitri, 2016). Il a été rapporté que les levures possèdent une forte activité lipolytique par rapport à celles des BL. Les estérases et les lipases sont les enzymes responsables, agissant sur les triglycérides en produisant des acides gras libres qui seront utilisées comme des précurseurs d'autres réactions biochimiques et la production des composés aromatiques (Fleet, 1990).

### III. Méthodes d'identification des communautés microbiennes

Depuis des décennies, l'étude de la biodiversité microbienne était basée sur les techniques classiques de la croissance contrôlée du microbiote dans des milieux nutritifs. Ces techniques ne favorisent qu'une fraction limitée de la biodiversité réelle d'un écosystème, en raison de la non-cultivabilité de certains microorganismes. Pour mieux étudier la composition des flores non cultivables, il est apparu que l'étude de leur ADN, permettait d'accéder à un certain niveau d'information, sur les espèces concernées, ou sur certaines fonctions qu'elles pouvaient exercer. Différentes techniques ont été mises au point et ont évolué en fonction des avancées technologiques, comme le clonage des acides nucléiques après extraction d'ADN ou l'amplification de marqueurs taxonomiques. Puis, avec l'apparition des méthodes de séquençages à haut débit (NGS : next-generation sequencing), qui permet le séquençage rapide de milliers à des millions de molécules d'ADN ou d'ARN simultanément, en déterminant l'ordre unique et spécifique des bases des acides nucléiques. Le séquençage direct des molécules a permis un développement rapide de ces techniques dites de métagénomique. Les techniques de l'étude de la biodiversité microbiennes des matrices alimentaires sont alors groupées en 2 catégories : l'approche de culture-dépendante et l'approche de culture-indépendante (Zagorec *et al.*, 2012 ; Cocolin et Ercolini, 2015 ; El sheikha et Hu, 2018) (Figure 7).



**Figure 7.** Techniques d'identifications des communautés microbiennes selon les approches de culture-dépendantes et de culture-indépendantes.

### III.1. Techniques de culture-dépendantes

#### III.1.1. Isolement et identification phénotypique des microorganismes

Les méthodes de culture classiques ont été développées pour la première fois au 19<sup>ème</sup> siècle par Robert Koch et ses collègues. Ces techniques reposent sur la culture d'un ou de plusieurs types de microorganismes sur des milieux gélosés convenables à la croissance qui contiennent des substances nutritives à incorporer dans la masse. Le but de ces techniques est d'évaluer la croissance microbienne et ou de dénombrer la flore endogène des denrées alimentaires, ainsi à isoler certains groupes microbiens. Pour une croissance optimale, l'exigence de certains microorganismes nécessite l'ajout dans les milieux de culture des facteurs de croissance spécifiques (vitamines, acides gras essentiels, oligoéléments etc...). D'autres milieux sont sélectifs et contiennent des composants inhibant la croissance de microorganismes non ciblés. Les milieux sélectifs sont particulièrement utiles pour l'isolement de microorganismes spécifiques à partir des populations mixtes (Atlas, 2004 ; Branger *et al.*, 2007). L'approche de culture-dépendante, présente un avantage de pouvoir isoler et de caractériser des cultures pures provenant des écosystèmes alimentaires complexes. L'identification phénotypique consiste d'étudier les caractères cultureux des microorganismes : macroscopique (taille, forme, aspect, pigmentation...), microscopique (forme des cellules, mode de regroupement, type de reproduction pour les levures, type de thalle, structure de reproduction pour les moisissures.), des caractères biochimiques (catalase, oxydase, assimilation de certains substrats...) et des caractères physiologiques (croissance à pH acide, température élevée...) (Reller *et al.*, 2007). Les techniques phénotypiques permettent alors, une éventuelle orientation vers une identification au niveau du genre ou pour sélectionner certains types pour une identification génotypique. Malheureusement, les techniques de culture-dépendantes présentent certains inconvénients et limitations. Les milieux de culture ne peuvent pas être adéquats à la croissance de l'ensemble de la population présente, généralement, ils ne permettent que la croissance d'une fraction limitée de microorganismes, car la majorité d'entre eux ne peuvent pas être cultivables hors de leurs conditions métaboliques et physiologiques de départ, dans ce cas-là, les microorganismes peuvent passer à un état viable mais non-cultivable. Notant également que la croissance de certains microorganismes est rapide par rapport aux autres, leurs croissances pourraient supplanter efficacement celles des autres. Donc, Il est difficile de déterminer le nombre exact de microorganismes dans un écosystème donné. Par conséquent, les résultats obtenus par ces techniques peuvent être erronés (Carraro *et al.*, 2011 ; Zampieri *et al.*, 2021). Malgré les biais retrouvés par les techniques de culture-dépendantes, elles restent importantes pour la préservation des microorganismes d'intérêt alimentaire.

### III.1.2. Identification géotypique

Les techniques géotypiques ont ouvert de nouvelles opportunités pour caractériser le microbiote dans les matrices alimentaires ou autres à des niveaux moléculaires, par l'analyse de l'information génétique des microorganismes isolés. Elles passent de la limite des méthodes biochimiques et physiologiques qui ne permettent pas la différenciation d'un grand nombre d'isolats avec des caractères physiologiques similaires. L'identification géotypique repose soit sur l'obtention d'empreinte génétique d'un microorganisme soit sur l'amplification par PCR d'une région conservée au niveau d'un gène ciblé et son identification moléculaire par séquençage (Carraro *et al.*, 2011 ; El sheikha *et al.*, 2018).

#### a. Les techniques d'empreinte génétique

Le principe des techniques d'empreinte génétique est basé sur l'amplification d'ADN polymorphe grâce à une sélection spécifique de sites d'anneau d'amorces. Les amorces peuvent relier un seul ou plusieurs domaines de séquences variables. La présence de ces sites, conduit à la synthèse d'un ou plusieurs fragments d'ADN amplifiés de longueurs différentes. Ces différences peuvent être visualisées sur gel d'électrophorèse, générant des profils génétiques caractéristiques pour chaque microorganisme. Ces techniques permettent alors, le typage des isolats par assignation à des lignées clonales apparentées (Van Belkum, 1994 ; Vanechoutte, 1996).

Les méthodes de l'empreinte génétique ont été largement introduites en écologie microbienne afin d'évaluer les niveaux de biodiversité des populations microbiennes autochtones, d'évaluer les compositions de cultures starter complexes, et d'étudier la persistance des cultures ajoutés dans les productions industrielles. Ces méthodes présentent l'avantage de caractériser simultanément un très grand nombre d'isolats (Corich *et al.*, 2005). Plusieurs méthodes d'empreinte génétique sont couramment utilisées, elles permettent la caractérisation des communautés microbiennes par séparation physique des acides nucléiques sur gel d'électrophorèse selon la taille, les séquences et la conformation de séquences, donnant ainsi un "profil" ou une "empreinte génétique". Ces techniques reposent sur deux principales étapes : l'extraction des acides nucléiques et l'amplification par PCR (Abekhti, 2015). Parmi ces méthodes :

- l'**ARDRA** (Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis), la technique d'analyse de restriction de l'ADN ribosomique amplifié en utilisant des enzymes de restriction est également utilisée dans l'identification des micro-organismes à partir d'aliments fermentés, cependant son utilisation pour étudier des échantillons complexes reste délicate en raison du nombre important des bandes obtenues ;

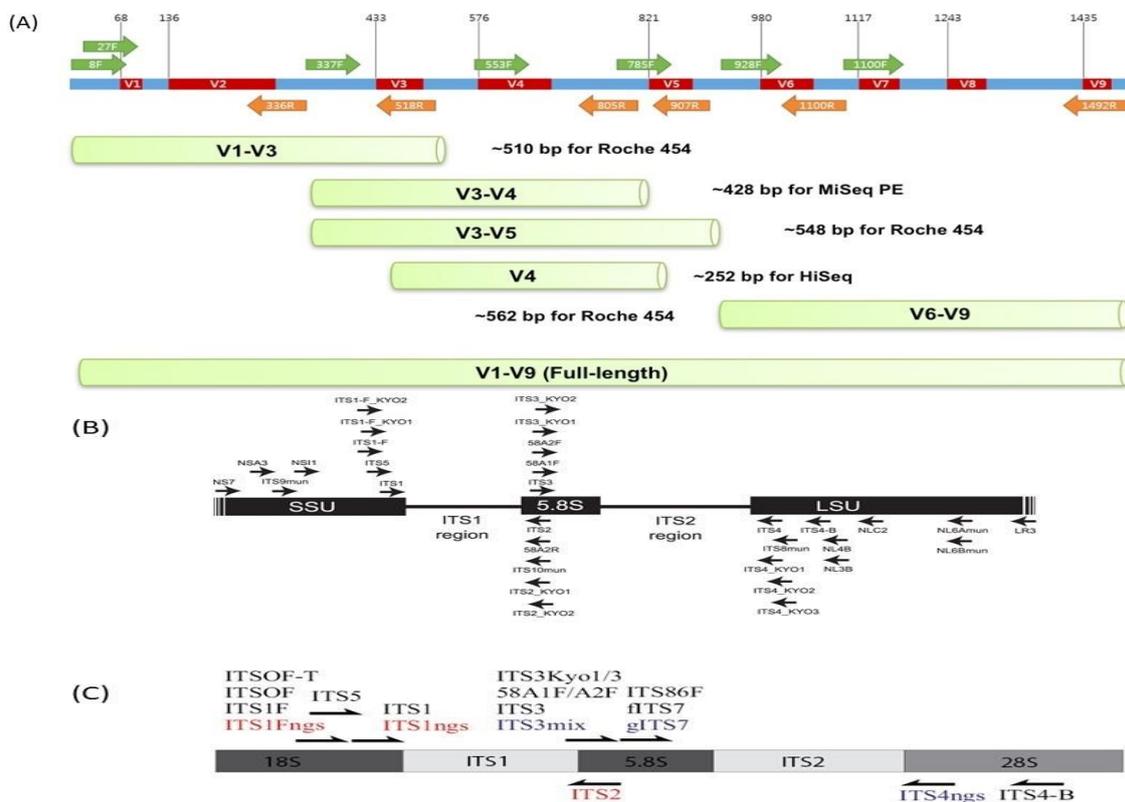
- l'**AFLP** (Amplified Fragment Length Polymorphism) est une technique basée sur l'amplification sélective et la séparation des fragments de restriction génomique, cette technique est beaucoup plus appliquée dans l'identification et la discrimination des souches de BL,
- la **RAPD** (Random amplification of polymorphic DNA) est une méthode de typage basée sur le profil de fragment d'ADN génomique amplifié par PCR, et est couramment utilisée pour typer des bactéries lactiques de différents aliments fermentés (Tamang *et al.*, 2016).

Chacune de ces méthodes, présente certains avantages et des inconvénients, en particulier la technique RAPD qui est assez simple et rapide et peut généralement être réalisée à partir d'un lysat d'une colonie bactérienne sans purification d'ADN ; ainsi elle ne nécessite aucune information de séquence préalable. Une seule amorce aléatoire de 10 pb est utilisée pour spécifier la séquence à amplifier. Cependant, il est bien connu que les profils RAPD peuvent être sensibles à des changements dans les conditions de réaction, qui pourraient conduire à des problèmes de reproductibilité. Contrairement à la RAPD, la technique d'AFLP ne pose pas de problème de reproductibilité, cependant certains inconvénients sont liés à la concentration initiale de l'ADN ainsi à l'efficacité de traitement de ligase ou d'endonucléase, elle est également assez laborieuse et prend du temps, compte tenu de ses besoins en deux réactions enzymatiques et des gros gels de polyacrylamide pour atteindre un bon niveau de séparation des bandes (Mc Gregor *et al.*, 2000 ; Corich *et al.*, 2005).

#### **b. Amplification d'un gène cible par PCR**

La majorité des techniques de biologie moléculaire utilisées repose sur la réaction de polymérisation en chaîne (PCR) qui est une méthode de répllication *in vitro*. Dans laquelle, l'ADN total (cellules eucaryotes et procaryotes) est extrait et un gène cible (spécifique d'une espèce ou d'un genre bactérien ou non spécifique) est amplifié. Elle est basée sur la capacité de l'ADN polymérase à synthétiser le brin complémentaire d'un ADN servant de matrice en utilisant des amorces oligonucléotidiques et d'une Taq polymérase, dans une simple réaction automatisée (Podglajen et Mainardi, 2007 ; Hadidi *et al.*, 2017). Les gènes les plus couramment utilisés pour une éventuelle identification moléculaire sont ceux de l'opéron ribosomal, particulièrement l'ARNr 16S chez les bactéries et le gène ARNr 26S chez les eucaryotes. L'utilisation du gène de l'ARNr 16S (ADNr 16S) comme gène marqueur est l'une des méthodes les plus courantes pour identifier des fragments de génome dérivés de groupes spécifiques de microorganismes ou qui jouent un rôle important dans l'environnement. L'ARN 16S est un gène non codant participant à la constitution de la petite sous-unité des ribosomes des procaryotes (16S). Il est constitué des régions conservées et des régions variables, ces dernières sont considérées comme des marqueurs reflétant les relations phylogénétiques entre les organismes

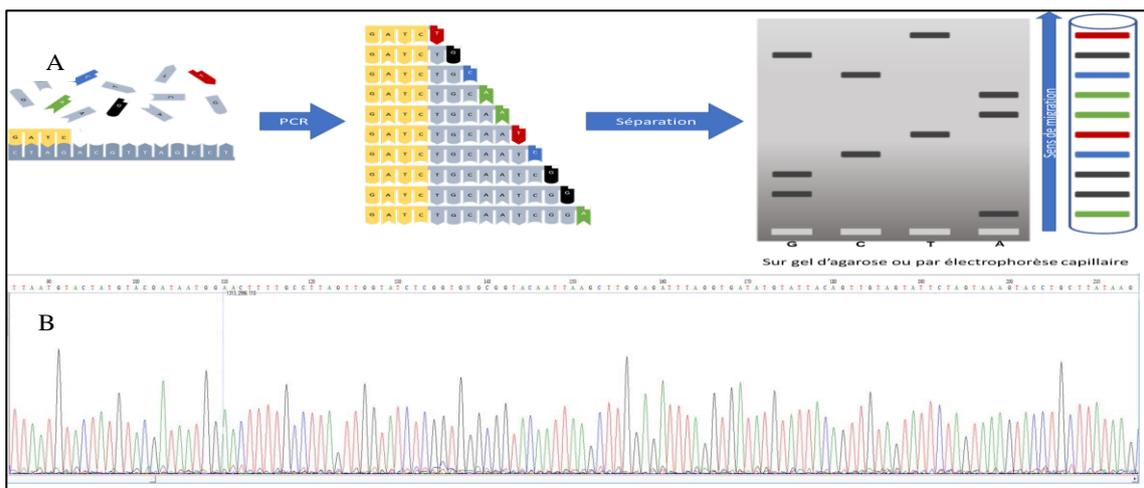
et permettent la discrimination des bactéries et leurs assignations taxonomiques tandis que les régions conservées sont destinées à la création des amorces. La taille du gène de l'ARN 16S est environ 1500 pb qui contient 9 régions variables (V1 jusqu'à V9), voir Figure 8 (A) (Suenaga, 2012 ; Falentin *et al.*, 2017). Pour les eucaryotes, l'ITS (Internal Transcribed Spacer) constitue le marqueur génétique le plus populaire dans les études phylogénétiques fongiques et végétales et comprend deux régions : ITS1 et ITS2 de tailles très variables de 200 à 900 pb (Porter et Golding, 2011 ; Falentin *et al.*, 2017). Le domaine D1/D2 du gène codant l'ARNr 26S est également utilisé pour l'identification des levures (Groenewald *et al.*, 2011).



**Figure 8.** A : Schéma de l'ARNr 16S des procaryotes représentant les : 9 régions variables (En rouge) et les régions conservées (en bleu). Les flèches indiquent la position des amorces ; B et C: Représentation de l'opéron ribosomique eucaryote (SSU : petite sous-unité ribosomique 18S, LSU : grande sous-unité ribosomique 28S, ITS : séquence interne du transcrit).

### c. Séquençage

L'identification de l'espèce microbienne est généralement réalisée par séquençage du fragment d'ADN amplifié (amplicon). Cette technique est basée sur la détermination de l'ordre d'enchaînement des quatre nucléotides d'un brin d'ADN (Lacoste *et al.*, 2017). Les deux premières techniques de séquençage de l'ADN, sont celle de Maxam-Gilbert, qui est basée sur le traitement chimique de l'ADN et celle de Sanger, qui est une méthode de synthèse enzymatique, elle est appelée également séquençage par terminaison de chaîne ou "séquençage déoxy". La méthode de Sanger a en effet rapidement dépassé la méthode de Maxam-Gilbert pour la remplacer et reste à ce jour la principale méthode de séquençage la plus utilisée dans les laboratoires. Son principe consiste à synthétiser le brin complémentaire d'un brin d'ADN préalablement dénaturé en présence d'une amorce spécifique du brin étudié (sens ou antisens), désoxyribonucléotides-triphosphates (dNTP) et des didésoxyribonucléotides triphosphates (ddNTP) marqués à l'aide de fluorophores de couleurs différentes pour chaque ddNTP (quatre couleurs); ainsi l'ADN polymérase effectue la synthèse de l'extrémité 5' vers l'extrémité 3' et ajoute les ddNTP complémentaires de manière aléatoire qui agissent comme des terminateurs de réaction, leurs incorporations entraînent l'arrêt de la réaction d'extension, car ils ne possèdent pas de groupe 3'-hydroxyle, indispensable à la réaction de polymérisation de l'enzyme. Le résultat est l'obtention des fragments de tailles différentes. Les fragments d'ADN obtenus sont soumis à une électrophorèse capillaire durant laquelle le signal fluorescent émis par chaque ddNTP marqué est analysé par informatique et les traitements des données aboutissent à l'identité du nucléotide et de reconstituer la séquence de la matrice d'ADN d'origine (Lamoril *et al.*, 2008).



**Figure 9.** A : Principe du séquençage selon la technique de Sanger ; B : Profil de migration après électrophorèse capillaire (<https://www.biomnigene.fr/fr/nos-solutions/sanger.html>).

### III.2. Techniques de culture-indépendantes

L'extraction directe de l'ADN à partir des matrices alimentaires, est communément appelée techniques de culture-indépendantes, ces techniques sont fréquemment utilisées en microbiologie alimentaire afin d'étudier le profil génétique des populations cultivables ou non cultivables (Tamang *et al.*, 2016), en suivant leurs évolutions dans l'espace ou dans le temps et de comprendre la biodiversité dans un écosystème donné (sans l'utilisation des milieux de cultures). C'est un avantage compte tenu des microorganismes difficiles à cultiver voir non cultivables. La métagénomique a permis des avancées potentielles, dans le domaine d'écologie microbienne, depuis l'étude de l'impact du microbiote sur les pathologies humaines et animales, jusqu'à l'étude de la biodiversité microbienne des écosystèmes environnementaux, et à la recherche des biomarqueurs de pollution (Giraffa, 2004 ; Giraffa and Carminati, 2008 ; Escudie *et al.*, 2017).

Deux stratégies sont utilisées pour obtenir des données à partir des échantillons d'ADN métagénomique :

- **La métagénomique globale ou métagénomique « shotgun »** : consiste à séquencer directement l'ensemble de l'ADN de l'échantillon, après une fragmentation de l'ADN total présent dans une matrice en courts fragments et les séquencer à l'aide d'un séquenceur haut débit. Cette approche permet d'accéder à l'ensemble des gènes dominants présents dans l'échantillon et donc d'accéder aux fonctions du microbiote (Blottière et Doré, 2016).

- **La Métagénomique ciblée ou metabarcoding (Métagénétique)** : Dans l'approche de métagénomique ciblée, une région d'ADN est choisie puis séquencée afin de réduire la complexité génétique. Elle peut fournir une large couverture et une redondance étendue des séquences pour les gènes ciblés, et révéler des zones génomiques spécifiques directement liées à une fonction écologique, même à faible abondance au sein d'un métagénome (Suenaga, 2012). Le choix du gène marqueur à amplifier est fait généralement en fonction de l'écosystème à étudier, tout d'abord il faut vérifier qu'il est possible de définir des amorces spécifiques pour le gène choisi, et que la taille du fragment (amplicon) à amplifier est compatible avec la longueur des séquences (reads) avec la technologie de séquençage choisie (Falentin *et al.*, 2019). Le metabarcoding consiste à extraire l'ADN total d'un échantillon donné, et à amplifier par PCR les gènes marqueurs de la biodiversité tels que ARNr 16S et ITS, et séquencer l'ensemble de l'information génétique par l'application des techniques de séquençage de nouvelle génération (Next generation sequences : NGS) et qui regroupent l'ensemble de technologies de séquençage haut débit (séquencer plusieurs milliers de séquences différentes à la fois). Les NGS ont permis

aux chercheurs l'identification taxonomique plus approfondie des microbiomes complexes (Escudié *et al.*, 2017 ; Cao *et al.*, 2017 ; Falentin *et al.*, 2017 ; Lamb *et al.*, 2019).

### III.2.1. Evolution des technologies de séquençage de nouvelle génération

Au cours de ces dernières décennies, le séquençage de Sanger représentait la méthode de choix pour séquencer l'ADN, ce procédé a été mis au point pour la première fois par Sanger en 1977, cette technique a été évoluée au cours le temps, avec l'invention du thermocycleur, l'automatisation et l'utilisation des produits chimiques non dangereux. Le séquençage de Sanger automatisé, également appelé : séquençage de première génération ne permet de séquencer qu'une proportion limitée d'amplicons et ne donne qu'une description incomplète de la communauté microbienne. Avec les séquenceurs capillaires automatiques, la cadence est passée dans les années (2000) à environ 500 kilobases (kb) par jour. Puis, à partir de 2006, avec le progrès de la science, des nouveaux séquenceurs ont été développés et permettent de réaliser plusieurs millions de réactions de séquences en parallèle. Ces derniers appelés : séquenceurs haut débit ou séquenceurs de nouvelles générations. Un seul séquenceur peut séquencer 1 Gb en quelques heures (Ambardar *et al.*, 2016 ; Lacoste *et al.*, 2017). Depuis, le nombre de génomes complètement séquencés et accessibles dans les banques de données a cru de façon exponentielle. Cette diffusion technologique s'est accompagnée d'une baisse brutale du coût associé à l'opération du séquençage (Audebert *et al.*, 2014).

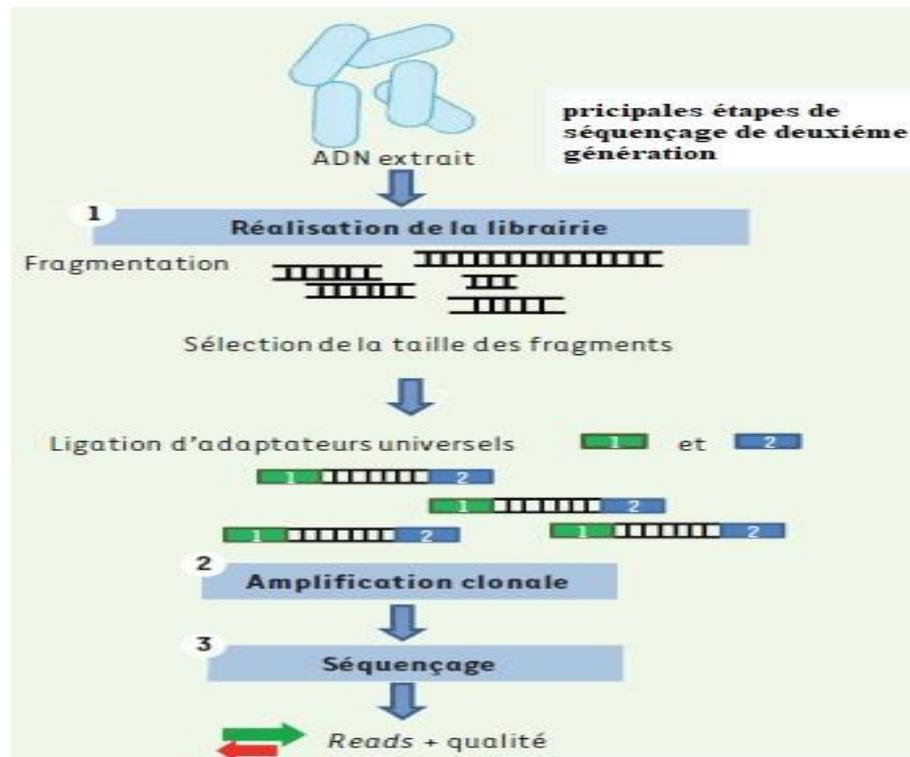
### III.2.2. Séquençage de seconde génération

Actuellement, il existe trois technologies majeures de séquençage de deuxième génération : pyroséquençage 454 Genome Sequencer 20 (Roche) ; SOLID (applied Biosystem) ; Illumina (SOLEXA). La différence entre ces trois technologies réside dans : le principe de la technique, le nombre de lectures (reads) générées, la taille des séquences et le taux d'erreur produite (tableau 6) (Cao *et al.*, 2017). Elles se reposent ensuite sur trois étapes successives (Figure 10) :

**-La réalisation d'une librairie**, l'ADN extrait est le plus souvent fragmenté suite à un traitement enzymatique, suivie de la liaison avec des adaptateurs ;

**-L'amplification clonale moléculaire**, les banques créées sont amplifiées grâce à des méthodes d'amplification clonale et de PCR ;

-Le **séquençage**, l'ADN est séquencé en utilisant différentes approches en fonction de la technologie utilisée.

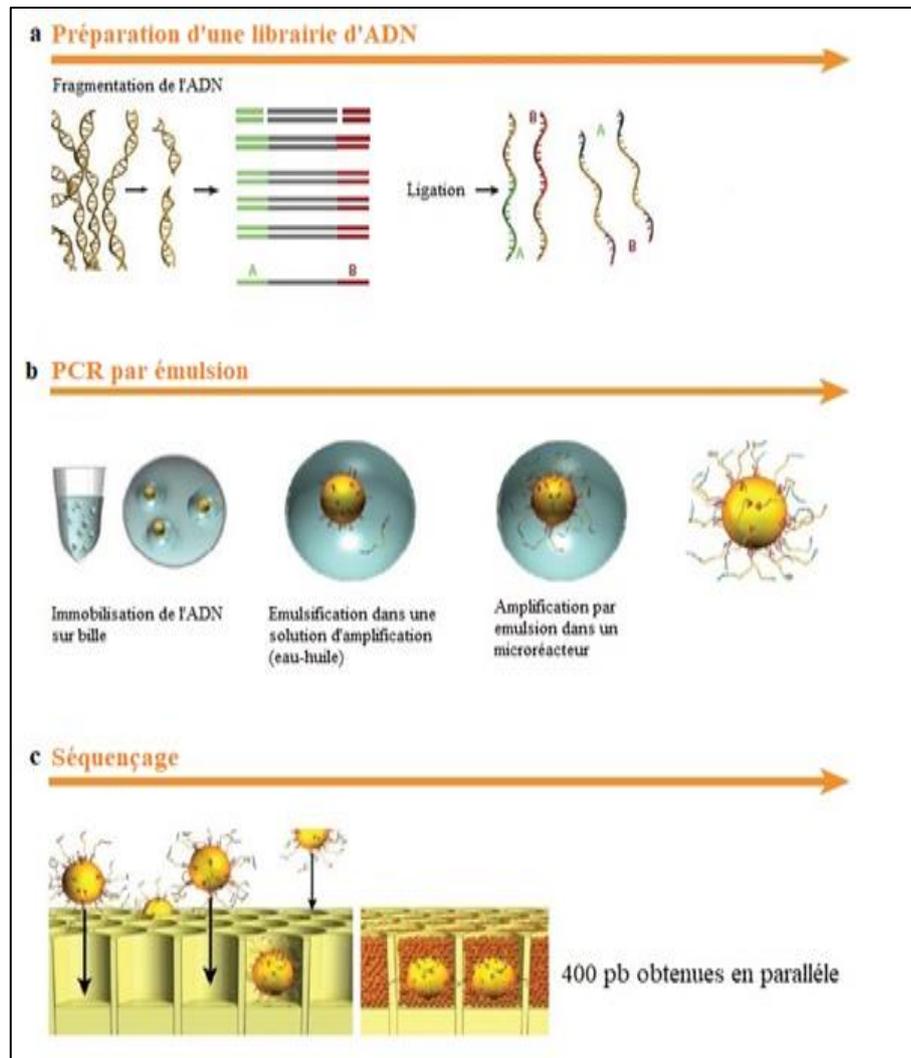


**Figure 10.** Principales étapes communes de séquençage de deuxième génération (Audebert *et al.*, 2014).

#### a. Le pyroséquençage ou la technologie ROCHE 454

La technologie de pyroséquençage 454-GS20 a été introduit en 2004. Il s'agit d'une méthode d'amplification de l'ADN par PCR en émulsion sur billes et par pyroséquençage en micropuits. La molécule de l'ADN est initialement découpée en petits fragments par digestion enzymatique ou par sonication, les extrémités de chaque fragment sont liées à des adaptateurs spécifiques, chaque fragment d'ADN est ensuite immobilisé sur une bille et émulsionné dans une solution d'amplification (mélange eau-huile) ; afin de créer des microréacteurs contenant une seule bille. Ces microréacteurs contenant tous les substrats nécessaires à la polymérisation. La PCR est effectuée ensuite par émulsion et produit environ un million de copies de chaque fragment d'ADN à la surface de chaque bille. Par la suite, les billes porteuses d'amplicons sont ensuite introduites dans des puits de la taille d'un picolitre où s'effectue la réaction de pyroséquençage. Le séquençage s'effectue en présence de quatre nucléotides, l'amorce, et les enzymes (polymérase, sulfurylase, luciférase, apyrase). Au cours de la synthèse des brins complémentaires lorsque chaque nucléotide est incorporé par la polymérase, un pyrophosphate est libéré (PPi) qui est ensuite transformé en ATP par l'ATP sulfurylase. Une luciférase intègre cet ATP à une luciférine en formant une oxyluciférine qui émet un signal lumineux capté par

une caméra CCD (Charge Coupled Device). Entre chaque ajout de nucléotide, les nucléotides en surplus dans le milieu réactionnel sont dégradés par une apyrase et le puits est lavé avant l'introduction d'un nouveau nucléotide. Le processus se continue avec l'ajout d'un autre nucléotide et le signal lumineux peut ensuite être associé à l'ordre d'incorporation des nucléotides, ce qui permet de déterminer l'enchaînement des séquences de chaque fragment d'ADN immobilisé sur une bille (Mardis, 2008 ; Abekhti 2015 ; Cao *et al.*, 2017).



**Figure 11.** Schémas représentatifs des différentes étapes du pyroséquençage selon la technologie ROCHE 454 GS FLX (Mardis, 2008).

### b. Technologie SOLID

Cette technologie repose sur l'amplification en émulsion sur billes. Le séquençage ne s'effectue pas par synthèse comme celui des autres technologies, mais par ligation. Après amplification, les billes contenant les amplicons sont immobilisées sur une plaque de verre spécialement traitée, ensuite les fragments d'ADN sont hybridés avec l'amorce qui est complémentaire avec les adaptateurs. Le séquençage par ligation utilise des oligonucléotides de

8 bases marquées par fluorescence, lors de la ligation d'un oligonucléotide approprié, un signal fluorescent est émis et permet l'identification des deux premières bases, ensuite un clivage chimique permet l'enlèvement des 6 autres nucléotides et le fluorophore, le cycle se répète à chaque fois avec un décalage d'une base nucléotidique jusqu'à la fixation et l'identification de 31 bases complémentaires. D'autres cycles de ligation sont relancés à nouveau avec des nouvelles amorces jusqu'à la fixation de 31 bases. La répétition progressive de ce processus révèle la séquence de l'ADN ainsi que la longueur de la lecture (Sengenès, 2012 ; Cao *et al.*, 2017).

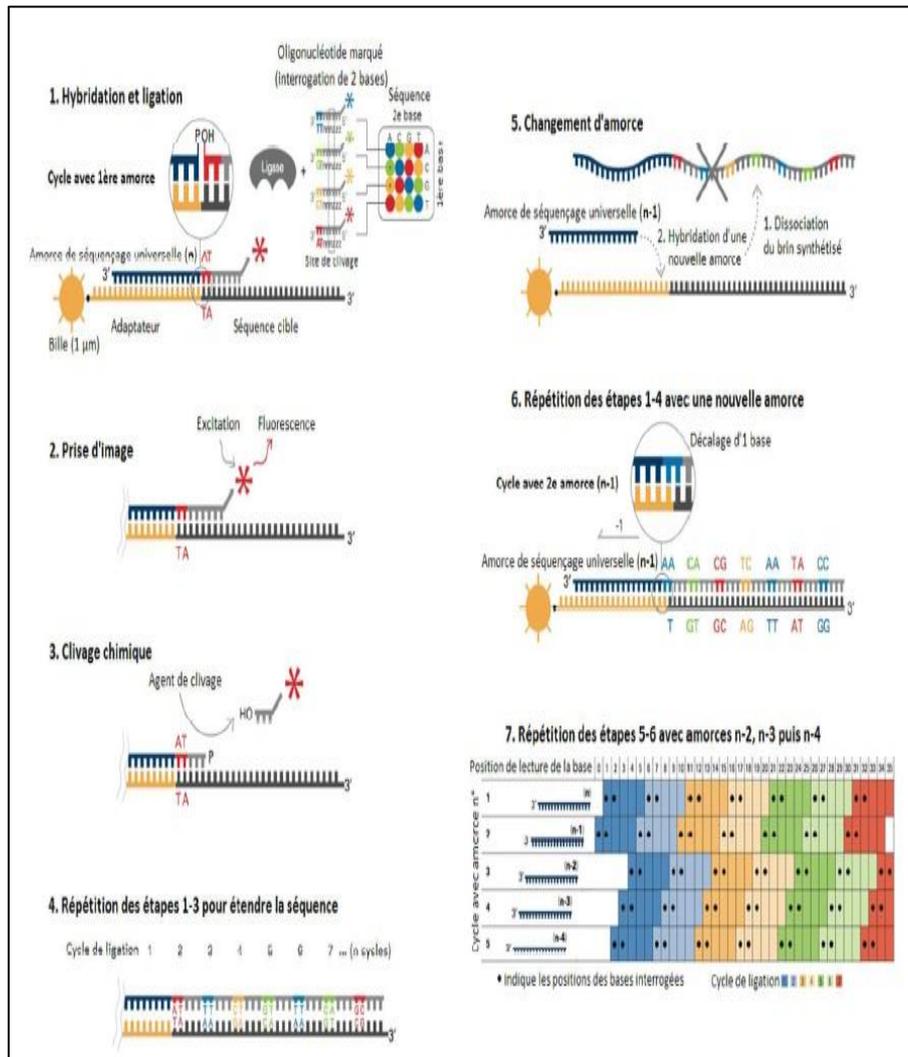
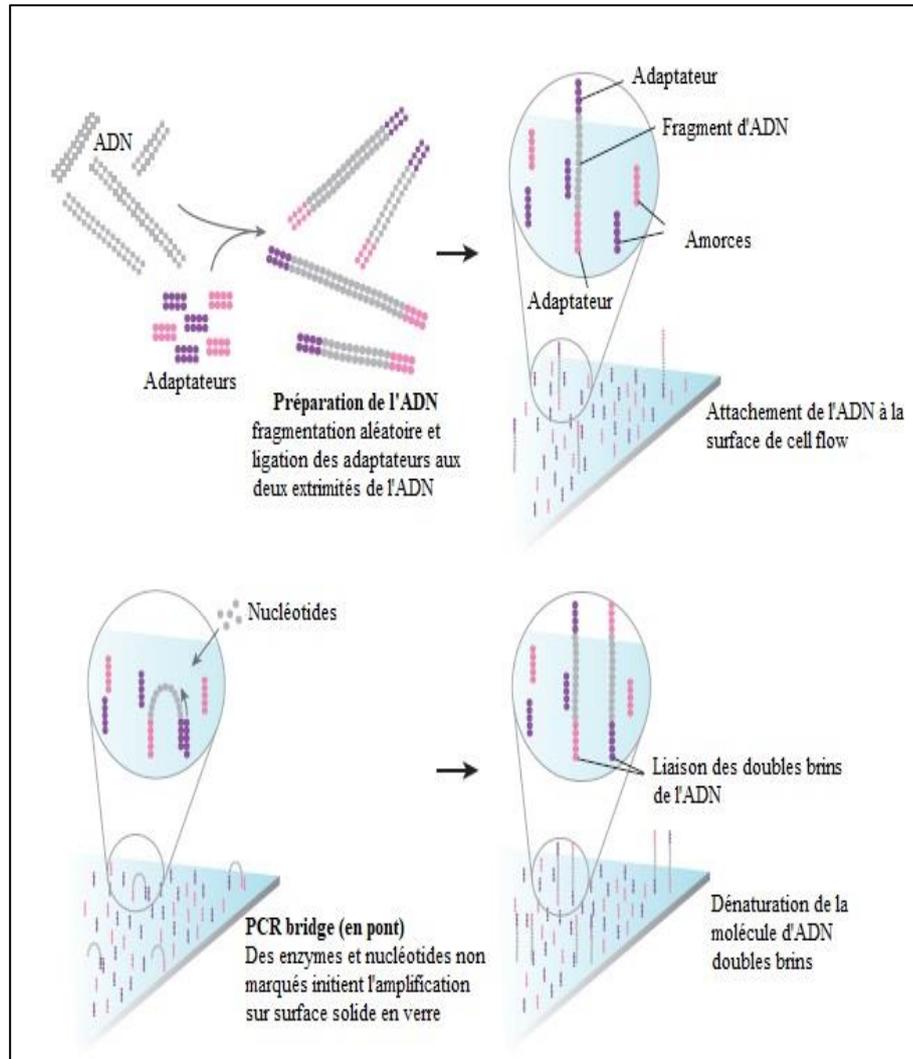


Figure 12. Schéma représentant les cycles de séquençage de la technologie SOLID (Sengenès, 2012).

### c. Technologie illumina

La stratégie d'amplification appliquée par cette technique est Bridge PCR (PCR en pont) elle est basée sur l'amplification clonale dans laquelle la construction de la librairie d'ADN implique une fragmentation aléatoire de l'ADN et la ligation d'adaptateurs oligonucléotidiques. Les deux amorces (directe et inverse) sont attachées à une surface solide en verre par un lien flexible (Flow cell) similaire à une lame microscopique ; l'ADN attaché aux adaptateurs est hybridé avec les deux amorces ; ensuite l'amplification est effectuée en utilisant la dénaturation à base de formamide et en présence de l'ADN polymérase, un nouveau brin est alors synthétisé et fixé sur la surface en verre, ensuite le brin d'origine est dénaturé. L'amplification se poursuit avec le brin nouvellement synthétisé qui s'attache aux amorces en formant un pont. L'opération se répète à chaque fois avec la dégradation du brin d'origine. La répétition des cycles d'amplification en pont, conduit à la génération d'un regroupement clonal appelé « cluster ». Le séquençage est effectué sur des centaines de clusters simultanément avec une ADN polymérase modifiée et quatre nucléotides. Les nucléotides sont marqués avec un groupe rapporteur fluorescent clivable chimiquement à l'extrémité 3'-OH permettant ainsi une seule incorporation de base dans chaque cycle. Au cours du séquençage, chaque nucléotide émet un signal fluorescent unique lorsqu'il est ajouté au brin en cours de synthèse, ce qui permet d'identifier simultanément les bases d'ADN lorsqu'elles sont incorporées dans la chaîne d'acide nucléique (Cao *et al.*, 2017).



**Figure 13.** Schéma représentant l'approche de séquençage par Technologie Illumina (Mardis, 2008).

**Tableau 6.** Caractéristiques des différentes technologies du séquençage de deuxième génération.

Caractéristiques	Pyroséquençage ROCHE 454	SOLID	Illumina
Longueur des lectures (Pb)	400	2x150	2x75
Nombre de lectures	1 million	3 milliards	3 milliards
Données produites	600 Mb	600 Gb	600 Gb
Durée du séquençage	10 heures	11 jours	8 jours

### III.2.3. Traitement bioinformatique des données

Les technologies de séquençage haut débit, génèrent en général un ensemble de données à grandes échelles, décrivant la composition microbienne d'une certaine niche écologique. Cependant, l'un des obstacles majeurs pour traiter ces données est le choix et la maîtrise d'un

logiciel performant qui pourra gérer et sauvegarder les données (Caporaso *et al.*, 2015 ; Kim *et al.*, 2017). La plupart de ces logiciels doivent être lancés à l'aide des lignes de commande et ne sont pas toujours faciles à installer, ce qui les rend difficiles à utiliser par les personnes qui ne sont pas étroitement connectées à une installation informatique. Les solutions les plus efficaces sont souvent conçues par des spécialistes, et des compétences en bioinformatique sont généralement nécessaires pour utiliser ces logiciels. Vu l'énorme demande d'avoir des outils fiables, efficaces et faciles à utiliser ; le pipeline FROGS (Find, Rapidly, OTUs with Galaxy Solution) peut être utilisé par les biologistes via des lignes de commande ou sur les plateformes Galaxy (Escudé *et al.*, 2018). Il permet l'analyse de grands ensembles de séquences d'amplicons d'ADN avec précision et rapidité, produit une table d'abondance des OTUs (Operational Taxonomique Units). L'OTU est un terme utilisé en écologie microbienne qui signifie l'ensemble des individus similaires qui sont regroupés ensemble, il est équivalent du concept d'espèce, avec leurs affiliations taxonomiques.

Le FROGS regroupe un ensemble de 13 outils qui traitent les lectures d'amplicons provenant des technologies de séquençage Illumina ou Roche 454. L'analyse sur le FROGS comprends 5 principales étapes :

- **Le pre-processig (prétraitement)** : permet de fusionner les lectures par paire en utilisant l'outil bioinformatique Flash, cet outil joint la lecture 1 et la lecture 2 avec un taux de mésappariement toléré de 10% dans les régions chevauchées. Cependant le but crucial de cette étape est de nettoyer les données en éliminant toutes les séquences contenant une base ambiguë, par exemple les lectures contenant des bases inconnues, les lectures longues ou trop courtes ainsi que les lectures qui ne contiennent pas d'amorces ou présentant des erreurs dans les amorces.

- Le Clustering**, permet de regrouper les lectures présentant un fort pourcentage de similarité en clusters, sur le FROGS l'algorithme SWARM est utilisé, ce dernier ne se base pas sur le regroupement par un seuil global de similarité mais en agrégeant progressivement les séquences qui ont entre 1 à 3 différences ;

- La Déchimerisation** est la détection des chimères sur le FROGS, elle repose sur l'algorithme de novo UCHIME sur l'outil VSEARCH. Les chimères sont détectées indépendamment dans chaque échantillon, un alignement de chaque lecture sur les autres lectures de l'échantillon est effectué. Une lecture mosaïque qui génère des alignements partiels (sur une partie de la longueur) sur 2 ou 3 ou 4 autres lectures différentes sera éliminée:

- **Le Filtrage**, le FROGS recommande d'appliquer un filtre d'abondance sur les OTUs avant le processus d'affiliation taxonomique. Les OTUs présentant une abondance inférieure à

$5 \times 10^{-5}$  sont automatiquement exclues. Ces derniers sont soit des chimères ou des lectures avec des erreurs de séquençages, qui n'ont pas été détectées avant. Cette étape est très importante, elle permet de réduire le nombre de faux OTUs, et rend l'interprétation biologique des résultats plus facile ;

- **L'assignation taxonomique** est effectuée par comparaison des séquences à des bases de données de séquences de référence. Le FROGS peut faire des assignations taxonomiques jusqu'au niveau de l'espèce. Plusieurs bases de données sont utilisées, citant SILVA, RDP pour 16S, et pour les ITS, la base de données UNITE est la plus largement utilisée.

#### III.2.4. Mesure de la biodiversité microbienne

Les caractéristiques importantes d'une communauté microbienne dans un écosystème donné sont distinguées par le nombre d'espèces présent, leur composition numérique et leur diversité microbienne. Afin de comparer la diversité des écosystèmes microbiens, une variété d'outils bioinformatique et statistiques ont été développés. En écologie, la diversité est structurée en 3 composantes : diversités alpha, bêta et gamma. Les composantes les plus étudiées sont la diversité alpha, qui mesure la diversité intrinsèque de chaque communauté dans un endroit et la diversité bêta qui reflète les différences entre les communautés (Cardoso *et al.*, 2015 ; Brittain *et al.*, 2020). Comprendre la diversité microbienne devient de plus en plus important lors de l'étude de la composition, de la fonction et de la dynamique du microbiote associé à un écosystème donné. Diverses approches ont été utilisées pour quantifier la diversité biologique. Cependant, deux facteurs principaux, doivent être pris en compte pour mesurer la diversité de certains échantillons : la richesse et la régularité.

La richesse est définie par la mesure du nombre de différents types d'organismes présents dans une communauté particulière, alors que la régularité est de comparer l'uniformité de la taille de la population de chacune des espèces présentes, brièvement la régularité est la mesure de l'abondance relative des différentes espèces constituant une communauté. En général, lorsque la richesse et la régularité des espèces augmentent, la diversité augmente également. Les indices de diversité désignent une mesure mathématique de la diversité des espèces dans une communauté. Ceux de Shannon et Simpson sont les indices les plus utilisés (Kim *et al.*, 2017).

### a. Estimateur de la richesse spécifique

L'estimation du nombre d'espèce microbienne et le degré de diversité est souvent difficile à déchiffrer dans un échantillon donné, notamment que plusieurs espèces sont rares dans un échantillonnage aléatoire. De ce fait une évaluation précise de la richesse des espèces est utile pour analyser des communautés biologiques, pour cela des estimateurs de la richesse spécifique ont été développés afin d'estimer la richesse réelle, citant : Chao 1 et ACE (Abundance-based Coverage Estimator), ces derniers calculent les OTUs attendues en fonction des OTUs observées (Cardoso *et al.*, 2015 ; Kim *et al.*, 2017).

- **Chao1**

C'est une méthode d'estimation non paramétrique de la richesse spécifique dans une communauté donnée, elle est basée sur le concept que les espèces rares donnent une idée ou déduisent plus d'information sur le nombre d'espèces manquantes. L'estimateur de Chao1 donne plus d'importance aux espèces à faible abondance, seuls les singletons (espèce capturée une fois) et les doubletons (espèce capturée deux fois) sont utilisés pour estimer le nombre d'espèces manquantes (Kim *et al.*, 2017 ; Hughes *et al.*, 2001).

- **ACE**

L'ACE est une méthode non paramétrique d'estimation du nombre d'espèces existants en utilisant la couverture de l'échantillon, qui est défini comme la somme des probabilités des espèces observées. La méthode ACE divise les fréquences observées en groupes abondants et rares. Les espèces abondantes sont celles qui comptent plus de 10 individus dans l'échantillon, et les espèces rares sont celles qui comptent moins de 10 individus. Seule l'information de présence ou d'absence d'espèces abondantes est prise en compte par la méthode ACE. En effet, les fréquences exactes pour les espèces les plus abondantes ne sont pas requises dans la méthode ACE. Par contre, les fréquences exactes pour les espèces rares sont nécessaires car l'estimation du nombre d'espèces manquantes est entièrement basée sur les fréquences d'espèces rares (Kim *et al.*, 2017).

### b. Les courbes de raréfaction

Une des méthodes simples pour mesurer la richesse en espèces, est de compter le nombre d'espèces présentes dans la communauté. Certaines communautés sont suffisamment simples pour permettre un dénombrement complet du nombre d'espèces présentes. Cependant, il est souvent impossible de dénombrer toutes les espèces d'une communauté de micro-organismes. Les échantillons de différentes tailles de séquences posent un problème de comparaison où la mesure de la richesse est affectée par la taille d'échantillon. Par conséquent, il est difficile à déterminer immédiatement la communauté qui présente la plus grande richesse

spécifique lorsque la comparaison est effectuée sur des échantillons de différentes tailles. Afin de confronter ce problème, une normalisation de la taille des échantillons sur la plus petite séquence trouvée dans un échantillon est nécessaire. La raréfaction est une technique statistique permettant d'estimer le nombre d'espèces attendues dans un échantillon aléatoire d'individus. Elle permet également des comparaisons directes d'échantillons de différentes tailles. La méthode de raréfaction dépend de la forme de la courbe d'abondance des espèces et du taux de découverte plutôt que le nombre absolu d'espèces par échantillon. Généralement les courbes de raréfaction mesurent les OTUs observées avec une profondeur de séquençage donnée, et sont utilisées pour comparer la richesse observée parmi les communautés (Hughes *et al.*, 2001 ; Kim *et al.*, 2017).

### **c. Les indices de diversité**

La biodiversité peut également être caractérisée selon différents aspects mesurés par les relations entre les espèces. Dans l'analyse de la diversité des communautés microbiennes, même s'il ne y'a pas un accord général sur le meilleur indice de diversité à utiliser, tous les indices constituent un élément important de comparaison et de description de la population présente dans les échantillons (Cardoso *et al.*, 2015 ; Kim *et al.*, 2017).

- **Indice de Shannon**

L'indice de Shannon mesure la moyenne du degré d'incertitude dans la prédiction de l'appartenance d'espèces individuelles choisies au hasard. Cet indice implique la richesse en taxon et l'abondance de chaque taxon. Plus l'indice de Shannon augmente plus le nombre d'espèces augmente et la répartition des individus entre les espèces devient uniforme (Kim *et al.*, 2017).

- **Indice de Simpson**

L'indice de Simpson reflète la probabilité que deux individus pris au hasard appartenant à la même espèce. Il varie entre 0 et 1. Plus l'indice de Simpson augmente plus la diversité diminue (Kim *et al.*, 2017).

- **Indice d'équitabilité (Evenness)**

Cet indice permet d'évaluer le degré de régularité de la répartition du nombre d'individus par espèce. Il varie entre 0 et 1. Plus la valeur est proche à 1, plus il n'existe pas d'espèces dominantes. Contrairement, plus la valeur est proche à 0 plus la communauté est dominée par certaines populations. Cet indice est généralement plus faible dans les écosystèmes perturbés qui sont dominés par les espèces les plus adaptées (Abekhti, 2015).

# *Etude expérimentale*

***Chapitre I.***  
***Beurre traditionnel,***  
***Smen/Dhan, investigation,***  
***production et consommation***  
***actuelles en Algérie***

## 1. Introduction

Actuellement, un intérêt accru sur l'étude et la caractérisation des aliments traditionnels fermentés locaux est observé. Ces produits représentent un patrimoine gastronomique appartenant à plusieurs pays ; ils doivent être préservés et protégés. L'importance de ces aliments est caractérisée par leur typicité et leurs qualités organoleptiques spécifiques à chaque produit. Les caractéristiques finales et la propriété sensoriale de ces aliments est le résultat de l'activité du consortium microbien qui est présent naturellement dans les matières premières (Tamang, 2004).

A notre connaissance aucune étude n'a traité de façon détaillée les pratiques ancestrales du *Smen/Dhan* en Algérie. La connaissance de notre patrimoine traditionnel devrait être prioritaire afin de conserver notre héritage et notre identité nationale. Le *Smen/Dhan* fait partie des habitudes alimentaires de différentes régions d'Algérie. Il est très apprécié par la population algérienne, utilisé pour agrémenter le goût de certains plats traditionnels culinaires, ainsi il est utilisé largement en médecine traditionnelle. La préparation de ce produit reste un savoir-faire transmis par les générations ; elle est différente selon chaque région et au niveau de chaque famille. Un travail d'enquête sur le terrain sur le *Smen/Dhan* a été réalisé dans 7 régions de l'Algérie. Cette investigation a pour but de collecter les informations nécessaires, pour définir la place du *Smen* dans la culture locale, déterminer ses modes de consommation et d'utilisation et identifier les méthodes de préparation selon le savoir-faire traditionnel.

## 2. Matériel et méthodes

### 2.1. Déroulement de l'enquête

Une enquête a été menée sur le terrain entre Mai 2016 et Mars 2018 dans différentes régions du Sud-Est (Biskra, El Oued et Ouargla) et du Nord-Est algérien (Batna, Khenchela, Jijel et Sétif) (Figure 14). Les régions de l'enquête ont été choisies sur la base des informations préliminaires indiquant que la préparation et la consommation du *Smen/Dhan* est assez courante dans ces régions. Nous avons ciblé 880 sujets composés de ménages et d'artisans laitiers.

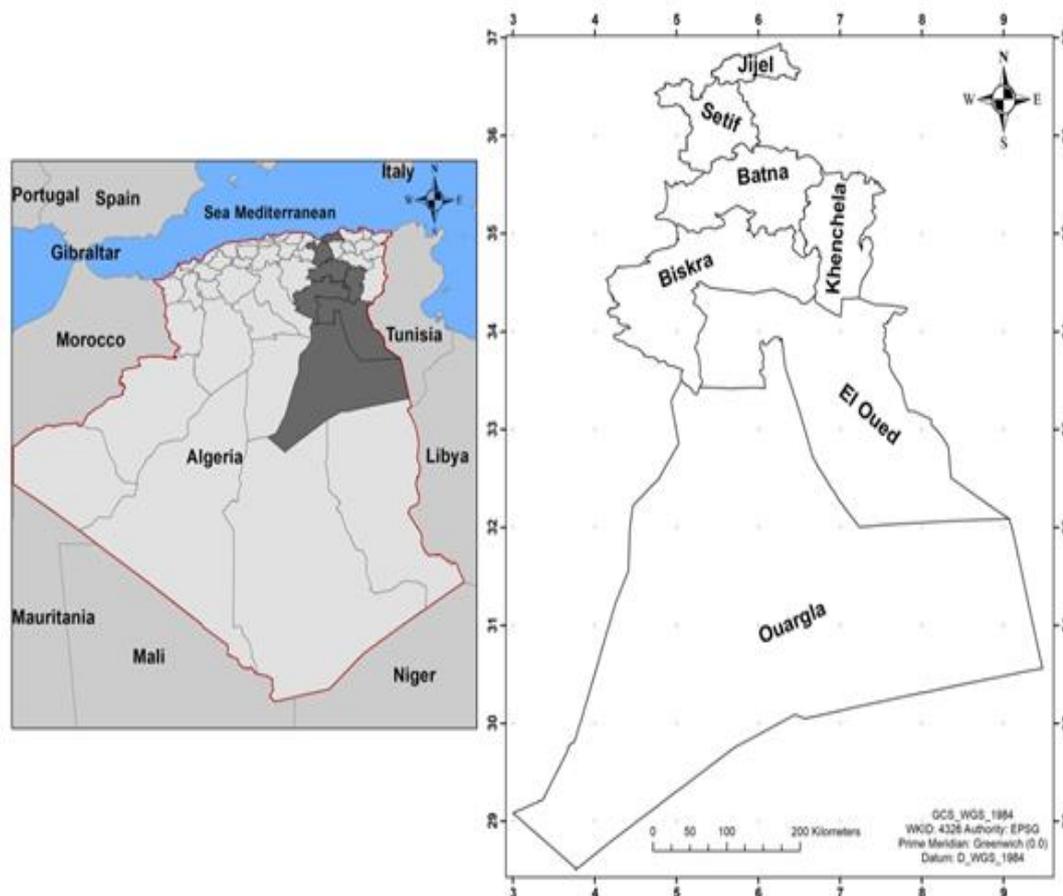


Figure 14. Carte géographique des régions où l'enquête s'est déroulée.

## 2.2. Collection des données

L'enquête s'adressait principalement aux : femmes, producteurs laitiers et agriculteurs habitués à préparer le *Smen/Dhan* et éventuellement à le commercialiser de manière informelle et avoir un regard le plus précis possible sur les pratiques associées à ce produit traditionnel.

L'enquête a été réalisée par interview (face à face) et à l'aide d'un questionnaire traduit en Français, auprès de la population ciblée. Les grandes lignes du questionnaire ont été expliquées et lues afin de faciliter l'interview. Le remplissage du questionnaire a été effectué par nous-même afin de s'assurer de l'intégrité des informations et faciliter l'analyse des données.

## 2.3. Contenu du questionnaire

Le questionnaire de l'enquête contenait quarante-huit questions. Il était divisé en cinq parties :

- **La première partie** du questionnaire contenait des questions sur l'identité de la personne interrogée (sexe, âge, activité professionnelle et résidence) ;

- **La deuxième partie** portait sur le profil de l'entreprise de la préparation de *Smen/Dhan*, sa localisation, la nature de la préparation (domestique ou autre) ;
- **La troisième partie** a permis de recueillir des informations sur le *smen* lui-même, c'est-à-dire sa place dans la culture locale, son nom local, l'aire géographique de production, le mode et la période de consommation ainsi que l'utilisation du produit ;
- **La quatrième partie** comprenait des questions sur les propriétés organoleptiques du produit (texture, couleur, odeur, goût...)
- Et **la cinquième partie** concernait la description du processus de production, les matières premières utilisées et leurs origines, ainsi que les équipements utilisés.

Le questionnaire a été élaboré et proposé par le consortium du projet international « Promotion of local Mediterranean fermented foods through a better knowledge and management of microbial resources » (*ProMedFoods*) et adapté en fonction de la nature et le mode de préparation du produit indigène (annexe 1).

#### **2.4. Difficultés rencontrées au cours de l'enquête**

Nous avons confronté à plusieurs difficultés qui ont empêché le bon déroulement de l'enquête, citant comme exemple :

- Les problèmes d'insécurité et le manque des moyens de transport lors de nos passages auprès des ménages localisés dans des régions isolées (rurales et montagneuses) ;
- Le refus de plusieurs personnes à la participation de l'enquête pour de nombreuses raisons par exemple, manque de temps pour répondre à nos questions, prudence de donner ses informations personnelles (âge et situation professionnel), la négligence et la moquerie de notre investigation etc.. ;
- Le manque d'aide de la part des personnes de l'entourage sollicité, pour pouvoir accéder aux ménages situés dans les zones isolées ;
- L'imprécision des informations données par certains ménages, surtout relatives à la quantité des ingrédients utilisés et le temps de maturation du produit fini.

#### **2.5. Analyse statistique**

Elle a été réalisée avec le logiciel XLSTAT, version 2014, en utilisant les statistiques descriptives exprimées en pourcentage de réponse à chaque question de l'enquête. Un test de corrélation de Pearson a été effectué pour déterminer la relation entre la préparation de *Smen/Dhan* et quelques variables.

### 3. Résultats

#### 3.1. Caractéristiques de la population étudiée et lien avec la préparation du *Smen/Dhan*

Le nombre de la population enquêté était de 880 sujets ; leurs âges varient de 19 à 99 ans. Cette population est composée majoritairement d'adulte de plus de 38 ans. La moyenne d'âge et la médiane de la population étudiée sont respectivement de 49,47 et 50 ans. Après avoir subdivisé les personnes interrogées en groupes d'âge de 20 ans, nous n'avons observé aucune relation entre les groupes d'âge, la situation professionnelle des sujets et la préparation du *Smen/Dhan* dans les ménages. Les résultats ont montré que la majorité des participants interrogés sont des femmes, leur pourcentage (84,54%) est hautement supérieur à celui des hommes et plus de la moitié de la population interrogée habitent dans les zones urbaines (Tableau 7).

**Tableau 7.** Structure sociodémographique des 880 personnes enquêtées

Population enquêtées	Nombre des enquêtés	Pourcentage (%)
<b>Age (ans)</b>		
19-38	202	22,95
38-58	424	48,18
59-78	226	25,68
79-99	28	3,18
<b>Genre</b>		
Féminin	744	84,54
Masculin	136	15,45
<b>Région</b>		
Urbaine	489	55,56
Rurale	391	44,43
<b>Activité professionnelle</b>		
Femmes au foyer	701	79,65
Etudiants	29	3,29
Fonctionnaire d'état	133	14,77
Retraités	17	1,93

#### 3.2. Place du produit dans la culture locale

*Smen* ou *Dhan*, est un produit très apprécié par les consommateurs pour ses caractéristiques organoleptiques typiques, ce produit fait partie des habitudes alimentaires des algériens, les résultats de l'enquête ont montré que 96,47% de la population connaissait le produit même s'il n'est pas préparé par l'ensemble des familles algériennes, au total uniquement

47,6% ont déclaré qu'elle préparait ce produit au sein de leur ménage, soit pour l'autoconsommation ou pour la commercialisation. Il est à noter que la dénomination de ce produit est différente selon chaque région, nous avons constaté que la majorité des régions enquêtées opte pour l'appellation *Dhan* (Batna, Biskra, El Oued, Khenchela, Sétif, Ouargla), à l'exception de la région de Jijel où l'appellation la plus utilisée est *Smen*.

En général *Smen/Dhan*, est largement utilisé par la population algérienne, en effet 75,22% des personnes interrogées ont déclaré qu'elles consommaient ce produit et l'utilisent régulièrement dans leurs habitudes alimentaires, soit pour agrémenter des plats traditionnels, ou pour d'autres utilisations médicinales.

Les résultats de l'enquête ont montré que la vente de *Smen/Dhan*, est faite de façon informel à travers les ménages, dans les marchés hebdomadaires ou chez les artisans laitiers. En général le prix de ce produit varie en fonction de l'origine du lait utilisé pour sa préparation et la région. Nous avons constaté que le prix d'un Kg de *Dhan* est de 2000 DA dans les régions du Sud-est de (Biskra, El Oued, Ouargla) alors qu'il est de 800 DA dans les régions du Nord-est.

**Tableau 8.** Répartition de la population enquêtée selon la connaissance, la fabrication, la consommation et l'achat de *Smen/Dhan* dans différentes régions d'Algérie.

Régions (Wilayas)	Répondants (n)	Connaissance (n)	Préparation (n)	Achat (n)	Consommation (n)
Batna	100	100	46	38	77
Biskra	100	100	21	50	67
El Oued	100	100	53	42	73
Jijel	100	69	42	21	68
Khenchela	276	276	158	114	221
Sétif	104	104	48	33	79
Ouargla	100	100	51	31	77
<b>Total (n)</b>	880	849	419	329	662
(%)	100	96,47	47,61	37,38	75,22

### 3.3. Procédé traditionnel de préparation de *Smen/Dhan*

Les résultats de l'enquête, ont permis de définir le diagramme de préparation de *Smen/Dhan*, selon la méthode traditionnelle. Les différentes étapes de préparation sont décrites ci-dessous (figure 16 (A, B)).

### 3.3.1. Matière première utilisée

Différents types de lait peuvent être utilisés pour préparer le beurre destiné à la préparation de *Smen*. Le lait cru de vache (non pasteurisé), de chèvre et de brebis (ou un mélange des deux lait) pourraient être utilisés. En effet, l'origine du lait se diffère significativement en fonction de chaque région, et cela dépend largement du type de cheptel de la région elle-même. Dans les régions du Nord-Est, le lait de vache est le lait le plus utilisé, selon les réponses des enquêtés (Batna : 73,9% ; Jijel : 100% ; Khenchela : 70% ; Sétif : 100%). Alors que, dans les régions du Sud-Est, le lait de chèvre est le plus utilisé (Biskra : 92,75% ; Ouargla ; 98,68% ; El Oued : 100 %).

L'utilisation du lait de brebis est rare, selon la réponse des enquêtés, il est utilisé uniquement en mélange avec le lait de chèvre pour la préparation de *Smen/Dhan*.

### 3.3.2. Coagulation du lait

Le lait cru, est fermenté spontanément à une température ambiante jusqu'à la coagulation. La fermentation peut durer de 12 h jusqu'à 120 h. En effet, le temps de la fermentation est différent en fonction des saisons, notant qu'en hiver, il est plus long et peut aller jusqu'à 120 h, à cette raison, certaines personnes ajoutent des ingrédients au lait, afin d'accélérer le processus de la fermentation : jus de citron, vinaigre, *Raib* (lait fermenté), du yaourt, *klila* (fromage) et/ou eau chaude, ou elles laissent le lait se coaguler devant une source chaude. Au printemps et en été, en raison des températures élevées, le temps de la fermentation peut varier entre 12 et 24 h. Le coagulum obtenu est appelé *Raib*, il peut être consommé tel qu'il est ou transformé davantage comme décrit ci-dessous.

### 3.3.3. Préparation du beurre

Pour la préparation du beurre, le *Raib* est ensuite baratté à l'aide d'un outil de barattage. Ce dernier peut s'effectuer : manuellement à l'aide de la *Chekoua* traditionnelle, une bouteille en plastique ou automatiquement à l'aide d'une baratte électrique (Figure 15).

Généralement, le barattage avec la *Chekoua*, est surtout utilisé par certains ménages dans les zones rurales. Les résultats ont montré que 21% de la population enquêtée utilisaient la *Chekoua*, alors que 41 et 38% des sujets interrogés utilisaient respectivement des barattes électriques et des bouteilles en plastique. La durée de barattage varie en fonction de l'outil utilisé ainsi que de la température ambiante, la quantité du *Raib* et la teneur en matière grasse du lait. Selon les réponses, la durée du barattage est variable selon l'outil utilisé (*Chekoua* et bouteille : 1 à 2 h ; baratte électrique : 30 min à 1 h). À la fin du barattage, une quantité d'eau froide ou chaude pourrait être ajoutée au mélange selon la température ambiante, afin de favoriser

l'agglomération des grains de beurre. À la fin du barattage, deux phases apparaissent. L'une est solide (*Zebda* : beurre frais), l'autre est liquide (*Lben* : babeurre).



**Figure 15.** Différents outils utilisés pour le barattage du Raib (a : *Chekoua* traditionnelle en peau de chèvre, b1 et b2 : baratte traditionnelle en bois, c : baratte électrique).

### 3.3.4. Préparation du *Smen/Dhan*

La préparation de *Smen* est basée sur la transformation du beurre frais en un produit affiné, selon les réponses, la préparation de *Smen* est transmise par des méthodes identiques à travers les générations. Cette production est liée à deux raisons, la première consiste à préserver le beurre plus longtemps et la deuxième raison pour son importance comme ingrédient, dans la préparation de certains plats et gâteaux traditionnels, mais aussi pour son utilisation possible en médecine traditionnelle.

En effet, le beurre qui sert à la préparation du *Smen/Dhan*, peut être préparé au niveau des ménages (61,3% des enquêtés préparent le beurre eux-mêmes), ou acheté directement (39,7%, l'achètent chez le laitier). Cette pratique a été observée dans les ménages, des zones urbaines à Batna, Jijel, Sétif et Khenchela qui utilise le beurre acheté ; contrairement aux ménages des zones rurales et ceux situés dans les régions du Sud-Est algériens.

Les laitiers sont des artisans commerçants qui collectent le lait cru à partir des fermes. Une partie est vendue de façon informelle et l'autre quantité est utilisée pour la préparation des produits artisanaux (*Lben*, *zebda*, fromage frais et parfois le *Smen/Dhan*), Ce dernier est préparé par leurs mères ou leurs épouses selon le procédé traditionnel.

Après le barattage, le beurre obtenu, peut être transformé immédiatement en *Smen/Dhan*, ou jusqu'à l'accumulation d'une grande quantité du beurre. En effet, 31,6% des ménages procèdent directement à la transformation du beurre en *Smen/Dhan*, tandis que le reste attendent jusqu'à l'accumulation d'une quantité suffisante. Dans ce dernier cas, le beurre est

conservé au réfrigérateur ou à une température ambiante avec une petite quantité de sel ce qui permet de conserver le beurre plus longtemps.

Généralement la méthode de préparation de *Smen*, est différente en fonction des régions de l'enquête, cette différence a été observée entre les régions de Batna, Khenchela, Sétif d'une part et entre les régions de Biskra, El oued, Jijel, Ouargla d'autre part. En effet, suite au lavage du beurre, les ménages des régions de Batna, Khenchela, Sétif procèdent directement au salage du beurre, tandis que ceux des régions de Biskra, El Oued, Jijel, Ouargla, utilisent une méthode différente ; qui implique d'abord un traitement thermique du beurre suivi de l'ajout d'un ou plusieurs ingrédients (voir figure 16 (A, B)).

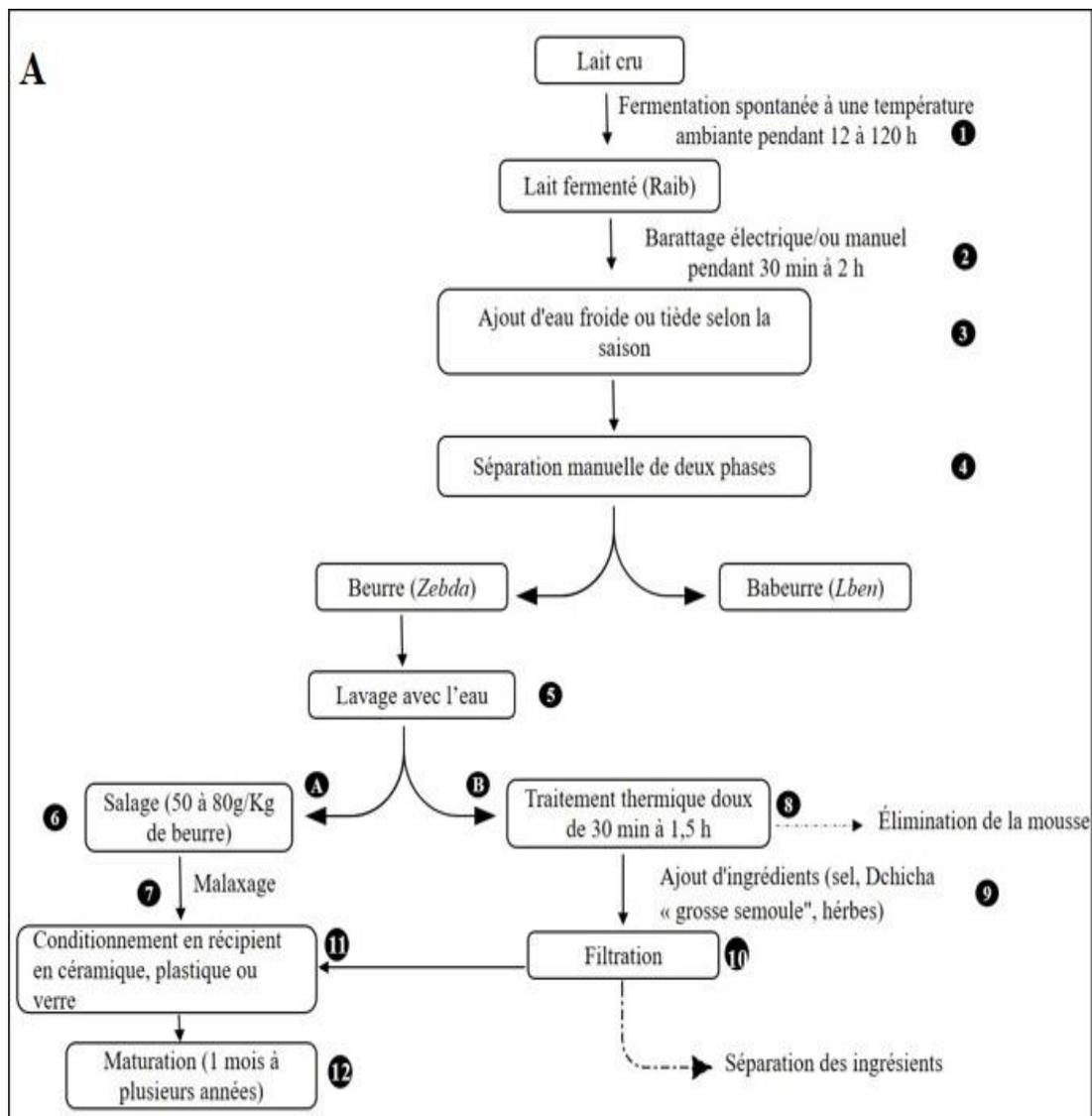
#### **a. Méthode de salage**

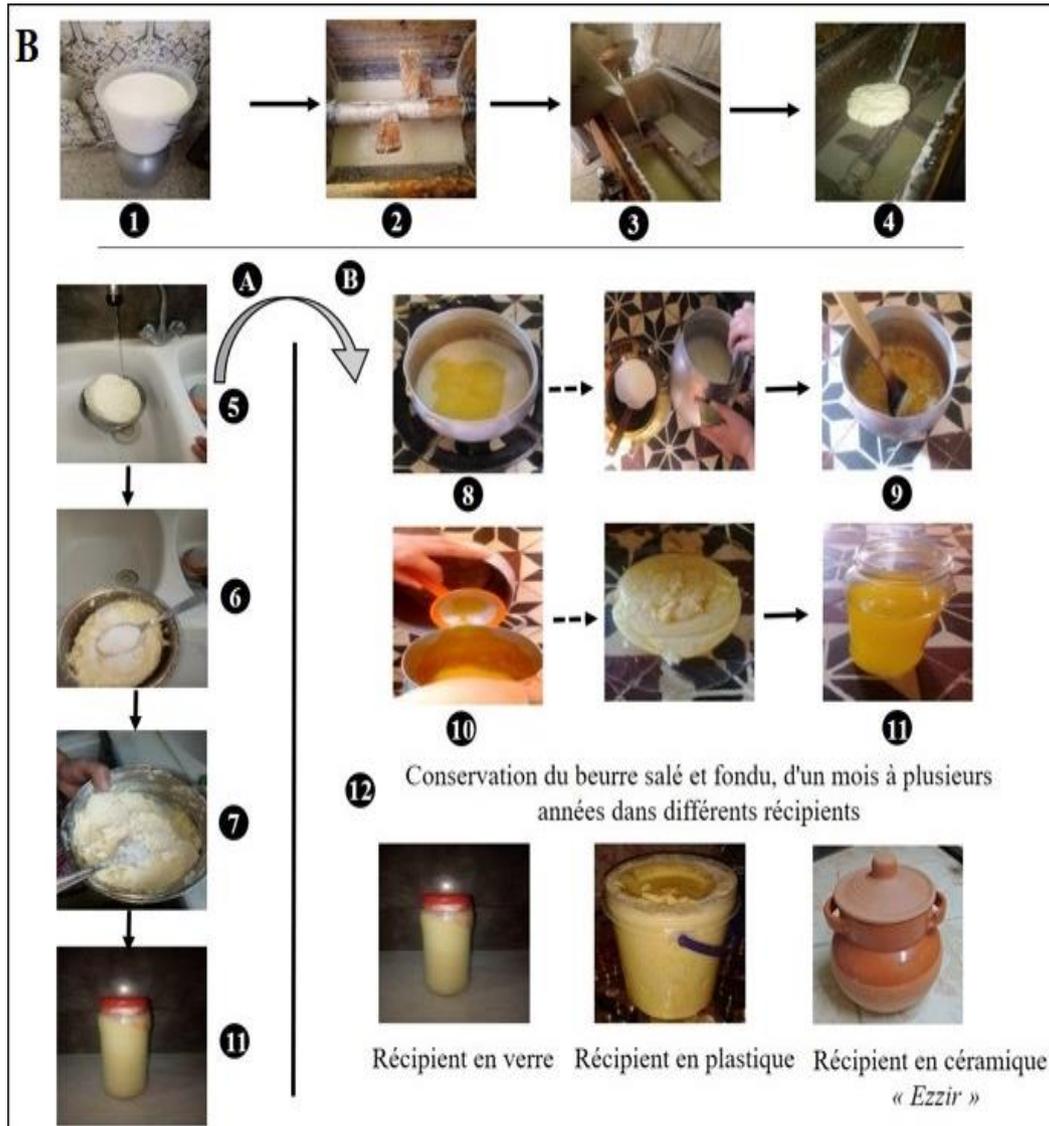
Cette méthode est pratiquée dans certaines régions (Batna, Khenchela et Sétif). La première étape consiste à laver le beurre plusieurs fois jusqu'à la disparition totale de toute substance résiduelle provoquant l'altération durant le stockage, ensuite une quantité de sel est ajoutée. Les réponses ont été très diversifiées, et les personnes interrogées ne connaissaient pas exactement la concentration en sel utilisée, seulement le fait que le beurre doit être bien salé selon 60% de la population enquêtée et sur la base de notre estimation, la concentration en sel varie entre 50 et 80 g/kg de beurre. Il est à noter que certains ménages (2,20 %) ajoutent une quantité de *Smen/Dhan* déjà mature (1 à plusieurs années) à celui préparé récemment ; afin de minimiser le temps d'affinage et avoir un résultat rapide. Après l'addition du sel, le beurre est bien malaxé, pour favoriser une distribution homogène du sel, ensuite le beurre salé, est laissé un certain temps, afin de permettre l'exsudation de l'eau à la surface et éliminée pour prolonger la durée de conservation de *Smen/Dhan*.

#### **b. Méthode de traitement thermique**

La méthode de traitement thermique est adoptée dans les régions de Biskra, Jijel, El Oued et Ouargla, dans cette méthode le beurre est fondu à basse température ; il doit être fondu lentement afin d'éviter la dégradation de la matière grasse et pour une meilleure séparation des résidus de *Lben* et des impuretés. A l'ébullition, une mousse blanche apparaît à la surface du beurre fondu, selon la réponse des interrogés, la mousse correspond aux résidus de *Lben*, cette dernière est ensuite écumée à l'aide d'une cuillère à soupe, suivie de l'ajout de différents ingrédients, le principal ingrédient utilisé pour cette méthode, est la grosse semoule appelé *Dchicha*, en effet, 92,5% de la population ajoutent la *Dchicha* au moment de l'ébullition, sous une agitation continue. La quantité de *Dchicha* ajoutée est généralement approximative ( $\leq 160$  g/Kg de beurre) ; son but est d'absorber les résidus de *Lben* et d'eau pour éviter l'altération durant le stockage et l'obtention d'un produit stable. En plus de cet ingrédient, des quantités de

sels ( $\leq 8$  g/Kg de beurre) sont ajoutés selon 88,75% des ménages. D'autres ingrédients sont également ajoutés, comme les herbes pour aromatiser le produit (selon 41,66 % des répondants des wilayas de Biskra, El oued et Ouargla). Les herbes les plus utilisées pour aromatiser le Smen, sont : le romarin (*Salvia rosmarinus*), Le thym (*Thymus spp.*), le genévrier (*Junipirus spp.*) et le fenugrec (*Trigonella foenum graecum*), ces dernières sont utilisées en petites quantités (une pincée). Enfin, 7,90% des répondants ajoutaient également un petit morceau d'oignon au mélange. Le temps de la clarification varie selon les ménages (30 min à 1,5 h). Cette variation est justifiée, par la décantation des grains de semoule. A la fin de cette étape, le produit est filtré à l'aide d'un tamis ou d'un morceau d'étamine pour éliminer toutes traces d'impuretés. Généralement, la semoule cuite *Dchicha* est récupérée pour être consommée selon 35% des ménages enquêtés.





**Figure 16.** Diagramme des deux méthodes utilisées par les ménages (A) et illustrations correspondantes aux étapes des préparations traditionnelles du *Smen/Dhan* (B).

### 3.4. Conditionnement, maturation et stockage

Le conditionnement du beurre salé ou clarifié est réalisé dans des récipients en verre (53,45%), en plastique (34,04%) ou en céramique traditionnel appelé *Ezzir* (12,5%). *Ezzir* est généralement plus utilisé et préféré par les habitants des zones rurales. Le beurre doit être bien compacté pour éliminer l'entrée d'air, et le récipient doit donc être complètement rempli pour minimiser l'espace libre, ainsi il doit être bien fermé. Certains enquêtés ont déclaré, qu'ils recouvrent la surface du récipient avec une pâte de semoule pour empêcher définitivement l'entrée d'air.

En général, la maturation, s'effectue dans un endroit sec, à l'obscurité et à une température ambiante (53,45%). Cependant dans le Sud algérien, le produit est conservé au

réfrigérateur (41,48%), à cause des hautes températures. Cependant, 3,45%, des enquêtés conservent le *Smen* soit à une température ambiante ou au réfrigérateur selon la saison, tandis que 1,59% l'enterrent sous terre. La durée de la maturation, varie fortement en fonction des préférences des consommateurs (goût de *Smen* plus prononcé). Au fait elle peut durer de quelques mois jusqu'à plusieurs années.

### **3.5. Consommation de Smen/Dhan**

Concernant l'utilisation du *Smen/Dhan* dans la culture locale, et sur la base des réponses de la population enquêtée, il peut être utilisé pour différents objectifs, soit pour agrémente le goût de certains plats traditionnels ou pour des utilisations thérapeutiques. En ce qui concerne l'utilisation culinaire, les consommateurs utilisent *Smen/Dhan* avec un temps de maturation compris entre 1 mois et 2 ans. D'où son caractère typique dépend largement du temps de la maturation. Il est généralement utilisé, à la fin de la cuisson, comme agent aromatisant dans certains plats traditionnels tels que le *couscous*, *chakhchoukha* et *trida*, ainsi que pour la cuisson des viandes, et pour la préparation de gâteaux traditionnels tels que *makrout*, *baklawa*, *mbardja* et *rfis*.

Cependant, le *Smen* qui a une durée de maturation supérieure à 2 ans, peut également être utilisé à des fins thérapeutiques, cette pratique est beaucoup plus observée dans les régions du sud algérien. Il peut être consommé avec le café pour traiter la toux ou la grippe, il est également utilisé pour traiter les blessures, les brûlures, les migraines, les hémorroïdes, et l'eczéma avec une application superficielle. Nous avons également noté que certains agriculteurs utilisent *Smen/Dhan* pour traiter les traumatismes et les blessures de leurs vaches et d'autres animaux.

## **4. Discussion**

*Smen*, occupe une place importante dans la culture locale, vu ses caractéristiques finales typiques. Le procédé de la préparation traditionnelle a été développé par les anciens peuples, afin de répondre aux besoins des consommateurs (conservation du beurre et pour des fins culinaires et thérapeutiques). La préparation du *smen* est exécutée indistinctement par des femmes appartenant à tous les groupes d'âge et n'a aucune relation avec l'activité professionnelle, cela peut s'expliquer par le fait qu'elle repose sur une méthode simple et rapide contrairement à la préparation du *couscous* traditionnel, qui nécessite plus d'efforts et d'expériences. Bekhouche *et al.*, (2013) ont rapporté que le *couscous Lemzeïet* préparé à partir de la semoule de blé fermenté, était principalement préparé par des femmes âgées de 40 ans et plus. Cette observation n'est pas surprenante étant donné le rôle des femmes dans la fabrication

des produits traditionnels, dont le *Smen/Dhan*. Pour toutes ces femmes, le savoir-faire ou l'art de la fabrication du *Smen/Dhan* s'est transmis par leurs mères, grand-mères ou belles-mères comme précédemment rapporté par Gagaoua et Boudchicha (2018) pour les produits carnés ethniques des pays d'Afrique du Nord et de la Méditerranée. Tout en gardant et en préservant les mêmes habitudes alimentaires, le processus de fabrication de *Smen/Dhan* a été considéré par les personnes interrogées comme un héritage précieux. En revanche, les hommes jouent un rôle relativement insignifiant dans la préparation du *Smen/Dhan*, mais sont impliqués dans les tâches de vente.

Concernant les méthodes utilisées pour l'obtention du beurre frais et sa maturation, L'ajout de l'eau (chaude ou froide), afin de favoriser l'agglomération des grains de beurre est également utilisée par les marocains (Tantaoui Elaraki et El Marrakchi, 1987). La transformation du beurre en *Smen* conduit à l'obtention d'un produit plus stable d'un point de vue organoleptique et microbiologique ainsi économique en transformant le surplus de beurre en *Smen* (Benkerroum et Tamim., 2004).

En Algérie, *Smen* peut être produit par deux méthodes de préparation distinctes, en fonction de chaque région. Ces deux méthodes sont assez similaires à celles dans d'autres pays. La méthode de salage, est existé également au Maroc, dont le procédé de préparation est similaire à celui rapporté par Tantaoui-Elaraki et El Marrakchi, (1987) ; Benkerroum et Tamime, (2004). Cependant, la méthode de traitement thermique est similaire, à celle de la préparation du *Samna* en Egypte et dans une moindre mesure au *Ghee* éthiopien et indien, sauf que les températures pour liquéfier le beurre sont différentes. En effet, pour le *Samna*, le beurre est chauffé sous une agitation continue à 50 ou à 60°C tandis que pour le *Ghee* éthiopien et indien, la température peut atteindre 110°C à 120°C, permettant l'élimination d'humidité et le développement d'une saveur spécifique (Sserunjogi et al., 1998 ; Chaudhary *et al.*, 2019). Selon Illingworth *et al.*, (2009). Le *Ghee* peut être défini comme une graisse pure clarifiée obtenue exclusivement à partir du lait, de la crème ou du beurre par application d'un traitement thermique conduisant à une élimination de l'humidité et des graisses solides (Illingworth *et al.*, 2009).

En général, la maturation du *Smen* est effectuée à une température ambiante et à l'obscurité et peut durer de quelques mois jusqu'à plusieurs années. Benkerroum et Tamim (2004) ont également signalé que la période de la maturation du *Smen* pourrait être diminuée à 30 jours après le mélange d'une portion (environ 5,8%) de *Smen* mûri avec un produit fraîchement préparé. Le *smen* mature a un pH acide, une teneur en sel (NaCl) relativement élevée et une faible activité d'eau. Ces paramètres vont contribuer potentiellement à sa stabilité

microbiologique et à l'augmentation de la durée de conservation (Sserunjogi *et al.*, 1998 ; Afsaneh *et al.*, 2016 ; Gemechu et Yeteneyat, 2017).

A la fin de la maturation, le produit obtenu, est fortement aromatisé, il peut être utilisé pour des fins culinaire voir thérapeutique en fonction de son degré de maturation et de lipolyse. Ceci est en accord avec des travaux antérieurs, qui indique que le *Smen* mûré possède un goût caractéristique fort, rance et salé, est principalement utilisé pour enrichir le goût et la saveur de certains plats traditionnels marocains (Benkerroum, & Tamime, 2004). Cependant Gemechu et Yeteneyat (2017), ont indiqué que le *Ghee* qui a un temps de maturation supérieur à 1 an, est destiné au traitement des toux chroniques. Le *Ghee* indien a été également rapporté pour ses utilisations médicinales, ceci est en accordance avec les résultats de notre enquête (Gandhi et Lal, 2015). Toutefois, Les effets thérapeutiques du *Smen* n'ont pas encore été étudiés mais concernant le *Ghee*, Ahmad et Saleem (2020) ont montré qu'il a une forte concentration en acide linoléique conjugué (CLA) qui possède des propriétés antioxydantes, anticancérigènes, antidiabétiques et antiathérogènes (Chinnadurai *et al.*, 2013).

## **5. Conclusion**

A travers cette étude, il a été constaté que le *Smen/Dhan* est un produit important dans la culture de la population de l'Est et le Sud algérien. Il représente un aliment ethnique avec un savoir-faire spécifique et fait partie des habitudes alimentaires algériennes. *Smen/Dhan* est préparé par les ménagères et prend une place importante au niveau familial. Ce produit est utilisé pour l'autoconsommation, et peut être commercialisé pour fournir un revenu à la famille. Malheureusement, la commercialisation se fait généralement dans des circuits informels car le *Smen/Dhan* n'a encore reçu aucuns labels de qualité et de préservation d'origine, malgré son importance dans la cuisine et la médecine traditionnelles. Il serait donc très intéressant de créer des coopératives qui pourraient commercialiser ce produit de manière formelle, tout en garantissant une meilleure qualité avec un label de propriété spécifique. Il pourrait aider les producteurs locaux à améliorer la qualité et la sécurité globales du produit et promouvoir la gastronomie patrimoine de l'Algérie.

Parce que le *Smen/Dhan* algérien est un aliment fermenté et aromatisé naturellement ; les prochains chapitres de la thèse seront consacrés à l'étude de la diversité microbienne en identifiant les micro-organismes, clés impliquées dans ses caractéristiques sensorielles, pour mieux contrôler les processus de la fermentation et par conséquent, ses attributs de qualité.

*Chapitre II. Analyse  
physicochimique et  
microbiologique des  
échantillons de Smen/Dhan  
collectés et ceux prélevés  
durant sa préparation  
traditionnelle*

## **1. Introduction**

Les aliments fermentés naturellement constituent la source d'alimentation la plus importante dans de nombreuses communautés à travers le monde. Ils ont été développés empiriquement par les anciennes populations selon un savoir-faire traditionnel ; afin de conserver les matières premières rapidement périssables (Tamang et Kailasapathy, 2010). Ces aliments abritent des communautés microbiennes complexes (bactéries, levures, champignons filamenteux etc..) qui sont à l'origine de la modification des caractéristiques organoleptiques (Blandino *et al.*, 2003 ; Giraffa, 2004 ; Shoustra *et al.*, 2014). Ainsi, ils peuvent abriter des microorganismes de contamination et des microorganismes pathogènes, ces derniers sont ceux autre que la flore responsable d'une fermentation spécifique et causent une altération du produit soit sur sa qualité sanitaire ou bien sur sa qualité marchande (Boonefooy *et al.*, 2002). Au cours de la fermentation, les conditions primaires de la matière première changent de façon globale : modification du pH du milieu, l'activité de l'eau, la nature des constituants, ainsi elle engendre la production de différents métabolites tels que les acides organiques, les bactériocines ainsi que la libération des composés volatils.

Cette partie est relative à l'étude microbiologique (qualité hygiénique et sanitaire et identification de la flore impliquée dans l'affinage), et l'étude de certains paramètres physico-chimiques classiques. Elle a été réalisée sur des échantillons de *Smen/Dhan* collectés auprès des ménages et ceux prélevés au cours de sa préparation.

L'évaluation de la qualité hygiénique et sanitaire a été effectuée par la recherche de la flore totale aérobie mésophile (FTAM), des coliformes totaux et fécaux, des Staphylocoques (*Staphylococcus aureus*), des Clostridiiums sulfito-réducteur et des Salmonelles. Les différents paramètres physico-chimiques recherchés (pH, humidité, indice d'acide, taux de sel et degré Dornic), ont pour but de connaître les modifications physicochimiques au niveau des matrices du *Smen/Dhan*.

## **2. Matériel et méthodes**

### **2.1. Echantillonnage**

#### **2.1.1. Echantillons collectés auprès des ménages**

Le choix des différents échantillons collectés, a été basé sur les résultats de l'enquête, qui nous ont permis de connaître les méthodes traditionnelles de préparation de *Smen/Dhan*. Les informations sur les échantillons collectés ont été bien notées (Boussekine *et al.*, 2020), afin de prendre en considération les facteurs environnementaux impliqués dans la détermination de sa qualité finale. 15 échantillons ont été collectés à partir différentes régions d'Algérie. Ils

ont été récupérés dans leurs récipients de conservation d'origine, sur chaque récipient, la traçabilité de l'échantillon est indiquée (région, origine de la matière première, méthode de préparation et temps de maturation). Le transport des échantillons a été effectué dans une glacière puis ils ont été conservés à 4°C (Tableau 9).

**Tableau 9.** Principales caractéristiques des échantillons de *Smen/Dhan* collectés auprès des ménages résidant dans 7 wilayas.

Codes	Régions	Origines du lait	Méthodes de préparation	Temps de maturation (mois)	Conservation
B1	Batna	Vache	Salage	120	Température ambiante
B3				<12	
B4					
B5				24	
Bi3	Biskra	Chèvre + brebis	Traitement thermique	<12	
E10	El Oued	Chèvre		12	
Jn	Jijel	Vache		<3	
K1	Khenchela	Chèvre	Salage	6	
K2				10	
O1	Ouargla		Traitement thermique	12	
O3				12	Température ambiante
S1	Sétif	Vache	Salage	6	
S2				2	
S3				1	
S5				24	

### 2.1.2. Echantillons prélevés durant la préparation traditionnelle du *Smen/Dhan*

Afin de suivre l'évolution de la biodiversité microbienne et la stabilité de certains microorganismes, nous avons jugé nécessaire d'étudier cette dynamique au niveau de chaque étape de la préparation du *Smen* et afin d'en appréhender la source et la nature de la biodiversité ; des échantillons ont été prélevés au niveau des ustensiles utilisés.

Un échantillon a été préparé auprès d'un ménage au niveau de la région de Sétif en utilisant le savoir-faire traditionnel (Figure 17). La préparation a été effectuée selon le protocole suivant :

Le lait cru a subi une fermentation spontanée à une température ambiante pendant 48 h ; après coagulation, le caillé obtenu (*Raib*) a été baratté avec une baratte traditionnelle en bois munie d'un dispositif électrique. Au cours du barattage, du lait chaud a été rajouté afin de

favoriser l'agglomération de la matière grasse. Après 55 minutes de barattage, le beurre cru a été récupéré à l'aide d'une écumoire, et son rendement était de 750 g pour 30 L de lait utilisé. Le beurre cru (750 g) a servi pour la préparation du *Smen/Dhan* ; il a été lavé plusieurs fois afin de se débarrasser des impuretés et toutes traces de *Lben* qui pourrait provoquer son altération durant sa conservation. Ensuite, 2 cuillères à soupe de sel (~46 g) ont été ajoutées ; le mélange a été bien homogénéisé et stocké dans une marmite bien couverte, pendant 7 jours à une température ambiante ; afin de permettre l'exsudation complète des résidus d'eau. Le beurre salé a été conditionné dans un bocal en verre hermétique (de façon à remplir complètement le bocal) et conservé dans un endroit sec (à l'abri de la lumière à température ambiante), pour une période de maturation de 6 mois.

Différents échantillons ont été collectés durant la préparation :

**- Lait et Raib**

Le lait et *Raib* ont été prélevés dans des conditions aseptiques. Pour chaque produit, 100 mL ont été utilisés pour les analyses microbiologiques et physicochimiques, alors que 50 mL sont répartis en 10 mL dans 5 tubes coniques de 25 mL de capacité et centrifugés (4000 g/10 min), les culots de centrifugation ont été conservés à -20°C, pour d'autres analyses.

**- Echantillons de la baratte (bio\_baratte) et du récipient utilisé pour la maturation (bio\_récipient)**

Avant la préparation du beurre, la baratte utilisée a été raclée à l'aide d'un écouvillon stérile, c'est l'échantillon bio\_baratte et avant la conservation du beurre salé, le récipient a été aussi raclé à l'aide d'un écouvillon, c'est l'échantillon bio\_récipient ; puis chaque écouvillon a été placé dans 9 mL d'eau physiologique stérile (0,9% NaCL). Les deux solutions ont été centrifugées (4000 g/10 min), les culots ont ensuite été conservés à -20°C, pour d'autres analyses.

**- Lait ajouté pendant le barattage (Lait\_barattage)**

50 mL de lait utilisé durant le processus du barattage ont été prélevés et répartis dans 5 tubes (10 mL chacun) puis centrifugés (4000 g/10 min), et les culots ont été conservés à -20°C.

**- Beurre cru**

Avant le salage du beurre, 20 g ont été prélevés pour les analyses microbiologiques et physicochimiques, et 25 g (5 g/pot stérile) ont été conservés à -20°C pour d'autres analyses.

**- Sel**

50 g de sel de table, ont été conservés dans deux pots stériles (25 g chacun) à -20°C pour d'autres analyses.

### - *Smen/Dhan* mature

Après chaque temps de maturation (1, 2, 3 et 6 mois), le *Dhan* a été d'abord bien mélangé selon la méthode traditionnelle ; 20 g ont été prélevés pour les analyses microbiologiques et physicochimiques et 25 g pour être conservés à -20°C (5 g/pot stérile) pour d'autres analyses.



**Figure 17.** Etapes de préparation traditionnelle du *Smen/Dhan*.

## 2.2. Caractérisation des paramètres physicochimiques

La caractérisation physicochimique permet d'avoir un aperçu sur les modifications de certains paramètres et qui sont des indicateurs de la qualité du produit.

### 2.2.1. pH

Le pH a été mesuré à l'aide d'un pH-mètre (Ohaus ST3100). Pour les échantillons de *Smen/Dhan* et du beurre, 10 g ont été fondus et homogénéisés puis l'électrode a été introduite directement dans chaque échantillon. Le pH du lait et du *Raib* ont été mesurés en insérant directement l'électrode dans 10 mL de chaque échantillon. Trois mesures ont été effectuées sur chaque échantillon puis les moyennes ont été calculées.

### 2.2.2. Humidité

La teneur en eau a été évaluée par la perte du poids initial (%), obtenue par dessiccation de 5 g d'échantillons de *Smen/Dhan* ou de beurre cru, dans une étuve (+102°C ±2°C) jusqu'à l'obtention d'un poids constant (Wolff, 1968).

$$\text{Humidité} = \frac{100 (p_1 - p_2)}{p_1}$$

$p_1$  : poids initial de la prise d'essais (g) ;  $p_2$  : poids de la prise d'essais après dessiccation (g)

### 2.2.3. Indice d'acide

L'indice d'acide d'un lipide est la masse en milligrammes d'hydroxyde de potassium (KOH), nécessaire pour neutraliser les acides gras libres présents dans 1 g de corps gras. Il correspond à la teneur en acide gras libre dans un produit. La détermination de l'indice d'acide donne une idée sur le degré de la lipolyse, dans la mesure où les acides gras libres sont des produits d'hydrolyse des triglycérides. Le principe consiste à neutraliser ces acides gras libres par une solution alcoolique de KOH (Paquot, 1979). Une prise d'essai de 5 g (Beurre ou *Smen*) a été dissoute dans un mélange d'éthanol et d'oxyde de diéthyle (100 mL v/v), préalablement neutralisé avec une solution de KOH (0,1N), en présence de la phénolphthaléine comme indicateur de couleur jusqu'au virage de l'indicateur de la couleur rose pâle, la coloration doit persister environ 10 secondes.

$$\text{Indice d'acide} = \frac{56,1 \times V \times C}{m}$$

56,1 : Masse molaire de KOH (g) ; V : Volume de KOH (mL) ; C : Concentration, de KOH (mol/L) ; m : Masse de la prise d'essai (g)

### 2.2.4. Taux de sel

C'est la mesure de la teneur de chlorure de sodium exprimée en pourcentage pondéral. Le principe consiste sur le titrage des chlorures de sodium présent dans la prise d'essai au moyen d'une solution de nitrate d'argent (AgNO<sub>3</sub>) en présence de chromate de potassium comme indicateur de couleur (Wolff, 1968). Une prise d'essais (Beurre ou *Smen*) de 5 g a été fondue dans 100 mL d'H<sub>2</sub>O à 100°C, le mélange a été bien homogénéisé puis refroidi (50-55°C). Le titrage du chlorure de sodium présent dans la prise d'essai a été réalisé avec une solution de nitrate d'argent (AgNO<sub>3</sub> : 0,1 N) en présence de 2 mL de chromate de potassium (K<sub>2</sub>CrO<sub>4</sub> solubilisé dans l'H<sub>2</sub>O) comme indicateur de couleur, jusqu'à l'apparition d'une couleur brunâtre qui persiste pendant une minute (Wolff, 1968).

$$\text{Taux de sel (\%)} = \frac{(58,5 \times 0,1N (V_1 - V_0))}{p}$$

N : Normalité de la solution d'AgNO<sub>3</sub> ; V<sub>1</sub> : Volume d'AgNO<sub>3</sub> (mL) ; V<sub>0</sub> : Volume d'AgNO<sub>3</sub> (mL) utilisé dans l'essai à blanc ; p : Masse de l'échantillon (g) ; 58,5 : masse molaire de NaCl.

### 2.2.5. Acidité titrable (°D)

L'acidité titrable est exprimée en degré Dornic (1°D correspond à 0,1 g d'acide lactique obtenu par la fermentation lactique). Son principe est de neutraliser l'acide lactique contenu

dans 10 mL de l'échantillon (Lait ou *Raib*), par une solution d'hydroxyde de sodium (NaOH : 0,1 N) jusqu'à virage de l'indicateur de couleur, la phénolphthaléine et l'apparition d'une couleur rose pâle, la coloration doit persister environ 10 secondes (AOAC, 1975).

$$Ca = \frac{(Cb \times Vb \times Mac)}{Va}$$

Cb : Concentration de NaOH ; Vb : Volume de NaOH (mL) ; Mac : Masse molaire de l'acide lactique ; Va : Volume de l'échantillon

### **2.3. Analyse microbiologique**

#### **2.3.1. Préparation des échantillons**

L'échantillon de beurre ou de *Smen* a été fragmenté à l'aide d'un couteau stérile et 2,5 g sont placés dans un tube à essais avec 2,1 mL d'une solution de Ringer au ¼. Après homogénéisation, le mélange a été chauffé au bain marie (40°C) jusqu'à séparation des deux phases et centrifugé (3500 rpm/10 min) (Idoui et al., 2008). 1 mL de la phase aqueuse a été prélevé à la pipette et introduit dans 9 mL d'une solution de Ringer ¼ stérile. Le mélange sert à la préparation des dilutions (de 10<sup>-1</sup> jusqu'à 10<sup>-9</sup>, selon la nature de chaque échantillon).

#### **2.3.2. Evaluation de la qualité hygiénique et sanitaire**

##### **a. Flore totale aérobie mésophile**

Le dénombrement de la flore totale aérobie mésophile (FTAM) reste la meilleure méthode qui permet l'estimation de l'indice de salubrité et la qualité des aliments. Il renseigne sur la charge microbienne globale dans un aliment donné. La FTAM, s'agit de l'ensemble des microorganismes capables de se multiplier en aérobiose à des températures optimales de croissance comprises entre + 20°C et + 37°C. Un excès de FTAM est la conséquence d'une contamination par les microorganismes pathogènes pour l'homme et l'animal mais aussi des microorganismes responsables d'altération variés de l'aliment (Bonnefoy et al., 2002).

Le dénombrement des germes totaux mésophiles a été réalisé selon la méthode ISO 4833 (2003). 1 mL de la solution mère ou de chaque dilution ont été ensemencés en masse sur gélose PCA (CondaLab, Espagne). Les cultures sont ensuite incubées (30°C/ 72 h).

$$N = \frac{\Sigma c}{(n_1 + 0,1 n_2) d}$$

N : Nombre de UFC (en g ou mL) ;  $\Sigma c$  : somme totale des colonies ; n<sub>1</sub> : nombre de boîtes de Pétri (1<sup>ère</sup> dilution) ; n<sub>2</sub> : nombre de boîtes de Pétri (2<sup>ème</sup> dilution) ; d : facteur de dilution à partir duquel les premiers comptages ont été obtenus.

##### **b. Coliformes totaux et fécaux**

Les coliformes totaux sont des bacilles asporulés, Gram négatif, mobiles ou non mobiles, aérobies ou anaérobies facultatifs, qui produisent du gaz par fermentation du lactose.

Cette flore est représentée par les microorganismes vivant normalement dans l'intestin de l'homme et des animaux ; lorsqu'elle se trouve dans un aliment, elle indique une contamination d'origine fécale. La presque totalité de ces bactéries sont non-pathogènes et ne présentent pas de risque direct sur la santé des consommateurs, à l'exception de certaines souches de *Escherichia coli* ainsi que des bactéries responsables de toxi-infection (Spencer et Spencer, 2001 ; Boonefooy *et al.*, 2002). Le dénombrement des coliformes totaux et fécaux a été réalisé selon la méthode ISO 4832 : (2006) sur gélose VRBL (milieu lactosé bilié au cristal violet et au rouge neutre). Après la préparation de la solution mère ; 1 mL de chaque dilution ont étéensemencés dans la masse et les cultures ont été incubées à 37°C pour les coliformes totaux et à 44°C pour les coliformes fécaux pendant 48 h. Après incubation, les coliformes forment des colonies rouges.

**c. *Staphylococcus aureus***

*Staphylococcus aureus* est une bactérie parasite de l'homme et des animaux, où elle représente une partie de la flore commensale transitoire. Ce germe est responsable de toxi-infection alimentaire par la production des entérotoxines. Des concentrations de *Staphylococcus* de  $10^6$  à  $10^9$  UFC/g, dans un aliment, peuvent provoquer une intoxication par la production d'entérotoxine (Boonefooy *et al.*, 2002).

**- *Dénombrement et isolement***

La gélose Baird-Parker (BP) est un milieu de culture sélectif et différentiel employé pour l'isolement et l'identification du pathogène *Staphylococcus aureus*. Ce milieu contient les sources de carbone et d'azote nécessaires à la croissance et d'agents sélectifs (glycine, chlorure de lithium et tellurite de potassium). La présence du jaune d'œuf permet de mettre en évidence la production de lécithinase provoquant ainsi la formation de zones claires autour des colonies correspondantes. Les staphylocoques produisent des colonies de couleur gris foncé à noire, en raison de la réduction du tellurite. L'activité de la lipase peut entraîner l'apparition d'une zone de précipitation opaque. L'utilisation de la gélose Baird-Parker est largement répandue et elle figure dans de nombreuses méthodes standard de détection des souches de *Staphylococcus aureus* dans les aliments.

0,1 mL de chaque dilution, ont étéensemencés en surface de la gélose BP, préalablement additionnée par 1% du tellurite de potassium et une émulsion de jaune d'œuf (5mL/100 mL du milieu « Annexe 2 ») (ISO 6888-1,1999). Les cultures ont été ensuite incubées (37°C/24-48 h). Les colonies typiques de staphylocoques à coagulase positive (*Staphylococcus aureus*) sont convexes brillantes de couleur gris foncé à noire et entourées d'une zone claire ou partiellement opaque. Les staphylocoques à coagulase négative entraînent une croissance faible ou aucune

croissance, et produisent des colonies grises à noires, généralement sans zones transparentes ou opaques. Les microorganismes autres que les staphylocoques sont souvent inhibés. Des tests supplémentaires sont nécessaires pour confirmer l'identification présomptive obtenue sur ce milieu. Après incubation, cinq colonies typiques (noires, brillantes, convexes, entourées d'une zone claire ou partiellement opaque) ont été prélevées pour effectuer les tests de confirmations de la souche (Baird-Parker, 1962 ; Lancette et Bennett, 2001).

- **Tests des activités enzymatiques**

Ces tests se rapportent aux différentes activités enzymatiques de la souche.

- **Recherche de la Catalase** consiste à verser une goutte de peroxyde d'hydrogène, sur une lame et d'y ajouter à l'aide d'une pipette pasteur une colonie caractéristique. L'apparition d'une effervescence indique une réaction positive ;

- **Recherche de la Coagulase**, chaque colonie prélevée a été ensemencée en profondeur dans un tube contenant le bouillon cœur-cerveille (BHI : Brain Heart Infusion) et incubée (37°C/24 h), puis 0,1 mL de chaque culture ont été ajoutées à 0,3 mL du plasma de lapin contenu dans des tubes stériles (10x75 mm) et incubé (37°C). La coagulation du plasma a été examinée après 4 à 6 heures. Parfois, la coagulation se produit plus lentement et peut aller jusqu'à 24 heures. La réaction a été considérée comme positive lorsque le coagulum occupe plus de la moitié du volume initialement mis en jeu. A titre de témoin, 0,1mL de BHI stérile a été additionné à la quantité recommandée du plasma de lapin et incubé. Pour que l'essai soit valable, le plasma témoin ne doit montrer aucun signe de coagulation ;

- **Mise en évidence de la DNase**, chaque colonie prélevée a été ensemencée en spot sur la surface de la gélose DNase. Les cultures sont incubées (37°C/24-48 h), la confirmation a été effectuée par une solution de HCl (1N). Une fois que la solution a été versée et laissée pénétrer dans la gélose (5 à 10 min) ; les souches DNase+ sont entourées de zones claires d'ADN dépolymérisé (ISO 6888-1,1999).

**d. Clostridium sulfito-réducteurs**

Les Clostridium sulfite réducteurs sont des bacilles Gram positif anaérobies stricts capables de sporuler, réduisant les sulfites en sulfure. Hôtes normaux de l'intestin des mammifères, ils peuvent également être d'origine tellurique. Leurs spores sont recherchées dans l'eau comme indice de contamination fécale ancienne. En bactériologie alimentaire, on recherche essentiellement les espèces d'origine fécale, en particulier *Clostridium perfringens* qui peut être responsable de toxi-infections alimentaires (Boonefooy *et al.* 2002). Le dénombrement a été réalisé selon la méthode ISO 7937 (2004). 1 mL de la solution mère ou des dilutions décimales ont été introduits dans des tubes stériles et incubés dans un bain marie

pendant 10 min à 80°C, afin de détruire toutes les formes végétatives éventuellement présentes et activer les formes sporulées. Après refroidissement 18 à 20 mL de la gélose viande-foie préalablement additionnée de 0,2 mL d'Alun de fer et de 0,5mL de Sulfite de sodium à 5%, ont été ajoutés à chaque tube à essai. L'incubation a été effectuée ensuite (37°C/24 h). Les colonies typiques apparaissent noires en réduisant le sulfite de sodium (Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>) en sulfure qui a été en présence de fer donne le sulfure de fer (FeS) de couleur noire.

#### ***e. Les Salmonelles***

Ces bactéries pourraient être à l'origine d'une toxi-infection alimentaire sévère. Elles sont présentes dans le tube digestif des animaux et de l'homme (malades ou porteurs sains). La salmonellose a été l'une des maladies les plus courantes transmise par les aliments contaminés et à base de volaille. La lutte contre la contamination par ces microorganismes devenait primordiale par les organismes de contrôle gouvernementaux. La prévention dépend dans une large mesure d'un programme de contrôle adéquat. La recherche des salmonelles dans les échantillons prélevés a été effectuée selon le protocole décrit par Spencer et Ragout de Spencer, 2001 et comprends trois étapes :

- **Etape de pré-enrichissement** : 25 g de produit à analyser ont été mélangés, dans un sac Stomacher, avec 225 mL d'eau péptonée tamponnée puis incubé à 37°C pendant 24 h ;

- **Enrichissement** : 10 mL de la solution de pré-enrichissement ont été dilués dans 100 mL de bouillon au sélénite de sodium et 100 mL de bouillon Muller Kauffmann à des températures d'incubation de 37 et 45° C respectivement pendant 24 h ;

- **Dénombrement et isolement des Salmonelles** : 0,1 mL de la solution d'enrichissement ont étéensemencés sur la gélose Hektoen et 0,1 mL sur la gélose Biliée lactosée au vert brillant et au rouge de phénol (BLBV), puis incubés (37°C/24 h). Les colonies observées sont incolores ou rose à centre rouge sur BLBV ; ce sont des bactéries qui ne fermentent ni lactose ni saccharose et sont des colonies susceptibles d'être des Salmonelles. Alors que sur la gélose Hektoen, les salmonelles apparaissent de couleur bleu-vert ou bleu dû à l'absence de la fermentation du sucre.

#### **2.3.3. Dénombrement et isolement des bactéries lactiques et des levures**

Il est bien connu que les bactéries lactiques et les levures représentent la flore la plus dominante dans les produits laitiers naturellement fermentés. En effet ces deux types de microorganismes contribuent ensemble aux modifications de la texture et au développement du goût et de l'arôme (Shangpliang *et al.*, 2018 ; Sessou *et al.*, 2019). Des études antérieures réalisées sur le *Smen* avaient également montrées que les bactéries lactiques et les levures

représentent la flore responsable des caractères finaux et jouent un rôle primordial tout au long le processus de la fermentation et de la maturation (Sakili et Issaoul, 2004 ; Benkerroum et Tamim, 2004 ; Guessass *et al.*, 2009). Dans cette approche, nous avons ciblé l'isolement de ces deux types de microorganismes par l'application des techniques culturales.

**a. Bactéries lactiques**

**La recherche et l'énumération** des bactéries lactiques (BL), ont été effectuées sur le milieu gélosé de Man Rogosa and Sharpe (MRS ; Conda Lab., Espagne). Après la préparation de la solution mère ; 1 mL de chaque dilution ont été ensemencés dans la masse et les cultures ont été incubées en anaérobiose (30°C/72 h). **L'isolement** des BL a été effectué sur le même milieu, et les colonies ont été prélevées à partir des boites contenant entre 30 et 300 colonies, selon leurs aspects macroscopiques puis purifiées par repiquage successif sur le milieu MRS (quatre repiquages successifs). Les isolats ont été également soumis à une caractérisation macroscopique et microscopique (Idoui *et al.*, 2008 ; Owusu-Kwarteng *et al.*, 2012). **L'aspect macroscopique des colonies** (forme, taille, relief, pigmentation...) a été effectué sur les colonies isolées. **L'examen microscopique** a été réalisé à l'aide de la coloration de Gram (annexe 2), qui nous a permis d'écarter les bactéries Gram négatif, ainsi à déterminer la forme et le mode de regroupement des cellules. Les isolats Gram positif, catalase négative, présentant des aspects macroscopiques et microscopiques différents, ont été repiqués sur la gélose MRS dans les conditions optimales, puis les cellules ont été conservées à -20°C dans un mélange de glycérol et de bouillon MRS (30/70 v/v).

**b. Levures**

**Le dénombrement et l'isolement** des levures, ont été réalisés sur la gélose Sabouraud au dextrose et chloramphénicol (Conda Lab., Espagne), préalablement coulée et solidifiée. 0,1 mL de chaque dilution ont été ensemencés sur la surface de la gélose et incubés (25°C/3 à 7 jours). Les boites contenant entre 30 à 300 colonies ont été retenues, l'isolement des levures a été effectué sur la base de leurs **caractères macroscopiques** en examinant la forme, la taille, le relief et la pigmentation. **L'examen microscopique** a été effectué par la coloration des cellules au bleu de méthylène, afin de visualiser la morphologie cellulaire et le mode de multiplication végétative et aussi vérifier la pureté des isolats. Chaque isolat obtenu a été réactivé sur la gélose Sabouraud au dextrose et chloramphénicol, les cellules jeunes ont été ensuite prélevées et conservées dans un mélange de glycérol et de bouillon BHI dans un volume (30/70 v/v) (ISO 21527-2008).

### **3. Résultat**

#### **3.1. Caractérisation physicochimique et évaluation de la qualité hygiénique des échantillons collectés auprès des ménages**

##### **3.1.1. Physicochimie**

Les valeurs du **pH** obtenues pour les 15 échantillons, étaient différentes selon le temps de maturation. Elles étaient comprises entre  $3,12 \pm 0,005$  et  $5,21 \pm 0,005$ . Cependant, la majorité des échantillons présentaient un  $\text{pH} > 4$ , la valeur minimale a été obtenue pour l'échantillon B1 qui a un temps de maturation de 10 ans, tandis que les valeurs les plus élevées ont été enregistrées pour les échantillons qui ont un temps de maturation variait entre 3 mois et 1 an. L'**humidité** variait fortement en fonction de la méthode de préparation de *Smen* : L'humidité des échantillons préparés selon la méthode de salage est comprise entre 2,49 et 19,87% et ceux ayant subi un traitement thermique ne dépassait pas 1%. Les valeurs de l'**indice d'acide** variaient entre 2,24 et 153,7 mg KOH/g et sont proportionnelles avec l'augmentation du temps de maturation. La **teneur en sel** variait aussi selon la méthode de préparation : les valeurs étaient plus élevées pour les échantillons qui ont été préparés par la méthode de salage où la valeur maximale ( $7,38 \pm 0,11\%$ ) a été enregistrée pour l'échantillon S1 (tableau 10).

##### **3.1.2. Qualité sanitaire et hygiénique**

Les résultats ont montré la pauvreté des échantillons en flore microbienne, nous avons détecté la flore totale aérobie mésophile uniquement dans sept échantillons où l'âge de maturation variait entre 1 mois et 1 an. Tous ces échantillons (sauf O1), ont été préparés par la méthode de salage. La charge globale variait entre  $1,5 \times 10^3$  et  $2,8 \times 10^5$  UFC/g. Les 15 échantillons de *Smen/Dhan* étaient satisfaisants en termes de sécurité et de qualité hygiénique, le nombre des staphylocoques à coagulase positive était inférieur à 100 UFC/g, les salmonelles n'étaient pas détectables, les coliformes totaux/fécaux étaient en dessous de leurs seuils de détection respectifs et les spores de clostridiiums anaérobies sulfito-réducteurs étaient absentes.

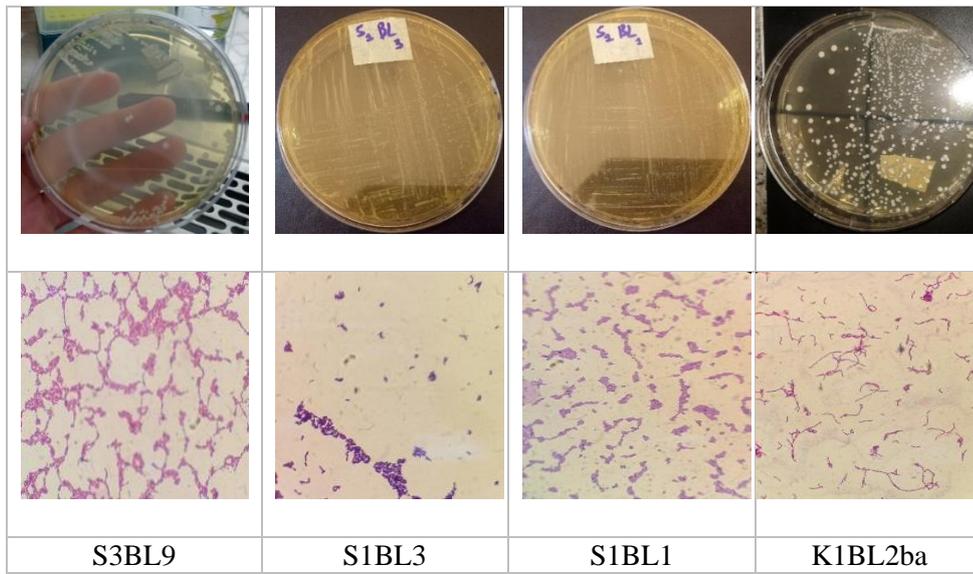
**Tableau 10.** Propriétés physicochimiques et dénombrement des différents groupes microbiens (UFC/g) dans les échantillons de *Smen/Dhan* collectés auprès des ménages.

Echantillons	pH	Humidité (%)	Indice d'acide mg KOH/g	Taux de sel (%)	FTAM	Coliformes totaux	Coliformes fécaux	<i>Staphylococcus aureus</i>	Clostridium sulfite réducteurs	Salmonella spp.	Bactéries lactiques	Levures et moisissures
B1	3,12±0,01	19,9	153,7±1,7	ND	<10	<10	<10	<100	Non détectés	Non détectée	<10	<100
B3	3,49±0,00	12,2	35,9±0,0	ND	2,99x10 <sup>4</sup>	<10	<10	<100	Non détectés	Non détectée	1,8x10 <sup>2</sup>	<100
B4	3,37±0,00	12	40,3±0,1	ND	<10	<10	<10	<100	Non détectés	Non détectée	<10	<100
B5	3,58±0,00	12,6	31,4±0,0	ND	<10	<10	<10	<100	Non détectés	Non détectée	<10	<100
Bi3	3,78±0,01	0,8	19,1±1,1	ND	<10	<10	<10	<100	Non détectés	Non détectée	<10	<100
E10	ND	ND	ND	ND	<10	<10	<10	<100	Non détectés	Non détectée	<10	<100
Jn	4,33±0,01	0	3,9±0,1	0,1±0,0	<10	<10	<10	<100	Non détectés	Non détectée	<10	<100
K1	3,25±0,00	12,7	6,7±0,0	3,3±0,0	1,69x10 <sup>5</sup>	<10	<10	<100	Non détectés	Non détectée	1,17x10 <sup>5</sup>	<100
K2	3,81±0,01	9,0	14,58±1,5	2,2±0,0	1,38x10 <sup>4</sup>	<10	<10	<100	Non détectés	Non détectée	1,21x10 <sup>3</sup>	<100
O1	5,21±0,01	0	2,2±0,0	0,1±0,0	1,5x10 <sup>3</sup>	<10	<10	<100	Non détectés	Non détectée	1,86x10 <sup>3</sup>	<100
O3	ND	0	2,2±0,0	ND	<10	<10	<10	<100	Non détectés	Non détectée	<10	<100
S1	3,33±0,01	12,8	3,3±0,0	7,4±0,1	4,90x10 <sup>3</sup>	<10	<10	<100	Non détectés	Non détectée	2,90x10 <sup>4</sup>	<100
S2	3,63±0,00	7,3	3,6±0,0	3,9±0,9	2,10x10 <sup>5</sup>	<10	<10	<100	Non détectés	Non détectée	3,50x10 <sup>5</sup>	1,5x10 <sup>4</sup>
S3	4,36±0,00	10,5	4,4±0,6	1,4±0,0	2,80x10 <sup>5</sup>	<10	<10	<100	Non détectés	Non détectée	4,50x10 <sup>6</sup>	4,85x10 <sup>4</sup>
S5	ND	2,5	43,75±1,9	ND	<10	<10	<10	<100	Non détectés	Non détectée	<10	<100

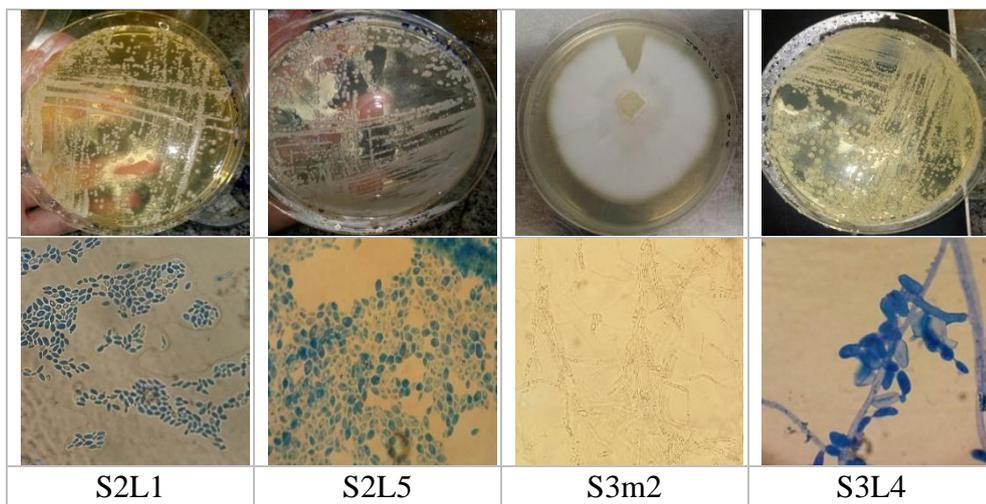
ND : Non Déterminé

### 3.1.3. Dénombrement et isolement des bactéries lactiques et des levures

Les bactéries lactiques ont été détectés dans sept échantillons ( $1,86 \times 10^3$  à  $4,50 \times 10^6$  UFC/g). Les levures étaient présentes uniquement dans les échantillons S2 ( $1,5 \times 10^4$  UFC/g) et S3 ( $4,85 \times 10^4$  UFC/g). Au total, 76 isolats de bactéries lactiques et 25 isolats de levures ont été isolés. Les caractéristiques macroscopiques et microscopiques, des différents isolats sont mentionnées dans les annexes 3 et 4.



**Figure 18.** Aspect macroscopique et microscopique de quelques isolats de BL sur gélose MRS, obtenus de quelques échantillons de *Smen* collectés (agrandissement 1000x après coloration de Gram).



**Figure 19.** Aspect macroscopique et microscopique de quelques isolats de levures sur gélose SAB, isolés des échantillons S2 et S3 (agrandissement 1000x après coloration au bleu de méthylène).

### 3.2. Caractérisation physicochimique et évaluation de la qualité hygiénique des échantillons prélevés au cours de la préparation du *Smen*

#### 3.2.1. Physicochimie

La valeur initiale du pH du lait cru était de 6,67. Après fermentation pendant 48 h, le pH a diminué progressivement pour atteindre la valeur de 4,23, ce qui était associé à une augmentation considérable de l'acidité de 16,27 à 47 D°. Après barattage, le pH du beurre mesuré était de 4,46, puis a diminué de 0,4 unité après le premier mois de la maturation du *Smen* et poursuit sa diminution progressivement jusqu'à 3,97 à 6 mois. Notant que l'indice d'acide du beurre était de 6,73±1,03 mg KOH/g, cette valeur a augmenté au cours de la maturation du *Smen* (1 mois : 10,09 ± 1,6 ; 6 mois : 21,05±0,30 mg KOH/g). Les valeurs d'humidité ont diminué avant et après la préparation du *Smen* (beurre : 22,6% ; 1 mois : 15,93% ; 6 mois : 14,76%). Le taux de sel dans l'échantillon de beurre était de 0,16±0,03 et augmentait considérablement après l'addition du sel pour s'enregistrer à 1%, cette valeur augmentait lentement pour atteindre 1,26% à la fin de la maturation (Tableau 11).

**Tableau 11.** Caractéristiques physicochimiques des échantillons prélevés au cours de la préparation du *Smen/Dhan*.

Echantillons	pH	Humidité (%)	Acidité Dornic (D°)	Taux de sel (%)	Indice d'acide (mg KOH/g)
Lait	6,67±0,00	ND	16,27±0,03	ND	ND
Raib	4,23 ±0,01	ND	47±0,00	ND	ND
Beurre	4,46 ±0,05	22,6	ND	0,16±0,03	6,73±0,00
D1	4,03±0,05	15,93	ND	1,01±0,02	10,09±1,12
D2	4,30±0,06	15,05	ND	1,13±0,01	18,43±0,03
D3	4,10 ±0,04	15,01	ND	1,17±0,03	19,07±1,12
D6	3,97±0,02	14,76	ND	1,26±0,06	21,05±0,30

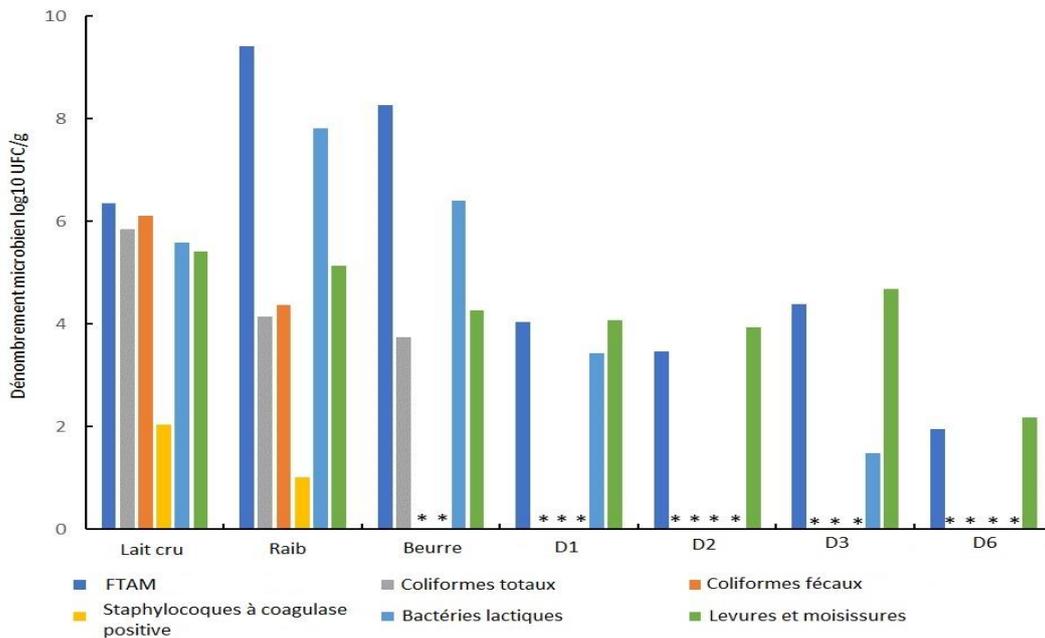
ND : Non Déterminé

#### 3.2.2. Evaluation de la qualité hygiénique et dynamique des BL et des levures

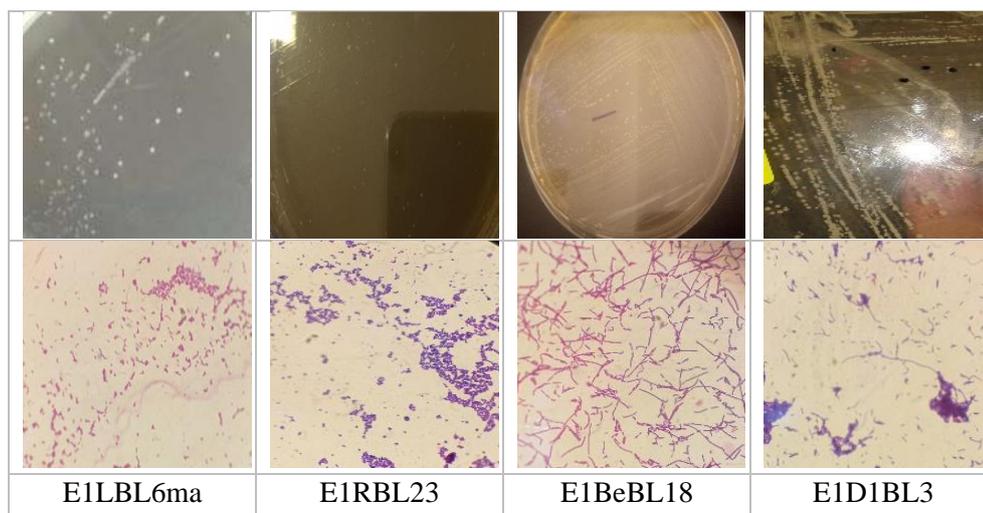
Des variations importantes dans le dénombrement des microorganismes ciblés ont été observées tout au long les différentes étapes de la préparation du *Smen* et à différents temps de sa maturation. Le nombre des populations de la FTAM (9,42 log<sub>10</sub> UFC/mL), a été augmenté considérablement au cours de la fermentation du lait cru. Cependant, une légère diminution a été observée dans le beurre, puis progressivement au cours de la maturation du *smen*. Concernant les coliformes totaux et fécaux, ils étaient présents à des taux élevés (6 log<sub>10</sub> UFC/mL) dans le lait cru. Ensuite les valeurs diminuaient progressivement dans le *Raib* (2 log<sub>10</sub>

UFC/mL), et inférieur à leurs seuils de détections dans le beurre et au cours de la maturation du *Smen*. Les staphylocoques à coagulase positive avaient la même tendance : dans le lait cru (2,04 log<sub>10</sub> UFC/mL) et non détectable dans le beurre. Les Salmonelles et les spores de clostridium sulfito- réducteurs étaient absents dans tous les échantillons prélevés au cours de la préparation de *Smen* (Figure 20).

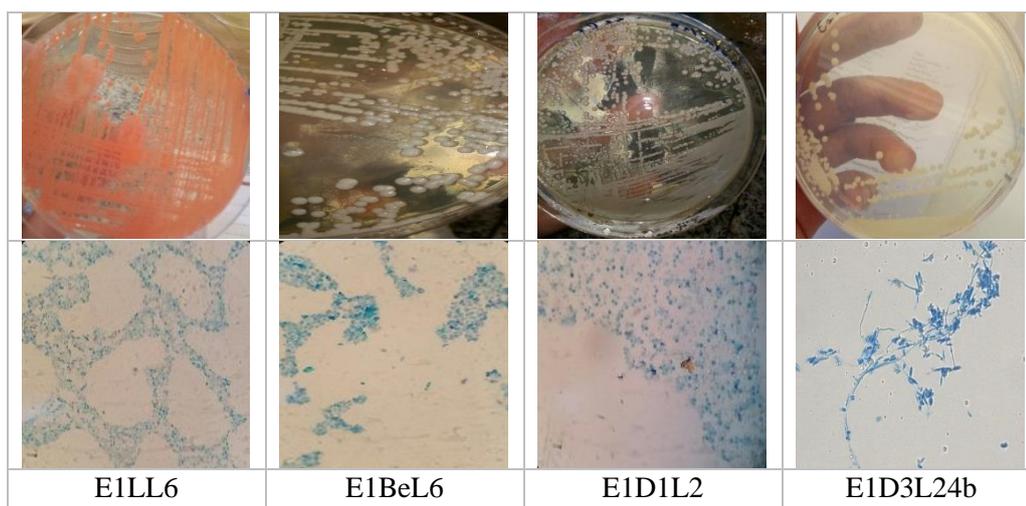
Le dénombrement des BL augmentait durant la fermentation du lait cru (de 5,59 log<sub>10</sub> UFC/g au 7,81 log<sub>10</sub> UFC/g pour le Raib), puis diminuait progressivement dans le beurre (6,4 log<sub>10</sub> UFC/g) et après maturation du *Smen* pour atteindre 1,41 log<sub>10</sub> UFC/g au 3<sup>ème</sup> mois. Néanmoins, elles n'étaient pas détectables durant le 2<sup>ème</sup> et le 6<sup>ème</sup> mois de la maturation. En revanche, les dénombrements des levures restaient stables pendant la préparation jusqu'au 3<sup>ème</sup> mois avec des valeurs comprises entre 4 et 5 log<sub>10</sub> UFC/mL ou g. Un total de 45 BL et 77 isolats de levure ont été obtenus à partir de différentes étapes de préparation (lait cru, Raib, beurre, D1, D3). Les caractéristiques macroscopiques et microscopiques, des différents isolats sont mentionnées dans les annexes 6 et 7.



**Figure 20.** Dénombrements microbiens (log<sub>10</sub> UFC/g ou/mL) dans les échantillons prélevés durant la préparation du *Smen*. \* : Nombre des colonies inférieures au seuil de détection.



**Figure 21.** Aspect macroscopique et microscopique de quelques isolats de BL sur gélose MRS, obtenus de quelques échantillons prélevés au cours de la préparation du *Smen* (agrandissement 1000x après coloration de Gram).



**Figure 22.** Aspect macroscopique et microscopique de quelques isolats de levures sur gélose SAB, obtenus de quelques échantillons prélevés au cours de la préparation du (agrandissement 1000x après coloration au bleu de méthylène).

#### **4. Discussion**

La diversité microbienne est fortement liée aux conditions environnementales de la matrice alimentaire, les résultats obtenus pour les échantillons collectés, ont démontré une qualité hygiénique et sanitaire satisfaisante du *Smen/Dhan* et elle était liée directement aux caractères physicochimiques (pH acide, activité d'eau faible et une forte lipolyse), ces facteurs ont contribué largement à sa salubrité avec l'ajout du sel qui est utilisé empiriquement comme un agent conservateur et antimicrobien et pour l'amélioration du goût (Albarracín *et al.*, 2011). Cela explique l'absence des microorganismes pathogènes dans la quasi-totalité des échantillons. Ces résultats corroborent avec ceux d'El Marrakchi *et al.*, (1988) dans l'étude de la flore microbienne du *Smen* marocain. En addition, chaque échantillon collecté auprès des ménages, représente un écosystème différent et caractérisé par la méthode de préparation utilisée, le temps de la maturation et l'origine de la matière première. Les paramètres analysés ont permis l'observation des différences entre les échantillons. En effet, les valeurs d'indice d'acide élevées ont été enregistrés avec les échantillons présentant un temps de maturation long, cela est expliqué par le degré de la lipolyse qui était proportionnelle avec le temps de conservation (Benkerroum et Tamim, 2004). La méthode de préparation a influé également le degré de lipolyse de *Smen*, les valeurs obtenues pour les échantillons qui ont subi un traitement thermique étaient significativement faibles par rapport à celles des échantillons préparés par la méthode de salage ; cela est dû probablement à l'inhibition des activités enzymatiques et à la détérioration de la flore autochtone responsable de la dégradation de la matière grasse. Des valeurs similaires ont été également rapportés par Dhurvey *et al.*, (2013) pour le *Ghee* Indien et Suleiman *et al.*, (2013) pour le *Smen* Soudan.

Le dénombrement des BL et des levures dans les échantillons de *Smen*, avait la même tendance pour les autres types de microorganismes, où ces derniers étaient détectables uniquement dans certains échantillons. Les BL cultivables dans les échantillons de *Smen* collectés étaient inférieurs à ceux d'autres produits laitiers fermentés tels que : *Rayeb*, Fromage, Beurre et *Klila* (Abd El Gawad, 2010 ; Colombo *et al.*, 2010 ; Bao *et al.*, 2012 ; Belyagoubi et Abdelouahid, 2013). Cette différence est expliquée par les conditions hostiles de *Smen*, comme c'est déjà décrit. En revanche, le dénombrement des levures était proche à celui rapporté par Meshref (2009) et Akgül *et al.*, (2019).

L'analyse des caractéristiques physicochimiques des échantillons prélevés aux cours de la préparation du *Smen* a montré une diminution du pH et une augmentation des valeurs de l'indice d'acide. Ce résultat est en accord avec celui trouvé par El Marrakchi *et al.*, (1986), qui

ont expliqué l'augmentation des valeurs de l'indice d'acide par la forte lipolyse qui a été ensuite confirmée par l'analyse chromatographique des acides gras libres.

La méthode traditionnelle de la préparation de *Smen*, contribue fortement à sa sécurité. La fermentation spontanée par les BL du lait cru en *Raib*, a entraîné des phénomènes d'exclusion et de compétition avec la production d'acide lactique qui a favorisé une diminution du pH. Le beurre salé et mature a conduit à l'augmentation de l'indice d'acide, qui constitue un obstacle sur l'évolution des microorganismes, cela est clairement observé par la diminution de la flore microbienne et par la non détection des coliformes et des staphylocoques. Nos résultats sont en accord avec ceux de El Marrakchi *et al.*, (1988) ; Samet-Bali *et al.*, (2009), qui ont rapporté que durant la conservation, la croissance microbienne diminue progressivement avec le temps. Au cours de la maturation du *Smen*, les BL persistaient uniquement durant 3 mois, cependant Sakili et Issoual, (2004) ont rapporté que les BL disparaissaient au 3<sup>ème</sup> mois de la maturation. En revanche le dénombrement des levures diminuait fortement au bout du 6<sup>ème</sup> mois, selon Nanis *et al.*, (2020) les levures peuvent se multiplier à des concentrations élevées en sel et à un pH acide. En général la libération progressive des acides gras libres, perturbe les conditions favorables de la croissance microbienne, où le nombre des cellules viables diminue en conséquence, cependant certains microorganismes peuvent persister, mais cela ne dure pas longtemps (Benkerroum et Tamim, 2004).

## **5. Conclusion**

À partir des résultats obtenus, nous pouvons conclure que la méthode de préparation a contribué largement à la salubrité et la sécurité sanitaire de *Smen*. Le *Smen*, par son caractère acide, ainsi que sa faible teneur en eau, constitue un milieu défavorable à la croissance des pathogènes. Les BL et les levures font partie de la flore autochtone du *Smen* et contribuent largement à sa maturation et son assainissement.

***Chapitre III. Identification  
de la biodiversité des  
échantillons de Smen/Dhan  
collectés et ceux prélevés  
durant la préparation  
traditionnelle, par  
l'application des techniques  
de culture-dépendantes et  
indépendantes***

## **1. Introduction**

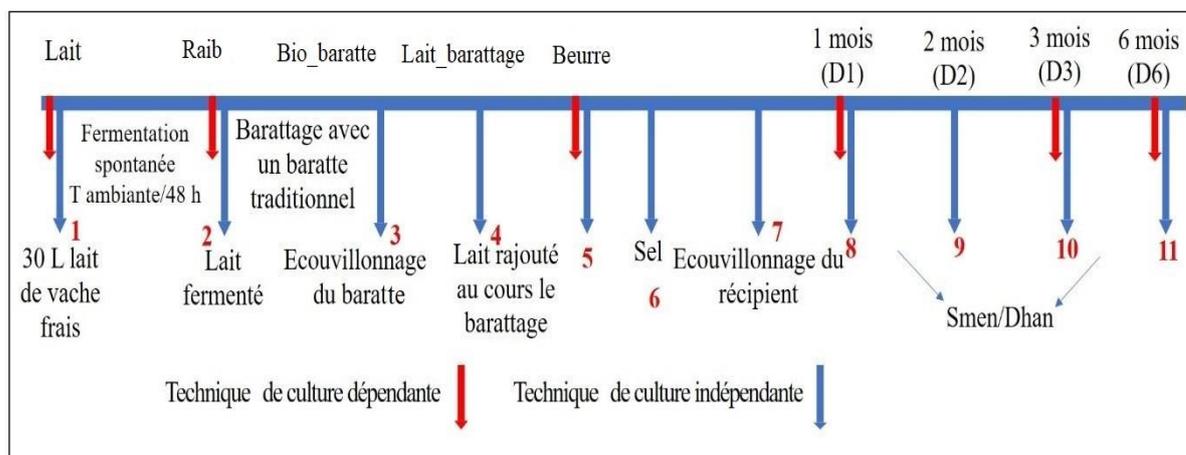
Depuis des décennies, les écosystèmes alimentaires qui sont « a priori » relativement simples sont étudiés par le biais des méthodes culturelles. Cependant ces techniques sont assez longues et prennent du temps et ne révèlent qu'une partie partielle de la biodiversité microbienne présente dans un écosystème. En effet, elles ne permettent d'accéder qu'à un nombre réduit d'espèces présentes dans une matrice qui pourrait ne pas être cultivable avec les milieux existants connus ainsi que dans certaines conditions, certains microorganismes en dehors de leur écosystème naturel peuvent passer dans un état viable mais non cultivable. C'est pour cette raison, les chercheurs ont abordé la description des écosystèmes alimentaires par des méthodes de métagénomique, en ciblant l'ADN existant dans la matrice, avec principalement l'utilisation des technologies de séquençage de nouvelle génération. Ces études ont montré que les approches classiques de la composition microbienne des écosystèmes des aliments étaient biaisées, voire erronées (Ongol *et al.*, 2009 ; Renault *et al.*, 2015). En effet l'application des techniques de culture indépendantes permet de suivre l'évolution des populations microbiennes dans l'espace ou dans le temps et de comprendre la biodiversité microbienne dans un écosystème, sans utilisation de milieux de cultures (Giraffa, 2004). Il est bien noté que les méthodes de culture dépendantes restent cruciales pour isoler et préserver la diversité microbienne pour une utilisation ultérieure à l'échelle industrielle. De nombreuses variétés d'aliments fermentés sont produites à travers le monde, cependant la quasi-totalité de ces aliments n'a pas encore subi des études scientifiques rigoureuses et les processus biologiques et microbiologiques sont mal compris, parmi ces aliments traditionnels *Smen* ou *Dhan*. A cet égard, l'objectif de cette étude est d'identifier pour la première fois, la diversité microbienne de *Smen/Dhan* par l'application des techniques de culture dépendantes et indépendantes (métagénomique).

## **2. Matériel et Méthodes**

### **2.1. Echantillons étudiés**

15 échantillons collectés à partir différentes régions d'Algérie (Chap. 2) et des échantillons prélevés durant la préparation traditionnelle de *Smen/Dhan* (Chap. 2 et figure 23), ont fait l'objet d'une caractérisation de la biodiversité microbienne par l'application des techniques de culture dépendantes et indépendantes. L'isolement des bactéries lactiques et des levures a été effectué comme il est décrit précédemment dans le chapitre 2. 121 isolats de BL et 102 de levures, ont été isolés à partir les différents échantillons étudiés (échantillons

collectés : B3, K1, K2, O1, S1, S2, S3 et ceux prélevés durant la préparation du *Smen/Dhan* :Lait, Raib, D1, D3, D6).



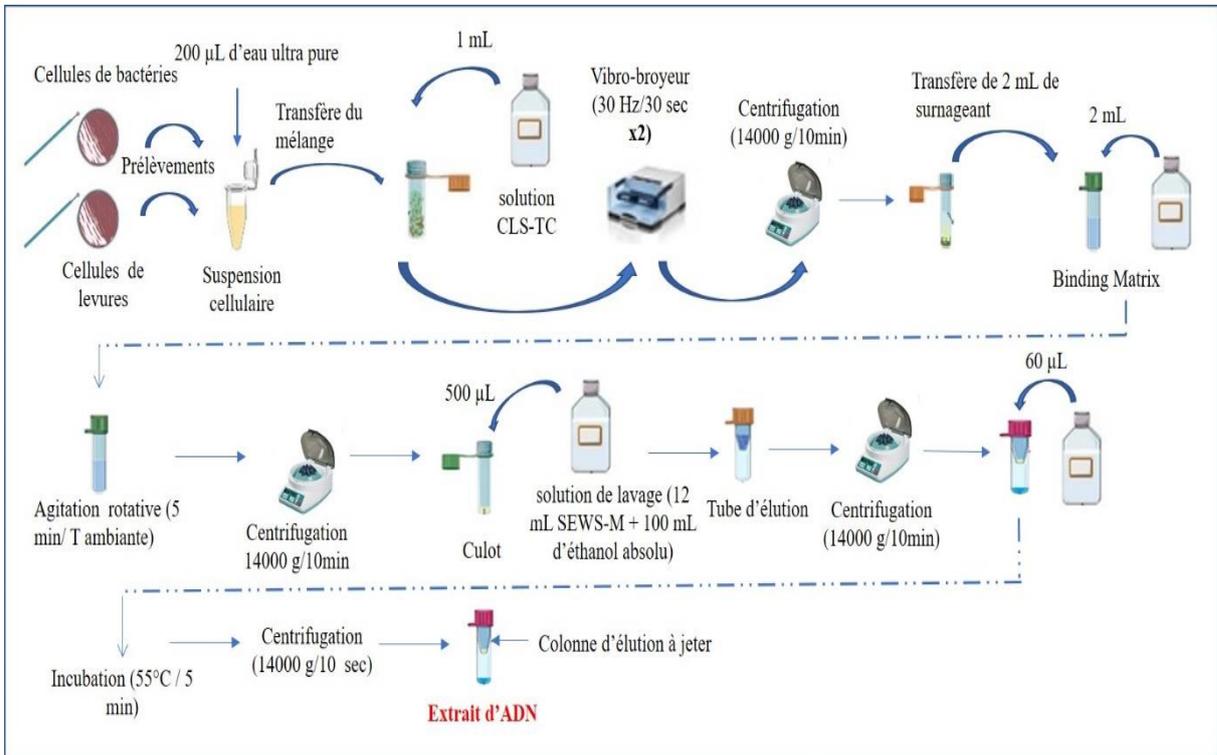
**Figure 23.** Plan présentant les points de prélèvements des échantillons, durant la préparation traditionnelle de *Smen/Dhan*.

## 2.2. Diversité des BL et des levures par les techniques de culture dépendantes

### a. Extraction de l'ADN

Avant d'entamer le processus d'extraction, les isolats congelés ont été repiqués sur leurs milieux de cultures et incubés à des températures de croissance convenables. Après incubation, les cellules jeunes, ont été prélevées et mises en suspension dans 200  $\mu$ L d'eau ultra pure stérile. L'extraction de l'ADN a été effectuée en utilisant le kit enzymatique FastDNA Spin (MP Biomedicals, France), composé de : Tampon de lyse CLS-Y ; Solution de Binding Matrix (fixation et concentration de l'ADN) ; Solution de lavage SEW-M ; et Tampon d'élution EDS. 1 mL de chaque suspension bactérienne ou levurienne, a été placé dans un tube de matrice de lyse A (MP Biomedicals), ensuite 1 mL d'une solution de lyse CLS-TC, a été ajouté. Le tube du mélange a été placé dans un vibro broyeur (MM400, Retsch) (30 s à 30 Hz) le broyage a été répété 2 fois, ensuite une centrifugation du mélange a été effectuée (14000 g/10 min) ; puis le mélange a été transféré dans un tube Eppendorf stérile de capacité de 2 mL, sans entrainer la phase lipidique. Un équivalent d'une solution de Binding Matrix (matrice de liaison) a été ajouté au mélange, puis homogénéisé sur un agitateur rotatif (5 min à une température ambiante). Par la suite une centrifugation du mélange a été effectuée (14000 g/10 s,) après avoir éliminé le surnageant, le culot a été ensuite mélangé avec 500  $\mu$ L d'une solution de lavage SEWS-M préalablement préparée (100 mL d'éthanol absolu + 12 mL de la solution SEWS-M concentrée). Le mélange a été transvasé sur une colonne d'élution placée dans un tube de 2 mL de capacité. Par la suite une première centrifugation (14000 g/1 min) a été effectuée, après avoir éliminé l'éluant, une deuxième centrifugation a été réalisée dans les mêmes conditions. Ensuite,

la colonne est placée dans un microtube d'une capacité de 1,5 mL, puis 60 µL du tampon d'éluion a été ajouté à la surface de la colonne. Le tube contenant le mélange a été incubé (55°C/5 min) dans un bain marie à sec (ThermoStat plus, Eppendorfs), par la suite une centrifugation (14000 g/1 min) a été effectuée, la colonne a été jetée et l'ADN obtenu a été conservé à -20°C.



**Figure 24.** Protocole d'extraction de l'ADN des isolats de BL et de levures.

### ***b. Vérification de la pureté et quantification de l'extrait d'ADN***

Le contrôle de la pureté de l'ADN extrait, est nécessaire afin de confirmer l'absence des contaminants (ARN, protéines, glucides...). Un dosage de l'ADN a été effectué à l'aide d'un spectrophotomètre Nanodrop (Spectrophotomètre Nanodrop 1000, Thermo Scientific) sur 2 µL d'échantillon à 260 nm. Le résultat est affiché sur l'écran d'un ordinateur attaché au Nanodrop, en montrant la concentration de l'ADN et les rapports de la pureté  $A_{260}/A_{280}$  et  $A_{260}/A_{230}$ .

### ***c. Amplification aléatoire d'ADN polymorphe (PCR-RAPD)***

Le principe de cette technique consiste à utiliser une ou plusieurs amorces très courtes (8 à 10pb), qui se fixent sur plusieurs sites de l'ADN génomique à faible température d'hybridation, et permettent d'amplifier plusieurs régions de l'ADN. Le résultat obtenu, est plusieurs fragments amplifiés caractéristiques pour chaque souche, ces derniers apparaissent sous forme de plusieurs bandes sur gel d'électrophorèse, généralement les souches similaires ont la même empreinte génétique. (Stammers *et al.*, 1995). La PCR-RAPD a été appliquée sur

223 extraits d'ADN, en utilisant l'amorce M13, (5'-GAGGGTGGGCGGCTCT-3') comme décrit précédemment par Guinebretiere et Nguyen-The (2003).

La reproductibilité des expériences a été évaluée en utilisant une souche pure inoculée comme témoin dans toutes les expériences M13-PCR et en vérifiant qu'aucune déviation dans son profil génétique n'a été observée. L'amplification de l'ADN a été réalisée en utilisant le thermocycleur Analytik Jena (FlexCycler, Allemagne) avec un programme comportant une étape de dénaturation initiale (95°C/5 min), suivie par 45 cycles : de dénaturation (95°C/1 min), d'hybridation (36°C/1 min) et une extension finale (72°C/4 min). La réaction d'amplification a été effectuée dans un volume total de 25 µL de milieu réactionnel (Tableau 12).

**Tableau 12.** Composition du milieu réactionnel de la PCR-RAPD.

<b>Composants</b>	<b>Volume (µL)</b>
Amorce M13 (10µM)	5
Mix de dNTP (10mM)	1
Tampon 5X	5
Taq DNA polymérase (5U/µL)	0,25
MgCL <sub>2</sub> (25mM)	2
ADN (50 µL)	2
H <sub>2</sub> O ultra pure	9,75

#### *d. Electrophorèse sur gel d'agarose des amplicons*

Une électrophorèse sur gel d'agarose à 1,2% a été effectuée afin de visualiser les différents profils génétiques des produits de la PCR. 1,2 g d'agarose a été ajouté à 100 mL du tampon TAE 1X (tris acétate EDTA « Éthylène Diamine Tétra-Acétique ») (Promega, France). La solution est ensuite chauffée jusqu'à ébullition, après refroidissement 0,5 µL d'intercalant GelRed 1X a été ajouté. La préparation est ensuite versée dans le support d'électrophorèse. 10 µL de chaque amplicon, et 5 µL de marqueur de taille moléculaire de 100 pb (BnechTop DNA ladder, Promega, France) ont été déposés dans chaque puits du gel. La migration a été ensuite effectuée à 120 Volt à 1h 20 min. La visualisation des produits de la migration a été effectuée sous transillumination de la lumière ultraviolet (UV) grâce d'une longueur d'onde de 260 nm, par la suite les images ont été capturées en utilisant le logiciel Quatum capt (Vilber Lourmat, France).

***e. Analyse des profils électrophorétiques par le logiciel Bionumerics***

Les gels d'électrophorèse ont été enregistrés sous format JPEG et introduits dans le logiciel Bionumerics (version 6.6 ; Mathématiques appliquées), afin d'avoir une idée sur les relations génétiques entre les isolats étudiés, par comparaison des profils électrophorétiques obtenus. Le principe consiste à comparer les distances de la migration et la taille des bandes.

Le logiciel permet alors, l'analyse, la détection et la normalisation des bandes qui consiste en une correction des distances de la migration en fonction des marqueurs de taille, de façon à tenir compte des variations dues aux aléas de la migration (Ghazi, 2014).

Après la détection des bandes par le logiciel ; la correction des positions et de la taille de chaque bande des profils obtenus, ont été effectuées manuellement. Ensuite la génération des dendrogrammes, a été réalisée par le même logiciel en calculant le coefficient de la similarité de Dice, l'optimisation a été fixée à 5% et la tolérance à 2%. Le regroupement des isolats a été effectué par la méthode UPGMA (Unweighted pair group method with arithmetic mean). A la fin 1 à 2 représentatifs de chaque cluster ont été choisis pour le séquençage.

***f. Amplification des gènes de l'ARNr 16S par réaction de polymérisation en chaîne (PCR)***

82/121 isolats de BL (52 : échantillons collectés ; 30 : échantillons prélevés durant la préparation) ont fait l'objet d'une identification génétique. Les gènes codant de l'ARNr 16S des isolats ont été amplifiés en utilisant les amorces décrites par Weisburg *et al.* (1991) :16S-F (5F-CCGAATTCGTCGACAACAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') et 16S-R (5'-CCCGGGATCCAAGCTTACGGCTACCTTGTTACGACTT-3'), l'amplification a été effectuée dans le thermocycleur Analytik Jena (FlexCycler, Allemagne), avec une étape de dénaturation initiale (94°C/5 min) ; suivie par 29 cycles : de dénaturation (94°C/45 s), d'hybridation (60°C/45 s), d'élongation (72°C/90 s) et nous terminons par une étape d'élongation finale (72°C/7 min). La composition du mélange réactionnel est présentée dans le tableau 13.

**Tableau 13.** Composition du milieu réactionnel de la PCR de l'ARN16S.

<b>Composants</b>	<b>Volume (µL)</b>
Amorce 16S-F (10µM)	0,2
Amorce 16S-R (10µM)	0,2
Mix de dNTP (10mM)	0,2
Tampon 5X	5
Taq DNA polymérase (GoTaq G2 DNA polymerase) (5U/µL)	0,125
MgCL <sub>2</sub> (25mM)	2
ADN (50ng/ µL)	1

H <sub>2</sub> O ultra pure (µL)	16,275
----------------------------------	--------

***g. Amplification des régions D1/D2 de l'ARNr 26S par la réaction de polymérisation en chaîne (PCR)***

69/102 isolats de levures (30 : échantillons collectés ; 39 : échantillons de la préparation), ont fait l'objet d'une identification moléculaire. L'identification des levures a été réalisée par séquençage de la région D1/D2 du gène de l'ARNr 26S (Kurtzman et Robnett, 1997), en utilisant les amorces NL1 (5G-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3') et NL4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3'). L'amplification a été effectuée dans le thermocycleur Analytik Jena (FlexCycler, Allemagne) avec un cycle de dénaturation initiale (95°C/2 min), suivie par 36 cycles : de dénaturation (95°C/1 min), d'hybridation (52°C/1 min 30 sec), et d'élongation (72°C/2 min) et terminés par une étape d'élongation finale (72°C/10 min). La composition du mélange réactionnel est affichée dans le tableau 14.

**Tableau 14.** Composition du milieu réactionnel de la PCR des régions D1/D2 de l'ARN26S.

<b>Composants</b>	<b>Volume (µL)</b>
Amorce NL-1 (10µM)	0,5
Amorce NL-4 (10µM)	0,5
dNTP (10mM)	0,5
Tampon 5X	5
<i>Taq</i> DNA polymérase (GoTaq G2 DNA polymerase) (5U/µL)	0,0625
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	1,5
ADN (50ng/ µL)	1
H <sub>2</sub> O ultra pure (µL)	16,69

***h. Electrophorèse sur gel d'agarose***

Les produits de PCR ont été vérifiés par électrophorèse sur gel d'agarose (0,8% m/v dans le tampon 1X TAE). 5 µL de chaque marqueur de tailles différentes de 1 Kb et 100 pb (Bench Top DNA ladder), ont été utilisés pour la migration des amplicons 16S et 26S respectivement et 5 µL de chaque amplicon ont été mélangés avec 1 µL de tampon de charge (loading Dye 6X ; Promega, G190A) puis déposés dans chaque puits. Après migration, les gels ont été révélés comme décrit précédemment. Les produits de PCR ont été congelés à -20°C pour une utilisation ultérieure.

***i. Séquençage des produits de PCR***

Le séquençage a été effectué par le service d'Eurofins Genomics (Ebersberg, Allemagne), en utilisant les mêmes amorces utilisées pour les PCR. Les séquences obtenues ont été analysées, assemblées à l'aide du logiciel DNA baser. Ce dernier est un logiciel

bioinformatique qui est utilisé pour la détection des erreurs de séquençage, l'édition et la correction des bases mal appariées ainsi à l'assemblage des séquences d'ADN et la conversion de contigs en format FASTA.

Les formats FASTA des séquences obtenues après analyse sur DNA baser ont été alignés sur la base de données GenBank à l'aide du « Basic Local Alignment Search Tool » (BLAST) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). Les résultats sont exprimés en pourcentage de similarité de la souche à identifier avec les espèces les plus proches.

#### ***j. Numéro d'accèsion des séquences nucléiques***

Les séquences analysées (format FASTA), ont été déposées dans la banque des données GenBank. Les numéros d'accèsion de chaque souche sont illustrés dans les annexes 9 et 10.

### **2.3. Identification de la diversité microbienne par la technique de culture indépendante (metabarcoding)**

Le metabarcoding est une nouvelle méthode d'évaluation de la biodiversité contenue dans un environnement ou un échantillon donné à partir duquel L'ADN est extrait, puis un fragment cible est amplifié à l'aide des amorces générales ou universelles par PCR. Les produits de PCR sont séquencés à l'aide du séquençage de nouvelle génération, après l'ajout de barcodes (oligonucléotides uniques pour chaque échantillon) et adaptateurs de séquençage.

En général la méthode d'extraction est à optimiser en fonction la nature de l'échantillon, en effet des kits d'extraction spécifique sont généralement adaptés à extraire l'ADN contenue dans une matrice et ils sont de plus en plus performants selon la matrice à extraire (sol, aliments gras...) et les espèces en présence (Ruppert *et al.*, 2019 ; Falentin *et al.*, 2019).

Dans cette étude, l'extraction de l'ADN a été effectuée sur tous les échantillons collectés auprès des ménages (Tableau 9, chapitre II) et sur les échantillons prélevés tout au long le procédé de la préparation de *Smen/Dhan* (Figure 23). L'extraction a été effectuée selon différentes étapes :

#### ***a. Préparation des échantillons***

Avant l'extraction de l'ADN nous avons traité chaque échantillon selon sa nature afin d'éliminer toute substance chevauchant le processus d'extraction :

- 20 g de chaque échantillon de *Smen* et de beurre ont été solubilisés avec 90 mL de citrate trisodique à 2% préalablement chauffé à 42°C, le mélange a été homogénéisé pendant 3 minutes dans un sac Stomacher® (Interscience, St-Nom, France). Des aliquotes de 50 mL ont été ensuite centrifugées à 8420 g pendant 15 minutes à 4°C. La phase liquide (le surnageant) et

la phase grasse ont été éliminées, l'élimination de la phase grasse a été effectuée à l'aide d'un écouvillon stérile. Les culots ont été ensuite conservés à -20°C pour une analyse ultérieure.

- Pour les échantillons de Lait, *Raib*, Lait de barattage, les culots qui ont été déjà conservés, sont solubilisés avec 10 mL de citrate trisodique à 2% préalablement chauffés à 42°C, le mélange a été ensuite centrifugé à 8420 g pendant 15 minutes à 4°C, les culots ont été conservés à -20°C.

- Pour l'échantillon de sel, 10 g ont été solubilisés avec 90 mL de citrate trisodique à 2% préalablement chauffé à 42°C, le mélange a été ensuite centrifugé à 8420 g pendant 15 minutes à 4°C, le culot a été conservé à -20°C.

- Pour les échantillons : Bio\_baratte (prélèvement de baratte), bio\_ récipient (prélèvement de récipient), les culots qui ont été déjà conservés avant, ont été directement utilisés pour l'extraction de l'ADN.

#### ***b. Lyse enzymatique et mécanique***

Les culots ont été décongelés à une température ambiante, puis resuspendus dans une solution de 400 µL du tampon de lyse :(Tris-HCl 20 mM à pH 8,0, EDTA 2 mM, 1% Triton X-100) contenant de lysozyme (20 mg/mL) et de mutanolysine (10 µL à 5U/µL). Ensuite 0,9 µL d'une solution d'RNase A (1 mg/mL) et 10 µL de lyticase (200 U) ont été ajoutées séparément par échantillon. Les échantillons ont été ensuite incubés à 37°C pendant 2 h et le mélange a été agité fréquemment.

Après traitement enzymatique, une étape de lyse mécanique a été réalisée. 300 mg de billes de zirconium ont été ajoutées pour chaque échantillons. Le mélange a été placé dans un vibro broyeur (MM400, Retsch) pendant 1 min à 30 Hz. Les tubes ont été refroidis dans la glace pendant 5 minutes, ensuite le même cycle de broyage a été effectué dans les mêmes conditions. Un traitement final avec la protéinase K (20 mg/mL) a été appliqué pendant 1 heure à 54°C (Penland *et al.*, 2021).

#### ***c. Extraction et purification de l'ADN***

Après les étapes de lyse, une étape d'extraction a été effectuée en utilisant le kit DNeasy®Blood & Tissue (Qiagen, Allemagne), suivant le protocole décrit par le fabricant. Le mélange déjà traité a été centrifugé (6000 g/10 min) à une température ambiante, ensuite le surnageant a été récupéré dans un tube Eppendorf stérile, 200 µL d'éthanol absolu préalablement congelé à -20°C ont été ajoutés, le contenu est ensuite mélangé par aspiration/refoulement et incubé pendant 5 min à une température ambiante.

Le mélange a été ensuite transféré sur la colonne de purification, et a subi une première centrifugation (6000g/2 min). L'éluant récupérer dans le tube collecteur a été jeté, et l'extrait

sec obtenu a été dilué dans 500 µL du tampon AW1, transféré dans un autre tube, pour une deuxième centrifugation (6000g/2 min). L'éluant a été ensuite jeté, et l'extrait sec obtenu a été dilué dans 500 µL du tampon AW2 et transféré dans un autre tube, une troisième centrifugation a été également réalisée (10000g/2 min). L'éluant a été ensuite jeté et une quatrième centrifugation à sec a été réalisée (10000g/2 min). La colonne a été transférée dans un autre tube collecteur. L'extrait sec a été dilué avec 50 µL d'eau ultra pure puis incubé (70°C/5 min). Une dernière centrifugation a été également effectuée (6000g/2 min), l'extrait sec obtenu a été jeté et l'ADN récupéré.

**d. Dosage et quantification de l'ADN extrait**

Les concentrations et la qualité de l'ADN extrait ont été effectuées par Spectrophotomètre (Nanodrop 1000, Thermo Scientific), et ensuite congelé à -20°C pour une utilisation ultérieure.

**e. Conditions de PCR et de séquençage métagénétique des communautés bactériennes**

La PCR a été réalisée comme décrit par Klindworth *et al.* (2013), en utilisant la Taq polymérase MTP (TM) 250 U (sigma : D7442-250UN). Les amorces SD-bact-0341-bS-17 (5'-CCTACGGGNGGCWGCAG-3') et SD-BAct-0785-aA-21 (5'-GACTACHVGGGTATCTAATCC-3') ont été utilisées pour amplifier les régions V3-V4 de l'ARN 16S avec : un cycle de dénaturation initiale (94°C/1 min) ; suivie par 30 cycles : de dénaturation (94°C/1 min), d'hybridation (65°C/1 min) et d'élongation (72°C/1 min) et une dernière étape d'élongation finale (72°C/10 min). La composition du milieu réactionnel de la PCR est illustrée dans le tableau 15.

**Tableau 15.** Composition du milieu réactionnel de la PCR des régions V3-V4 de l'ARN 16S.

Composants	Volume (µL)
Amorce S-D-BAct-0785-a-A-21 (20µM)	1,25
Amorce S-D-bact-0341-b-S-17 (20µM)	1,25
Mix de dNTP (10mM)	1
Tampon 10X	5
Taq DNA polymérase (5U/µL)	0,5
ADN (10ng/ µL)	2
H <sub>2</sub> O ultra pure (µL)	39

**f. Conditions de PCR et de séquençage métagénétique des communautés fongiques**

Pour la communauté fongique les amorces ITS3f (5'-GCATCGATGAAGAACGCAGC-3') et ITS4\_Kyo1 (5'-TCCTCCGCTTWTGWTGTC-

3') ont été utilisées pour amplifier la région ITS2 comme décrit par Toju *et al.*, (2012). Les conditions de la PCR sont : un cycle de dénaturation (94°C/1 min) ; suivie par 30 cycles : de dénaturation (94 °C /1 min), d'hybridation (55°C/1 min) d'élongation (72°C/1 min), et s'achève par une étape d'élongation finale (72°C/10 min). La composition du milieu réactionnel de la PCR est illustrée dans le tableau 16.

**Tableau 16.** Composition du milieu réactionnel de la PCR ITS2.

Composants	Volume (µL)
Amorce ITS3f (20µM)	1,25
Amorce ITS4_Kyo1 (20µM)	1,25
Mix de dNTP (10mM)	1
Tampon 10X	5
Taq DNA polymérase (5U/µL)	0,5
ADN (10ng/ µL)	2
H <sub>2</sub> O ultra pure (µL)	39

#### ***g. Séquençage Illumina Miseq***

Les amplifications et les étapes de séquençage ont été effectuées dans le même cycle dans la plateforme de séquençage de Génome Québec (Université McGill, Canada) en utilisant la technologie Illumina Miseq PE300 230 générant des lectures de 2x300 pb.

La technologie illumina Miseq est l'une des technologies de séquençage haut débit la plus utilisée, en raison de son faible coût de séquençage, sa rapidité, ainsi que sa haute précision et son faible taux d'erreur. Les lectures générées par cette technologie allant jusqu'au 30 millions de longueur de 2x300 pb (Schirmer *et al.*, 2015 ; Wu *et al.*, 2015 ; Falentin *et al.*, 2019). L'un des intérêts des NGS est le séquençage simultané de plusieurs échantillons, c'est-à-dire un séquençage multiplex, en accordant à chaque échantillon un barcode unique (Falentin *et al.*, 2019).

#### **2.4. Analyse bioinformatique et phylogénétique**

Les données de séquençage obtenues par la méthode de métabarcoding ont été démultiplexées et les barcodes ont été supprimés des lectures par le fournisseur de séquençage. Ensuite les séquences envoyées par la plateforme du séquençage ont été compressé et analysées à l'aide du pipeline FROGS (Find Rapidly OTU with Galaxy Solution), sous la plateforme Galaxy (<https://galaxy.migale.inra.fr/>), développé par l'INRA de Toulouse et de Signasse (Escudié *et al.* 2018). Ce pipeline est conçu pour analyser de grands ensembles de séquences d'amplicons et de produire des tableaux d'abondances des OTUs avec leurs affiliations taxonomiques. Les lectures appariées ont été fusionnées à l'aide de Flash, puis regroupées en

unités taxonomiques opérationnelles (OTUs), à l'aide de l'algorithme SWARM et avec une distance d'agrégation de 3. La suppression des chimères a été effectuée à l'aide de l'algorithme UCHIME sur l'outil VSEARCH. Avant l'affiliation taxonomique, un filtre d'abondance a été appliqué pour filtrer les groupes de séquences, les séquences présentant une abondance relative inférieure à  $5 \times 10^{-5}$  ont été exclues. Enfin, l'assignation taxonomique a été effectuée à l'aide des bases de données (SILVA Pintail100-138) et (UNITE Fungi 8.2) pour les données 16S et ITS respectivement. Les multi-affiliations ont été corrigées sur NCBI. Les OTUs affiliées aux séquences chloroplastiques et mitochondriales ont été supprimées de l'ensemble de données 16S.

## **2.5. Biodiversité et analyse statistique**

Des analyses de la diversité alpha (diversité au sein d'une communauté) et bêta (diversité entre plusieurs communautés) ont été effectuées à l'aide du pipeline QIIME 2 (Quantitative Insights Into Microbial Ecology). Ce pipeline est dédié à l'analyse des résultats de type métabarcoding. Il comprend de nombreux outils pour différentes analyses y compris les analyses d'alpha et de bêta diversité et des outils de visualisation des résultats (Caporaso *et al.*, 2010). Des courbes de raréfaction ont été également générées en utilisant ce pipeline, après normalisation sur le plus petit nombre de séquence trouvé dans un échantillon, les indices de diversité ont été également calculés (Chao1, Shannon, Simpson, Evenness).

L'analyse statistique a été effectuée en utilisant le logiciel en ligne Calypso (Zakrzewski *et al.*, 2016). Ce dernier permet aux utilisateurs d'exploiter, interpréter et de comparer des informations taxonomiques, à partir d'un ensemble de données métagénomiques, et permet aussi des visualisations quantitatives des tests statistiques, tels que : l'analyse multivariée, l'analyse factorielle, la régression multivariée et les estimations de la diversité.

Une analyse des coordonnées principales (PCoA) basée sur les distances Bray-Curtis a été réalisée pour comparer la répartition de la biodiversité au niveau de l'OTU selon différents paramètres (origine du lait, région d'origine, méthode de préparation). Les différences statistiques entre les groupes ont été évaluées à l'aide d'un test Adonis. En outre, l'algorithme de taille d'effet (LEfSe), de l'analyse discriminante linéaire (LDA) a été appliquée pour identifier les taxons bactériens et fongiques représentatifs dans les matrices des échantillons étudiés.

### 3. Résultats

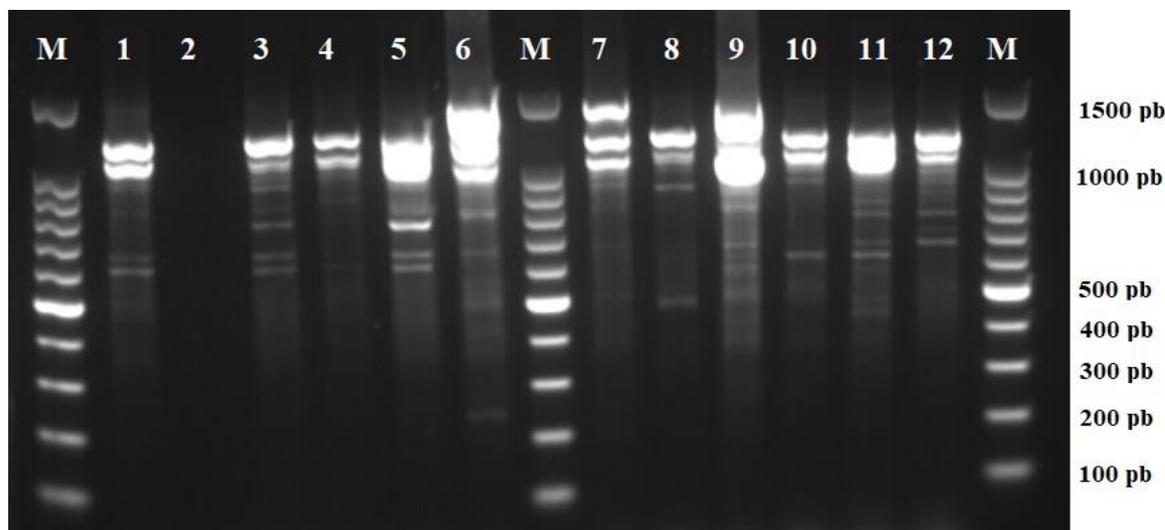
#### 3.1. Diversité microbienne des échantillons de *Smen/Dhan* collectés

##### 3.1.1. Bactéries lactiques et levures identifiées par les techniques de culture dépendantes

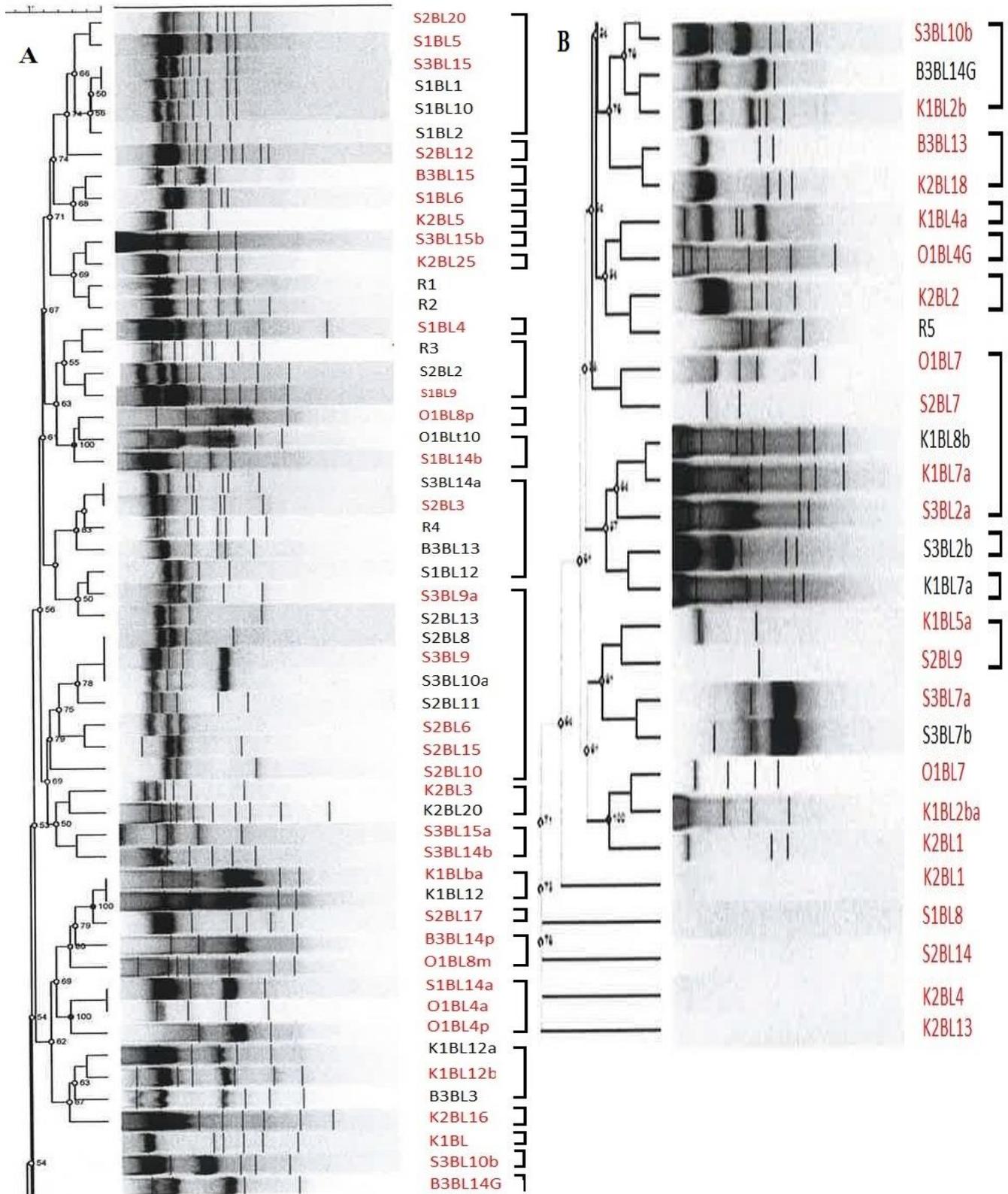
###### a. Typage M13-PCR

Après la dérégulation à l'aide de la M13 RAPD-PCR, différents profils de bandes ont été obtenus. L'amplification avec l'amorce M13 a généré 2 à 7 bandes entre 400 et 1500 pb (Ex. Figure 25). L'analyse des profils électrophorétiques sur le logiciel Bionumerics a permis de regrouper les isolats et de générer des dendrogrammes de proximité (Figure 26 et 27).

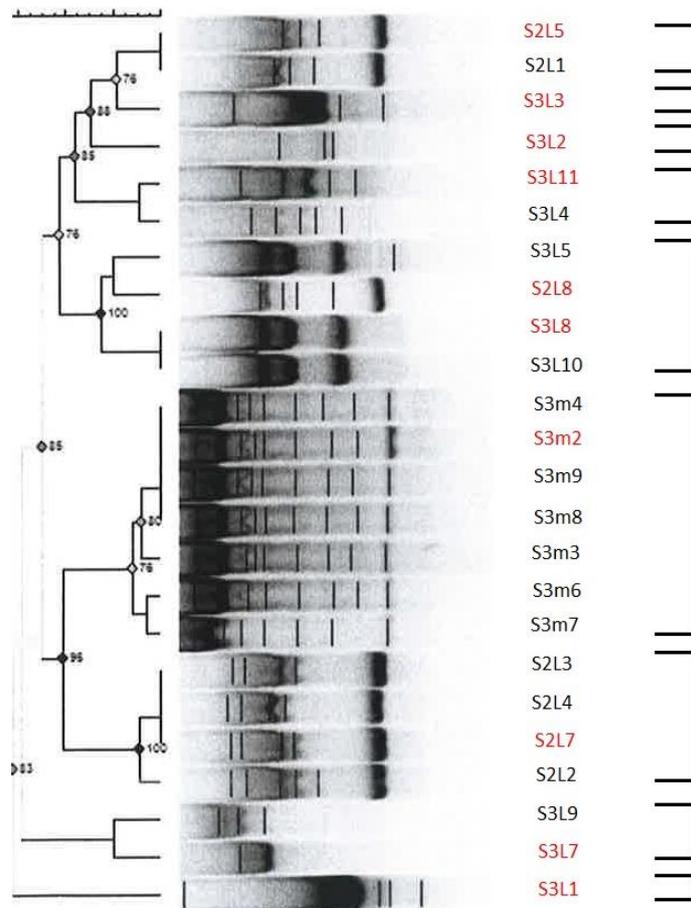
52 isolats de BL et 9 de levures, représentatifs de chaque cluster ont été identifiés par l'amplification et le séquençage de l'ARNr 16S et le domaine D1-D2 du gène de l'ARNr 26S, respectivement.



**Figure 25.** Profils électrophorétiques de certains isolats de BL résultant de la RAPD-PCR en utilisant l'amorce M13.



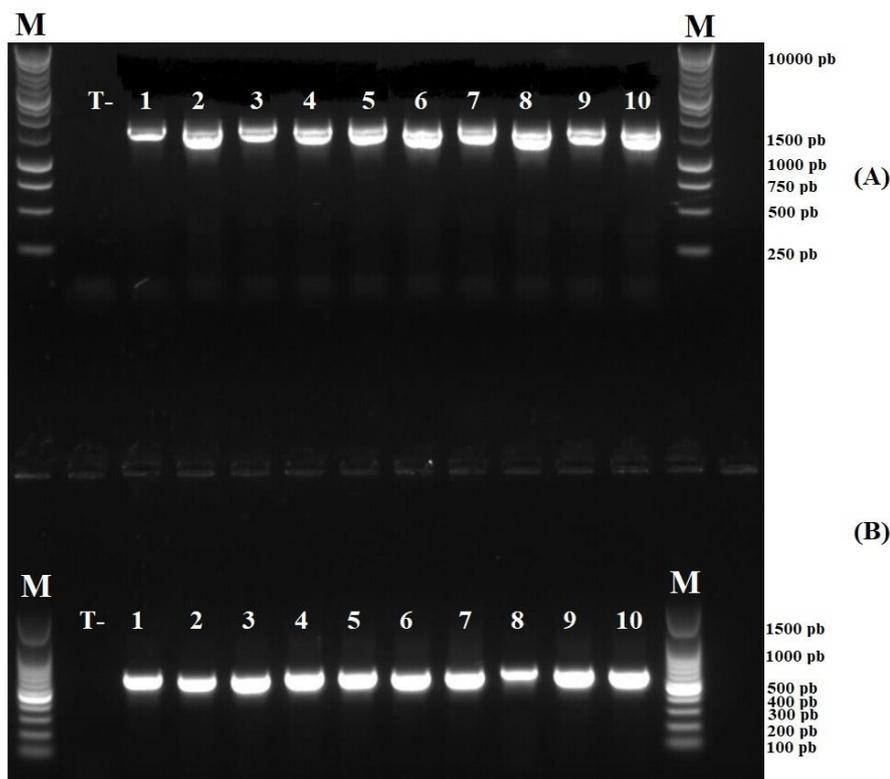
**Figure 26.** Dendrogrammes (A et B) des résultats de la RAPD-PCR des BL isolées des échantillons de *Smen/Dhan* collectés. Les souches présentant des profils similaires sont regroupés dans les mêmes clusters. Les souches sélectionnées en rouge ont été choisies pour une éventuelle identification moléculaire et R1, R2, R3, R4 sont des souches contrôles.



**Figure 27.** Dendrogramme du résultat de la RAPD-PCR des levures isolées des échantillons collectés (Echantillons S2 et S3), les souches présentant des profils similaires ont été regroupées dans les mêmes clusters. Les souches sélectionnées en rouge ont été choisies pour une éventuelle identification moléculaire.

***b. Amplification des gènes de l'ARNr 16S et les régions D1-D2 de l'ARN 26S***

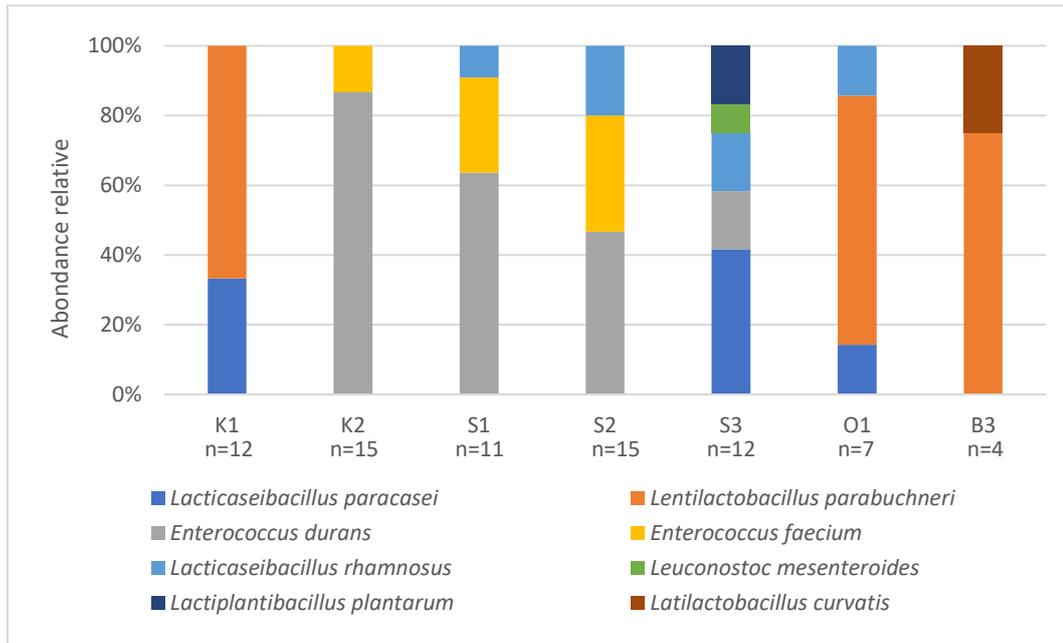
Les gènes codant de l'ARNr 16S et D1-D2 de l'ARN 26 S ont été amplifiés par PCR. Les fragments amplifiés obtenus sont séparés selon leurs poids moléculaire par électrophorèse sur gel d'agarose. Après migration, la présence des bandes électrophorétiques correspondant à la taille du gène de l'ARN16S (1500 pb) et pour les régions D1-D2 de l'ARN26S (600 à 650 pb), a été visualisée sous lumière UV (Figure 28).



**Figure 28.** Produits d'amplification PCR des gènes de l'ARNr 16S (A) et D1-D2 de l'ARN 26S (B) de quelques souches sur gel d'agarose à 0,8 % (m/v). T- : témoin négatif, M : marqueurs de taille.

### *c. Identification des bactéries lactiques*

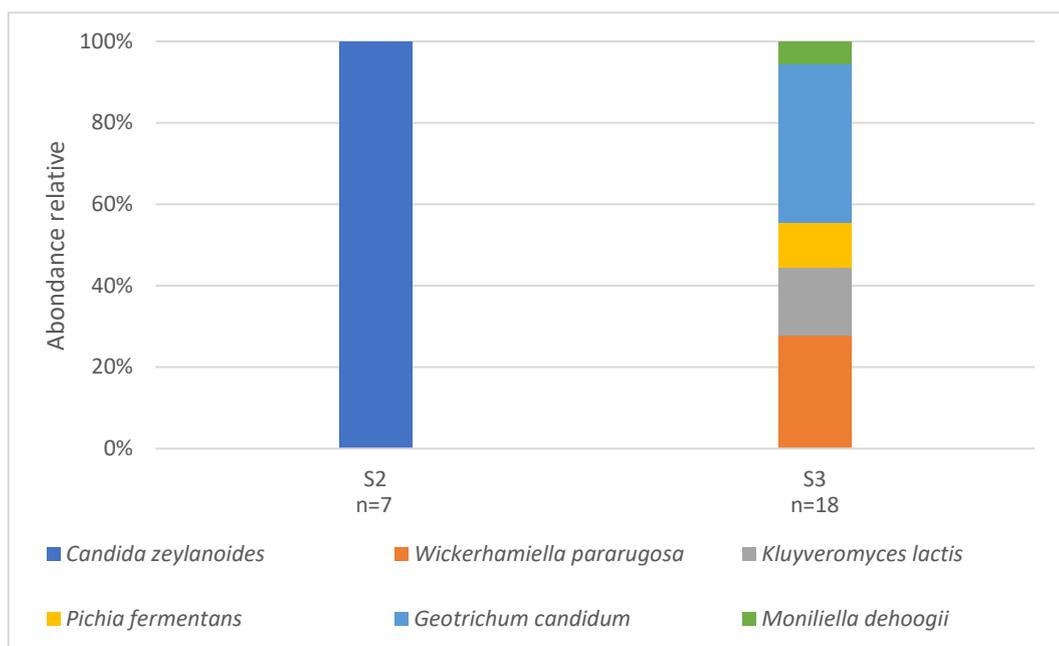
Sur la base des résultats de séquençage de l'ARNr 16S, les isolats des bactéries lactiques des échantillons de *Smen* collectés ont été identifiés et appartiennent à 3 genres : *Enterococcus*, *Lactobacillus* et *Leuconostoc*. Parmi les BL identifiées, les entérocoques et les lactobacilles, représentaient respectivement 51,31 et 47,36 % de l'ensemble des isolats. Pour les entérocoques, deux espèces ont été identifiées, *Enterococcus faecium* et *Enterococcus durans*, elles sont dominantes dans 3 échantillons (S1, S2 et K2). La diversité des lactobacilles est beaucoup plus importante, elles sont dominantes dans les 4 échantillons restants (B3, K1, O1, S3), avec des abondances élevées en ordre décroissant : *Lentilactobacillus parabuchneri*, *Lacticaseibacillus paracasei*, *Lacticaseibacillus rhamnosus*, *Lactiplantibacillus plantarum* et *Latilactobacillus curvatus*. Un isolat de *Leuconostoc mesenteroides* a été également identifié dans l'échantillon S3 (Figure 29). Les numéros d'accèsion des souches identifiées sont représentés dans les annexes 9 et 10.



**Figure 29.** Diversité des bactéries lactiques dans les échantillons de *Smen* collectés par l'application des techniques de culture dépendantes. n : le nombre d'isolats collectés dans chaque échantillon.

#### **d. Identification des levures**

6 espèces ont été identifiées à partir deux échantillons de *Smen* collectés, dont *Candida zeylanoides* était la seule espèce identifiée dans l'échantillon S2, tandis que 5 espèces ont été identifiées dans l'échantillon S3, où *Geotrichum candidum* a été identifiée étant l'espèce la plus dominante suivie par *Wickerhamiella pararugosa*, *Kluyveromyces lactis*, *Pichia fermentans* et *Moniliella dehoogii* (Figure 30).



**Figure 30.** Diversité des levures identifiées dans les échantillons de *Smen* collectés par l'application des techniques de culture dépendantes. n : le nombre d'isolats collectés pour chaque échantillon.

### 3.1.2. Diversité microbienne identifiée par les techniques de culture indépendantes

#### a. Diversité bactérienne par métabarcoding des régions V3-V4 de l'ARNr16S

Après extraction de l'ADN des 15 échantillons de *Smen* collectés ; seulement 9 échantillons (B4, B5, K1, K2, O1, S1, S2, S3, S5) présentaient des concentrations d'ADN suffisantes pour l'analyse métabarcoding. A l'exception de l'échantillon O1, tous les échantillons ont été préparés par la méthode de salage. 297 203 séquences de qualité filtrées ont été générées et regroupées en 160 OTUs. Après normalisation sur le plus petit nombre de séquence trouvé dans un échantillon (17 291). Le nombre d'espèces observées (richesse) variait entre 44 et 107 tandis que les indices : de Chao1 (richesse estimée) variait entre 47 et 103, d'evenness entre 0,16 et 0,7, de shannon entre 0,82 et 4,6 et de simpson entre 0,18 et 0,91 (Tableau 17). Des différences significatives ont été observées au sein des communautés bactériennes, en tenant compte des variables catégorielles des échantillons étudiés. L'indice de Chao1 est significativement plus élevé dans les échantillons de *Smen* préparés avec le lait de vache que dans les échantillons de *Smen* préparés avec le lait de chèvre ( $p < 0,05$ ). En plus, les indices de Chao1 et de Simpson sont significativement différents ( $p < 0,05$ ) selon la région d'origine où le *Smen* a été préparé, notant que les échantillons de *Smen* collectés à partir de la région de Sétif préparés avec le lait de vache, présentaient les valeurs les plus élevées pour les deux indices (Annexe 14).

**Tableau 17.** Indices d'alpha-diversité des communautés bactériennes des échantillons de *Smen* collectés.

Echantillons	Séquences/Echantillon normalisées	Chao1 Moy.	Equitabilité Moy.	Bonne couverture Moy.	Espèces observés Moy.	Shannon Moy.	Simpson Moy.
B4	17290	83,937	0,284	0,999	73,9	1,762	0,523
B5	17290	69,962	0,46	0,999	61,3	2,733	0,723
K1	17290	54,224	0,472	0,999	47,2	2,622	0,745
K2	17290	51,264	0,315	1	48,5	1,765	0,468
O1	17290	46,8	0,151	1	43,9	0,825	0,182
S1	17290	113,149	0,68	1	106,5	4,579	0,905
S2	17290	88,349	0,548	0,999	76,1	3,427	0,824
S3	17290	102,822	0,511	0,999	94,9	3,354	0,803
S5	17290	98,031	0,434	0,999	86,6	2,795	0,723

L'analyse de la composition des échantillons de *Smen* a révélé que les OTUs identifiés appartiennent à 8 phyla, les Firmicutes représentaient 67,5% des séquences totales suivis des Proteobacteria (20,4%), Actinobacteria (5,7%), Patescibacteria (5%) et Bacteroidota (1,4%) (Annexe 12).

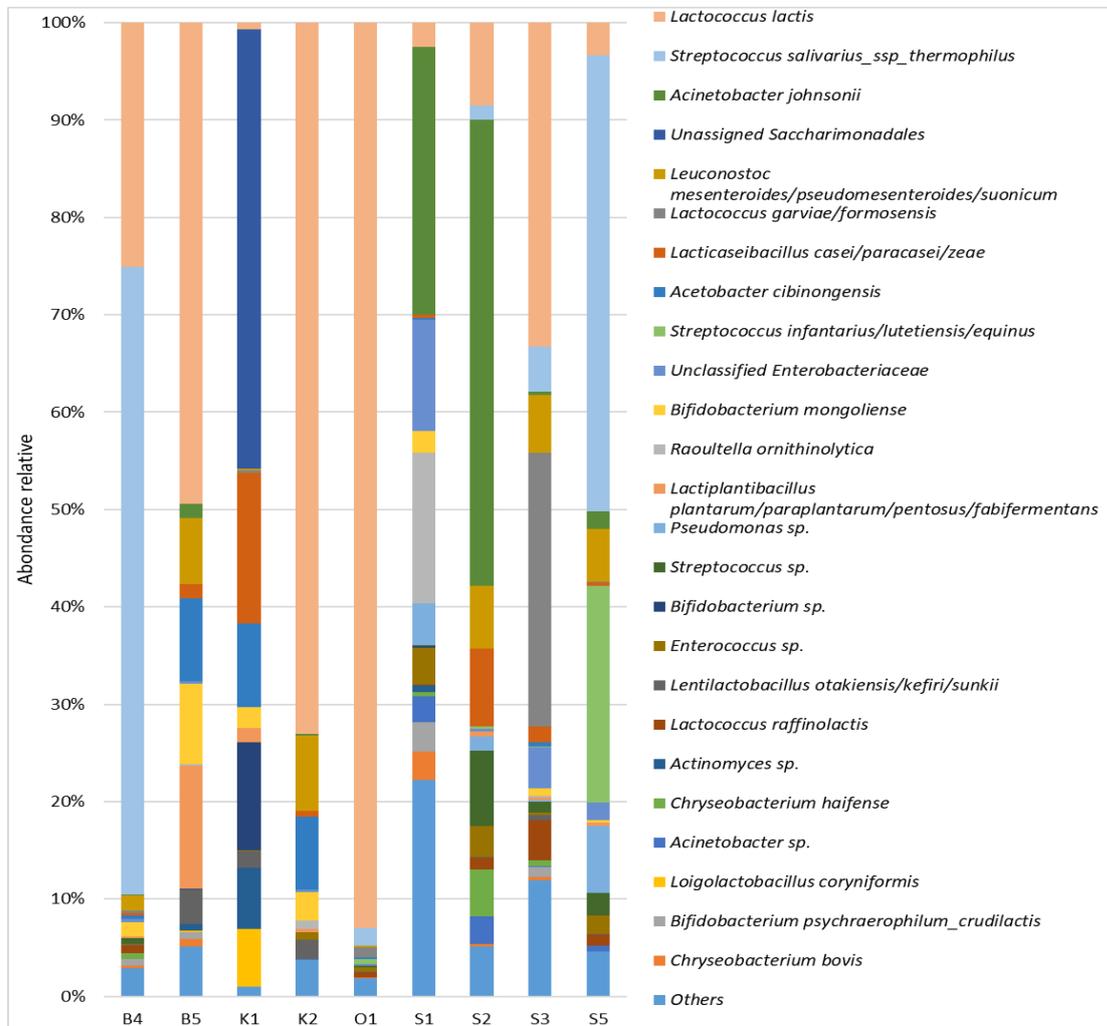
Une importante diversité microbienne a été observée : 57 genres ont été identifiés, parmi lesquels les bactéries lactiques présentaient le groupe le plus abondant. *Lactococcus* représentait 36,6% des séquences totales, suivi par *Streptococcus* (17,1%), *Lactobacillus sensu lato* (7,9%) et *Leuconostoc* (4%). Il est à noter que le genre *Lactococcus* était présent dans tous les échantillons collectés avec des abondances relatives comprises entre 1,1 % et 92,3 %, et il représentait le genre le plus dominant dans 4 échantillons de *Smen* étudiés (B5, S3, K2 et O1). Les échantillons restants présentaient des abondances relatives élevées soit en *Streptococcus* (B4 et S5), ou en *Acinetobacter* (S1 et S2). D'autres genres ont été également identifiés (*Bifidobacterium*, *Acetobacter*, *Pseudomonas*, *Raoultella*, *Enterococcus* et *Chryseobacterium*) avec des moyennes d'abondances relatives supérieures à 1% des séquences totales (Annexe 13).

La figure 31 représente la distribution des 25 principales espèces identifiées dans les échantillons de *Smen* collectés, nous remarquons que les échantillons abritaient des communautés bactériennes complexes. Il est à noter que les espèces de *Lactococcus lactis*, *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus* et *Acinetobacter johnsonii*, présentaient les principales espèces représentatives. *L. lactis* était l'espèce la plus dominante dans les échantillons B4, B5, K2, S3 et O1 avec des moyennes d'abondances relatives de 25,0%, 49,2%, 72,0%, 33,0% et 90,6%, respectivement, et en faible proportion dans les échantillons K1

(0,7%), S2 (8,5 %), S1 (2,5 %), S5 (3,3 %). D'autres espèces de *Lactococcus* (*Lactococcus raffinolactis* et *Lactococcus garvieae/formosensis*) ont été également trouvées à des abondances relatives élevées dans l'échantillon S3. D'autre part, l'espèce de *S. salivarius subsp. thermophilus* était présente dans cinq échantillons (B4, S3, S2, O1 et S5) avec des abondances élevées dans les échantillons B4 (64,2 %) et S5 (46,7%). Une autre espèce de *Streptococcus sp.* liée à *Streptococcus infantarius/lutetiensis/equinus* a été également mis en évidence dans l'échantillon S5.

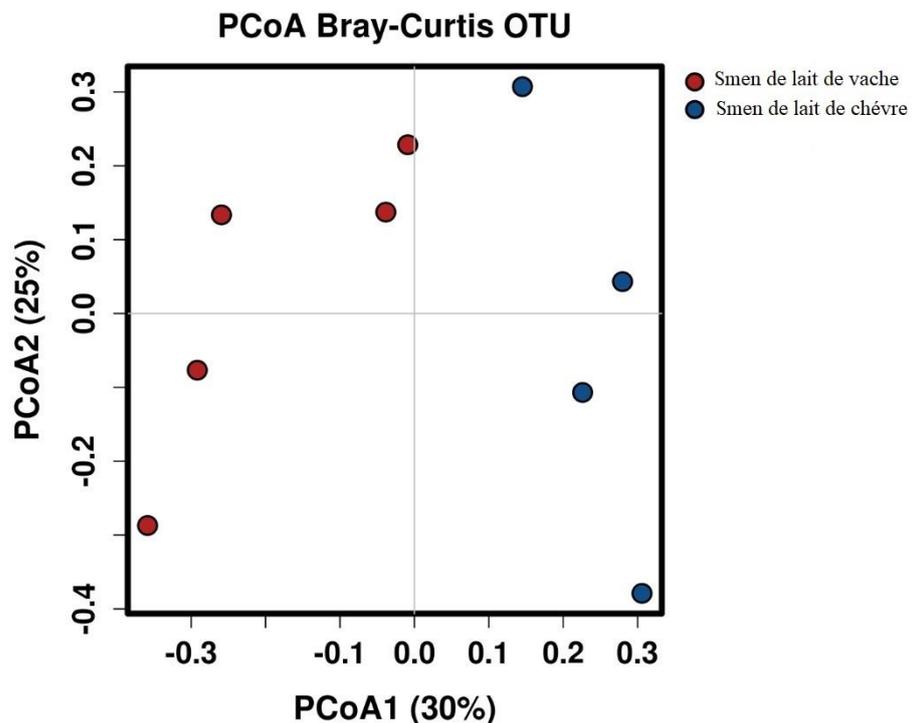
*A. johnsonii* était l'espèce la plus dominante dans les échantillons S1 et S2 avec des abondances relatives de 27,5 et 47,7 %, respectivement.

Contrairement aux résultats trouvés par les techniques de culture dépendantes, les lactobacilles et les entérocoques ne présentaient pas les taxons les plus dominants ; mais leurs espèces font partie des 25 principaux taxons des échantillons de *Smen*.



**Figure 31.** Diversité des espèces bactériennes des échantillons de *Smen/Dhan* collectés et identifiées par métabarcoding.

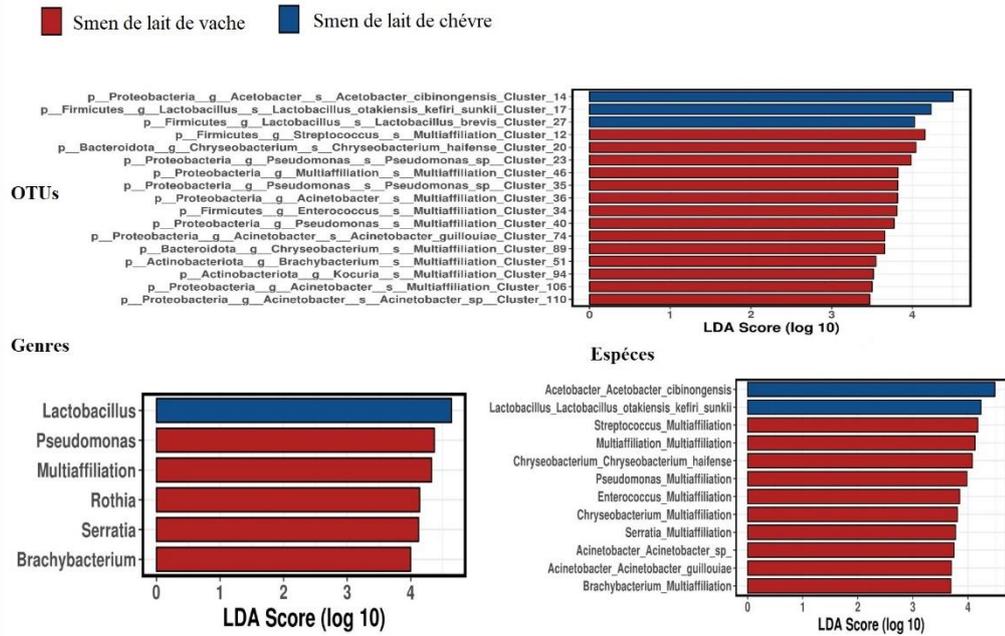
La bêta-diversité des communautés bactériennes de différents échantillons de *Smen*, a été étudiée à l'aide du test PCoA basée sur les distances de Bray-Curtis. Une analyse de la variance de ces distances a été également effectuée à l'aide du test Adonis de permutation multivariée. Au niveau de l'OTU, l'origine du lait était le seul facteur qui affectait significativement la distribution des communautés bactériennes ( $p < 0,05$ ,  $R^2 = 0,257$ ). La PCoA représente 55% de la variabilité totale. La PCoA1 (30%), a permis la séparation des échantillons préparés avec le lait de chèvre, apparaissant à droite des échantillons du lait de vache apparaissant à gauche (Figure 32).



**Figure 32.** Analyse des coordonnées principales (PCoA) basée sur la distance de Bray-Curtis pour les données métabarcoding de la région V3-V4 de l'ARN16S des échantillons de *Smen* collectés.

Pour identifier davantage les taxons bactériens surreprésentés ou sous-représentés dans les échantillons de *Smen* préparés à partir du lait de vache ou de chèvre, une analyse discriminante linéaire (LDA) couplée à des mesures de la taille de l'effet (LEfSe) a été réalisée au niveau du genre, de l'espèce et de l'OTU. Six genres, 12 espèces et 17 OTUs présentaient des abondances significativement différentes selon l'origine du lait.

En effet, le microbiote des échantillons de *Smen* préparés à partir du lait de chèvre est enrichi en OTUs liés à *Acetobacter cibinongensis*, *Lentilactobacillus otakiensis/kefiri/sunkii* et *Levilactobacillus brevis* tandis que le microbiote des échantillons préparés avec du lait de vache est enrichi en *Streptococcus*, *Chryseobacterium haifense*, *Pseudomonas sp*, *Enterococcus*, *Acinetobacter guillouiae*, *Brachybacterium spp* (Figure 33).



**Figure 33.** Taxons bactériens représentatifs de chaque échantillon de *Smen* collecté, selon le test LefSe au niveau d'OTUs, genres et espèces, sur la base des données de séquençage du métabarcoding V3-V4.

**b. Diversité fongique par métabarcoding de la région ITS2**

L'analyse du métabarcoding de la région ITS2 a généré un total de 646 883 séquences de qualité filtrée à partir de 10 échantillons (B3, B4, B5, E10, K1, K2, S1, S2 S3, S5) qui sont regroupés en 70 OTUs. Après rarefaction sur le plus petit nombre de séquence trouvé dans un échantillon (50 092), la richesse variait entre 21 et 52, tandis que les indices de : Chao1 variait de 21 à 56, d'evenness de 0,008 à 0,51, de Shannon de 0,03 à 3,15 et de Simpson de 0,005 à 0,83 (tableau 18).

**Tableau 18.** Indices d'alpha-diversité des communautés fongiques des échantillons de *Smen* collectés.

Echantillons	Seq/Echantillon normalisées	Chao1 Moy.	Equitabilité Moy.	Bonne couverture Moy.	Espèces observées Moy.	Shannon Moy.	Simpson Moy.
B3	45130	21	0,23	1	20,7	1,006	0,319
B4	45130	30,176	0,102	1	28,4	0,492	0,161
B5	45130	28,3	0,375	1	26,9	1,782	0,587
E10	45130	23,401	0,008	1	20,1	0,036	0,005
K1	45130	44,883	0,355	1	41,9	1,914	0,633
K2	45130	31,575	0,347	1	29,3	1,693	0,529
S1	45130	54,068	0,554	1	51,6	3,151	0,833
S2	45130	37,903	0,283	1	34,2	1,443	0,499
S3	45130	41,825	0,515	1	41,4	2,768	0,749
S5	45130	56,333	0,466	1	53	2,671	0,766

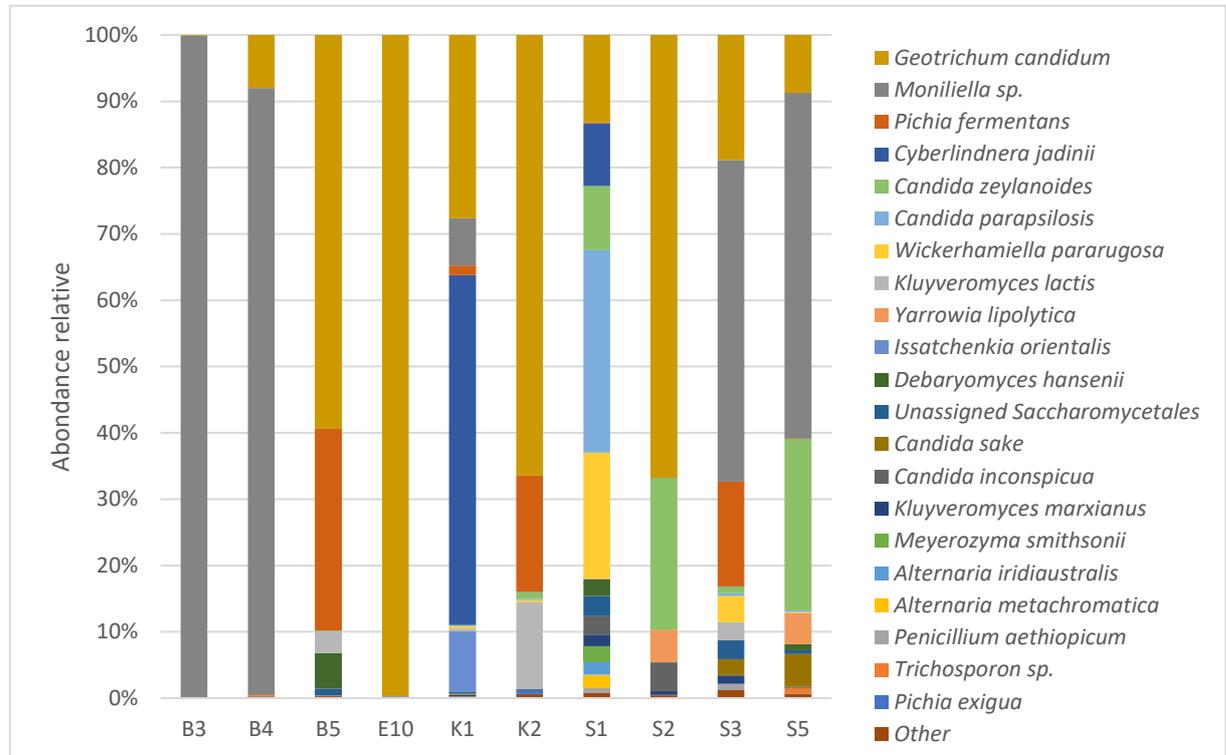
La comparaison des indices de diversité alpha selon les variables catégorielles a montré que les indices de Shannon et de Simpson sont significativement différents ( $p < 0,05$ ) en fonction de l'origine des régions des échantillons collectés. Ceux collectés des régions de Sétif et de Khenchela présentaient les valeurs les plus élevées (Annexe 18). Cependant, les indices de diversité alpha les plus faibles ont été enregistré dans l'échantillon E10 qui a été préparé selon la méthode de traitement thermique.

Les communautés fongiques des échantillons de *Smen* sont dominées par des membres des Ascomycota (69,9%) et Basidiomycota (30,1%) (Annexe 16). 33 genres ont été identifiés et 7 genres prédominants ont montré des moyennes d'abondances relatives supérieures à 1% des séquences totales. Le genre *Geotrichum* représentait 36,8%, *Moniliella* (29,9%), *Candida* (10,7%), *Pichia* (6,7%), *Cyberlindnera* (6,2%), *Wickerhamiella* (2,4%), *Kluyveromyces* (2,4%) et *Yarrowia* (1,0%). D'autres genres étaient également présents avec des abondances relatives moyennes entre 0,1 et 0,9% des séquences totales : *Issatchenkia*, *Debaryomyces*, *Alternaria*, *Meyerozyma*, *Tirchosporon*, *Penicillium* (Annexes 17).

La figure 34 montre la distribution des espèces fongiques dans les différents échantillons de *Smen* collectés. Globalement, le mycobiote de *Smen* de chaque échantillon est dominé par une à cinq espèces différentes. Il est à noter que les échantillons S1 et S3 sont caractérisés par une diversité beaucoup plus élevée et abritaient 12 et 9 espèces respectivement à des abondances relatives supérieures à 1%. *G. candidum* était la seule espèce trouvée à des abondances relatives élevées (allant de 8 à 99,7 %) dans tous les échantillons à l'exception de l'échantillon B3.

La deuxième espèce la plus abondante est *Moniliella sp.* qui était trouvée à des abondances relatives supérieures à 1% dans 5 échantillons sur 10, cette espèce est identifiée étant la plus dominante dans les échantillons abritant de faibles abondances relatives de *G.*

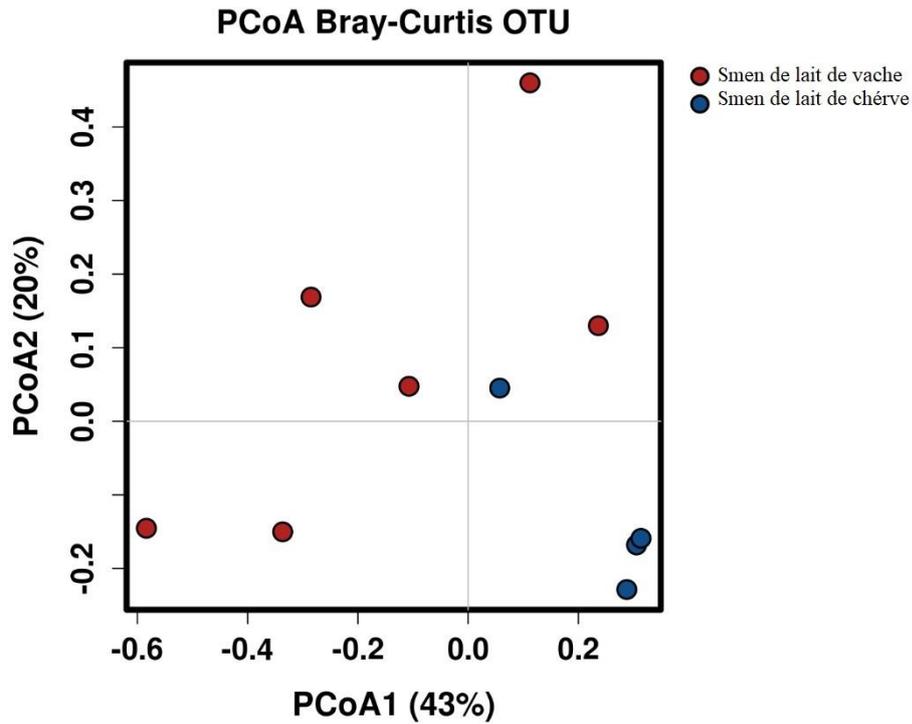
*candidum*. D'autres espèces importantes ont été également identifiées : *P. fermentans*, *C. zeylanoides*, *K. lactis*, *Cyberlindnera jadinii* et *W. pararugosa*.



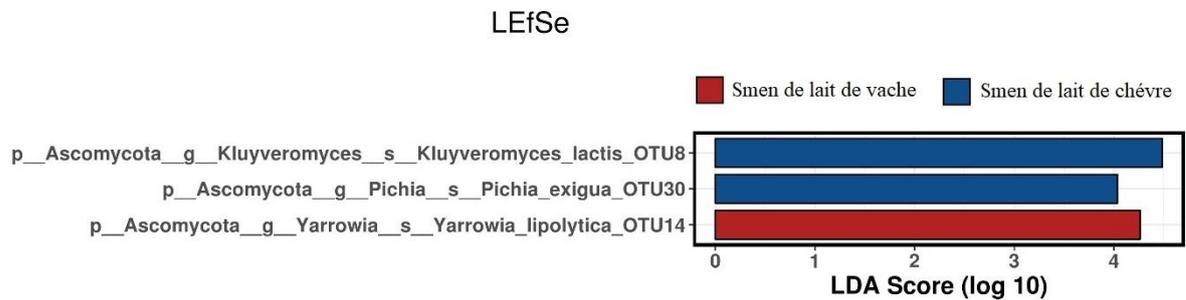
**Figure 34.** Diversité des espèces fongiques des échantillons de *Smen/Dhan* collectés et identifiées par métabarcoding de la région ITS2.

Concernant l'analyse de la diversité bêta, comme il est précédemment observé pour les communautés bactériennes, l'origine du lait des échantillons collectés, était le seul facteur qui affectait significativement la distribution des communautés fongiques ( $p < 0,05$ ,  $R^2 = 0,258$ ) (Figure 35).

L'analyse LefSe au niveau des OTUs a montré que les échantillons de *Smen* préparés avec du lait de chèvre sont enrichis en OTUs de *Pichia exigua* et *K. lactis* alors que l'OTU liée à *Yarrowia lipolytica* est plus répandue dans les échantillons de *Smen* de lait de vache (Figure 36).



**Figure 35.** Analyse des coordonnées principales (PCoA) basée sur la distance de Bray-Curtis pour les données métabarcoding de la région ITS2 des échantillons de *Smen* collectés.



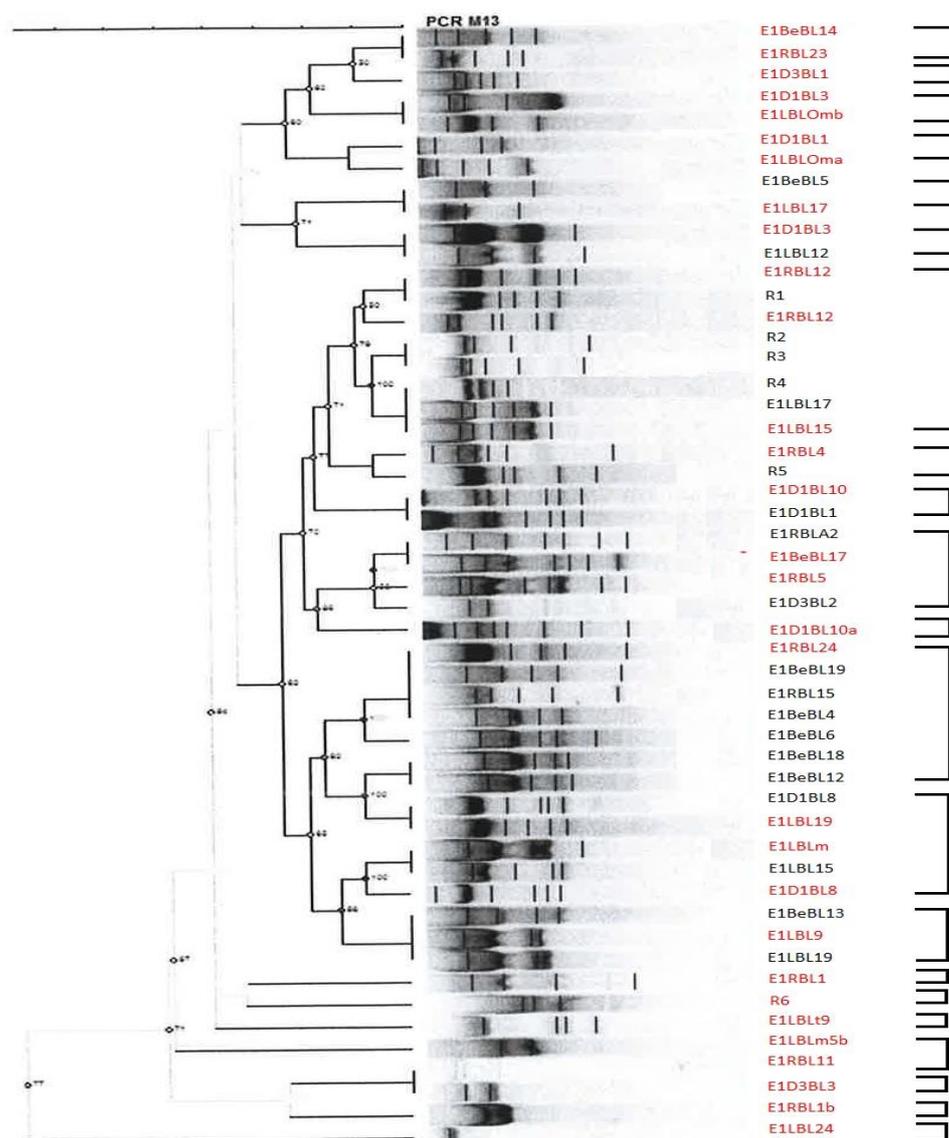
**Figure 36.** Taxons fongiques représentatifs de chaque échantillon selon le test LEfSE des échantillons de *Smen* collectés sur la base des données de séquençage du métabarcoding ITS2.

### 3.2. Diversité microbienne des échantillons prélevés durant la préparation du *Smen*

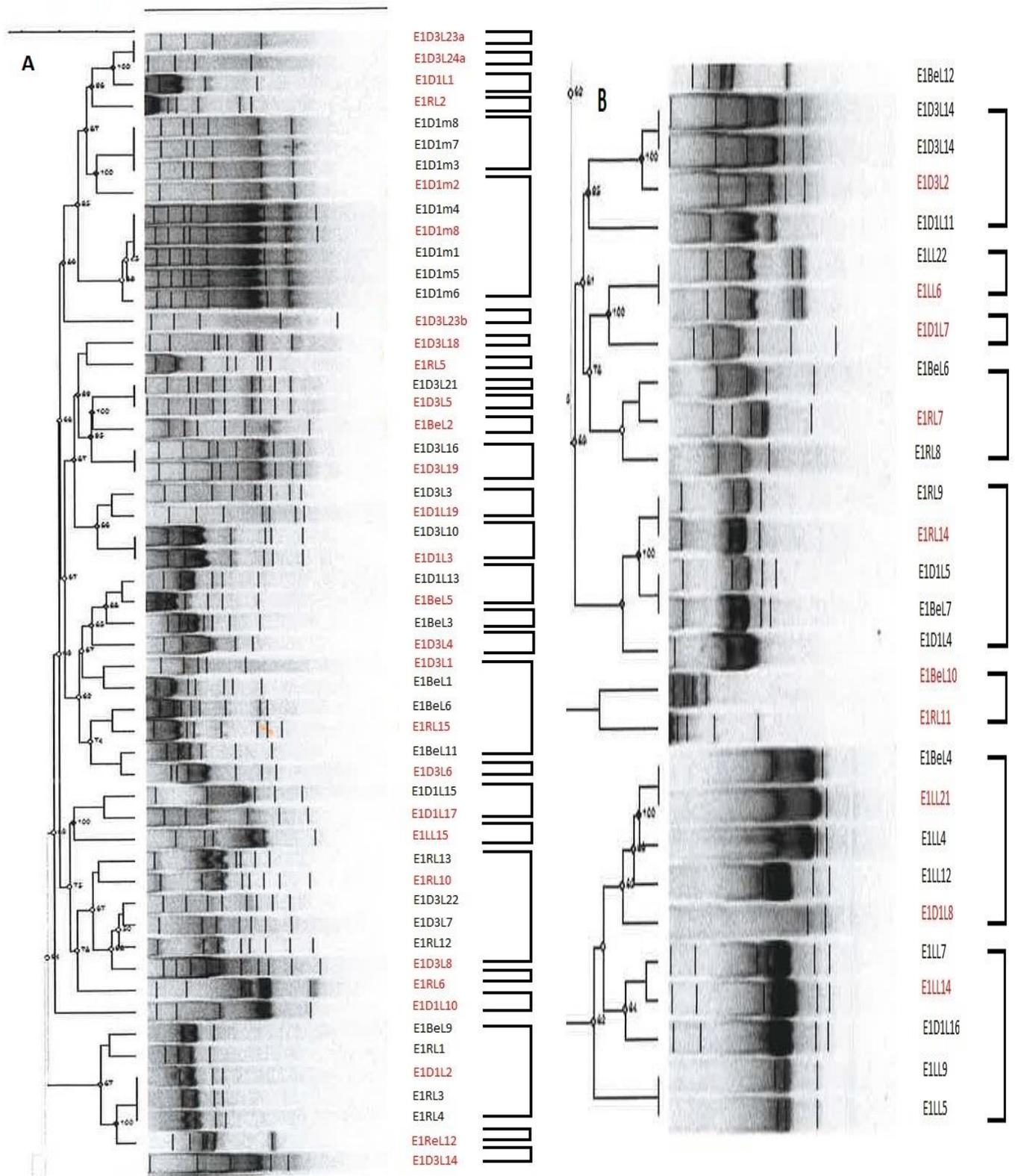
#### 3.2.1. Bactéries lactiques et levures identifiées par les techniques de culture dépendantes

##### a. Typage M13-PCR

30/45 isolats de BL et 39/77 de levures représentant des motifs de bandes différents (Figure 37 et 38), ont été choisis pour une éventuelle identification moléculaire.



**Figure 37.** Dendrogramme du résultat de la RAPD-PCR en utilisant l'amorce M13 des BL isolées, les souches présentant des profils similaires sont regroupées dans les mêmes clusters. Les souches sélectionnées en rouge ont été choisies pour une éventuelle identification moléculaire. R1, R2, R3, R4, R5, R6 sont des souches contrôles.



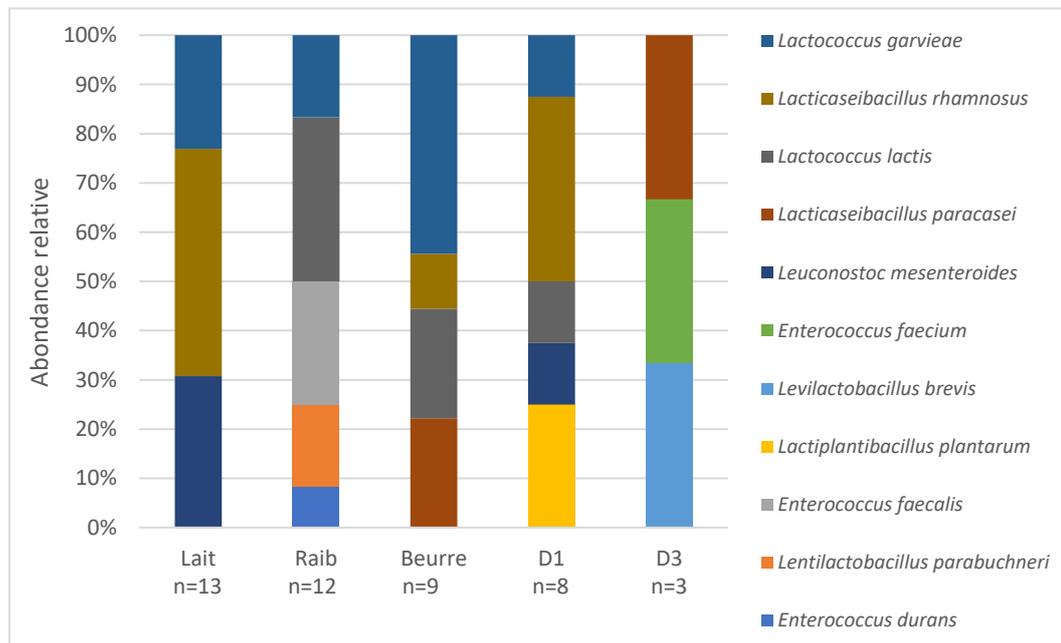
**Figure 38.** Dendrogrammes (A et B) du résultat de la RAPD-PCR des levures isolées en utilisant l'amorce M13, les souches présentant des profils similaires sont regroupées dans les mêmes clusters. Les souches sélectionnées en rouge ont été choisies pour une éventuelle identification moléculaire.

### **b. Amplification des gènes de l'ARNr 16S et les régions D1-D2 de l'ARNr 26S**

Les gènes codant de l'ARNr 16S et D1-D2 de l'ARNr 26S des isolats sélectionnés pour le séquençage ont été amplifiés par PCR (comme il est décrit précédemment 3.3.1.b).

### **c. Identification moléculaire des bactéries lactiques**

Les résultats ont montré que les isolats identifiés appartiennent à 4 genres différents ; *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* et *Lactococcus*, avec 11 espèces identifiées des échantillons : lait cru, *Raib*, beurre et *Smen/Dhan* (1 mois (D1) et 3 mois (D3)). Comme c'est illustré dans la figure 39, des changements dans les communautés des BL ont été observés tout au long les différentes étapes de la préparation du *Smen*. En effet, *L. rhamnosus*, *L. mesenteroides* et *L. garvieae* représentaient les espèces les plus dominantes dans le lait cru, alors que *L. lactis*, *L. garvieae*, *L. parabuchneri*, *E. faecalis* et *E. durans* et *L. paracasei*, *L. lactis*, *L. rhamnosus*, *L. garvieae* étaient dominants dans les échantillons du *Raib* et du beurre, respectivement. Les espèces rencontrées dans le beurre (à part *L. paracasei*) en plus de *L. mesenteroides* et *Lactiplantibacillus plantarum* ont été également identifiées dans le *Smen* après 1 mois de la maturation. Au 3<sup>ème</sup> mois, 3 isolats uniquement ont été obtenus dans le *Smen* et affiliés aux espèces suivantes : *L. brevis*, *E. faecium* et *L. paracasei*.

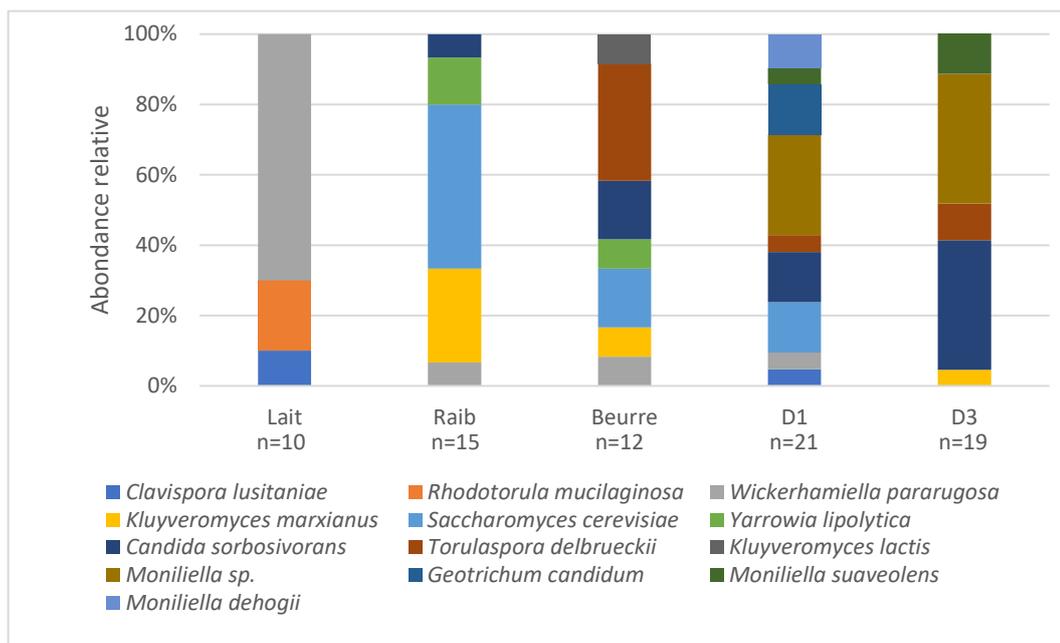


**Figure 39.** Diversité des bactéries lactiques isolées des échantillons prélevés durant la préparation du *Smen/Dhan* par l'application des techniques de culture dépendantes. n : le nombre des isolats collectés pour chaque échantillon.

#### **d. Identification moléculaire des levures**

Les isolats de levures des échantillons prélevés durant la préparation du *Smen*, ont été identifiés et appartiennent à 13 espèces : *Clavispora lusitaniae*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *W. pararugosa*, *Kluyveromyces marxianus*, *Saccharomyces cerevisiae/paradoxus*, *Y. lipolytica*, *Candida sorbosivorans*, *Torulaspora delbrueckii*, *K. lactis*, *G. candidum*, *M. dehoogii*, *Moniliella suaveolens*, et une espèce de *Moniliella* non identifiée, Il est à noter que ce dernier isolat, était dominant dans les échantillons de *Smen* au 1<sup>er</sup> et au 3<sup>ème</sup> mois de la maturation, qui correspond probablement à une nouvelle espèce, car sa séquence de gènes d'ARNr 26S du domaine D1-D2 partage moins de 95 % de similitude avec *M. dehoogii* qui représente son plus proche phylogénétique relatif (Annexe 8). Comme c'est observé précédemment pour la flore lactique, il y'avait également des changements dans les communautés fongiques pendant la préparation et la maturation de *Smen*. En effet, dans le lait cru, 3 espèces dominantes ont été identifiées, *W. pararugosa*, *R. mucilaginosa*, *C. lusitaniae*. Après la fermentation du lait cru en *Raib*, les espèces de *R. mucilaginosa* et *C. lusitaniae* n'étaient plus détectées et de nouvelles espèces sont installées; il s'agit des espèces *S. cerevisiae*, *K. marxianus*, *Y. lipolytica*, *C. sorbosivorans* et *W. pararugosa*.

Le mycobiote du beurre était composé par les mêmes espèces rencontrées dans le *Raib* en plus de *T. delbrueckii* et *K. lactis*. Après un mois de la maturation du *Smen* (D1) des espèces précédemment trouvées dans le lait cru, le *Raib* et le beurre ont été identifiées avec d'autres espèces non détectées auparavant (*G. candidum* et *Moniliella spp.*) Enfin, au 3<sup>ème</sup> mois de la maturation de *Smen*, le mycobiote était caractérisé par une forte dominance de *Moniliella spp.* et *C. sorbosivorans* tandis que d'autres espèces, tels que *S. cerevisiae* et *G. candidum*, n'étaient plus détectées.



**Figure 40.** Diversité des levures des échantillons prélevés durant la préparation du *Smen/Dhan* par des techniques de culture dépendantes. n : nombre d'isolats collectés pour chaque échantillon.

### 3.2.2. Diversité microbienne identifiée par les techniques de culture indépendantes

#### a. Diversité bactérienne par métabarcoding des régions V3-V4 de l'ARNr16S

L'analyse métabarcoding a été réalisée sur tous les échantillons prélevés durant la préparation du *Smen* (voir figure 23). Le nombre total des lectures filtrées et de haute qualité générées à partir de tous les échantillons est de 368 039, regroupées en 104 OTUs. Ces dernières appartenaient à 5 phyla, dont le phylum des Firmicutes était le plus dominant et représentait 88,3% des moyennes d'abondances totales. D'autres phyla ont été également identifiés : Halobacterota (5,5%), Proteobacteria (4,3%), Actinobacteriota (0,9%), Bacteroidota (0,9%) (Annexe 20).

Parmi les Firmicutes, les OTUs liées au genre *Lactococcus* étaient les plus dominantes et représentaient 69% du nombre total de lectures. Les genres *Lactococcus*, *Streptococcus* (9,90%) et *Lactobacillus* (8,30%) étaient présents dans tous les échantillons. Parmi les Proteobacteria, des agents pathogènes opportunistes ont été détectés tels que *Klebsiella* (1,50%), *Enterobacter* (0,50%), *Aeromonas* (0,40%) (Annexe 21).

Après raréfaction sur le plus petit nombre de séquences trouvées dans un échantillon (22 483), la richesse variait entre 53 et 75, tandis que les indices de : Chao1 variaient de 54 à 79, d'évenness de 0,12 à 0,64, de Shannon de 0,67 à 3,95 et de Simpson de 0,14 à 0,88 (tableau 19). En considérant uniquement les indices de diversité alpha des échantillons de lait, *Raib*, beurre et *Smen* (D1, D2, D3, D6). Le microbiote bactérien du lait cru est caractérisé par la plus

grande richesse en espèces (75) ainsi que par les indices de Simpson (0,88), d'Evenness (0,64) et de Shannon (3,95). Ensuite, après la fermentation du lait, la richesse spécifique est restée assez élevée avec des valeurs comprises entre 53 (*Raib*) et 72 (beurre). Cependant les indices de Simpson, d'Evenness et de Shannon des échantillons de : *Raib*, beurre et *Smen* (D1, D2, D3, D6), ont diminué à des valeurs allant de 0,14 à 0,24, 0,12 à 0,18 et 0,67 à 1,1, respectivement.

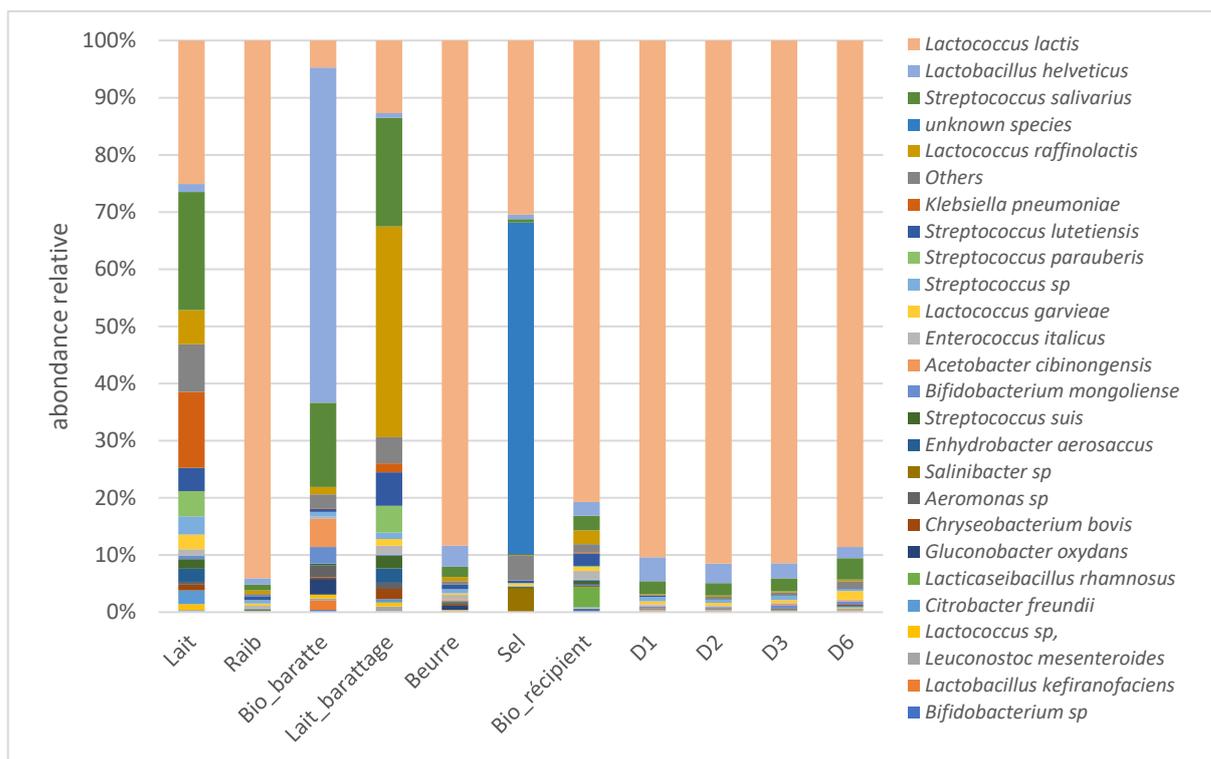
**Tableau 19.** Indices d'alpha-diversité des communautés bactériennes des échantillons prélevés durant la préparation du *Smen/Dhan*

Description	Seq/ Echantillons normalisées	Chao1 (Moy.)	Evenness (Moy.)	Bonne Couverture (Moy.)	Espèces observées (Moy.)	Shannon (Moy.)	Simpson (Moy.)
Lait	22480	75,067	0,634	1	75	3,95	0,879
Raib	22480	61,648	0,116	1	53	0,67	0,137
Bio_baratte	22480	75,933	0,408	1	65,3	2,459	0,629
Lait_barattage	22480	75,5	0,548	1	74	3,405	0,807
Beurre	22480	79,598	0,177	1	72	1,092	0,24
Sel	22480	57,144	0,322	1	52,7	1,84	0,578
Bio_récipient	22480	69,091	0,243	1	62,3	1,447	0,345
D1	22480	61,433	0,146	1	55,7	0,849	0,2
D2	22480	53,705	0,133	1	50,3	0,752	0,175
D3	22480	64,558	0,139	1	56,8	0,811	0,181
D6	22480	70,41	0,18	1	59,9	1,1	0,24

Les résultats obtenus, sont confirmés par l'analyse de la composition bactérienne des échantillons (figure 41). En effet, le lait cru abritait une communauté bactérienne complexe dont 14 espèces ont été trouvées à des abondances relatives >1%. Ces espèces correspondent d'une part à des membres du phylum des Firmicutes, comprenant des Lactocoques (*L. lactis*, *L. raffinolactis*, *L. garvieae*), des Streptocoques (*S. salivarius subsp. thermophilus*, *S. lutetiensis/infantarius/equinus*, *Streptococcus parauberis*, *Streptococcus suis*), et dans une moindre mesure, des Entérocoques (*Enterococcus italicus*) et des Lactobacilles (*Lactobacillus helveticus*). D'autre part, le lait cru est également caractérisé par la présence des membres du phylum des Proteobacteria appartenant soit à l'ordre des Enterobacterales (*Klebsiella pneumoniae*, *Citrobacter freundii*) soit à l'ordre des Pseudomonadales (*Enhydrobacter aerosaccus*). Par contre, les échantillons de *Raib*, de beurre et de *Smen* (D1, D2, D3, D6) ont été dominés par des espèces de *L. lactis* (88 à 91%), *L. helveticus* (1,10 à 4,20%) et *S. salivarius subsp. thermophilus* (1 à 3,70%). D'autres espèces mineures (abondances relatives <1%) ont été également identifiées dans ces mêmes échantillons, comprenant des espèces qui ont été déjà révélées dans le lait cru : Entérocoques (*Enterococcus italicus/hirae*), Lactocoques (*L. garvieae* et *L. raffinolactis*), Lactobacilles (*Lactobacillus kefiranofaciens*) et *Leuconostoc* (*L. mesenteroides*) ainsi que des membres du phylum des Proteobacteria.

Il convient à noter que, la distribution des espèces bactériennes dans l'échantillon : Bio\_récipient est, assez similaire à celle du beurre. Cependant, la distribution des espèces dans les échantillons : Lait\_barattage, Bio\_baratte et le sel, était différente.

Les échantillons de : lait\_barattage et Bio\_baratte étaient caractérisés par des abondances relatives élevées d'OTUs liées à *L. helveticus* et *L. raffinolactis*, respectivement, tandis que la communauté bactérienne du sel était dominée par des OTUs liées à *Haloparvum* et *Salinibacter sp.*; d'autres espèces des bactéries lactiques ont été rencontrées dans l'échantillon de sel avec des abondances relatives : pour *L. lactis* (30,40 %), *L. helveticus* (0,80 %) et *Streptococcus salivarius* (0,60 %).



**Figure 41.** Diversité bactérienne des échantillons prélevés durant la préparation du *Smen/Dhan* par métabarcoding des régions V3-V4 de l'ARNr16S.

### ***b. Diversité fongique par métabarcoding de la région ITS2***

Après filtrage des séquences de faible qualité et chimériques, un total de 634339 séquences de haute qualité a été obtenu et regroupé en 78 OTUs. Ces dernières ont été identifiées et appartiennent à deux différents phyla, dont les Ascomycota étaient les plus dominants et représentaient 81,1%, suivis par des Basidiomycota (18,8%). Les OTUs liées aux genres *Wickerhamiella* (34,57 %), *Geotrichum* (25,49 %), *Moniliella* (18,64 %), *Saccharomyces* (7,25 %), *Kluyveromyces* (7,25 %), étaient les plus dominants (Annexe 24).

Après raréfaction sur le plus petit nombre de séquences trouvé dans un échantillon (39 443), le nombre d'espèces observées (richesse) variait entre 47 et 60, tandis que les indices de : Chao1 variait de 49 à 90, d'Evenness de 0,34 à 0,53, de Shannon de 1,9 à 3,39 et de Simpson de 0,64 à 0,82 (tableau 20).

**Tableau 20.** Indices d'alpha-diversité des communautés fongiques des échantillons prélevés durant la préparation du *Smen/Dhan*.

Description	Seqs/Echantillon normalisées	Chao1 Ave.	Equitabilité Moy.	Bonne couverture Moy.	Espèces observées Moy.	Shannon Moy.	Simpson Moy.
Lait	39440	60,973	0,344	1	57	2,005	0,622
<i>Raib</i>	39440	49,75	0,34	1	49	1,911	0,644
Bio_ baratte	39440	54,133	0,434	1	50	2,446	0,709
Lait_barattage	39440	49,261	0,391	1	47	2,169	0,686
Beurre	39440	53,657	0,416	1	50,8	2,36	0,681
Sel	39440	53,9	0,528	1	53,9	3,039	0,755
Récipient	39440	90,05	0,398	1	51	2,257	0,669
D1	39440	57,412	0,427	1	55,7	2,478	0,701
D2	39440	60,7	0,506	1	56,7	2,95	0,819
D3	39440	54,453	0,367	1	52,3	2,097	0,646
D6	39440	64,858	0,491	1	60,4	2,905	0,793

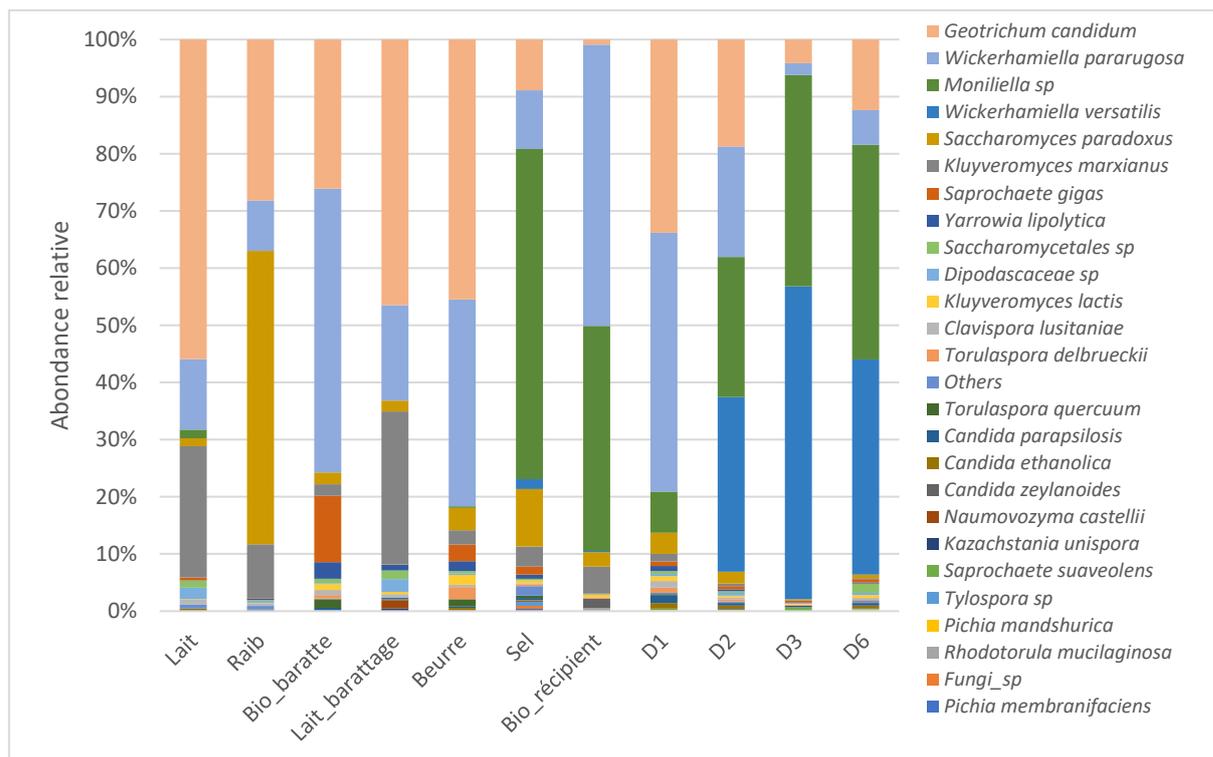
Dans l'ensemble, la comparaison des indices de la diversité alpha des différents échantillons étudiés n'a pas montré des variations importantes, la seule exception était l'échantillon de sel qui était caractérisé par un indice de Chao1 élevé (90), par rapport aux autres échantillons. En plus les indices de diversité n'ont montré aucune différence entre les facteurs étudiés, à l'exception de l'indice de Chao1, qui a montré une différence significative selon le type de l'échantillon ( $p < 0,05$ ).

En ce qui concerne la diversité fongique dans les échantillons prélevés durant la préparation de *Smen*, nos résultats ont mis en évidence des changements importants dans la flore fongique dominante (Figure 42). En effet, le mycobiote du lait cru et du *Raib* était dominé par des espèces de : *G. candidum*, *K. marxianus* et *W. pararugosa*.

L'espèce de *S. cerevisiae/paradoxus* était également abondante dans l'échantillon de *Raib*, et présente dans le lait cru mais à une faible abondance relative. Dans l'échantillon de beurre, *G. candidum* et *W. pararugosa* restaient dominantes, d'autres espèces (*K. marxianus*, *S. cerevisiae/paradoxus*, *C. lusitaniae*, *Saprochaete gigas*, *K. lactis*, *T. delbrueckii*, *Torulaspora quercuum* et *Y. lipolytica*), ont été également trouvées dans le même échantillon avec des moyennes d'abondances relative supérieurs à 1%.

Après un mois de la maturation (D1), le mycobiote de *Smen* était assez similaire à celui du beurre avec une nouvelle installation de *Moniliella sp.* ; qui était présente à une abondance relative de 7,2%. Après le 2<sup>ème</sup> (D2), 3<sup>ème</sup> (D3) et le 6<sup>ème</sup> (D6) mois de la maturation de *Smen*, *Moniliella sp.* ; a évolué de façon progressive avec la présence de *Wickerhamiella versatilis* ; tandis que les abondances relatives de *G. candidum* et *W. pararugosa* diminuaient en même temps.

En ce qui concerne les potentiels réservoirs fongiques rencontrés lors de la préparation de *Smen*, la plupart d'entre eux abritaient des abondances relatives élevées en *G. candidum* (à l'exception du Bio\_récipient) et de *W. pararugosa*. En plus, les échantillons de Bio\_baratte et Lait\_barattage, abritaient des abondances relatives élevées en *Saprochaete gigas* et *K. marxianus* tandis que les échantillons de sel et de Bio\_récipient semblaient être des sources importantes de *Moniliella sp.* et dans une moindre mesure de *W. versatilis* (Figure 42).



**Figure 42.** Diversité fongique des échantillons prélevés durant la préparation du *Smen/Dhan* par métabarcoding de la région ITS2 de l'ARNr 26S. D1, D2, D3, D6 : les échantillons de *Smen* après différents mois de la maturation.

#### 4. Discussion

Dans la présente étude, la diversité et la dynamique du microbiote du *Smen/Dhan* algérien, ont été étudiées en utilisant pour la première fois, la combinaison de deux approches : culture-dépendante et culture-indépendante. Jusqu'à présent, aucune étude n'a traité de façon approfondie la diversité microbienne du *Smen* par l'application des techniques de culture indépendantes ; les seuls travaux antérieurs sur ce produit, concernent uniquement l'application des techniques culturelles (El Marrakchi *et al.*, 1988 ; Bensalah *et al.*, 2011 Guessas *et al.*, 2012 ; Labtar *et al.*, 2019).

15 échantillons de *Smen/Dhan* collectés (produits finis) et un échantillon préparé selon le procédé traditionnel, ont fait l'objet de cette étude. L'ADN extrait des isolats a subi une identification moléculaire en ciblant le gène de l'ARNr 16S (bactéries lactiques) et les régions D1/D2 de l'ARNr 26S (levures), tandis que l'ADN extrait de différents échantillons, a fait l'objet d'un séquençage à haut débit, par la technologie de 2<sup>ème</sup> génération illumina-Miseq, en ciblant la région de l'ARNr16S (V3-V4) pour les bactéries et la région ITS2 (ITS3f/ITS4) pour les champignons.

**Les isolats de BL des échantillons collectés** ont été principalement identifiés comme étant des entérocoques et des lactobacilles. Ces derniers ont le statut GRAS ; alors que les

entérocoques (*E. faecium*), ont un statut paradoxal : car ils jouent un rôle positif dans de nombreux produits laitiers fermentés mais certains sont responsables d'infections nosocomiales et peuvent transférer des gènes de résistances aux antibiotiques (Ogier et Serror, 2008).

La technique de culture dépendante a révélé, que certaines espèces de lactobacilles et d'entérocoques ainsi que des espèces de levures, ont été capable de survivre plus d'une année dans certains échantillons, ce qui corroborent les résultats antérieurs obtenus sur d'autres produits alimentaires (Sakili et Isoual, 2004 ; Savadogo et Traore, 2011 ; Fröhlich-Wyder *et al.*, 2013 ; Berthoud *et al.*, 2017 ; da Rosa *et al.*, 2014 ; Čanak *et al.*, 2015). La persistance de ces microorganismes durant la conservation dépend largement de la nature des nutriments, des conditions environnementales, ainsi que de leurs systèmes enzymatiques.

Il est à noter que les résultats trouvés par cette étude, montrent une différence significative entre les deux approches de culture utilisées. Les communautés bactériennes se sont avérées très diverses, par l'analyse métagénétique et n'ont pas été détectées avec les techniques culturales. En effet, des études antérieures ont montré que les méthodes culturales ne révèlent que 1 à 10% de la diversité totale d'un écosystème (Jackson *et al.*, 2013). Bien que ces méthodes sont limitées pour définir la biodiversité, mais elles restent importantes pour la conservation de la richesse microbienne pour des utilisations technologiques ultérieures.

L'analyse de la culture indépendante est basée sur l'analyse de l'ADN total qui est dérivé soit de cellules vivantes ou mortes ; elle a fourni une image générale des espèces microbiennes qui ont laissé leur signature (trace) d'ADN pendant la préparation et la maturation du *Smen*. Les échantillons de *Smen* collectés dans lesquels une quantité d'ADN suffisante a pu être extraite pour **l'analyse métagénétique** ; a permis de distinguer des communautés bactériennes très diverses avec l'identification des principales espèces représentatives : *L. lactis*, *S. salivarius subsp. thermophilus* et/ou *A. johnsonii*. Toutefois, ces espèces n'ont pas été détectées par la technique de culture dépendante. Une étude antérieure sur le *Ghee* ougandais a rapporté que *L. lactis* et *S. salivarius* ont été également détectés par les techniques de culture indépendantes en utilisant la technique TTGE et DDGE alors qu'elles n'ont pas pu être identifiées en utilisant la technique culturale (Ongol et Asano, 2009).

En effet, *L. lactis* et *S. salivarius subsp. thermophilus* sont auparavant identifiés comme les principales espèces impliquées dans la fermentation spontanée du lait cru en *Raib*, également appelé *Rayeb* au Maroc, qui peut être consommé tel qu'il est ou transformé en un fromage blanc traditionnel appelé *Jben* ou baratté pour obtenir du babeurre (*Lben* marocain et algérien, *Leben* tunisien, *Laban* égyptien, irakien et libanais) et le beurre cru (*zebda*), ce dernier étant utilisé

pour la production de *Smen* (Tantaoui-Elaraki *et al.* 1987 ; Abd-El-Malek, 1978 ; Ben Amor *et al.* 1998 ; Hamama, 1997 ; Guessas *et al.* 2012 ; Labtar *et al.* 2019).

L'espèce *A. johnsonii*, présentait des abondances relatives élevées que celles des BL, dans 2 échantillons (S1 et S2) avec d'autres espèces Gram-négatifs du phylum des *Proteobacteria*, cela est dû probablement soit à une déviation de la fermentation spontanée du lait ou l'utilisation d'un lait cru altéré et/ou de mauvaise qualité hygiénique car cette espèce est considérée comme une espèce majeure d'altération du lait (Schmidt *et al.* 2012).

La présente étude nous a permis aussi pour la première fois d'avoir une idée globale sur le **mycobiote de *Smen*** qui a toujours été négligé jusqu'à ce jour. **Les techniques de cultures indépendantes** ont montré que nos échantillons de *Smen* collectés étaient dominés par 1 à 5 espèces, dont *G. candidum*, *Moniliella sp.*, *P. fermentans*, *C. zeylanoides*, *K. lactis*, *C. jadinii* et *W. pararugosa*. La plupart de ces espèces ont été également isolées par les techniques de culture dépendantes et la plupart d'entre elles sont régulièrement rencontrées dans le lait cru et les produits laitiers (Delavenne *et al.*, 2012 ; Wouters *et al.*, 2002 ; Gardini *et al.*, 2006 ; Sessou *et al.*, 2019). Nos résultats sont complètement différents à ceux trouvés par Ongol et Asano, (2009) qui ont étudié la diversité du *Ghee* Ougandais, où les espèces de levures les plus dominantes (identifiées par DGEE) étaient : *Geotrichum sp.*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Issatchnkia orientalis*, *Brettanomycess custersianus*, etc. La seule espèce commune avec notre étude est *Kluyveromyces lactis*.

Plusieurs facteurs pourraient influencer la richesse et la distribution de la diversité microbienne, tels que les conditions environnementales et chimiques ainsi que la méthode de préparation et la période de conservation. Les données analysées ont montré que les échantillons de *Smen* ayant subi un traitement thermique étaient moins riches en flore microbienne par rapport à ceux qui n'ont pas traité thermiquement, cela est dû probablement à la destruction des microorganismes présents dans le beurre comme il est expliqué auparavant dans le chapitre 2. Des observations similaires ont été rapportées par Abekhti *et al*, (2015) dans l'analyse de la diversité microbienne du Btana (datte traditionnelle conditionnées dans des peaux de moutons pour être commercialisée).

Concernant la distribution de la diversité microbienne des échantillons collectés, il a été démontré que l'origine du lait représentait un facteur discriminant dans la composition des communautés bactériennes. Généralement, le lait est considéré comme un milieu sélectif et pourrait enrichir sélectivement son microbiote, pour former une communauté microbienne spécifique pour chaque type de lait. Ces différences peuvent être dues également à la

composition de chaque lait ainsi au type d'alimentation apporté par chaque animal (Wei *et al.*, 2021).

Les résultats obtenus concernant la biodiversité des produits finis (échantillons collectés) ont été confirmés par l'étude de la dynamique des communautés microbiennes durant la préparation et la maturation de *Smen*. En effet, il a été constaté que *L. lactis* dominait juste après la fermentation du lait cru, comme c'est révélé par les deux techniques utilisées, cependant les techniques de culture dépendantes montraient que cette espèce est devenue progressivement sous-dominante après barattage et maturation. En revanche, l'identification des BL cultivables isolés des échantillons collectés a indiqué qu'elles appartenaient uniquement aux lactobacilles et aux entérocoques. Une étude antérieure sur l'évolution de la flore lactique au cours de la maturation du *Smen* marocain à l'aide des méthodes culturelles, a rapporté que *L. Lactis* disparaissait progressivement à partir le 7<sup>ème</sup> jour de la maturation et que les lactobacilles étaient le groupe le plus dominant à la fin de la maturation (Sakili et Issoual, 2004). La seule explication possible de la forte dominance de cette espèce, identifiée par approche métagénomique dans les échantillons de *Smen* collectés est dû à la présence de VBNC ou plus probablement de cellules mortes ; une observation similaire a été également rapportée par Penland *et al.* (2021).

L'analyse par métabarcoding nous a permis la détection des abondances relatives élevées en *Klebsiella pneumoniae* dans l'échantillon de lait, ce microorganisme est un pathogène opportuniste responsable d'une pneumonie et généralement sa présence dans le lait ne présente pas de risque sur la santé des consommateurs (Donkor *et al.*, 2007). D'autres pathogènes opportunistes ont été également détectés dans le lait, et disparaissaient après la fermentation en *Raib*, cela est expliqué par la diminution des conditions optimales à la croissance de ces microorganismes comme il est expliqué dans le chapitre 2.

Il est à noter, qu'au cours le séquençage illumina-Miseq, certaines séquences inattendues pourraient être identifiées. Ces séquences ont été identifiées comme provenant d'autres bibliothèques séquencées dans le même run, et seraient donc mal attribuées (Falentin *et al.*, 2018). Cela explique la présence des groupes inattendus dans les échantillons de Sel et le récipient (Bio\_récipient) utiliser pour la conservation de *Smen*. Telle contamination, pourrait avoir surtout lors de l'extraction d'une faible quantité d'ADN présent dans un échantillon.

L'analyse de la diversité fongique par les deux techniques nous a permis de décrire plus finement les populations de levures et de confirmer que chaque échantillon possède sa propre richesse. Durant la préparation et la maturation du *Smen*, la succession des levures changeait

selon le type d'échantillon. En comparant les résultats des deux techniques utilisées, neuf espèces communes ont été seulement identifiées : *G. candidum*, *Moniliella sp.*, *W. pararugosa*, *K. lactis*, *Y. lipolytica*, *K. marxianus*, *T. delbrueckii*, *C. lusitaniae* et *R. mucilaginosa*.

Une forte divergence a été également noté entre les deux approches de culture concernant la prévalence de *G. candidum*. La technique de culture indépendante a montré que cette espèce était dominante dans l'échantillon de lait et restait présente dans tous les échantillons durant la préparation du *Smen*, cependant, elle était identifiée uniquement dans l'échantillon de *Smen* : D1 (après 1 mois de maturation) par les méthodes culturales. *G. candidum* est généralement présent dans le lait, les produits laitiers et certains fromages, il représente 17 à 40% des échantillons de lait cru (Boutrou et Guéguen, 2005). Des études antérieures ont montré que cette espèce est responsable des caractéristiques organoleptiques de certains fromage en raison de leur forte activité lipolytique et protéolytique (Sacristán *et al.*, 2012). En effet, la majorité des espèces isolées ou identifiées par les deux techniques ont déjà été rapporté possédant des importantes activités lipolytiques et protéolytiques, citant par exemple *K. lactis* et *C. zeylanoides* (Flores *et al.*, 1999 ; Sacristán *et al.*, 2012, da Rosa *et al.*, 2014 ; Čanak *et al.*, 2015).

Une découverte intéressante a été notée dans cette étude qui est, l'isolement de *Moniliella sp.*, une levure noire du phylum des *Basidiomycota*. Les membres de ce genre sont généralement considérés comme des agents d'altération des aliments notamment les aliments acides et/ou à faible teneur en eau, y compris les produits laitiers riches en matières grasses (Rosa *et al.* 2009, Nakayama *et al.* 2016). Cependant, dans le cas du *Smen*, cette espèce pourrait avoir un rôle positif au cours de la maturation. Sa présence n'est pas surprenante car ce genre comprend des espèces xérophiles, fermentaires ainsi résistantes aux conditions acides. Probablement *Moniliella spp.* pourrait être développée au cours de la maturation de *Smen* comme il est démontré au cours de la suivie de la dynamique durant la préparation du *smen*. Il convient à noter que l'espèce *Moniliella spathulata* (CBS 241.79) a été isolée la première fois à partir du *Ghee* indien fabriqué avec le lait de buffle (de Hoog, 1979).

A cet égard nous pourrions conclure que la flore fongique a joué un rôle fonctionnel fondamental dans le développement des propriétés organoleptiques de *Smen*. Benkerroum et Tamim (2004) ont déjà rapporté que les levures jouent un rôle majeur dans la maturation de *Smen*, par la dégradation de la matière grasse et la libération des composés aromatiques. De ce fait, il serait intéressant d'étudier prochainement la dynamique fongique dans d'autres préparations de *Smen* pour confirmer cette hypothèse.

## **5. Conclusion**

La présente étude a apporté de nouvelles connaissances sur la diversité microbienne, du *Smen/Dhan* algérien et nous a permis d'identifier des micro-organismes clés dans la préparation et la maturation du *Smen/Dhan*. Les deux techniques de cultures utilisées, nous ont fourni une image globale sur la biodiversité microbienne et chacune des deux rajoute une information supplémentaire à cause des divergences trouvées entre les deux méthodes utilisées. La technique de métabarcoding a permis d'avoir des informations potentielles sur la composition de la biodiversité microbienne de *Smen*, et c'est aussi une étude complémentaire à la technique de culture dépendante. Grâce à la présente étude, une collection de micro-organismes a été obtenue et sera utilisée pour la réalisation des Starters qui pourraient être appliqués pour des futures productions de *Smen* à l'échelle pilote, où à aider les producteurs locaux, pour mieux contrôler le processus de maturation et les attributs de qualité de *Smen*.

***Chapitre IV. Analyse des  
composés volatils par espace  
de tête-chromatographie en  
phase gazeuse couplée à la  
spectrométrie de masse (HS-  
GC-MS)***

## **1. Introduction**

La qualité des produits laitiers, dépend généralement de différents paramètres ; physicochimiques, nutritionnels et sensoriels ; parmi les caractéristiques organoleptiques : le goût et la saveur jouent un rôle primordial sur la typicité des produits et l'acceptabilité des consommateurs. La saveur des produits laitiers est affectée par la combinaison d'un grand nombre de composés, dont la plupart sont produits au cours du processus de la maturation (Castellani *et al.*, 2019). De nombreux composés volatils ont été identifiés dans des produits laitiers fermentés ; ils comprennent des acides carboxyliques libres, des composés soufrés et des composés carbonylés. Leur analyse pourrait s'effectuer par plusieurs méthodes impliquant la préparation, l'extraction et la concentration des échantillons, suivis de la séparation, de la détection et de l'identification. En générale la chromatographie en phase gazeuse couplée au spectrophotomètre de masse est la méthode la plus utilisée, elle est considérée comme l'étalon or pour l'analyse de nombreuses substances (lipides, métabolites médicales, contaminants environnementaux...). Cette méthode permet simultanément la séparation et l'analyse d'un mélange qui pourrait présenter une complexité de nature et de volatilité très variées (Garcia et Barbas, 2011 ; Pogačić *et al.*, 2015). L'analyse des composés volatils nécessite une étape préliminaire d'extraction, le choix de cette étape est devenu primordial car elle a une grande influence sur les profils qualitatifs et quantitatifs des volatiles extraits, ainsi que sur l'exactitude des résultats. La méthode d'extraction de l'espace de tête "Head Space" (HS) est la méthode la plus adoptée pour extraire les substances volatiles des produits alimentaires, y compris de nombreux fromages.

Dans le but de comprendre les différents changements effectués, au cours de la maturation du *Smen/Dhan*, sous l'influence des microorganismes ; la caractérisation des conditions environnementales de l'écosystème s'avère nécessaire ; pour cela nous avons opté à l'étude du profil aromatique en analysant les composés volatils par espace de tête- chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrophotométrie de masse (HS-GC-MS). L'analyse a été réalisée sur 15 échantillons de *Smen/Dhan* collectés et 5 échantillons prélevés durant sa préparation : Beurre frais ; *Smen/Dhan* à différents temps de maturation (D1 : 1 mois, D2 : 2 mois, D3 : 3 mois, D6 : 6 mois).

## **2. Matériel et méthodes**

### **2.1. Préparation des échantillons**

2,50 ± 0,05 g de chaque échantillon ont été placés dans des flacons vial (Perkin Elmer Vial B0104236 : ø20 mm /22 mL) et scellés avec des capsules en aluminium à l'aide d'une

pince adaptée (capsule Perkin : B4000022). Les échantillons ont été ensuite congelé à  $-80^{\circ}\text{C}$  jusqu'à une analyse ultérieure.

## **2.2. Extraction des composés volatils**

L'extraction des volatils a été effectuée par la méthode piège à espace de tête « purge and trap », en utilisant l'échantillonneur Turbomatrix HS-40 trapautomatic HS (Perkin Elmer, Courtabœuf, France). La technologie du piège à espace de tête comprend un système d'espace de tête statique amélioré qui permet l'enrichissement et la concentration des analytes sur des pièges adsorbants avant la séparation par chromatographie en phase gazeuse (Schulz et *al.*, 2007). Le principe de cette méthode est de séparer les composés volatils dans une phase vapeur qui se trouve au-dessus de l'échantillon solide ou liquide, dans ce cas-là les analytes volatils diffusent dans la phase gazeuse, formant le gaz de l'espace tête (Jerković et Marijanović, 2009).

Les échantillons sont chauffés pendant 15 min à  $65^{\circ}\text{C}$ , afin d'atteindre les conditions d'équilibration. Les flacons sont ensuite pressurisés pendant 1 min à 207 kPa avec l'hélium comme gaz porteur, en introduisant une aiguille à travers le septum. Un piège Tenax<sup>TM</sup> (Trap Tenax<sup>TM</sup>) est chargé pendant 2,3 min à  $35^{\circ}\text{C}$ , provoquant la diminution de la pression à travers le piège et permettant l'adsorption et la concentration des analytes volatils de l'espace de tête (HS) sur le piège. La charge du piège est répétée deux fois pour chaque flacon. L'eau adsorbée est ensuite éliminée en purgeant l'hélium à travers le piège (purge à sec : 3 min). Le piège est chauffé à  $250^{\circ}\text{C}$  pendant 0,1 min et rincé sous pression à 164 kPa, conduisant à la désorption des analytes, qui sont ensuite transférés au GC à travers une ligne de transfert maintenue à  $150^{\circ}\text{C}$ , avec un temps d'injection de 0,6 min. Le piège est maintenu à  $250^{\circ}\text{C}$  pendant 5 min (Pogacic *et al.*, 2015).

## **2.3. Analyse des composés volatils par HS-GC-MS**

Les composés volatils sont analysés à l'aide d'un chromatographe en phase gazeuse Clarus 680 couplé à un spectromètre de masse quadripolaire Clarus 600T (Perkin Elmer, Courtabœuf, France). Les composés volatils sont séparés sur une colonne capillaire Elite 5MS (60 m 0,25 mm 1 mm ; Perkin-Elmer), avec l'hélium comme phase mobile. La température initiale  $35^{\circ}\text{C}$  est maintenue pendant 10 min, puis augmentée à  $5^{\circ}\text{C}/\text{min}$  jusqu'à  $230^{\circ}\text{C}$ . La température est ensuite augmentée à une vitesse de  $7^{\circ}\text{C}/\text{min}$  jusqu'à  $140^{\circ}\text{C}$  puis à  $13^{\circ}\text{C}/\text{min}$  jusqu'à  $280^{\circ}\text{C}$ . Des étalons sont régulièrement injectés afin de vérifier l'absence de dérive instrumentale du système GC/MS et pour générer des courbes standards. L'eau déminéralisée et chauffée à  $100^{\circ}\text{C}$ , est utilisée comme un blanc, injectée pour vérifier l'absence des traces.

Le spectromètre de masse est opéré en mode scan (scan ; 0,3 s et interscan ; 0,03s) dans une gamme de masse de  $m/z$  29 à 206. L'ionisation est réalisée par impact électronique à 70 eV.

#### **2.4. Traitement des données et identification des composés volatils**

Les composés volatils ont été identifiés par comparaison de leurs spectres de masse et leurs temps de rétention avec les étalons et avec les composés répertoriés dans la bibliothèque de spectres de masse (Scientific Instrument Services, Ringoes, NJ, USA). Les données HS-GC-SM sont traitées en convertissant les données brutes en zones de pics chromatographiques alignés sur le temps et la masse à l'aide du package XCMS open source implémentée avec le langage statistique R (Smith *et al.*, 2006). Les composés volatils sont identifiés et quantifiés selon l'abondance d'un fragment de masse sélectionné ( $m/z$ ), en unités arbitraires.

#### **2.5. Analyse statistique**

Une analyse en composantes principales (ACP) a été effectuée pour déterminer les différences entre les profils des composés volatils de chaque échantillon, en utilisant le logiciel R. Ensuite une classification hiérarchique a été effectuée en utilisant le couplage de la variance minimale de Ward et la méthode de la distance euclidienne sous le logiciel R, afin d'investiguer l'abondance des composés volatils de chaque échantillon et leur dynamique au cours de la maturation.

#### **2.6. Analyse des corrélations entre les composés volatils et le microbiote autochtone de *Smen/Dhan***

Afin de déterminer la relation entre la biodiversité microbienne (Chap. III) et la production d'arôme. Une corrélation de Spearman a été effectuée entre les données de la diversité microbienne (données métabarcoding : les moyennes d'abondance qui sont inférieure à 0,5% ne sont pas pris en considération) et les données des composés volatils des échantillons (Beurre frais, D1, D2, D3 et D6). Les valeurs de p ont été ajustées en utilisant la correction de Benjamini-Hochberg et le niveau de signification a été fixé à 0,05 (Benjamini et Hochberg, 1995). Les résultats pour les espèces présentant au moins une corrélation significative ont été visualisés sur une carte thermique avec un regroupement hiérarchique en utilisant la liaison de variance minimale de Ward et la méthode de la distance euclidienne. Les corrélations avec  $p > 0,05$  ont été considérées comme nulles et fixées à  $r = 0$ . Toutes les analyses ont été effectuées avec le logiciel R en utilisant les packages FactoMiner, Factoextra, Hmisc, Psych et gplots (Lê *et al.*, 2008 ; Wickham, 2016).

### **3. Résultats**

#### **3.1. Profile en composés volatils de tous les échantillons (*Smen/Dhan* et beurre frais)**

L'analyse des composés volatils par HS-GC-MS, a permis d'identifier 81 composés appartenant à différentes familles : Esters (20), cétones (20), aldéhydes (13), acides gras (12), alcools (7), furanes (3), terpènes (2), styrène (1) et autres composés (3), comme c'est illustré dans le tableau 21. Le tableau montre que les esters et les cétones étaient parmi les familles les plus abondantes dans tous les échantillons.

Tableau 21. Composés organique volatils identifiés dans les différents échantillons collectés de *Smen/Dhan* par HS-GC-SM

Famille	Composés	<sup>a</sup> Odeur	Formule chimique	MM (g/mol)	Ion (m/z)	IR calcule (AT)	IR Littérature
Alcools	Ethanol	Sucré	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> O	46,07	46	937	925-955
	2-Pentanol*	Balsamique	C <sub>5</sub> H <sub>12</sub> O	88,15	45	1133	1081-1153
	3-Méthylbutanol	Fermenté, fruité, âcre	C <sub>5</sub> H <sub>12</sub> O	88,148	70	1225	1180-1230
	Pentanol	Fuité	C <sub>5</sub> H <sub>12</sub> O	88,15		1270	1241-1271
	2-Heptanol	Herbe	C <sub>7</sub> H <sub>16</sub> O	116,2	83	1335	1280-1344
	Phénylméthanol	Florale, rose, phénolique	C <sub>7</sub> H <sub>8</sub> O	108,14	60	1898	1821-1909
	Phényléthanol	Miel, sucré	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> O	122,16	79	1942	1859-1947
Aldéhydes	Butanal	Âcre	C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O	72,11	72	859	855-911
	Méthylbutanal	Malt	C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> O	86,13	58	905	884-924
	Hexanal	Gazon, suif, graisse	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O	100,16	56	1077	1062-1111
	2-pentenal	Amande, malt, âcre	C <sub>5</sub> H <sub>8</sub> O	84,12	84	1130	1043-1145
	heptanal	Graisse, agrumes, rance	C <sub>7</sub> H <sub>14</sub> O	114,19	96	1182	1160-1196
	4-heptenal	Biscuit, crème	C <sub>7</sub> H <sub>12</sub> O	112,17	68	1238	1216-1267
	Octanal	Graisse, savon, citron,	C <sub>8</sub> H <sub>16</sub> O	128,21	84	1283	1273-1306
	2-Heptenal	vert	C <sub>7</sub> H <sub>12</sub> O	112,17	83	1314	1287-1340
	Nonanal	Gras, agrumes, rance	C <sub>9</sub> H <sub>18</sub> O	142,24	96	1389	1375-1409
	2-Octenal	Gras, agrumes, rance	C <sub>8</sub> H <sub>14</sub> O	126,2	70	1432	1392-1466
	Heptadienal	Vert noix, gras	C <sub>7</sub> H <sub>10</sub> O	110,15	81	1514	1451-1522
	Benzaldehyde	Noix, graisse	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O	106,12	105	1536	1488-1529
	2-Nonenal	Amande, sucre brulé	C <sub>9</sub> H <sub>16</sub> O	140,22	83	1548	1497-1582
		Iris, graisse, concombre					

*Chapitre IV. Identification des composés volatils par espace de tête- chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (HS-GC/MS)*

Esters	Ethyl acétate	Ananas	C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>	60,05	70	869	856-917
	Ethyl propanoate	Fruité, vineux	C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> O <sub>2</sub>	130,18	102	944	910-977
	Méthyl butanoate	Fruité, vineux	C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> O <sub>2</sub>	88,105	102	989	943-1008
	Ethyl butanoate	Ether, fruité, sucré	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub>	116,16	88	1030	1010-1071
	Isopropyle butanoate	Doux, fruité	C <sub>7</sub> H <sub>14</sub> O <sub>2</sub>	130,18	71	1035	
	Ethyl-2-méthylbutanoate*	Piquant, fruité	C <sub>7</sub> H <sub>14</sub> O <sub>2</sub>	130,18	102	1045	1015-1073
	Ethyl 3-méthylbutanoate	Doux, fruité	C <sub>7</sub> H <sub>14</sub> O <sub>2</sub>	130,18	85	1063	1041-1114
	Méthylbutyl_ acétate	Doux, fruité	C <sub>7</sub> H <sub>14</sub> O <sub>2</sub>	130,18	70	1130	1112-1143
	Ethyl-2-Butenoate*	Fruitée	C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>2</sub>	114,14	99	1165	
	Pentan-2-yl butanoate		C <sub>9</sub> H <sub>18</sub> O <sub>2</sub>	158,24	71	1211	1214-1260
	Butyl butanoate		C <sub>8</sub> H <sub>16</sub> O <sub>2</sub>	144,21	101	1214	1183-1243
	Ethyl_hexanoate		C <sub>8</sub> H <sub>16</sub> O <sub>2</sub>	144,21	88	1232	1222-1258
	Méthylethyl hexanoate	Pelure de pomme, fruit	C <sub>9</sub> H <sub>18</sub> O <sub>2</sub>	158,24	158	1232	1223-1236
	Méthylbutyl 2-méthylpropanoate*		C <sub>9</sub> H <sub>18</sub> O <sub>2</sub>	158,24	70	1263	1183-1234
	Héptyle acétate	Fleur	C <sub>9</sub> H <sub>18</sub> O <sub>2</sub>	158,24	98	1372	1360-1401
	Heptan-2-yl butanoate*		C <sub>11</sub> H <sub>22</sub> O <sub>2</sub>	186,29	115	1398	1388-1401
	Isopropyl_octanoate		C <sub>11</sub> H <sub>22</sub> O <sub>2</sub>	186,29	84	1446	1419-1471
Ethyl octanoate	Fruité, vineux	C <sub>10</sub> H <sub>20</sub> O <sub>2</sub>	172,26	88	1446	1428-1466	
Ethyl decanoate	Fruité, vineux	C <sub>12</sub> H <sub>24</sub> O <sub>2</sub>	200,32	101	1636	1595-1678	
Phényléthyle acétate		C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub>	164,2	104	1812	1775-1862	
Acides gras	Acide hexanoïque	Fruité, gras, acide	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub>	116,16	60	1846	1810-1860
	Acide butanoïque	Acide, beurre	C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>	88,11	60	1623	1596-1653
	Acide acétique	Aigre	C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	60,05	60	1475	1403-1479
	Acide formique	Âcre	CH <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	46,025	46	1534	1470-1533
	Acide heptanoïque	Rancissement	C <sub>7</sub> H <sub>14</sub> O <sub>2</sub>	130,18	87	1951	1915-1997
	Acide octanoïque	Grasse, rance, caprique	C <sub>8</sub> H <sub>16</sub> O <sub>2</sub>	144,21	60	2059	2024-2067
	Acide nonanoïque	Gras	C <sub>9</sub> H <sub>18</sub> O <sub>2</sub>	158,24	129	2169	2128-2202
	Acide propanoïque	Piquant, rance, soja	C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>	74,08	74	1555	1486-1560
	Acide pentanoïque	Sucré	C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> O <sub>2</sub>	60	60	1739	1685-1770
	Acide décanoïque	Rance, gras	C <sub>10</sub> H <sub>20</sub> O <sub>2</sub>	60	60	2275	2231-2316
	Acide méthylpropanoïque		C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>	73	73	1577	1547-1588
Acide 3-méthylbutanoïque	Vert, phénolique	C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> O <sub>2</sub>	60	60	1670	1647-1686	
Furanes	Éthylfurane		C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O	96.13	81	939	1219-1249

**Chapitre IV. Identification des composés volatils par espace de tête- chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (HS-GC/MS)**

Furanes	Pentylfurane	Haricot vert, beurre	C <sub>9</sub> H <sub>14</sub> O	138,21	81	1228	1282
	Trans-2-(2-Pentényl) furane		C <sub>9</sub> H <sub>12</sub> O	136,19	107	1296	1005-1067
Cétones	Methylpentanone	Menthe	C <sub>8</sub> H <sub>16</sub> O	128,21	100	1011	1005-1067
	Tetrahydro-6-methyl-2H-Pyran-2-one		C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>2</sub>	114,14	70	1786	1751-1830
	3,5-Octadien-2-one						
	Undecanone	Géranium, métal	C <sub>8</sub> H <sub>12</sub> O	124,18	124	1573	1524-1610
	3,4-dimethyl-2,5-furandione	Orange, frais, vert	C <sub>11</sub> H <sub>22</sub> O	170,29	58	1595	1570-1628
	Acetone		C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	126,11	126	1729	1680-1764
	Butanone		C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>	88,11	58	810	809-842
	Diacetyl		C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O	88,11	72	887	893-943
	Pentanone	Beurre	C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub>	86,09	86	976	951-999
	Hexanone	Ether, fruit	C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> O	86,13	71	985	845-980
	Heptanone	Ether, raisin	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O	100,16	100	1075	1069-1116
	5-Hepten-2-one	Savon	C <sub>7</sub> H <sub>14</sub> O	114,19	114	1180	1178-1190
	Methylheptan-3-one*	Métal	C <sub>7</sub> H <sub>12</sub> O	112,17	112	1218	1249
	Acetoin		C <sub>8</sub> H <sub>16</sub> O	128,21		1262	
	Octanone	Beurre, crème	C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>	88,11	88	1278	1265-1287
	Hydroxypropanone	Herbe, beurre, résine	C <sub>8</sub> H <sub>16</sub> O	128,21	128	1279	1265-1309
	1-hydroxy-2-butanone		C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub>	74,08	74	1295	1266-1326
	Nonanone		C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>	88,11	57	1373	1351-1399
	8-Nonen-2-one	Lait chaud, savon, vert	C <sub>9</sub> H <sub>18</sub> O	142,24	58	1384	1374-1403
5-ethyl-dihydro-2(3H)-uranone		Cuite	C <sub>9</sub> H <sub>16</sub> O	140,22	111	1457	1473-1494
			C <sub>8</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub>	140,18	85	1695	1661-1745
Terpènes	α-Pinene	Pin, térébenthine	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	136,23	136	1010	1000-1077
	Limonene	Citron, orange	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	136,23	136	1186	
	β-Phellandrene	Menthe, térébenthine	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	136,23	79	1900	1190-1220
Autres	Disulfure de diméthyle	Oignon, chou, putride	C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> S <sub>2</sub>	94,2	94	1062	1036-1094
	Diméthylsulfone	Soufre, brûlé	C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub> S	94,14	93	1196	1895-1912
Styrène	Styrène	Balsamique, essence	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub>	104,15	93	1248	1299-1293

\*Provisoirement identifié

**MM** : masse molaire

**IR** : Indice de rétention

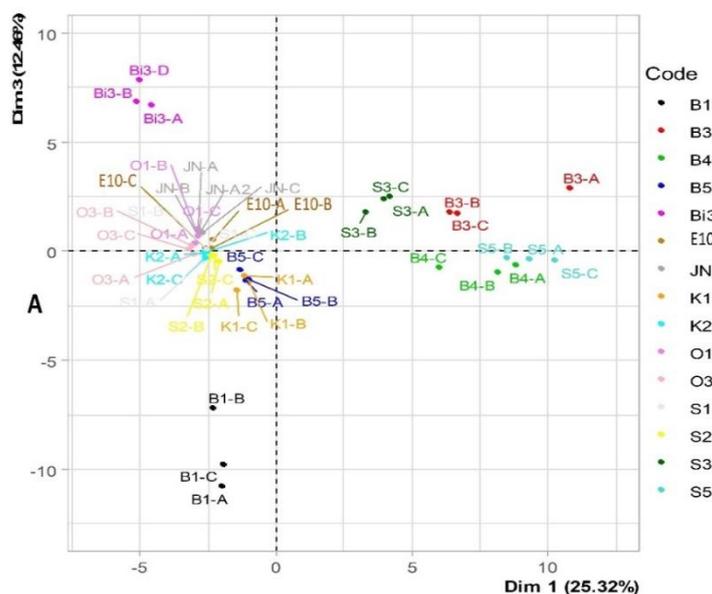
<sup>a</sup>Descripteur de l'odeur associé aux composés volatils sur la base des données Flavornet : <http://www.flavornet.org/flavornet.html>

## 3.2. Analyse statistique des données obtenues sur les 15 échantillons de *Smen* collectés

### 3.2.1. Analyse en composantes principales des données

Une Analyse en composantes principales (ACP) a été effectuée pour déterminer les différences entre les profils des composés volatils de chaque échantillon. Les principales différences sont illustrées dans la figure 43. La projection des échantillons de *Smen* collectés, sur les trois premiers axes de l'ACP, a montré que la première composante (CP1) avec 25,32% de la variabilité, séparait les échantillons S3, B3, B4 et S5 apparaissaient sur la droite des échantillons B5, Jn, E10, O3, S1, S2, K1 et K2 apparaissaient sur la gauche. La CP1 est positivement associée à la plupart des composés volatils notamment : les esters (n=14, ex. Acétate d'héptyle, acétate d'éthyle, hexanoate d'éthyle), les cétones (n = 12, ex. diacétyl, hexanone, acétone), les alcools (n = 4 éthanol, 2 pentanol, 2 héptanol, phénylméthanol) et les styrènes. Tandis que : le butanal, l'hexanal, le limonène, l'acide butanoïque, le 3,4-diméthyl-2,5-furandione, le tétrahydro-6-méthyl-2H-Pyran-2-one et l'éthylfuran, sont négativement associés à la CP1.

La CP3 représentait 15,5% de la variabilité et séparait l'échantillon Bi3 qui est situé dans le quadrant supérieur gauche de l'échantillon B1 situé dans le quadrant inférieur gauche. La CP3 est liée positivement à certains composés qui sont liées à l'échantillon Bi3 : aldéhydes (n=8, ex. heptadienal, 2 hexanal, butanal, hexanal), Cétones (n=5, ex. hydroxypropanone, 3,5-Octadien-2-one, acétoïne). D'un autre coté l'échantillon B1 contient significativement plus de : Octanal, benzaldéhyde, methylbutanal, Butanoate de butyle, acide butanoïque, acide propanoïque, acide méthylbutanoïque, éthylfuran, trans-2-Pentenyl furane, pentylfuran, 5-ethylhydro-2(3H)-furanone, Limonène.



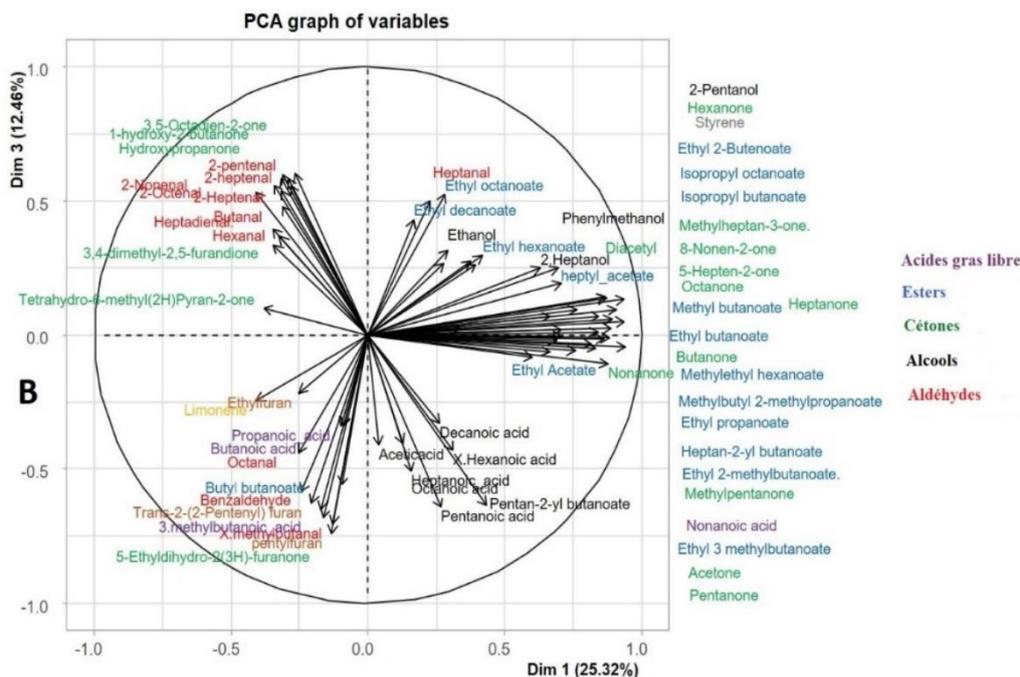


Figure 43. Cartes des facteurs individuels (A) et variables (B) de l'analyse en composantes principales de 81 composés aromatiques volatils, des 15 échantillons collectés de *Smen/Dhan*.

### 3.2.2. Classification hiérarchique des données sous forme d'une carte thermique

Une classification hiérarchique des composés volatils identifiés a été effectuée sous forme d'une carte thermique, afin d'appréhender leur abondance dans chaque échantillon. En se basant sur la distribution de l'abondance des composés volatils, 5 différents groupes pourraient être se différencier :

**Le groupe I.** Regroupait 25 composés principalement des cétones (n=12, ex. pentanone, diacétyle, hexanone), esters (n=11, ex. butanoate d'éthyle, acétate d'éthyle, butanoate de méthyle), un alcool (2 pentanol) et un acide gras (acide nonanoïque). Ces composés sont plus abondants dans les échantillons B3, S5 et B4, tandis que 12 composés ont été trouvés à des abondances élevées dans l'échantillon S3 : 3 méthylbutanoate d'éthyle, 2 pentanol, héptanone, butanoate d'éthyle, 5-Hepten-2-one, méthylpentanone, nonanone, diacétyle, pentanone, 2-méthylbutanoate d'éthyle, acide nonanoïque, méthylheptan-3-one, acétate d'éthyle.

**Le groupe II.** Rassemblait 9 composés, parmi lesquels 3 composés ont été trouvés à des abondances élevées dans l'échantillon B3 ; méthylbutyle-2-méthylpropanoate, styrène, acétate d'héptyle. Les autres 6 composés étaient abondants dans l'échantillon B3 ainsi que l'échantillon S3, ces composés correspondent aux : 3 alcools (phénylméthanol, 2-éptanol, éthanol) et 3 esters éthylique (hexanoate d'éthyle, octanoate d'éthyle, décanoate d'éthyle).

**Le groupe III.** Associait 13 composés volatils à des abondances élevées dans l'échantillon Bi3, ils consistent aux : 9 aldéhydes : heptadienal, 2-nonénal, 2-hepténal, 2-pentenal, 4-hepténal, 2-octénal, hexanal, butanal, heptanal ainsi que 4 cétones : hydroxypropanone, 1-hydroxy-2-butanone, 3,5-Octadien-2-one, 3,4-diméthyl-2,5-furandione.

**Le groupe IV.** Rassemblait 18 composés qui étaient très abondants dans l'échantillon B1, ils correspondent à sept acides gras : acide acétique, acide hexanoïque, acide octanoïque, acide décanoïque, acide heptanoïque, acide pentanoïque ; quatre aldéhydes : méthylbutanal, octanal, benzaldéhyde, nonenal ; deux esters : pentan-2-yl butanoate, butanoate de butyle ; trois furanes : pentylfurane, trans-2,2-pentényl furane, éthylfurane ; une cétone : 5-éthyl-2,3-dihydro-2,3H-furanone et un alcool : pentanol. Les mêmes acides gras à l'exception de l'acide pentanoïque étaient également abondants dans l'échantillon Bi3 tandis que l'éthylfurane, le nonenal, l'acide formique et le pentanol ont été trouvés également à des abondances très élevées dans les deux échantillons : Bi3 et B1.

**Le groupe V.** Regroupait 16 composés appartenant à différentes familles : cétones, esters, alcools, acides gras, terpènes et autres. Dans ce groupe, l'échantillon K1 est associé à un nombre important de composés : acétate de méthylbutyle, phényléthanol, 3 méthylbutanol, acide 3 méthylbutanoïque, acide propanoïque, acide méthylpropanoïque, phényléthyl acétate, diméthylsulfone, undécanone.

L'acétoïne est liée aux échantillons K2, B4 et O3. D'un autre côté, l'échantillon O3 est associé aux : diméthylsulfone, phényléthyl acétate, undécanone, tétrahydro-6-méthyl-2H-Pyran-2-one, tandis que l'échantillon O1 est associé à la diméthylsulfone, phényléthyl acétate et l'échantillon Jn est associé à l'undécanone, tétrahydro-6-méthyl-2H-Pyran-2-one.

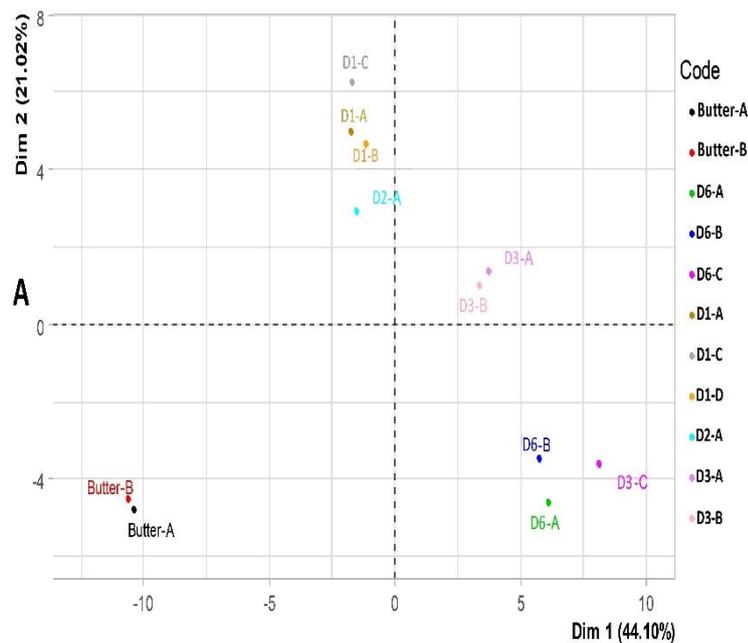
Les terpènes ( $\beta$ -phellandrène,  $\alpha$ -pinène, limonène) ont été trouvés à des abondances élevées dans l'échantillon B5. Le limonène est également abondant dans les échantillons O3, E10 et S2 tandis que son abondance était plus faible dans les échantillons E10 et S2.

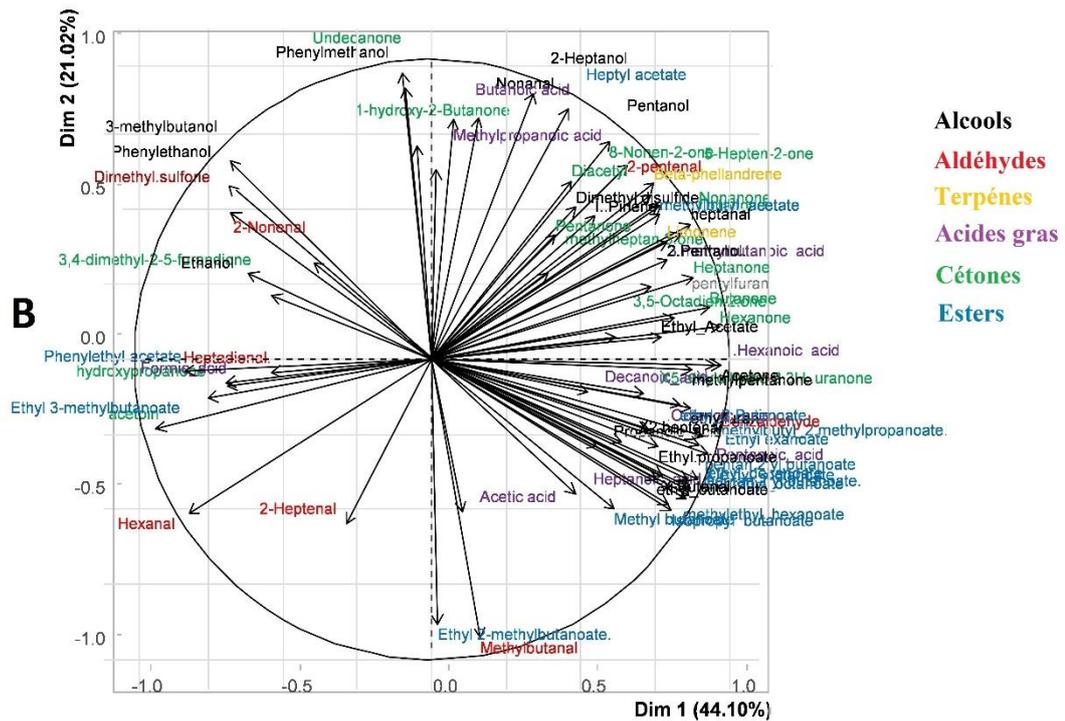


L'analyse en composantes principales a montré que les deux premières composantes qui représentaient 44,10% et 21,02% de la variabilité totale, séparaient les échantillons selon leur temps de maturation du jour 0 (beurre frais) à gauche aux 180 jours (D6) à droite. Les échantillons D3 et D6 sont groupés ensemble et situés dans les deux quadrants droits, tandis que les échantillons D1 et D2 sont situés dans le quadrant moyen supérieur. L'échantillon de beurre forme un groupe séparé de tous les échantillons, il est situé dans le quadrant inférieur gauche.

Les échantillons qui ont un temps de maturation de 90 et 180 jours (D3, D6) sont associés à la plupart des composés volatils, notamment les esters (n = 16 ex. acétate de méthylbutyle, acétate d'éthyle, butanoate de méthyle), cétones (n=15, ex. diacétyl, octanone, acétone) et d'autres composés tels que : alcools (n=2, ex. 2 pentanol, pentanol), aldéhydes (n=5, ex. butanal, benzaldéhyde, heptanal), acides gras (n=6, ex. acide heptanoïque, acide hexanoïque, acide décanoïque), furanes (n=2, éthylfurane, pentylfurane), et terpènes (n=3, ex.  $\alpha$ -pinène,  $\beta$ -phénlandrène, limonène).

La CP2 est associée négativement avec les échantillons D1 et D2, ces derniers sont associés uniquement à certains alcools : méthylbutanol, phényléthanol, éthanol ; aux aldéhydes : heptadienal, 2-nonéal ; aux esters : acétate de phényléthyle, 3-méthylbutanoate d'éthyle ; acides gras : acide formique ; cétones : diméthyle-2,5-furandione, hydroxypropanone, acétoïne et diméthyle sulfone. D'autre part, l'échantillon de beurre est lié uniquement aux : heptanal, méthylbutanal, l'éthyl-2 méthylbutanoate et l'acide acétique.





**Figure 45.** Cartes des facteurs individuels (A) et variables (B) de l'analyse en composantes principales de 81 composés aromatiques volatils identifiés au cours la maturation de *Smen/Dhan*. Les 2 premières dimensions expliquent 68,47% de la variabilité totale.

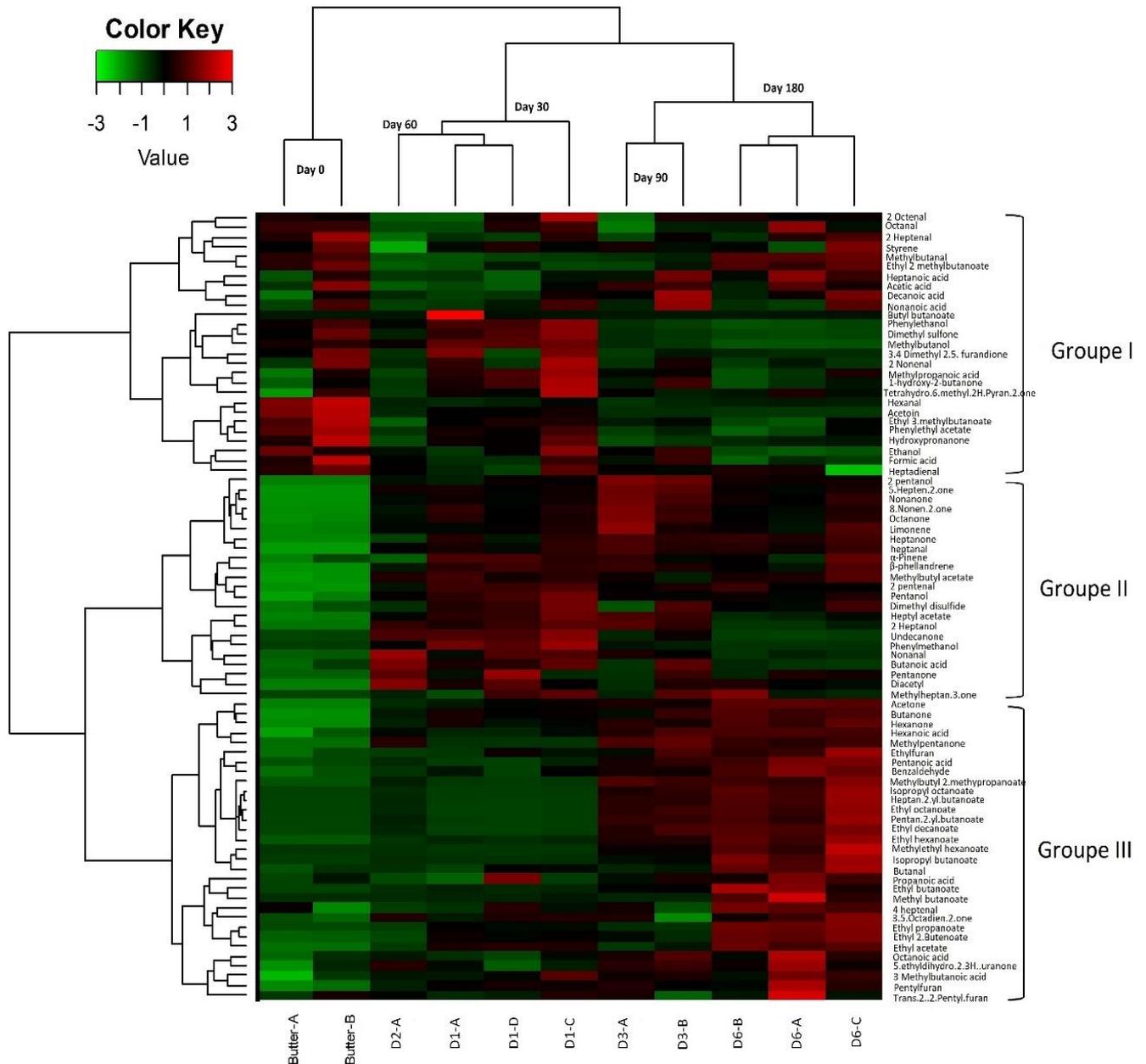
### 3.3.2. Classification hiérarchique des données sous forme d'une carte thermique

Afin d'étudier la dynamique des composés volatils au cours les différents temps de la maturation, une classification hiérarchique sous forme d'une carte thermique a été réalisée en présentant les 81 composés volatils identifiés. Nous avons pu identifier 3 différents groupes. Le **groupe I** de 27 composés contenait principalement 7 aldéhydes (ex. octénal, 2-hepténal, hexanal), 6 acides gras (ex. acide heptanoïque, acide décanoïque, acide acétique), 5 Cétones (ex. hydroxypropanone, acétoïne, 1-hydroxy-2-butanone), 4 esters (2-méthylbutanoate d'éthyle, butanoate de butyle, acétate de phényléthyle), 3 alcools (phényléthanol, 3-méthylbutanol, éthanol) et un sulfone. Certains aldéhydes (2-octénal, octanal, 2-hepténal, hexanal, heptadienal) sont trouvés à des abondances élevées dans l'échantillon de beurre, après ils diminuaient progressivement entre le premier et le troisième mois de la maturation cependant, leurs abondances augmentaient plus tard au sixième mois de la maturation avec l'augmentation de l'abondance de certains composés: méthylbutanal, éthyl-2 méthylbutanoate, butylbutanoate, acide heptanoïque, acide acétique, acide nonanoïque, styrène alors que, une légère diminution de l'abondance de l'acétoïne, hydroxypropanone, acétate de phényléthyle, éthanol et de l'acide formique a été constatée à la fin de la maturation comparant à celui de l'échantillon de beurre.

Le premier mois de la maturation (D1), était caractérisé par des abondances élevées en certains composés, principalement des cétones, ex. 1-hydroxy-2-butanone, acétoïne, hydroxypropanone ; des esters, ex. butanoate de butyle, 3-méthylbutanoate, acétate de phényléthyle ; aldéhydes, ex. heptadiénal, hexanal, 2-nonénal, et alcools, ex. éthanol, phényléthanol, 3-méthylbutanol.

**Le groupe II** rassemblait 23 composés, principalement des cétones, ex. 5-hepten-2-one, nonanone, 8-nonen-2-one, octanone, leurs abondances a augmenté à partir le premier mois de la maturation, et continuait d'augmenter légèrement jusqu'à la fin de la maturation (jour = 180). La même tendance a été observée pour le 2-pentanol, limonène, heptanal,  $\alpha$ -pinène,  $\beta$ -phellandrène, acétate de méthylbutyle. Entre 30 et 60 jours de la maturation, certains composés présentaient des abondances les plus élevées : pentanone, diacetyl, méthylheptan-3-one, pentanol, 2-héptanol, nonanal, 2-heptanal, acide butanoïque, acétate d'héptyle, disulfure de diméthyle, ces derniers diminuaient légèrement entre 90 et 180 jours de la maturation du *Smen*.

**Le groupe III** rassemblait 31 composés, avec des abondances significativement élevées à la fin de la maturation : 14 esters (ex. octanoate d'isopropyle, octanoate d'éthyle, hexanoate de méthyle), 6 cétones (ex. acétone, butanone, hexanone), 5 acides gras (ex. acide hexanoïque, acide pentanoïque, acide propanoïque), 3 aldéhydes (ex. benzaldéhyde, butanal, 4 hepténal), 3 furanes (ex. éthylfurane, pentylfurane, trans-2,2-pentylfurane).



**Figure 46.** Représentation de la carte thermique de la dynamique des composés volatils au cours de la maturation de *Smen*. Le regroupement hiérarchique a été effectué en utilisant la liaison de Ward et la distance euclidienne. La couleur passe du rouge au vert indique les abondances les plus élevées aux ceux les plus faibles.

### 3.3.3. Recherche des corrélations entre les composés volatils et le microbiote autochtone de *Smen*

Pour mieux comprendre la nature de la relation entre les composés volatils et la diversité microbienne (chap. III), une corrélation de Spearman a été effectuée entre les deux paramètres ; les profils des composés volatils et les données métabarcoding dans lesquelles le seuil d'abondance relative a été fixé à  $> 0,5\%$  (Figure 47).

Différents profils pourraient être se différenciés, 9 espèces présentaient une forte corrélation négative ( $r > 0,7$ ) avec la production des esters : *L. helveticus* (n = 9), *G. candidum* (n = 12), *Saccharomyces paradoxus* (n = 12), *K. marxianus* (n = 10), *Saprochaete gigas* (n = 9), *Y. lipolytica* (n = 11), *C. lusitaniae* (n = 4), *K. lactis* (n = 4), *T. delbrueckii* (n = 10), tandis que des profils opposés ont été observés pour *L. garvieae* (n = 14), *S. salivarius* (n = 11), *Wickerhamiella versatilis* (n = 8), *Moniliella sp.* (n = 12). En revanche, *Y. lipolytica* et *T. delbrueckii* ont montré une forte corrélation avec l'acétate de phényléthyle ( $r > 0,8$ ).

En se concentrant sur les fortes corrélations, 3 espèces ont présenté des corrélations positives et fortes avec la production de certains esters ( $r > 0,9$ ), *Moniliella sp.* était liée à la production de l'hexanoate d'éthyle, hexanoate de méthyle, butanoate d'éthyle, octanoate d'isopropyle, 2-méthylpropanoate de méthylbutyle, pentan-2-yl-butanoate, isopropyle butanoate, décanoate d'éthyle, octanoate d'éthyle, heptan-2-yl-butanoate alors que *L. garvieae* était liée à la production de butanoate d'éthyle, butanoate d'isopropyle, acétate d'éthyle, hexanoate d'éthyle, 2-buténoate, butanoate de méthyle, hexanoate de méthyle, pentan-2-yl-butanoate, et *S. salivarius* était liée avec la production 2-Buténoate d'éthyle, butanoate d'éthyle, hexanoate d'éthyle, 2-méthylpropanoate de méthylbutyle, hexanoate de méthyl éthyle, pentan-2-yl-butanoate, acétate d'éthyle.

*Moniliella sp.* et *W. versatilis* sont les seules espèces présentant des fortes corrélations positives avec la production des acides gras, ex. acide octanoïque, acide pentanoïque, acide hexanoïque, par contre d'autres espèces ont montré des fortes corrélations négatives avec les mêmes acides gras : *L. helveticus*, *G. candidum*, *W. pararugosa*, *S. paradoxus*, *S. gigas*, *Y. lipolytica*, *T. delbrueckii*, d'un autre côté, *K. lactis* et *C. lusitaniae* ont montré des corrélations négatives avec l'acide hexanoïque et l'acide octanoïque respectivement.

La production d'acétoïne était associée à différentes espèces : *L. helveticus*, *G. candidum*, *K. marxianus*, *S. gigas*, *Y. lipolytica*, *T. delbrueckii*.

La production de 2-pentanol était liée fortement à *S. salivarius* ( $r=0,96$ ), *Moniliella sp.* ( $r=0,8$ ) et *W. versatilis* (0,88), tandis qu'une forte corrélation négative a été observée entre la production de 2-pentanol et la plupart des espèces: *G. candidum*, *W. pararugosa*, *S. paradoxus*, *K. marxianus*, *S. gigas*, *Y. lipolytica*, *K. lactis*, *T. delbrueckii*. En revanche, la diméthylsulfone a montré un profil opposé avec certaines espèces ; des corrélations positives ont été notées pour *L. helveticus*, *K. marxianus*, *Y. lipolytica*, *C. lusitaniae*, *T. delbrueckii*, alors que d'autres négatives ont été observées pour : *L. garvieae* et *S. salivarius*. Une forte corrélation négative a été notée pour la production de benzaldéhyde et d'heptanal pour 4 espèces : *S. paradoxus*, *K. marxianus*, *Y. lipolytica*, *T. delbrueckii*. Par contre des corrélations positives ont été observées



#### **4. Discussion**

*Smen/Dhan* est un produit très apprécié par les consommateurs pour ses caractéristiques gustatives uniques. Ce produit est le résultat de la dégradation de la matière grasse qui est catalysée par les enzymes endogènes et microbiennes, la lipolyse est considérée comme l'une des voies chimiques la plus importante entraînant la modification organoleptique et rhéologique, au cours de la maturation du *Smen* (Sarhir *et al.*, 2020).

La maturation de *Smen* est caractérisée par la production des composés aromatiques, en lui contribuant son caractère typique. L'identification des composés volatils par HS-GC-MS nous a permis d'identifier 81 composés appartenant à différentes familles, ces derniers ont été déjà identifiés et publiés dans d'autres travaux sur le *Smen* Marocain (Iradukunda *et al.*, 2018 ; Sarhir *et al.*, 2020). La lipolyse entraîne la formation des acides gras libres qui pourraient directement, contribuer à la saveur caractéristique du produit, et également servir comme précurseurs d'autres réactions cataboliques, conduisant à la production des composés aromatiques. Ces réactions, sont principalement catalysées par la flore autochtone ou bien par les enzymes endogènes du lait, cependant les lipases endogènes ont une importance mineure dans le processus de la lipolyse, car ils peuvent être inhiber par les conditions acides ainsi que les teneurs élevés en sel (Collins, *et al.*, 2003 ; Iradukunda *et al.*, 2018). Il a été précédemment démontré que les espèces isolées dans la présente étude : Les entérocoques (ex. *E. faecalis* et *E. durans*), les lactobacilles (ex. *L. paracasei*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus*) et les levures (ex. *C. zeylanoides*, *G. candidum*, *M. dehoogii*, *W. pararugosa*) possèdent des activités lipasique et estérasiques ainsi, grâce à la lipolyse du lait et à la conversion des acides gras libres en d'autres composés, ils contribuent probablement à la maturation de *Smen* pendant la conservation (ex. acides gras à chaîne courte, les méthylcétones et les thioesters) (Boutrou et Gueguen ; 2005 ; Oliszewski *et al.*, 2007 ; Serio *et al.*, 2010 ; da Rosa *et al.*, 2014 ; Garcia-Cano *et al.*, 2019 ; Sakpuntoon *et al.*, 2020).

Les résultats trouvés dans la présente étude montrent que la famille des esters est parmi les familles les plus abondantes dans les échantillons de *Smen*, ainsi au cours de sa maturation, ils sont généralement plus abondants dans les échantillons qui ont un temps de maturation variant entre 1 mois et 2 ans. De plus, trois esters éthyliques ont été trouvés en abondance élevée à la fin de la maturation : acétate d'éthyle, butanoate d'éthyle et hexanoate d'éthyle. Généralement, les esters éthyliques se forment après la période de la maturation et contribuent à des notes agréables, sucrées, florales et fruitées (Sarhir *et al.*, 2020). Les esters peuvent se former par rééquilibrage chimique ou par réaction enzymatique, lorsque les acides réagissent avec les alcools issus de la fermentation du lactose ou d'alcoololyse, dans lequel les esters se

forment par réaction d'alcools et acylglycérols ou alcools et acyl-CoA dérivés du métabolisme des acides gras, en général l'alcoololyse est considéré comme le majeur mécanisme de la biosynthèse des esters par les bactéries lactiques et les levures dans les produits laitiers (Collins *et al.*, 2003 ; Liu *et al.*, 2004 ; Irradukinda *et al.*, 2018). En général l'estérification est catalysée par les estérases ainsi que les lipases. L'estérase est souvent rencontrée dans les espèces impliquées dans l'affinage des fromages (Collins *et al.*, 2003). Des corrélations positives ont été observées avec la production des esters et certaines espèces : *L. helveticus*, *L. garvieae*, *S. salivarius subsp. thermophilus*, *Moniliella sp.*, *W. versatilis*, toutes ces espèces sont déjà connues par leurs activités estérasiques (Collins *et al.*, 2003, Fernandez *et al.*, 2010, Kalantsopoulos *et al.*, 1990, Higuchi *et al.*, 1991). Deux espèces présentaient des corrélations positives avec la production de phényléthyl acétate : *Y. lipolytica* et *T. delbrueckii*, ce dernier est le résultat de la condensation d'acide acétique et de l'alcool phénythylique, il se caractérise par un agréable arôme de rose (Białecka-Florjanczyk *et al.*, 2011).

Dans cette étude, un nombre important de cétones a été également détectés (20 composés) dans les différents échantillons de *Smen/Dhan*. Nos résultats sont différents à ceux trouvés par Irradukunda *et al.*, 2018 et Sarhir *et al.*, 2020, qui ont détecté seulement 4 à 8 cétones comme odeur active dans le *Smen* marocain. Nos résultats montrent que la plupart des cétones identifiées dans cette étude sont des méthyles cétones (acétone, pentanone, héptanone, etc...). Ces derniers ont été déjà détectés dans la majorité des produits laitiers et contribués à un attribut positif, notamment dans les fromages (Collins *et al.*, 2003). Une étude sur le *Ghee* Iranien, a reporté que les méthylcétones sont à l'origine de sa saveur, car leur seuil olfactif est 10 fois plus fort que les autres cétones. Des études antérieures ont rapporté que le taux de méthylcétones, augmente durant la maturation des fromages, cette augmentation est liée à l'activité lipolytique (lipases ou estérases) de la flore autochtone, en général ces derniers se forment suite à la décomposition des  $\beta$ -cétoacides soit par processus thermique ou des activités enzymatiques (Collins *et al.*, 2003 ; Bergamini *et al.*, 2010, Erfani *et al.*, 2020). Au cours la maturation de notre échantillon préparé, l'abondance des cétones augmentaient progressivement à partir du premier mois jusqu'à la fin de la maturation, le premier mois était caractérisé par l'abondance de l'hydroxypropanone, 1-hydroxy-2-butanone, et l'acétoïne, ce dernier présentait des corrélations positives avec certaines espèces : *G. candidum*, *L. helveticus*, *K. marxianus*, *Y. lipolytica* and *T. delbrueckii*, des études antérieures ont montré que l'acétoïne pourrait être produit par la réduction du diacétyle via la diacétyle réductase, ou par la conversion du lactose, du pyruvate ou du citrate par les bactéries lactiques (Sarhir *et al.*, 2020).

*Moniliella sp.*, présentait des corrélations positives avec la production de diacétyle et avec l'acétone. Le diacétyle est l'un des principaux odorants dans certains types de fromages, il est également associé à des notes de beurre, généralement il est produit par les bactéries lactiques, notamment par les espèces du genre *lactococcus* (Bergamini *et al.*, 2010).

Les espèces de *Moniliella* sont hautement lipolytiques et peuvent produire des composés aromatiques tels que la  $\gamma$ -décylactone et d'autres  $\gamma$ -lactones et lactones (Laufenberg *et al.*, 2004) ou des odeurs fruitées ou de type ester (Dakin et Stolk, 1968), il serait intéressant d'étudier profondément son impact sur les profils volatils de *Smen*. En revanche les caractéristiques de *Moniliella sp.* n'ont pas encore été étudiés, les résultats obtenus doivent être confirmés par des études plus approfondies validant et rassurant leur rôle fonctionnel.

Concernant le profil des composés volatils de *Smen*, il est généralement considéré jusqu'à présent que les acides gras à courtes chaînes sont les principaux contributeurs à son profil aromatique. En addition, d'autres composés pourraient être contribuer et comprendrait certaines méthylcétones et esters en particulier les esters éthyliques (Iradukunda *et al.*, 2018).

Les résultats de la présente étude montrent que la nature des composés volatils dépend largement au degré de la lipolyse du produit ainsi que à l'origine du lait utilisé pour sa préparation, et à la nature de la flore autochtone présente dans le produit. Une lipolyse intensive pourrait influencer l'odeur de *Smen* et provoquerait le rancissement du produit, nous remarquons que l'échantillons B1 qui a un temps de maturation supérieur à 10 ans, est lié à de nombreux acides gras : acide acétique, acide hexanoïque, acide octanoïque, acide décanoïque, acide heptanoïque et acide pentanoïque. Ces composés sont caractérisés par de fortes notes odorantes et généralement sont décrits par des notes d'odeur grasse, beurrée rance, fromage-moisi, et savonneuse. Concernant l'échantillon préparé, à la fin de la maturation (D6 : 6 mois) certains acides gras ont été trouvés à des abondances élevées : acide hexanoïque, acide propanoïque, acide octanoïque, acide 3-méthylbutanoïque, tous ces composés ont été déjà considérés comme le principal odorant de *Smen* Marocain (El Marrakchi *et al.*, 1986 ; Tantaoui-Elaraki et El Marrakchi, 1987 ; Benkerroum et Tamime, 2004).

En général, les lipides présents dans les aliments peuvent subir une dégradation oxydative ou hydrolytique. Les acides gras polyinsaturés sont particulièrement sujets aux réactions d'oxydation, ce qui conduit à la formation de divers aldéhydes à chaîne droite qui sont fortement aromatisés et entraînent des défauts d'arôme appelé rancissement oxydatif. Les aldéhydes peuvent également être formés suite à la désamination des acides aminés, ou suite au métabolisme microbien (collins *et al.*, 2003). Nous avons noté une forte présence des aldéhydes dans le profil aromatique de *Smen/Dhan* où 13 aldéhydes ont été identifiés, notre résultat est

différent à celui reporté par Sarhir *et al.*, (2020), où le Benzaldéhyde était le seul aldéhyde détecté dans le profil aromatique du *Smen* marocain. Selon la bibliographie la plupart des aldéhydes identifiés dans cette étude sont issus de l'oxydation des acides gras insaturés, ex. nonanal, butanal, hexanal (Collins *et al.*, 2003). Une étude sur le développement d'odeur au cours du stockage du beurre et de l'huile de beurre, a montré que certains aldéhydes (hexanal, 2-pentanal, heptanal, 2-octenal, 2-nonenal) augmentaient durant le stockage, et la formation de ces composés est liée à la diminution de la concentration de l'acide linoléique (Magda *et al.*, 1995). La même observation a été notée durant la maturation de *Smen*, l'abondance de certains aldéhydes a augmenté à la fin de la maturation. L'échantillon B1 a été associé à un nombre très important d'aldéhydes, notamment ceux de chaîne droite issue de l'oxydation de acides gras insaturés, ces derniers sont responsables de défavorables notes d'odeur au produit, semblable à l'herbe verte et du savon (Collins *et al.*, 2003). Le benzaldéhyde qui est lié aux attributs positifs dans certains produits laitiers tels que le yaourt et les fromages (odeur d'amande, sucre brûlé) a été identifié durant la maturation de *Smen*, son abondance a augmenté à partir le 3<sup>ème</sup> mois de la maturation, et était élevée au 6<sup>ème</sup> mois. Ce composé est produit suite à une réaction de méthylglyoxal avec un aminoacide. Des corrélations positives ont été notées entre la production de benzaldéhyde et avec *S. salivarius ssp thermophilus*, *Moniliella sp.*, *L. garvieae*, *W. versatilis*, ces microorganismes peuvent être liés à sa production. En effet les aldéhydes formés peuvent généralement être déshydrogénée, ou hydrogénée à leurs alcools ou acides organiques correspondants (Smit *et al.*, 2005), aussi bien que, les alcools peuvent être produits selon différentes voies, tels que le métabolisme du lactose, la réduction des méthylcétones, le métabolisme des acides aminés et la dégradation des acides gras insaturés (Iradukunda *et al.*, 2018). En général, les alcools ont été déjà identifiés dans plusieurs types de fromages, beurre et *Smen* (Nursten, 1997 ; Bergamini *et al.*, 2010 ; Liu *et al.*, 2012 ; Iradukunda *et al.*, 2018 ; Sarhir *et al.*, 2020), ils sont considérés comme les principaux composés dans certains fromages de brebis, alors que l'éthanol s'est révélé quantitativement le plus important. Les alcools contribuent à des notes fruitées, sucrés et ajoutent des attributs positifs aux produits laitiers. Nous avons pu identifier 7 alcools que leurs abondances variaient en fonction du temps de la maturation. L'éthanol, phényléthanol et le 3-méthyl butanol ont été à des abondances élevées dans l'échantillon de beurre. Ces derniers diminuaient progressivement après 30 jours de la maturation du *smen*. L'éthanol et le 3-méthyl butanol ont été identifiés comme les alcools les plus importants dans les fromages de brebis, ils peuvent également être produit à partir d'alanine ou la leucine respectivement, via la dégradation de Strecker (conversion des acides aminés en aldéhyde), l'éthanol peut se former également suite de la fermentation directe du

lactose ou du citrate (Bergamini *et al.*, 2010). Le 2-pentanol et le 2-héptanol, ont été également identifiés au cours la maturation de *Smen* ou leurs abondances étaient élevées au premier et au troisième mois de la maturation respectivement, ces derniers peuvent se former suite à la réduction enzymatique des méthyl cétones, cette action est associée à l'activité lipolytique des microorganismes. La dynamique des alcools diminuait en fonction le temps de la maturation, cela pourra être expliqué à la conversion d'alcools à d'autres composés.

Les terpènes ont été également détectés dans les échantillons de *Smen*, leurs abondances augmentaient dès le premier mois de la maturation ( $\alpha$ -pinène,  $\beta$ -phellandrène et Limonène). Les terpènes ont une origine végétale et ils ne sont pas un produit de métabolisme des microorganismes, ils peuvent être apporter par le lait selon l'alimentation des bétails (Bugaud *et al.*, 2001), ces derniers ont été identifiés dans le *Smen* marocain ainsi dans plusieurs variétés des fromages de fermes (Iradukunda *et al.*, 2018 ; Sarhir *et al.*, 2020).

En général, la nature des composés volatils, est fortement lié à la nature de la flore autochtone et leurs activités enzymatique ainsi que le degré de lipolyse du produit, tous ces facteurs contribuent largement à la typicité des produits.

## **5. Conclusion**

L'analyse des composés volatils réalisée à différents stades de la maturation et pour différents échantillons collectés a mis en évidence l'identification de 81 composés volatils appartenant à différentes familles. La nature et l'abondance de ces composés étaient fortement liées avec le temps de la maturation et au degré de la lipolyse ainsi qu'à la nature du microbiote autochtone. L'analyse des corrélations a permis de conclure que certaines espèces de BL et de levures jouaient un rôle prépondérant dans la maturation et la production d'arome de *Smen*. Des expériences ultérieures seront nécessaires pour la confirmation de ces corrélations et ainsi bien, déterminer le rôle fonctionnel des espèces d'importance dans cette maturation, ceci nous permettra prochainement la sélection de starters spécifiques qui pourront accélérer le temps de la maturation de *Smen* et l'obtention d'un produit final avec des caractéristiques sensorielles et organoleptiques recherchées.

***Conclusion générale et  
perspectives***

Cette thèse avait deux objectifs pour l'étude du beurre traditionnel *Smen/Dhan*. Le premier concerne un travail d'enquête sur le terrain : afin de connaître l'usage du *Smen/Dhan* dans la culture locale et le savoir-faire associé à sa production. Le deuxième est l'étude expérimentale sur deux types d'échantillons de *Smen* (collecté et préparé): relative à l'évaluation de la qualité hygiénique et de certains paramètres physicochimiques; à l'identification de la diversité et la dynamique microbienne impliquée dans la maturation du *Smen*, par l'application des techniques de culture dépendantes et indépendantes; et enfin, à l'étude du profil aromatique par GC-MS et ressortir les corrélations entre la diversité microbienne et les composés volatils identifiés.

*Smen/Dhan* est un produit du terroir important dans les familles de l'Est et le Sud algérien. Son appellation ethnique, son savoir-faire transmis à travers les générations et les méthodes de sa préparation uniquement au sein des ménages, sont spécifiques à chaque région d'origine. Ce produit est utilisé pour l'autoconsommation comme il peut être commercialisé de façon informelle pour fournir un revenu aux ménages. Ce produit n'a pas encore reçu de label de qualité et d'aliment d'origine protégée.

L'étude de la biodiversité et la dynamique microbienne de ce produit, nous a permis d'identifier des micro-organismes clés dans la fabrication et la maturation de *Smen* et de constituer une collection de souches qui pourraient avoir des activités enzymatiques importantes. L'analyse de la corrélation a montré que certaines espèces ont pu être corrélées à de nombreux composés d'arômes et sont responsables du développement des caractéristiques organoleptiques fins du smen. La sélection de starters spécifiques pour la production du *Smen* à l'échelle industrielle serait intéressante afin de contrôler le processus de la fermentation et par conséquent, ses attributs de qualité.

Au terme de ce travail de thèse, plusieurs perspectives pourraient être envisagées afin d'approfondir les connaissances sur le microbiote et son interaction avec la matrice du *Smen/Dhan*, les sujets d'intérêts seront :

- Promouvoir la production de *Smen* et participer potentiellement à l'organisation des coopératives des producteurs locaux, pour mieux contrôler les processus de fermentation et les attributs de sa qualité.
- La poursuite de l'étude de la dynamique des BL et des levures dans un nombre plus élevé d'échantillons et avec des différentes méthodes de préparation ;
- Evaluer le potentiel technologique des espèces identifiées, pour des futures applications dans l'industrie alimentaire.

# *Références bibliographiques*

## A

1. **Abd El Gawad, I. A., Abd El Fatah, A. M., & Al Rubayyi, K. A. (2010).** Identification and characterization of dominant lactic acid bacteria isolated from traditional rayeb milk in Egypt. *Journal of American Science*, 6(10), 728-735.
2. **Abdelbasset, M., & Djamila, K. (2008).** Antimicrobial activity of autochthonous lactic acid bacteria isolated from Algerian traditional fermented milk "Raïb". *African Journal of Biotechnology*, 7(16).
3. **Abd-El-Malek, Y. (1978).** Traditional Egyptian dairy fermentations, in: Stantan, W.R., Da Silva, E.J. (Eds.), *Global Impact of Food Microbiology (GIAM). State of the Art: GIAM and its Relevance to Development in Developing Countries*. University of Malaya Press., Kuala Lumpur, pp. 198–208.
4. **Abd-El Salam, M., & Benkerroum, N. (2006).** North African brined cheeses. *Brine Cheese*, 139-187.
5. **Abekhti, A. (2015).** Évaluation et valorisation du procédé traditionnel de conservation des dattes « Btana » et détermination de leur biodiversité microbienne. Thèse de doctorat en Microbiologie Fondamentale et Appliquée. Oran, Algérie.
6. **Abekhti, A., Taminiau, B., Kihal, M., & Daube, G. (2015).** Metagenomic analysis of the bacterial microbiota linked to the traditional Algerian date product "Btana". *Annals of microbiology*, 65(4), 2415-2424.
7. **Accolas, J. P., Deffontaines, J. P., & Aubin, F. (1978).** Le lait et les produits laitiers en République Populaire de Mongolie. *Le lait*, 58(575-576), 278-286.
8. **Afsaneh, M. A., Hosseinpour, M. A., & Mina, A. (2016).** Investigation of quality, advantages and disadvantages, processing and characteristics of ghee: a review paper. *Indian J. Fundam. Applied Life Science*, 6(S2), 1-7.
9. **Ahmad, N., & Saleem, M. (2020).** Characterisation of cow and buffalo ghee using fluorescence spectroscopy. *International Journal of Dairy Technology*, 73(1), 191-201.
10. **Akgül, H.İ., Şengül, M., Ürkek, B., & Kotan, T. E. (2021).** Determination of physicochemical and microbiological properties and fatty acid composition of butter produced in Trabzon, Turkey. *Acta Scientiarum. Technology*, 43, e48905-e48905.
11. **Alganesh, T.G., Yetenayet, T. (2017).** Traditional butter and ghee production, processing and handling in Ethiopia *African Journal of Food Science*, 11 (4), 95-105.
12. **Ambardar, S., Gupta, R., Trakroo, D., Lal, R., & Vakhlu, J. (2016).** High throughput sequencing: an overview of sequencing chemistry. *Indian journal of microbiology*, 56(4), 394-404.
13. **Ambardar, S., Gupta, R., Trakroo, D., Lal, R., & Vakhlu, J. (2016).** High throughput sequencing: an overview of sequencing chemistry. *Indian journal of microbiology*, 56(4), 394-404.
14. **Antoine, J. M. (2011).** Les ferments lactiques et les laits fermentés: nature et effets. *Phytothérapie*, 9(2), 76-81.
15. **AOAC. (1975).** Official methods of analysis, twelfth ed. D.C: Association of official analytical chemists, Washington.

- 16. Atlan, D., Béal, C., Champomier-Verges, M. C., Chapot-Chartier, M. P., Chouayekh, H., Coccagn-Bousquet, M., & Deghorain, M. (2008).** Métabolisme et ingénierie métabolique. *Bactéries Lactiques De la génétique aux ferments*, 271-509.
- 17. Atlas, R. M. (2004).** Handbook of microbiological media. CRC press.
- 18. Audebert, C., Hot, D., Lemoine, Y., & Caboche, S. (2014).** Le séquençage haut-débit-Vers un diagnostic basé sur la séquence complète du génome de l'agent infectieux. *Médecine/sciences*, 30(12), 1144-1151.

## B

- 19. Baird-Parker, A. C. (1962).** An improved diagnostic and selective medium for isolating coagulase positive staphylococci. *Journal of applied bacteriology*, 25(1), 12-19.
- 20. Bao, Q., Yu, J., Liu, W., Qing, M., Wang, W., Chen, X., ... & Zhang, H. (2012).** Predominant lactic acid bacteria in traditional fermented yak milk products in the Sichuan Province of China. *Dairy science & technology*, 92(3), 309-319.
- 21. Behera, S. S., Ray, R. C., & Zdolec, N. (2018).** *Lactobacillus plantarum* with functional properties: an approach to increase safety and shelf-life of fermented foods. *BioMed Research International*, 2018.
- 22. Bekhouche, F., Merabti, R., & Bailly, J. D. (2013).** "Lemzeiet": Traditional couscous manufacture from fermented wheat (Algeria): process and technological and nutritional quality. *African Journal of Food Science and Technology*, 4(8), 167-175.
- 23. Belyagoubi, L., Abdelouahid, D.E. (2013).** Isolation, identification and antibacterial activity of lactic acid bacteria from traditional algerian dairy products. *Advances in Food Sciences* 35, 82–90.
- 24. Ben Amor, K., Cornelieus, C., Mahjoub, A., & Thonart, P. (1998).** Identification de la flore lactique du lait fermenté traditionnel tunisien (Lben) et évaluation des composés aromatisants. *MHA (Sousse)*, 10(27), 31-36.
- 25. Ben Amor, K., Cornelieus, C., Mahjoub, A., & Thonart, P. (1998).** Identification de la flore lactique du lait fermenté traditionnel tunisien (Lben) et évaluation des composés aromatisants. *MHA (Sousse)*, 10(27), 31-36.
- 26. Bendimerad, N., Kihal, M., & Berthier, F. (2012).** Isolation, identification, and technological characterization of wild leuconostocs and lactococci for traditional Raib type milk fermentation. *Dairy science & technology*, 92(3), 249-264.
- 27. Benjamini, Y., & Hochberg, Y. (1995).** Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the Royal statistical society: series B (Methodological)*, 57(1), 289-300.
- 28. Benkerroum, N., & Tamime, A. Y. (2004).** Technology transfer of some Moroccan traditional dairy products (lben, jben and smen) to small industrial scale. *Food Microbiology*, 21(4), 399-413.
- 29. Bensalah, F., Labtar, A., Delorme, C., & Renault, P. (2011).** Occurrence, isolation and DNA identification of streptococcus thermophilus involved in algerian traditional butter'Smen'. *African Journal of Biotechnology* 75 (10), 17251-17257.

- 30. Bergamini, C. V., Wolf, I. V., Perotti, M. C., & Zalazar, C. A. (2010).** Characterisation of biochemical changes during ripening in Argentinean sheep cheeses. *Small Ruminant Research*, 94(1-3), 79-89.
- 31. Berhe, T., Seifu, E., & Kurtu, M. Y. (2013).** Physicochemical properties of butter made from camel milk. *International Dairy Journal*, 31(2), 51-54.
- 32. Berthoud, H., Wüthrich, D., Bruggmann, R., Wechsler, D., Fröhlich-Wyder, M. T., & Irmeler, S. (2017).** Development of new methods for the quantitative detection and typing of *Lactobacillus parabuchneri* in dairy products. *International Dairy Journal*, 70, 65-71.
- 33. Bhalla, T. C. & Savitri (2016).** Yeasts in Fermented Foods and Beverages. In: *Fermented Foods, Part I: Biochemistry and Biotechnology*, 1-33.
- 34. Bialecka-Florjańczyk, E., Krzyczkowska, J., Stolarzewicz, I., & Kapturowska, A. (2012).** Synthesis of 2-phenylethyl acetate in the presence of *Yarrowia lipolytica* KKP 379 biomass. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 74(3-4), 241-245.
- 35. Blandino, A., Al-Aseeri, M. E., Pandiella, S. S., Cantero, D., & Webb, C. (2003).** Cereal-based fermented foods and beverages. *Food research international*, 36(6), 527-543.
- 36. Blottière, H. M., & Doré, J. (2016).** Impact des nouveaux outils de métagénomique sur notre connaissance du microbiote intestinal et de son rôle en santé humaine-Enjeux diagnostiques et thérapeutiques. *Médecine/sciences*, 32(11), 944-951.
- 37. Boonefoy, C., Guillet, F., Leyral G., Verne Bourdais, E. (2002).** *Microbiologie et qualité dans les industries agroalimentaires*, édition Doin, centre régional de documentation pédagogique d'aquitaine, France.
- 38. Boussekine, R., Merabti, R., Barkat, M., Becila, F. Z., Belhoula, N., Mounier, J., & Bekhouche, F. (2020).** Traditional Fermented Butter Smen/Dhan: Current Knowledge, Production and Consumption in Algeria. *Journal of Food Research*, 9(4).
- 39. Boutrou, R., & Guéguen, M. (2005).** Interests in *Geotrichum candidum* for cheese technology. *International journal of food microbiology*, 102(1), 1-20.
- 40. Branger, A. (2007).** *Microbiochimie et alimentation*. Educagri Editions.
- 41. Branger, A., Richer, M. M., & Roustel, S. (2007).** *Alimentation, sécurité et contrôles microbiologiques*. Educagri Editions.
- 42. Brittain, J. E., Heino, J., Friberg, N., Aroviita, J., Kahlert, M., Karjalainen, S. M., ... & Ylikörkkö, J. (2020).** Ecological correlates of riverine diatom and macroinvertebrate alpha and beta diversity across Arctic Fennoscandia. *Freshwater Biology*.
- 43. Bugaud, C., Buchin, S., Hauwuy, A., & Coulon, J. B. (2001).** Relationships between flavour and chemical composition of Abondance cheese derived from different types of pastures. *Le Lait*, 81(6), 757-773.
- 44. Burgain, J., Scher, J., Francius, G., Borges, F., Corgneau, M., Revol-Junelles, A. M., ... & Gaiani, C. (2014).** Lactic acid bacteria in dairy food: surface characterization and interactions with food matrix components. *Advances in colloid and interface science*, 213, 21-35.

## C

- 45. Čanak, I., Berkics, A., Bajcsi, N., Kovacs, M., Belak, A., Teparić, R., ... & Mrša, V. (2015).** Purification and characterization of a novel cold-active lipase from the yeast *Candida zeylanoides*. *Journal of molecular microbiology and biotechnology*, 25(6), 403-411.
- 46. Cao, Y., Fanning, S., Proos, S., Jordan, K., & Srikumar, S. (2017).** A review on the applications of next generation sequencing technologies as applied to food-related microbiome studies. *Frontiers in microbiology*, 8, 1829.
- 47. Caporaso, J. G., Kuczynski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F. D., Costello, E. K., ... & Knight, R. (2010).** QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature methods*, 7(5), 335-336.
- 48. Cardoso, P., Rigal, F., & Carvalho, J. C. (2015).** BAT–Biodiversity Assessment Tools, an R package for the measurement and estimation of alpha and beta taxon, phylogenetic and functional diversity. *Methods in Ecology and Evolution*, 6(2), 232-236.
- 49. Carraro, L., Maifreni, M., Bartolomeoli, I., Martino, M. E., Novelli, E., Frigo, F., ... & Cardazzo, B. (2011).** Comparison of culture-dependent and-independent methods for bacterial community monitoring during Montasio cheese manufacturing. *Research in microbiology*, 162(3), 231-239.
- 50. Castellani, F., Vitali, A., Bernardi, N., Marone, E., Grotta, L., & Martino, G. (2019).** Lipolytic volatile compounds in dairy products derived from cows fed with dried olive pomace. *European Food Research and Technology*, 245(1), 159-166.
- 51. Chaudhary, B. N., Vaghela, K. D., Mehta, B. M., Jain, A. K., Darji, V. B., & Aparnathi, K. D. (2019).** Development of a Rapid Qualitative Test Using Ferroin Dye for Detection of Rancid Ghee Mixed with Fresh Ghee. *Journal of Food Chemistry Nanotechnology*, 5(3), 49-55.
- 52. Chinnadurai, K., Kanwal, H. K., Tyagi, A. K., Stanton, C., & Ross, P. (2013).** High conjugated linoleic acid enriched ghee (clarified butter) increases the antioxidant and antiatherogenic potency in female Wistar rats. *Lipids in health and disease*, 12(1), 1-9.
- 53. Cocolin, L., & Ercolini, D. (2015).** Zooming into food-associated microbial consortia: a ‘cultural’ evolution. *Current Opinion in Food Science*, 2, 43-50.
- 54. Collection FAO : Alimentation humaine. (1995).** Le lait et les produits laitiers dans la nutrition humaine (Collection FAO : Alimentation et nutrition n°28) ISBN 92-5-203534-6
- 55. Collins, Y. F., McSweeney, P. L., & Wilkinson, M. G. (2003).** Lipolysis and free fatty acid catabolism in cheese: a review of current knowledge. *International Dairy Journal*, 13(11), 841-866.
- 56. Colombo, E., Franzetti, L., Frusca, M., & Scarpellini, M. (2010).** Phenotypic and genotypic characterization of lactic acid bacteria isolated from artisanal Italian goat cheese. *Journal of food protection*, 73(4), 657-662.
- 57. Corich, V., Mattiazzi, A., Soldati, E., Carraro, A., & Giacomini, A. (2005).** Sau-PCR, a novel amplification technique for genetic fingerprinting of microorganisms. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(10), 6401-6406.

## D

- 58. Dakin, J. C., & Stolk, A. C. (1968).** *Moniliella acetoabutans*: some further characteristics and industrial significance. *International Journal of Food Science & Technology*, 3(1), 49-53.
- 59. Dallé da Rosa, P., Mattanna, P., Carboni, D., Amorim, L., Richards, N., & Valente, P. (2014).** *Candida zeylanoides* as a new yeast model for lipid metabolism studies: effect of nitrogen sources on fatty acid accumulation. *Folia microbiologica*, 59(6), 477-484.
- 60. De Hoog, G. S. (1979).** Taxonomic Review of *Moniliella*, *Trichosporonoides* and *Hyalodendron*. *The Black Yeasts. II. Moniliella and Allied Genera. Studies in Mycology*, nineteenth ed. Centraalbureau Voor Schimmelcultures, Baarn.
- 61. Debbabi, H., Gliguem, H., & SALAH, A. (2018).** Effect of milk pre-treatmentS on chemical composition, and sensory quality of traditional fermented milk, raYeb. *Journal of New Sciences*, 56, 3653-3659.
- 62. Delavenne, E., Mounier, J., Déniel, F., Barbier, G., & Le Blay, G. (2012).** Biodiversity of antifungal lactic acid bacteria isolated from raw milk samples from cow, ewe and goat over one-year period. *International Journal of Food Microbiology*, 155(3), 185-190.
- 63. Derouiche, M. Aissaoui zitoune, W. Medjouj, N.H, & Zidoune, M.N. (2016).** Consommation de lait et de produits laitiers en milieu rural de Tebessa, Algérie. *Livestock Research for Rural Development*. 28-89.
- 64. Dhurvey, Y.R., Kawtikwar, P. S., & Sakarkar, D. M. (2012).** Evaluation of physicochemical properties of cow ghee before and after hydrogenation. *Evaluation*, 4(1), 185-189.
- 65. Diaz, M., Kellingray, L., Akinyemi, N., Adefiranye, O. O., Olaonipekun, A. B., Bayili, G. R., ... & Narbad, A. (2019).** Comparison of the microbial composition of African fermented foods using amplicon sequencing. *Scientific reports*, 9(1), 1-8.
- 66. Diop, M. B., Destain, J., Tine, E., & Thonart, P. (2010).** Les produits de la mer au Sénégal et le potentiel des bactéries lactiques et des bactériocines pour la conservation. *Base*.
- 67. Donkor, E. S., Aning, K. G., & Quaye, J. (2007).** Bacterial contaminations of informally marketed raw milk in Ghana. *Ghana Medical Journal*, 41(2).
- 68. Dortu, C., & Thonart, P. (2009).** Les bactériocines des bactéries lactiques: caractéristiques et intérêts pour la bioconservation des produits alimentaires. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*, 13(1), 143-154.

## E

- 69. El Marrakchi, A., Berrada, M., Chahboun, M., & Benbouhou, M. (1987).** Etude chimique du smen marocain. *Le Lait*, 66(2), 117-133.
- 70. El Marrakchi, A., Tantaoui-Elaraki, A., Hamama, A., & Grini, A. (1988).** La flore microbienne du smen marocain. II. Flores lipolytique et caséolytique. *Le Lait*, 68(3), 333-347.
- 71. El Marrakchi, A., Tantaoui-Elarraki, A., El Mane, A., & Tifrit, L. (1988).** La flore microbienne du smen marocain I. Flore naturelle et flore d'intérêt hygiénique. *Le Lait*, 68(2), 205-217.
- 72. El Sheikha, A. F., & Hu, D. M. (2020).** Molecular techniques reveal more secrets of fermented foods. *Critical reviews in food science and nutrition*, 60(1), 11-32.

**73. Erfani, S. H., Ghavami, M., Shoeibi, S., Zand-Moghaddam, A., & Rastegar, H. (2020).** Evaluation of fatty acids and volatile compounds in Iranian ghee by head space-solid phase microextraction coupled with gas chromatography/mass spectroscopy. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 22(1), 147-158.

**74. Escudié, F., Auer, L., Bernard, M., Mariadassou, M., Cauquil, L., Vidal, K., ... & Pascal, G. (2018).** FROGS: find, rapidly, OTUs with galaxy solution. *Bioinformatics*, 34(8), 1287-1294.

## F

**75. Faid, M., Larpent, J. P., Adrian, Y., Chabard, J. L., Tantaoui-elaraki, A., & MARRAKCHI, A. E. (1993).** Industrial scale production of Moroccan samn. *International Journal of Dairy Technology*, 46(1), 9-11.

**76. Falentin, H., Auer, L., Mariadassou, M., Pascal, G., Rué, O., Dugat-Bony, E., ... & Abraham, A. L. (2019).** Guide pratique à destination des biologistes, bioinformaticiens et statisticiens qui souhaitent s'initier aux analyses métabarcoding. *Cahiers des Techniques de l'INRA*, 2019(97), 1-23.

**77. Fernández, E., Alegría, Á., Delgado, S., & Mayo, B. (2010).** Phenotypic, genetic and technological characterization of *Lactococcus garvieae* strains isolated from a raw milk cheese. *International dairy journal*, 20(3), 142-148.

**78. Fessard, A. (2017).** Recherche de bactéries lactiques autochtones capables de mener la fermentation de fruits tropicaux avec une augmentation de l'activité antioxydante (Doctoral dissertation, Université de la Réunion).

**79. Fleet, G. H. (1990).** Yeasts in dairy products. *Journal of applied bacteriology*, 68(3), 199-211.

**80. Flores, M. V., Cuellas, A., & Voget, C. E. (1999).** The proteolytic system of the yeast *Kluyveromyces lactis*. *Yeast*, 15(14), 1437-1448.

**81. Fröhlich-Wyder, M. T., Guggisberg, D., Badertscher, R., Wechsler, D., Wittwer, A., & Irmeler, S. (2013).** The effect of *Lactobacillus buchneri* and *Lactobacillus parabuchneri* on the eye formation of semi-hard cheese. *International Dairy Journal*, 33(2), 120-128.

## G

**82. Gagaoua, M., & Boudechicha, H. R. (2018).** Ethnic meat products of the North African and Mediterranean countries: An overview. *Journal of Ethnic Foods*, 5(2), 83-98.

**83. Gandhi, K., Lal, D., (2018).** Potential of Herbal Nutraceuticals in Ghee: A Review. *Research & Reviews:Journal of Dairy Science and Technology*, 4, 1-5.

**84. Garcia, A., & Barbas, C. (2011).** Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS)-based metabolomics. In *Metabolic Profiling* (pp. 191-204). Humana Press.

**85. García-Cano, I., Rocha-Mendoza, D., Ortega-Anaya, J., Wang, K., Kosmerl, E., & Jiménez-Flores, R. (2019).** Lactic acid bacteria isolated from dairy products as potential producers of lipolytic, proteolytic and antibacterial proteins. *Applied microbiology and biotechnology*, 103(13), 5243-5257.

- 86. Gardini, F., Tofalo, R., Belletti, N., Iucci, L., Suzzi, G., Torriani, S., ... & Lanciotti, R. (2006).** Characterization of yeasts involved in the ripening of Pecorino Crotonese cheese. *Food Microbiology*, 23(7), 641-648.
- 87. Gemechu, A. T., & Tola, Y. B. (2017).** Traditional butter and ghee production, processing and handling in Ethiopia: A review. *African Journal of Food Science*, 11(4), 95-105.
- 88. Ghazi, F. (2014).** Identification des bactéries lactique par l'utilisation des techniques moléculaires (profils protéiques et génétiques) applicables dans le domaine de la taxonomie. Thèse de doctorat en Microbiologie Appliquée. Oran, Algérie.
- 89. Giraffa, G. (2004).** Studying the dynamics of microbial populations during food fermentation. *FEMS Microbiology Reviews*, 28(2), 251-260.
- 90. Giraffa, G., Carminati, D. (2008).** Molecular Techniques in Food Fermentation: Principles and Applications. In *Molecular Techniques in the Microbial Ecology of Fermented Foods* p. 280. Springer, New York.
- 91. Groenewald, M., Robert, V., & Smith, M. T. (2011).** The value of the D1/D2 and internal transcribed spacers (ITS) domains for the identification of yeast species belonging to the genus *Yamadazyma*. *Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, 26, 40.
- 92. Guessas, B., Adjoudj, F., Hadadji, M., Kihal, M., 2012.** Isolation and identification of lactic acid bacteria from Dhan, a traditional butter and their major technological traits. *World Applied Sciences Journal*, 17(4), 480-488.
- 93. Guinebretiere, M. H., & Nguyen-The, C. (2003).** Sources of *Bacillus cereus* contamination in a pasteurized zucchini puree processing line, differentiated by two PCR-based methods. *FEMS Microbiology Ecology*, 43(2), 207-215.
- 94. Guiraud J.P. (2003).** Microbiologie alimentaire. Dunod, Paris.
- 95. Guiraud, J.P. (1998).** Microbiologie des principaux produits alimentaires, Microbiologie alimentaire. Ed. Dunod, Paris.

## H

- 96. Hadidi, A., Levy, L., & Podleckis, E. V. (2017).** Polymerase chain reaction technology in plant pathology. In *Molecular methods in plant pathology* (pp. 167-187). CRC Press.
- 97. Hamama, A., 1997.** Improvements of the manufacture of traditional fermented products in Morocco: case of jben (moroccan traditional fresh cheese), in: Dirar, H.A. (Eds.), *Emerging Technology Series. Food Processing Technologies for Africa*. UNIDO, Vienna, pp. 85–102.
- 98. Hassan, A. N., & Frank, J. F. (2001).** Starter cultures and their use. In *Applied dairy microbiology*. CRC Press.
- 99. Higuchi, T., Aoki, T., & Uchida, K. (1991).** Esterase activity in soy sauce Moromi as a factor hydrolyzing flavor esters. *Journal of fermentation and bioengineering*, 71(3), 163-167.
- 100. Hughes, J. B., Hellmann, J. J., Ricketts, T. H., & Bohannon, B. J. (2001).** Counting the uncountable: statistical approaches to estimating microbial diversity. *Applied and environmental microbiology*, 67(10), 4399-4406.
- 101. Hutkins, R. W. (2008).** Microbiology and technology of fermented foods (Vol. 22). John Wiley & Sons.

## I

- 102. Idoui, T., & Karam, N. E. (2008).** Lactic acid bacteria from Jijel's traditional butter: Isolation, identification and major technological traits. *Grasas y Aceites*, 59(4), 361-367.
- 103. Illingworth, D., Patil, G. R., Tamime, Y (2009).** Anhydrous Milk Fat Manufacture and Fractionation. In *Dairy Fats and Related Products*.
- 104. Iradukunda, C., Aida, W. M. W., Ouafi, A. T., Barkouch, Y., & Boussaid, A. (2018).** Aroma profile of a traditionally fermented butter (smen). *The Journal of dairy research*, 85(1), 114.
- 105. Ismaili-Alaoui M.M. (1986).** Contribution à la connaissance du rôle du thym dans la maturation du Smen : etude de 3 techniques de conservation. Mémoire d'assistanat institut agronomique et veterinaire. Hasan II, Maroc.
- 106. ISO 4832:2006.** Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of coliforms -Colony-count technique.
- 107. ISO 4833:2003.** Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of microorganisms - Colony-count technique at 30 degrees C.
- 108. ISO 6888-1:1999.** Microbiology of food and animal feeding stuffs Horizontal method for the enumeration of coagulase-positive staphylococci (*Staphylococcus aureus* and other species) - Part 1: Technique using Baird-Parker agar medium.
- 109. ISO 7937:2004.** Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of *Clostridium perfringens* - Colony-count technique.

## J

- 110. Jackson, C. R., Randolph, K. C., Osborn, S. L., & Tyler, H. L. (2013).** Culture dependent and independent analysis of bacterial communities associated with commercial salad leaf vegetables. *BMC microbiology*, 13(1), 1-12.
- 111. Jerković, I., & Marijanović, Z. (2009).** A short review of headspace extraction and ultrasonic solvent extraction for honey volatiles fingerprinting. *Croatian journal of food science and technology*, 1(2), 28-34.

## K

- 112. Kacem, M., & Karam, N.E. (2006).** Physicochemical and microbiological study of "shmen", a traditional butter made from camel milk in the Sahara (Algeria): isolation and identification of lactic acid bacteria and yeasts. *Grasas y Aceites*, 57(2), 198-204.
- 113. Kalantzopoulos, G., Tsakalidou, E., & Manolopoulou, E. (1990).** Proteinase, peptidase and esterase activities of cell-free extracts from wild strains of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* isolated from traditional Greek yogurt. *Journal of dairy research*, 57(4), 593-601.
- 114. Khandelwal, P., Gaspar, F. B., Crespo, M. T. B., & Upendra, R. S. (2016).** Lactic Acid Bacteria, General Characteristics, Food Preservation and Health Benefits. In: *Fermented Foods, Part I: Biochemistry and Biotechnology*, 112-132.
- 115. Kim, B. R., Shin, J., Guevarra, R. B., Lee, J. H., Kim, D. W., Seol, K. H., ... & Isaacson, R. E. (2017).** Deciphering diversity indices for a better understanding of microbial communities. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27(12), 2089-2093.

**116. Kirazci, A., Javidipour, I., 2008.** Some chemical and microbiological properties of ghee produced in Eastern Anatolia. *International Journal of Dairy Technology* 61, 300–306.

**117. Klindworth, A., Pruesse, E., Schweer, T., Peplies, J., Quast, C., Horn, M., & Glöckner, F. O. (2013).** Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic acids research*, 41(1), e1-e1.

**118. Kurtzman, C. P., & Robnett, C. J. (1997).** Identification of clinically important ascomycetous yeasts based on nucleotide divergence in the 5'end of the large-subunit (26S) ribosomal DNA gene. *Journal of clinical microbiology*, 35(5), 1216-1223.

**119. Kwak, H. S., Ganesan, P., & Mijan, A. M. (2013).** Butter, ghee, and cream products. *Milk and Dairy Products in Human Nutrition: Production, Composition and Health*, 390-411.

## L

**120. Labtar, A., Larouci, S., Guermouche, A., & Bensalah, F. (2019).** Study on molecular identification of lactic acid bacteria from fermented milks and "Smen" (a traditional steppe butter) and their enzyme producing attributes. *South Asian Journal of Experimental Biology*, 9(3), 95-103.

**121. Lachenmeier, D. W. (2007).** Determination of volatile constituents in spirits using headspace trap technology. *Journal of Chromatography A*, 1145(1-2), 204-209

**122. Lacoste, C., Fabre, A., Pécheux, C., Lévy, N., Krahn, M., Malzac, P., ... & Bourgeois, P. (2017).** Le séquençage d'ADN à haut débit en pratique clinique. *Archives de Pédiatrie*, 24(4), 373-383.

**123. Laithier, C. (2012).** L'ouvrage « Microflore du lait cru—Vers une meilleure connaissance des écosystèmes microbiens du lait et de leurs facteurs de variation ». *Rencontres autour des recherches sur les ruminants*, (19).

**124. Lamb, P. D., Hunter, E., Pinnegar, J. K., Creer, S., Davies, R. G., & Taylor, M. I. (2019).** How quantitative is metabarcoding: A meta-analytical approach. *Molecular ecology*, 28(2), 420-430.

**125. Lamoril, J., Ameziane, N., Deybach, J. C., Bouizegarène, P., & Bogard, M. (2008).** Les techniques de séquençage de l'ADN : une révolution en marche. Première partie. *Immuno-analyse & Biologie Spécialisée*, 23(5), 260-279.

**126. Lancette, G.A., and R.W. Bennett. (2001).** Staphylococcus aureus and staphylococcal enterotoxins. In: Downes, F.P., and K. Ito (ed.). *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*, 4<sup>th</sup> edition. American Public Health Association (APHA). Washington, D.C. USA.

**127. Lapointe-Vignola, C. (2002).** Science et technologie du lait : transformation du lait. Presses inter Polytechnique.

**128. Laufenberg, G., Rosato, P., & Kunz, B. (2004).** Adding value to vegetable waste: Oil press cakes as substrates for microbial decalactone production. *European journal of lipid science and technology*, 106(4), 207-217.

- 129. Lê, S., Josse, J., & Husson, F. (2008).** FactoMineR: an R package for multivariate analysis. *Journal of statistical software*, 25(1), 1-18. Wickham, H., 2016. *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*, second Ed. Springer International Publishing, Berlin Lortal, S. (2015, June). Ferments et aliments: une longue histoire riche d'enseignements. In *Innovations Agronomiques* (p. np). Magda et al., 1995.
- 130. Leksir, C., & Chemmam, M. (2015).** Contribution à la caractérisation du klila, un fromage traditionnel de l'est de l'Algérie. *Livestock Research for Rural Development*, 27(5).
- 131. Leksir, C., Boudalia, S., Moujahed, N., & Chemmam, M. (2019).** Traditional dairy products in Algeria: case of Klila cheese. *Journal of Ethnic Foods*, 6(1), 1-14.
- 132. Leveau, J.Y. & Bouix, M. (1993).** Microbiologie industrielle : les microorganismes d'intérêt industriel. Tec & Doc, Lavoisier. Paris.
- 133. Liu, S. Q., Holland, R., & Crow, V. L. (2004).** Esters and their biosynthesis in fermented dairy products: a review. *International Dairy Journal*, 14(11), 923-945.
- 134. Lopandic, K., Zelger, S., Banzky, L. K., Eliskases-Lechner, F., & Prillinger, H. (2006).** Identification of yeasts associated with milk products using traditional and molecular techniques. *Food microbiology*, 23(4), 341-350.
- 135. Lortal, S. (2015).** Ferments et aliments : une longue histoire riche d'enseignements. In *Innovations Agronomiques*.
- 136. Lortal, S., El Mecherfi, K. E., Mariotti, F., Eutamène, H., Rul, F., Champomier-Vergès, M. C., & Savary-Auzeloux, I. (2020).** Aliments fermentés & bénéfiques santé : un défi pour la recherche. *Cahiers de Nutrition et de Diététique*, 55(3), 136-148.
- 137. Luquet, F. M., Corrieu, G., & Marteau, P. (2006).** Bactéries lactiques et probiotiques.
- M**
- 138. Madigan, M.T & Martinko, J.M. (2007).** Brock Biologie des micro-organismes. Pearson. Paris.
- 139. Mardis, E. R. (2008).** Next-generation DNA sequencing methods. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.*, 9, 387-402.
- 140. Mayo, B., Ammor, M. S., Delgado, S., & Alegría, A. (2010).** Fermented milk products. *Fermented foods and beverages of the world*, 1, 263-288.
- 141. McGregor, C. E., Lambert, C. A., Greyling, M. M., Louw, J. H., & Warnich, L. (2000).** A comparative assessment of DNA fingerprinting techniques (RAPD, ISSR, AFLP and SSR) in tetraploid potato (*Solanum tuberosum* L.) germplasm. *Euphytica*, 113(2), 135-144.
- 142. Merabti, R., Bekhouche, F., Chuat, V., Madec, M. N., Maillard, M. B., Bailly, S., ... & Valence, F. (2015).** A large diversity of lactic acid bacteria species is involved in the fermentation of wheat used for the manufacture of lemzeiet. *European Food Research and Technology*, 241(1), 137-149.
- 143. Meshref, A. M. S. (2010).** Microbiological quality and safety of cooking butter in Beni-Suef governorate-Egypt. *African Health Sciences*, 10(2).
- 144. Monnet, C., Latrille, E., Béal, C., & Corrieu, G. (2008).** Croissance et propriétés fonctionnelles des bactéries lactiques. In : *Bactéries lactiques : De la Génétique Aux Ferments*.

**145. Mortensen, B.K. (2011).** Anhydrous Milk Fat/Butter Oil and Ghee. In Encyclopedia of dairy sciences (2nd E d.), London, UK: Elsevier Ltd.

## N

**146. Nakayama, M., Hosoya, K., Shimizu-Imanishi, Y., Chibana, H., & Yaguchi, T. (2016).** Development of rapid identification and risk analysis of *Moniliella* spp. in acidic processed foods. *Biocontrol science*, 21(2), 73-80.

## O

**147. Ogier, J. C., & Serror, P. (2008).** Safety assessment of dairy microorganisms: the *Enterococcus* genus. *International journal of food microbiology*, 126(3), 291-301.

**148. Oliszewski, R., Medina, R. B., Gonzalez, S. N., & Chaia, A. B. P. (2007).** Esterase activities of indigenous lactic acid bacteria from Argentinean goats' milk and cheeses. *Food Chemistry*, 101(4), 1446-1450.

**149. Ongol, M. P., & Asano, K. (2009).** Main microorganisms involved in the fermentation of Ugandan ghee. *International journal of food microbiology*, 133(3), 286-291.

**150. Ouiddir, M. A-K. (2015).** Etude de l'activité antifongique des bactéries lactiques et de la biopréservation des aliments Thèse de doctorat en Microbiologie Fondamentale et Appliquée. Oran, Algérie.

**151. Owusu-Kwarteng, J., Akabanda, F., Nielsen, D. S., Tano-Debrah, K., Glover, R. L., & Jespersen, L. (2012).** Identification of lactic acid bacteria isolated during traditional fura processing in Ghana. *Food microbiology*, 32(1), 72-78.

**152. Ozcan, T., Akpınar-Bayazit, A., Yılmaz-Ersan, L., Cetin, K., & Delikanli, B. (2016).** Evaluation of fatty acid profile of Trabzon butter. *International Journal of Chemical Engineering and Applications*, 7(3), 190.

## P

**153. Papagianni, M. (2012).** Metabolic engineering of lactic acid bacteria for the production of industrially important compounds. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 3(4), e201210003.

**154. Paquot, C. (1979).** Standard methods for the analysis of oils, fats and derivatives, sixth ed. Pergamon, New York.

**155. Penland, M., Falentin, H., Parayre, S., Pawtowski, A., Maillard, M. B., Thierry, A., ... & Deutsch, S. M. (2021).** Linking Pélardon artisanal goat cheese microbial communities to aroma compounds during cheese-making and ripening. *International Journal of Food Microbiology*, 345, 109130.

**156. Pieniak, Z., Verbeke, W., Vanhonacker, F., Guerrero, L., & Hersleth, M. (2009).** Association between traditional food consumption and motives for food choice in six European countries. *Appetite*, 53(1), 101-108.

**157. Pogačić, T., Maillard, M. B., Leclerc, A., Hervé, C., Chuat, V., Yee, A. L., ... & Thierry, A. (2015).** A methodological approach to screen diverse cheese-related bacteria for their ability to produce aroma compounds. *Food microbiology*, 46, 145-153.

**158. Porter, T. M., & Brian Golding, G. (2011).** Are similarity-or phylogeny-based methods more appropriate for classifying internal transcribed spacer (ITS) metagenomic amplicons?. *New Phytologist*, 192(3), 775-782.

**159. Puniya, A. K. (Ed.). (2015).** Fermented milk and dairy products (Vol. 6). CRC Press.

## R

**160. Rai, A. K., Pandey, A., & Sahoo, D. (2019).** Biotechnological potential of yeasts in functional food industry. *Trends in Food Science & Technology*, 83, 129-137.

**161. Ray, P. R. (2019).** Technological and Biochemical Aspects of Ghee (Butter Oil). In *Engineering Practices for Milk Products* (pp. 83-109). Apple Academic Press.

**162. Reller, L. B., Weinstein, M. P., & Petti, C. A. (2007).** Detection and identification of microorganisms by gene amplification and sequencing. *Clinical infectious diseases*, 44(8), 1108-1114.

**163. Renault, P., Zagorec, M., & Champomier-Vergès, M. C. (2015).** Communautés microbiennes des aliments. In *Champomier-Vergès et Zagorec (Coord) : La métagénomique – Développements et futures applications*. Editions Quae. pp. 57-70.

**164. Rosa, C. A., Jindamorakot, S., Limtong, S., Nakase, T., Lachance, M. A., Fidalgo-Jimenez, A., ... & Morais, P. B. (2009).** Synonymy of the yeast genera *Moniliella* and *Trichosporonoides* and proposal of *Moniliella fonsecae* sp. nov. and five new species combinations. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 59(2), 425-429.

**165. Ruppert, K. M., Kline, R. J., & Rahman, M. S. (2019).** Past, present, and future perspectives of environmental DNA (eDNA) metabarcoding: A systematic review in methods, monitoring, and applications of global eDNA. *Global Ecology and Conservation*, 17, e00547.

## S

**166. Sacristán, N., González, L., Castro, J. M., Fresno, J. M., & Tornadijo, M. E. (2012).** Technological characterization of *Geotrichum candidum* strains isolated from a traditional Spanish goats' milk cheese. *Food microbiology*, 30(1), 260-266.

**167. Sakili, D., & Isoual, D. (2003).** Les bactéries lactiques dans l'élaboration du Smen marocain. *Académie d'Agriculture de France*.

**168. Sakpuntoon, V., Anghuan, J., Boontham, W., Khunnamwong, P., Boonmak, C., & Srisuk, N. (2020).** Grease Waste as a Reservoir of Lipase-Producing Yeast and Description of *Limtongella siamensis* gen. nov., sp. nov. *Microorganisms*, 8(1), 27.

**169. Samet-Bali, O., & Attia, H. (2012).** Characterization of typical Tunisian fermented milk, Rayeb. *African Journal of Biotechnology*, 11(25), 6744-6749.

**170. Samet-Bali, O., Ayadi, M. A., & Attia, H. (2009).** Traditional Tunisian butter: Physicochemical and microbial characteristics and storage stability of the oil fraction. *LWT-Food Science and Technology*, 42(4), 899-905.

**171. Samet-Bali, O., Felfoul, I., Lajnaf, R., Attia, H., & Ayadi, M. A. (2016).** Hygienic quality of "Rayeb", a traditional Tunisian fermented cow's milk. *International Food Research Journal*, 23(1), 366.

**172. Sarhir, S. T., Amanpour, A., Bouseta, A., & Selli, S. (2020).** Fingerprint of aroma-active compounds and odor activity values in a traditional Moroccan fermented butter "Smen" using GC-MS-Olfactometry. *Journal of Food Composition and Analysis*, 96, 103761.

**173. Sauer, M., Porro, D., Mattanovich, D., & Branduardi, P. (2008).** Microbial production of organic acids: expanding the markets. *Trends in biotechnology*, 26(2), 100-108.

- 174. Savadogo, A., & Traore, A. S. (2011).** La flore microbienne et les propriétés fonctionnelles des yaourts et laits fermentés. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 5(5), 2057-2075.
- 175. Schirmer, M., Ijaz, U. Z., D'Amore, R., Hall, N., Sloan, W. T., & Quince, C. (2015).** Insight into biases and sequencing errors for amplicon sequencing with the Illumina MiSeq platform. *Nucleic acids research*, 43(6), e37-e37.
- 176. Schmidt, V. S., Kaufmann, V., Kulozik, U., Scherer, S., & Wenning, M. (2012).** Microbial biodiversity, quality and shelf life of microfiltered and pasteurized extended shelf life (ESL) milk from Germany, Austria and Switzerland. *International journal of food microbiology*, 154(1-2), 1-9.
- 177. Schoustra, S. E., Kasase, C., Toarta, C., Kassen, R., & Poulain, A. J. (2013).** Microbial community structure of three traditional zambian fermented products: mabisi, chibwantu and munkoyo. *PloS one*, 8(5), e63948.
- 178. Sengenès, J. (2012).** Développement de méthodes de séquençage de seconde génération pour l'analyse des profils de méthylation de l'ADN (Doctoral dissertation, Université Pierre et Marie Curie-Paris VI).
- 179. Serio, A., Chaves-López, C., Paparella, A., & Suzzi, G. (2010).** Evaluation of metabolic activities of enterococci isolated from Pecorino Abruzzese cheese. *International Dairy Journal*, 20(7), 459-464.
- 180. Sessou, P., Keisam, S., Tuikhar, N., Gagara, M., Farougou, S., & Jeyaram, K. (2019).** High-Throughput Illumina MiSeq amplicon sequencing of yeast communities associated with indigenous dairy products from republics of benin and niger. *Frontiers in microbiology*, 10, 594.
- 181. Smith, C. A., Want, E. J., O'Maille, G., Abagyan, R., & Siuzdak, G. (2006).** XCMS: processing mass spectrometry data for metabolite profiling using nonlinear peak alignment, matching, and identification. *Analytical chemistry*, 78(3), 779-787.
- 182. Spencer, J. F., de Spencer, A. L. R.T. (2001).** Food microbiology protocols. Humana, New Jersey.
- 183. Sserunjogi, M. L., Abrahamsen, R. K., & Narvhus, J. (1998).** A review paper: current knowledge of ghee and related products. *International Dairy Journal*, 8(8), 677-688.
- 184. Stammers, M., Harris, J., Evans, G. M., Hayward, M. D., & Forster, J. W. (1995).** Use of random PCR (RAPD) technology to analyse phylogenetic relationships in the *Lolium/Festuca* complex. *Heredity*, 74(1), 19-27.
- 185. Suenaga, H. (2012).** Targeted metagenomics: a high-resolution metagenomics approach for specific gene clusters in complex microbial communities. *Environmental microbiology*, 14(1), 13-22.

## T

- 186. Tamang, J. P. (2010).** Diversity of fermented foods. In *Fermented foods and beverages of the world* (pp. 53-96). CRC Press.
- 187. Tamang, J. P., Holzapfel, W. H., Shin, D. H., & Felis, G. E. (2017).** Microbiology of ethnic fermented foods and alcoholic beverages of the world. *Frontiers in microbiology*, 8, 1377.

- 188. Tamang, J. P., Watanabe, K., & Holzapfel, W. H. (2016).** Review: diversity of microorganisms in global fermented foods and beverages. *Front Microbiol.*
- 189. Tamang, J., Thapa, N., Tamang, B., Rai, A., Chettri, R. (2015).** Microorganisms in Fermented Foods and Beverages, in: Tamang, J. (Eds.). *Health Benefits of Fermented Foods and Beverages.* CRC Press., New York, pp. 1–110.
- 190. Tamang, J.P., Kailasapathy, K. (2010).** *Fermented foods and beverages of the world.* CRC Press, Boca Raton, USA.
- 191. Tantaoui-Elaraki, A., & El Marrakchi, A. (1987).** Study of Moroccan dairy products: Iben and smen. *MIRCEN journal of applied microbiology and biotechnology*, 3(3), 211-220.
- 192. Thomas, C., Romain, J., & Gérard, B. (2008).** *Fondements physicochimiques de la technologie laitière.* Lavoisier.
- 193. Toju, H., Tanabe, A. S., Yamamoto, S., & Sato, H. (2012).** High-coverage ITS primers for the DNA-based identification of ascomycetes and basidiomycetes in environmental samples. *PloS one*, 7(7), e40863.
- 194. Triqui, R., & Guth, H. (2001).** Potent odorants in "Smen", a traditional fermented butter product. *European Food Research and Technology*, 212(3), 292-295.

## V

- 195. Valence-Bertel, F. (2015).** Diversité intraspécifique des microorganismes du lait : prise en compte et conservation. In 14<sup>ème</sup> journée de l'animation transversale "Glande Mammaire, Lait".
- 196. Valence-Bertel, F., & Thierry, A. (2015).** Les Ressources microbiennes au service de nos aliments : une richesse préservée et explorée dans le réseau CIRM. La diversité fonctionnelle explorée grâce au criblage à haut débit. *Innovations Agronomiques*, 44, 99-108.
- 197. Van Belkum, A. (1994).** DNA fingerprinting of medically important microorganisms by use of PCR. *Clinical Microbiology Reviews*, 7(2), 174-184.
- 198. Vaneechoutte, M. (1996).** DNA fingerprinting techniques for microorganisms. *Molecular biotechnology*, 6(2), 115-142.

## W

- 199. Wei, W., Hu, X., Hou, Z., Wang, Y., & Zhu, L. (2021).** Microbial community structure and diversity in different types of non-bovine milk. *Current Opinion in Food Science.*
- 200. Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. A., & Lane, D. J. (1991).** 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of bacteriology*, 173(2), 697-703.
- 201. Wolff, J.P. (1968).** *Manuel d'analyse des corps gras.* Azoulay, Paris
- 202. Wouters, J. T., Ayad, E. H., Hugenholtz, J., & Smit, G. (2002).** Microbes from raw milk for fermented dairy products. *International Dairy Journal*, 12(2-3), 91-109.

**203. Wu, L., Wen, C., Qin, Y., Yin, H., Tu, Q., Van Nostrand, J. D., ... & Zhou, J. (2015).** Phasing amplicon sequencing on Illumina Miseq for robust environmental microbial community analysis. *BMC microbiology*, 15(1), 1-12.

## **Z**

**204. Zagorec, M., Champomier-Verges, M. C., Renault, P., Valence-Bertel, F., Le Loir, Y., & Montel, M. C. (2012).** Ecosystèmes microbiens et préservation des aliments. In *Innovations Agronomiques* (Vol. 24, pp. 57-77). Editions INRA.

**205. Zakrzewski, M., Proietti, C., Ellis, J. J., Hasan, S., Brion, M. J., Berger, B., & Krause, L. (2017).** Calypso: a user-friendly web-server for mining and visualizing microbiome–environment interactions. *Bioinformatics*, 33(5), 782-783.

**206. Zampieri, A., Babbucci, M., Carraro, L., Milan, M., Fasolato, L., & Cardazzo, B. (2021).** Combining Culture-Dependent and Culture-Independent Methods: New Methodology Insight on the *Vibrio* Community of *Ruditapes philippinarum*. *Foods*, 10(6), 1271.

*Publications et  
communications  
scientifiques*

## Liste des publications et de communications

### Publications internationales

**Article 1. Rania Boussekine**, Ryma Merabti, Malika Barkat, Fatima-Zohra Becila, Nora Belhoula, Jérôme Mounier & Farida Bekhouche., Traditional Fermented Butter *Smen/Dhan* : Current Knowledge, Production and Consumption in Algeria. Journal of Food Research. 9, 4–20. <https://doi.org/10.5539/jfr.v9n4p71>

**Article 2. Rania Boussekine**, Farida Bekhouche, Stella Debaets, Anne Thierry, Marie-Bernadette Maillard, Hélène Falentin, Audrey Pawtowski, Malika Barkat, Monika Coton, Jérôme Mounier. Deciphering the microbiota and volatile profiles of Algerian *Smen*, a traditional fermented butter. *Microorganisms*. 10(4), 736.

### Communications affichées

**BOUSSEKINE Rania**, BEKHOUCHE Farida, DEBAETS Stella, COTON Monika et MOUNIER Jérôme. «Etude du potentiel technologique et sécuritaire des bactéries lactiques isolées à partir des produits laitiers fermentés ». Journées Nationales de Biotechnologie Microbienne (JNTBM). Blida le 17, 18 Mai 2022 ;

**BOUSSEKINE Rania**, BEKHOUCHE Farida, DEBAETS Stella, COTON Monika et MOUNIER Jérôme. «Hygienic quality evaluation and microbial diversity during “*Smen/Dhan*” manufacturing». 1<sup>er</sup> Séminaire national sur: la Valorisation des Ressources Naturelles et de l’environnement (VRNE 2022). Webinaire, Sétif le 30 Mars 2022 ;

**Rania BOUSSEKINE**, Chizarura V-A, Merabti R, Becila F-Z, Barkat M, Bekhouche F. « Qualité hygiénique du *Dhan* consommé dans les ménages algériens ». Séminaire International de la Nutrition (SAN). Constantine le 28, 29, 30 Novembre 2017 ;

**BOUSSEKINE Rania**, MERABTI Ryma, BELHOULA Nora, BECILA Fatima Zohra, BARKAT Malika et BEKHOUCHE Farida « enquête sur la préparation du *Smen/Dhan* traditionnel auprès d’un échantillon de la wilaya de Sétif ». Séminaire International des sciences Alimentaires (SISA). Constantine le 15,16 Octobre 2018 ;

**BOUSSEKINE Rania**, MERABTI Ryma, BARKAT Malika et BEKHOUCHE Farida «Microbiological and physicochemical characterization of traditional Butter “*Dhan*” ». Séminaire International des sciences Alimentaires (SISA). Constantine le 15,16 Octobre 2018.

## Traditional Fermented Butter *Smen/Dhan*: Current Knowledge, Production and Consumption in Algeria

Rania Boussekine<sup>1</sup>, Ryma Merabti<sup>1,2</sup>, Malika Barkat<sup>1</sup>, Fatima-Zohra Becila<sup>1</sup>, Nora Belhoula<sup>1</sup>, J'éôme Mounier<sup>3</sup> & Farida Bekhouche<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Université Frères Mentouri Constantine 1, Laboratoire de la Biotechnologies et des Qualités des aliments (BIOQUAL), Institut de la Nutrition, de l'Alimentation et des Technologies Agro-Alimentaires (INATAA), Route de Ain-El-Bey, 25000 Constantine, Algeria

<sup>2</sup> Université d'Abbes Laghrour, Département de biologie cellulaire et moléculaire, 40000 Khenchela, Algeria

<sup>3</sup> Univ Brest, Laboratoire Universitaire de Biodiversité et Ecologie Microbienne, F-29280 Plouzané France

Correspondence: Rania Boussekine, Université Frères Mentouri Constantine 1, Laboratoire de la Biotechnologies et des Qualités des aliments (BIOQUAL), Institut de la Nutrition, de l'Alimentation et des Technologies Agro-Alimentaires (INATAA), Route de Ain-El-Bey, 25000 Constantine, Algeria. E-mail: rania.boussekine@umc.edu.dz

Received: May 4, 2020

Accepted: June 5, 2020

Online Published: July 16, 2020

doi:10.5539/jfr.v9n4p71

URL: <https://doi.org/10.5539/jfr.v9n4p71>

### Abstract

Algerian *Smen/Dhan* is an ethnic dairy product which is a traditional fermented butter made from whole raw milk by empirical methods. This product constitutes a significant part of the Algerian diet and represents a gastronomic heritage that needs to be preserved and protected. The aim of the present study was to investigate the place and use of this product in the Algerian culture as well as to identify the traditional methods used for its preparation. A survey was conducted on 880 households in the South and East of Algeria. The results revealed that 96.47% of the surveyed population knew what *Smen/Dhan* was, 75.22% consumed it and 47.61% prepared it at home. Concerning the production method, raw milk (cow, goat and/or sheep milk) is spontaneously fermented until coagulation. Then, the obtained coagulum (*Raib*) is churned with different tools to obtain the butter used for *Smen/Dhan* preparation. Then, two different preparation modes are used depending on the surveyed regions. Households from Batna, Khenchela and Setif proceed directly with butter salting while in the Biskra, Jijel, El Oued and Ouargla regions, a different process is used which first involves a heat-treatment of the butter followed by the addition of one or more ingredients. After packing in a traditional ceramic container (*Ezzir*) and other containers, a maturation step is applied with a long duration varying from one month to several years. This product is consumed as an additive to enhance the taste and aroma of some traditional dishes (*couscous*/other) and is also used in traditional medicine.

**Keywords:** *Smen/Dhan*, Algeria, survey, traditional preparation, consumption

### 1. Introduction

Nowadays, there is an increasing interest for foods that are linked with specific places or territories. Indeed, consumers are more and more attracted to local foods with a traditional character or image, and such local foods are often perceived as to be of higher quality, freshness, more sustainable and contributing to support the local economy (Pieniak, Verbeke, Vanhonacker, Guerrero, & Hersleth, 2009). Among traditional foods, fermented foods have been consumed since antiquity and still constitute a main food source in the population's diet throughout the world. They also represent an important part of human dietary and culinary culture and most of these products are produced at household level or in small enterprise using spontaneous fermentation (El Sheikha, & Hu, 2018; Johansen, Owusu-Kwarteng, Parkouda, Paonou, & Jesperen, 2020).

Among fermented foods, dairy products are very popular due to their simple formulation. Milk as a raw material is well suited to support the growth of microorganisms because it is rich in carbon and nitrogen sources as well as micronutrients. Indeed, the ability to maintain it in a fresh state is limited, especially in warm environments and in the absence of a cold chain (Hutkins, 2006; Puniya, 2015), as these latter conditions will rapidly lead to its spoilage; that is the reason why different methods have been developed to allow its preservation for longer

periods. Among these methods, milk fermentation is one of the most ancient practices to ensure milk preservation as it guarantees the availability of safe and nutritious foods throughout the year, and prevents the risk of shortage of dairy products to consumers (Abd-El Salam, & Benkerroum, 2006).

Many types of fermented milk products exist throughout the world. Their organoleptic properties depend on different factors such as the animal species from which milk it is obtained, milk pre-treatment, conditions of fermentation and associated microbiota, and subsequent processing (Zamfir et al., 2006).

In Algeria, a large variety of dairy products are prepared with naturally fermented milk. They have played and still play a major role in people's diet, especially those from rural areas. Among them, *Lben*, *Raib*, *Zebda*, *Dhan* or *Smen* and *Jben* are the most common and are mostly marketed throughout informal circuits (Idoui, Benhamada, & Leghouchi, 2010).

*Smen* or *Dhan* is a traditional fermented butter which is made from raw milk, cream or butter originating from several animal species (Rajorhia, 1993; Guessas, Adjoudj, Hadadji, & Kihal, 2012; Iradukunda, Aida, Ouafi, Barkouch, & Boussaid, 2018). Its fermentation can last from a few months to several years, depending on the moisture, humidity and room temperature of the storage place (Kacem, & Karam, 2006). It is produced in many countries around the world, in Asia, the Middle-East and Africa (Afsaneh, Hosseinpour, & Mina, 2016) and its name and preparation methods differ from one region to another. In Algeria, it is known as *Dhan* or *Smen* (Bensalah, Labtar, Delorme, & Renault, 2011; Guessas, Adjoudj, Hadadji, & Kihal, 2012), *Smen* in Morocco (Tantaoui-Elaraki, & El Marrakchi, 1987; Benkerroum, & Tamime, 2004; Faid et al., 1993; Sakili, & Isoual, 2003; Iradukunda, Ouafi, Barkouch, & Boussaid, 2018), *Ghee* in India and Ethiopia (Dhurvey, Kawtikwar, & Sakarkar, 2012; Mortensen, 2016; Alganesh, & Yetenayet, 2017), *Samna* in Egypt and *Samín* in Sudan (Sserunjogi, Abrahamsen, & Narvhus, 1998).

This fermented butter is mostly used as a flavouring ingredient to improve the taste and aroma of many traditional dishes (Iradukunda, Aida, Ouafi, Barkouch, & Boussaid, 2018). It is also used in traditional medicine for reducing pain associated with the cold feeling that accompanies coughs, rheumatism and bone trauma (Sakili, & Isoual, 2003).

In Algeria, *Smen/Dhan* represents an ethnic heritage. It is manufactured according to an artisanal process, which is far from being perfectly known. A better knowledge of this product presents a scientific interest. In this context, the aim of the present study was thus to investigate the use and consumption of this traditional product as well as to identify how it is manufactured and stored in the Northeastern and Southeastern parts of Algeria.

## 2. Material and Methods

### 2.1 Survey Study

A field survey was conducted between May 2017 and March 2018 in different regions of the Southeast (Biskra, El Oued and Ouargla) and the Northeast of Algeria (Batna, Khenchela, Jijel and Setif) as shown in **Figure 1**. These regions were chosen based on a preliminary survey showing that *Smen/Dhan* preparation and consumption is quite common in these areas.

Families were asked about their practices and utilization of *Smen/Dhan* and the overall sample surveyed consisted of 880 households distributed in 71 towns from and nearby different localities, i.e., Batna, Biskra, El Oued, Jijel, Khenchela, Ouargla and Setif. The survey was mostly directed towards elder people especially women, dairy farmers, and farmers who are used to prepare *Smen/Dhan* and possibly market it in informal circuits in order to have a view as precise as possible on the practices associated with this traditional product.

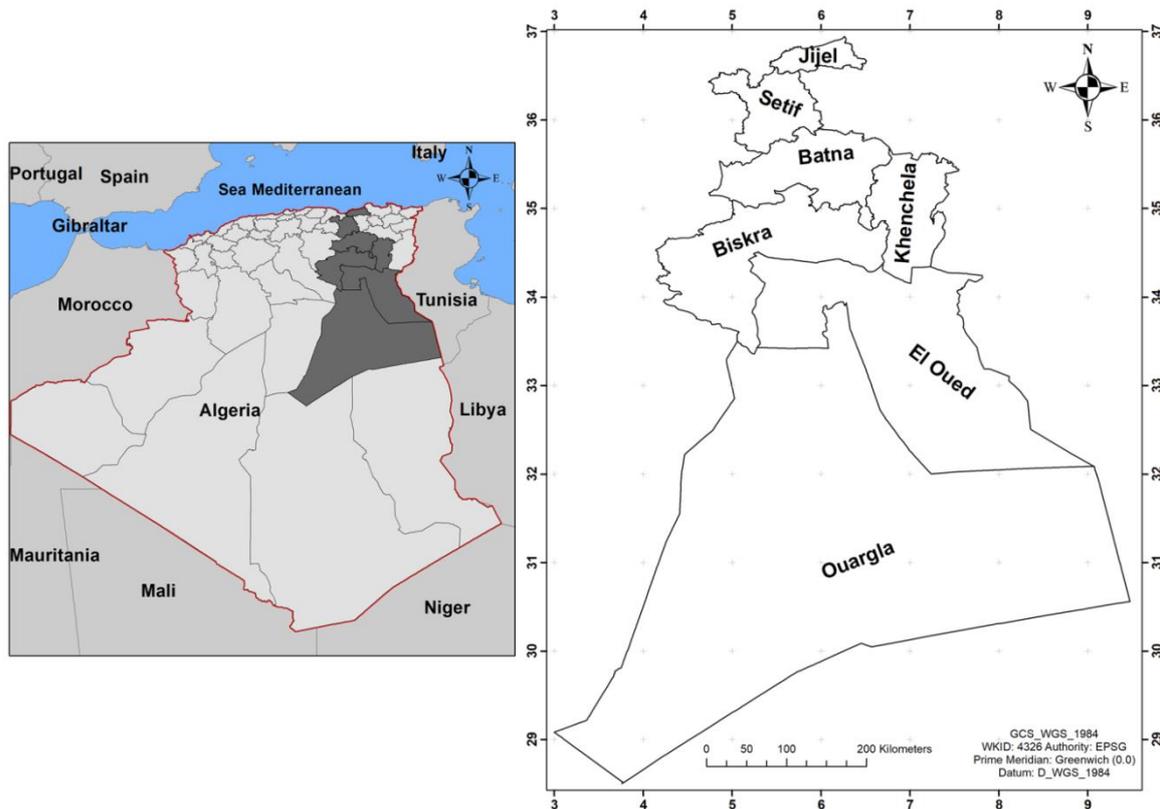


Figure 1. Detailed maps highlighting the surveyed regions of Algeria

## 2.2 Data Collection

Data were collected using a questionnaire and completed by face-to-face interviews. Before the beginning of the survey, the questionnaire framework and purpose was explained followed by the interview, which lasted about 15 to 20 minutes. Questions were read and if necessary, explained before collection of the answers.

## 2.3 General Content of the Questionnaire

The survey questionnaire contained forty-eight questions (**supplementary file 1**). It was divided into five parts. The first part of the questionnaire contained questions about the identity of the interviewed person (gender, age, education degree, professional activity and residence). The second part dealt with the profile of the business/enterprise where the product was produced. The third part allowed to gather information on the fermented product itself, i.e. the place of the fermented product in the local culture, its local name, the geographical production area, the mode and period of consumption as well as the product use. The fourth part included questions about the product organoleptic properties (texture, color, smell, taste...) and the fifth part concerned the description of the production process, the raw materials used and their origins, as well as the equipment used.

## 2.4 Statistical Analysis

Statistical analysis was performed using XL STAT, version 2014. The results of this study are presented using descriptive statistics and expressed as percentage of response to each question in the survey. ANOVA test was used to analyze the variance between modalities of each surveyed variables ( $p < 0.05$ ). Correlation analysis was used to explore the relationship between the different parameters.

## 3. Results and Discussion

### 3.1 Characteristics of the Studied Population and Link with Smen/Dhan Preparation

Our study group consisted of 880 households and the interviewed persons were aged between 19 and 99 years old. As shown in **Table 1**, the surveyed population was overwhelmingly composed of adults over 38 years of age. The average and median age of the surveyed population was 49.47 and 50 years old, respectively. Over 55% of

respondents lived in urban areas.

After subdividing the surveyed persons into 20 year age-groups, we did not observe any relationship between age groups and preparation of *Smen/Dhan* in households, which indicates that *Smen/Dhan* preparation was performed indistinctively by all age groups. This result may be explained by the fact that *Smen/Dhan* preparation relies on a simple method of preparation in contrast to other traditional foods, such as couscous, which need much more effort and experience in their preparation. As an example, (Bekhouché, Merabti, & Bailly, 2013) reported that couscous *lemzeiet* was mainly prepared by women that are aged between 40 and 60 years. On the other hand, we did not find any relationship between professional activity and *Smen/Dhan* preparation, this can be explained by the fact that the product preparation does not require a great effort, and its preparation is quick and easy.

The percentage of the surveyed females was higher than that of males, as 84.54% of the interviewed persons were females while only 15.45% were males. This observation is not surprising given the women's role in the manufacture of traditional products, including *Smen/Dhan*, and the fact that *Smen/Dhan* preparation is an activity exclusively realized by women. For all these women, the expertise or the art of *Smen/Dhan* making was passed on by their mothers, grandmothers or mothers-in-law as previously reported by Gagaoua and Boudchicha (2018) for ethnic meat products of the North African and Mediterranean countries. While keeping and preserving the same eating habits, the *Smen/Dhan* making process was considered by the interviewed persons as a precious legacy transmitted from one generation to another. In contrast, men play a relatively insignificant role in the *Smen/Dhan* preparation but are involved in selling tasks.

Table 1. Socio-demographic structure of the 880 surveyed persons

Surveyed population	Number	Percentage (%)
<b>Age (years)</b>		
19-38	202	22.95
38-58	424	48.18
59-78	226	25.68
79-99	28	3.18
<b>Gender</b>		
Female	744	84.54
Male	136	15.45
<b>Region</b>		
Urban	489	55.56
Rural	391	44.43
<b>Professional Activity</b>		
Housewives	701	79.65
Students	29	3.29
Civil servant	133	14.77
Retired	17	1.93

### 3.2 Place of the Product in Local Culture

*Smen/Dhan* is a traditional product very appreciated by the Algerian population. This product is part of the eating habits in different regions of Algeria. The results revealed that 96.47% of the surveyed population knew what *Smen/Dhan* was because of its importance in the Algerian kitchen (**Table 2**). Even if the product was not prepared by all Algerian families (47.6% of households), its recognition by most families confirmed that this product is a traditional product of Algeria, which knowledge and utilization are transmitted from one generation to another. It is worth noting that the name used for this product, i.e. *Smen* or *Dhan* varied according to the surveyed region. Indeed, we found out that the majority of respondents used the name *Dhan* in all the surveyed regions (Batna, Biskra, El Oued, Khenchela, Setif, Ouargla), except for Jijel in which the name *Smen* was used.

*Smen/Dhan* is widely used by Algerian families. Indeed, 75.22% of the surveyed population consumed it on a regular basis. The interviewed persons also indicated that they consumed *Smen/Dhan* for its taste, i.e., as flavouring agent in traditional dishes, but also for the health benefits associated with its consumption.

Concerning people that did not prepare themselves *Smen/Dhan*, the purchase of *Smen/Dhan* was done in formal circuits if available on the market or informally through other households producing their own product. We noted that the price of one Kg of *Dhan* was 2000 DA in southern areas of Algeria (Biskra, El Oued, Ouargla) while it

was 800 DA in Eastern areas. This price difference can be explained by the nature of the raw material used for its preparation in these two areas. Indeed, *Smen/Dhan* is prepared with goat's milk in the South and cow's milk in the East and goat's milk is more expensive than cow's milk.

Table 2. Distribution of the surveyed population according to knowledge, manufacture, consumption and purchase of *Smen/Dhan* in different regions of Algeria

Regions ( <i>Wilayas</i> )	Number of respondents	Knowledge (n)	Preparation (n)	Purchase (n)	Consumption (n)
Batna	100	100	46	38	77
Biskra	100	100	21	50	67
El Oued	100	100	53	42	73
Jijel	100	69	42	21	68
Khenchela	276	276	158	114	221
S áif	104	104	48	33	79
Ouargla	100	100	51	31	77
Total	880	849	419	329	662
%	100	96.47	47.61	37.38	75.22

### 3.3 Traditional Preparation Steps of *Smen/Dhan*

Based on the survey results, we could define the different steps used for the preparation of traditional “*Smen/Dhan*” (Figure 2, 3). These steps are described below.

#### 3.3.1 Raw Material Used

Raw milk of different animal species can be used in order to make butter, which is then further processed to *Smen/Dhan*. Based on the survey results, it was found that, cow, goat and sheep milk or mixture of two milk types (goat and sheep milk) could be used to produce butter, and the milk type differed significantly between eastern and southern regions. Indeed, cow's milk is the most widely used milk in the eastern regions with 73.97, 100, 70% and 100% of interviewed households using cow's milk in Batna, Jijel, Khenchela and Setif localities, respectively. In contrast, in the Southern regions, goat's milk is mostly used for the preparation of *Dhan*, with 92.75%, 98.68% and 100% of interviewed households preparing *Smen/Dhan* with goat milk in Biskra, Ouargla and El Oued localities, respectively. Concerning sheep milk, its utilization is scarce and most of the time, it is used in mixture with goat milk. It is not surprising that the milk type differs between Eastern and Southern regions as it reflects the most prevalent bred animals in these two regions.

##### 3.3.1.1 Milk Coagulation

After milk collection, raw milk is spontaneously fermented at room temperature until coagulation with a duration time varying from 12 to 120 h depending on the season at which this fermentation is performed. Indeed, in the summer season, because of higher temperatures, the fermentation time varies between 12 to 24 h while in the winter, it can last up to 120 h. In order to accelerate the fermentation process in the winter season, some people add ingredients to the milk, such as lemon juice, vinegar, *Raib* (fermented milk), yogurt, klila (cheese) and/or hot water, or leave the milk to coagulate in front of heat or the fireplace. The obtained coagulum is called *Raib* and it may be consumed as it is or processed further as described below.

##### 3.3.1.2 Butter Making

For butter making, *Raib* is then churned. Churning can be performed with several tools either manually using the traditional *Chekoua* which is a goatskin bag, an electric churn equipped with wood, metal, paddles or a plastic bottle (Figure 4).

In the past, *Chekoua* was the mostly used churning tool, but due to its decreasing availability as well as the better ease and speed of use of other tools, it disappeared gradually. Benkerroum and Tammim (2004) stated that the decreasing use of traditional churning tools was due to the fact that electric churns are faster and do not require much labour. In addition, these tools are easier to clean while *Chekoua* cleaning is more fastidious and laborious, and it can be easily contaminated by undesirable microorganisms including spoilage and pathogenic ones. On the other hand, this tool can be a source of beneficial microorganisms which could play a significant role in *Smen/Dhan* organoleptic properties, but this aspect has not been studied in detail so far.

Nevertheless, in Algeria, people still use the traditional *Chekoua*, especially people living in rural areas. Indeed, 21% of the surveyed population still used *Chekoua* for churning, while 41% and 38% use electric churns and

plastic bottles or cans, respectively. With regard to churning duration, it varied depending on the churning tool used as well as the ambient temperature, quantity of *Raib* to be processed and its fat content which is also dependent on the animal species from which milk is derived. According to the surveyed population, it can last between 1 to 2 h using a traditional *Chekoua* or a bottle and between 30 min to 1 h using an electric tool. At the end of churning, a quantity of cold or hot water can be added in the mixture according to the ambient temperature, in order to favor the agglomeration of butter grains. This trick is also used by the Moroccans (Tantaoui-Elaraki, & El Marrakchi, 1987). At the end of this process, two phases appear, a solid one called *zebda* i.e., butter and a liquid one called *Lben*, i.e., buttermilk. After that, the butter is collected by hand or using a strainer or a perforated ladle.

Concerning butter yield, 30 L of milk yield between 0.8 and 1 kg of butter, which is slightly lower than that reported by Alganesh and Yetenayet (2018) with 20 to 25 L of milk for 1 kg of butter. After churning, the butter is washed several times to remove *Lben* traces which constitute the aqueous phase.

### 3.3.2 *Smen/Dhan* Preparation

According to the surveyed households from East and South of Algeria, *Smen/Dhan* preparation is transmitted by identical method from generations. Its production is related to two main factors. First, *Smen/Dhan* is produced because it is an important ingredient in traditional foods, but also for its possible use in traditional medicine. The second reason is that *Smen/Dhan* production allows keeping the butter for longer time period. Indeed, butter transformation into *Smen/Dhan* leads to a more stable product from an organoleptic and microbiological point of view and thus prevent food losses. Benkerroum and Tamim (2004) also reported that the raw butter surplus exceeding the domestic demand, was transformed into Moroccan *Smen* for longer preservation.

It is also worth mentioning that among households preparing *Smen/Dhan* at home, 61.3 % prepared the butter themselves at home starting from raw milk as described above, while the others did not and purchased butter directly from milkmen. These milkmen are traders who collect milk from farms, and sell milk and traditional dairy products to people in the area. These traders own large churns which are used for the preparation of *Lben* and butter. This was also true for households living in urban areas of the Eastern regions (Batna, Jijel, Setif and Khenchela), which did not transform themselves the raw milk into butter, but bought directly the latter from milkmen, in contrast to households from rural areas and those from the Southern regions. These traders also manufacture and sell *Smen/Dhan* but, in general, *Smen/Dhan* preparation is performed by their mother or wife following the traditional process.

After churning, the obtained butter can be processed immediately into *Smen/Dhan*, or the latter is only produced after the accumulation of a large butter quantity in the household. Indeed, we noted that 31.6% of households used to prepare *Smen/Dhan*, immediately processed the butter, while the remaining households only prepared *Smen/Dhan* after accumulation of large butter quantities. In the latter case, butter is kept in the refrigerator or at room temperature with a small amount of salt which allows storing butter for a longer time period as salt addition reduces food water activity and thus prevents the growth of non-halotolerant undesirable microorganisms. Interestingly, we observed that *Smen/Dhan* preparation method is different according to the surveyed region. This difference was observed between the regions of Batna, Khenchela, Setif on one hand and the regions of Biskra, El oued, Jijel, Ouargla. Indeed, following butter washing, households from regions of Batna, Khenchela, Setif proceed directly with butter salting (Figure 2, see section 3.3.2.1) while in others regions of Biskra, El Oued, Jijel, Ouargla, a different process is used which first involves a heat treatment of the butter (Figure 2, see section 3.3.2.2) followed by the addition of one or more ingredients. Both methods, together with the butter acidic pH, relatively high salt (NaCl) content, and its low moisture and water activity, contribute to the microbiological stability of the obtained products, which in turn increases butter shelf life (Sserunjogi, Abrahamsen, & Narvhus, 1998; Afsaneh, Hosseinpour, & Mina, 2016; Alganesh, & Yetenayet, 2017).

#### 3.3.2.1 Butter Salting

As mentioned above, in certain localities, i.e., Batna, Khenchela, and Setif, people proceed directly to butter salting with a process similar to that of Moroccan *Smen* (Tantaoui-Elaraki & El Marrakchi, 1987; Benkerroum & Tamime, 2004). In the present study, 94% of households preparing *Smen/Dhan* with this method add directly salt to the butter and this quantity varies from one household to another. The answers of the surveyed population were very diversified, and the interviewed people did not know exactly the salt concentration used, only the fact that the butter must be well salted. According to 60% of surveyed population and based on our estimation, the salt concentration varies between 50 and 80 g/ kg of butter. It is worth mentioning that certain households (2.20%) add a quantity of matured *Smen/Dhan* (period of maturation between 2 years to 10 years) with recently prepared *Smen/Dhan* in order to minimize the maturation time and gives a result in a short time. Benkerroum and Tamim

(2004) also reported that the ripening period of Moroccan *Smen* could be shortened to 30 days after mixing a portion (ca.5–8%) of matured *Smen* with freshly made product.

After salt addition, butter is well kneaded allowing a homogeneous distribution of salt in the butter. People stated that the salt addition was necessary for better preservation and for taste improvement.

After salting, the salted butter is left for a certain time to get the water out, which is then removed, allowing a shelf-life extension of *Smen/Dhan* during storage. Salted butter can then be directly packaged for further maturation.

### 3.3.2.2 Heat Treatment

The use of heat treatment was adopted in Biskra, Jijel, El Oued and Ouargla localities. For this, the butter is heated at slow fire until melting. The melting temperature could not be defined precisely by the respondents, but they indicated that butter had to be slowly melted to avoid fatty degradation and for a better separation of *Lben* residues and impurities. This method is similar to that of *Samna* making in Egypt and to a smaller extent to Ethiopian and Indian *Ghee*. Indeed, for *Samna*, butter is heated under continuous stirring at 50 to 60 °C while for Ethiopian and Indian *Ghee*, temperature can reach to 110 °C at 120 °C, allowing the removal of more moisture and development of specific flavour (Sserunjogi, Abrahamsen, & Narvhus, 1998; Chaudhary et al., 2019). According to (Illingworth, Patil, & Tamime, 2009), *Ghee* can be defined as a clarified pure fat which is obtained exclusively from milk, cream or butter by application of heat treatment leading to an almost complete elimination of moisture and solid fats.

At boiling point, white froth, which corresponds to residual *Lben* as indicated by the interviewed persons, appears on the melted butter surface. This froth is then skimmed off with a soup spoon, followed by the addition of different ingredients, the basic one being coarse semolina called *Dchicha*. Indeed, 92.5% of the population who prepared *Smen/Dhan* using this method, declared that they added *Dchicha* to butter during boiling under continuous agitation. The quantity of added *Dchicha* was usually approximate but the majority of respondents added ~ 160 g of *Dchicha* per Kg of butter, the purpose of this addition being residual *Lben* and water absorption during cooking to obtain *Smen/Dhan* of good quality. According to (Sserunjogi, Abrahamsen, & Narvhus, 1998) who focused on *Ghee*, after separation, the fat phase is further boiled together with a piece of bread and the boiling step is stopped when the bread becomes crispy and light brown in colour.

Besides *Dchicha*, 88.75% of them also added a small quantity of salt, ~ 8 g/Kg of butter. Moreover, 41.66% of respondents were adding herbs to flavor the product. These herbs were added by people of Biska, El Oued and Ouargla while those of Jijel did not use them. The different herbs, *i.e.*, rosemary (*Salvia rosmarinus*), thyme (*Thymus spp.*), juniper (*Junipirus spp.*) and fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*) mixtures, are added in small quantities (a pinch) to butter during cooking. Finally, 7.90% of respondents were also adding a small onion piece to the mixture. Hazra and Parmar (2014) reported that the addition of herbs can prevent oxidative rancidity of *Ghee*.

The cooking duration differed from one respondent to another with duration between 30 min and 1.5 h. This variation was justified by the time needed for cooking and decanting the *Dchicha* semolina grains. At the end of cooking, the cooked butter is clarified with the semolina at the bottom of the pan. After this heat treatment phase, the product is filtered through using a sieve or a piece of a stamen to eliminate any trace of impurities and additives followed by packaging as described below.

The cooked semolina removed of melted butter is consumed by 35% of the respondents using this method. Nowadays, cooked semolina is considered as a traditional dish and is consumed for pleasure while in the past, it was also consumed to avoid food losses in a context of food shortage.

### 3.3.3 Packaging, Maturation and Storage

The packaging of salted or cooked butter is then carried out in containers made of glass (53.45% of the surveyed population preparing *Smen/Dhan*), plastic (34.04%), or a traditional ceramic container called *Ezzir* (12.5%). The latter type of container was mainly preferred by people from rural areas. The butter must be well compacted to remove air, so the pot must be fully filled to minimize free space. Some people declared that they covered the top a paste of semolina to completely prevent air entry. The ripening process was conducted in a dry place, in the dark and, at room temperature. In some cases, the product was left in the refrigerator, especially in the Southern regions of Algeria, because these regions are hot areas, especially in the summer. We noted that 53.45%, 41.48% and 3.45% of the population producing *Smen/Dhan* let it to mature at room temperature, in the refrigerator, or both depending on the season while 1.59% bury the *Smen/Dhan* underground. As previously reported by Benkerroum and Tamime (2004) for *Smen* made in several Morocco regions, the pot is buried underground to ensure darkness,

anaerobiosis and to minimize temperature variations.

The maturation duration was different from one person to another, varying from one month to several years, according to the consumer preferences. As indicated by the respondents, *Smen/Dhan* has a strong characteristic taste which strength depends on the maturation time.

After *Smen/Dhan* maturation, most people utilize it as it is (90.42% of the population consuming *Smen/Dhan*) while 9.57% heated *Smen/Dhan* at a slow fire until melting, before filtration and storage at room temperature, to stop the *Smen/Dhan* maturation process.

As for all other dairy products, *Smen/Dhan* may undergo physico-chemical or microbiological alterations. These phenomena can take place during storage and affect its organoleptic properties (texture, taste). According to the surveyed population, most people (70%) stated that they never experienced *Smen/Dhan* spoilage during storage. The others stated that they had observed mould spoilage on the *Smen/Dhan* surface which, according to the answers of some elderly people, was due to a default encountered during *Smen/Dhan* preparation and the remaining presence of *Lben* in the butter before packaging. Other spoilage encountered by consumers included rancidity defects, colour defect due to mould growth and unpleasant flavour development.

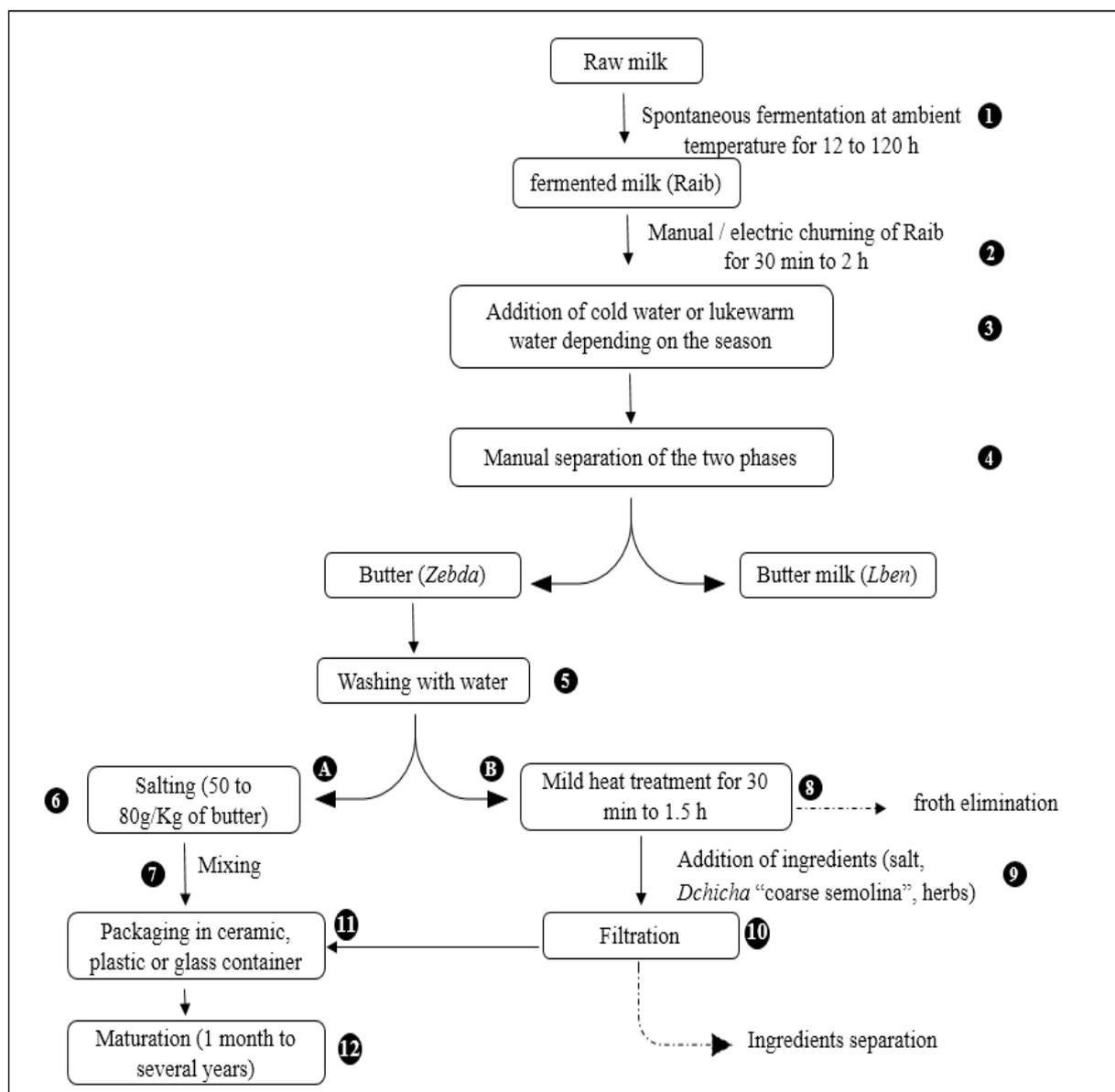


Figure 2. Diagram showing the different steps of traditional *Smen/Dhan* manufacturing

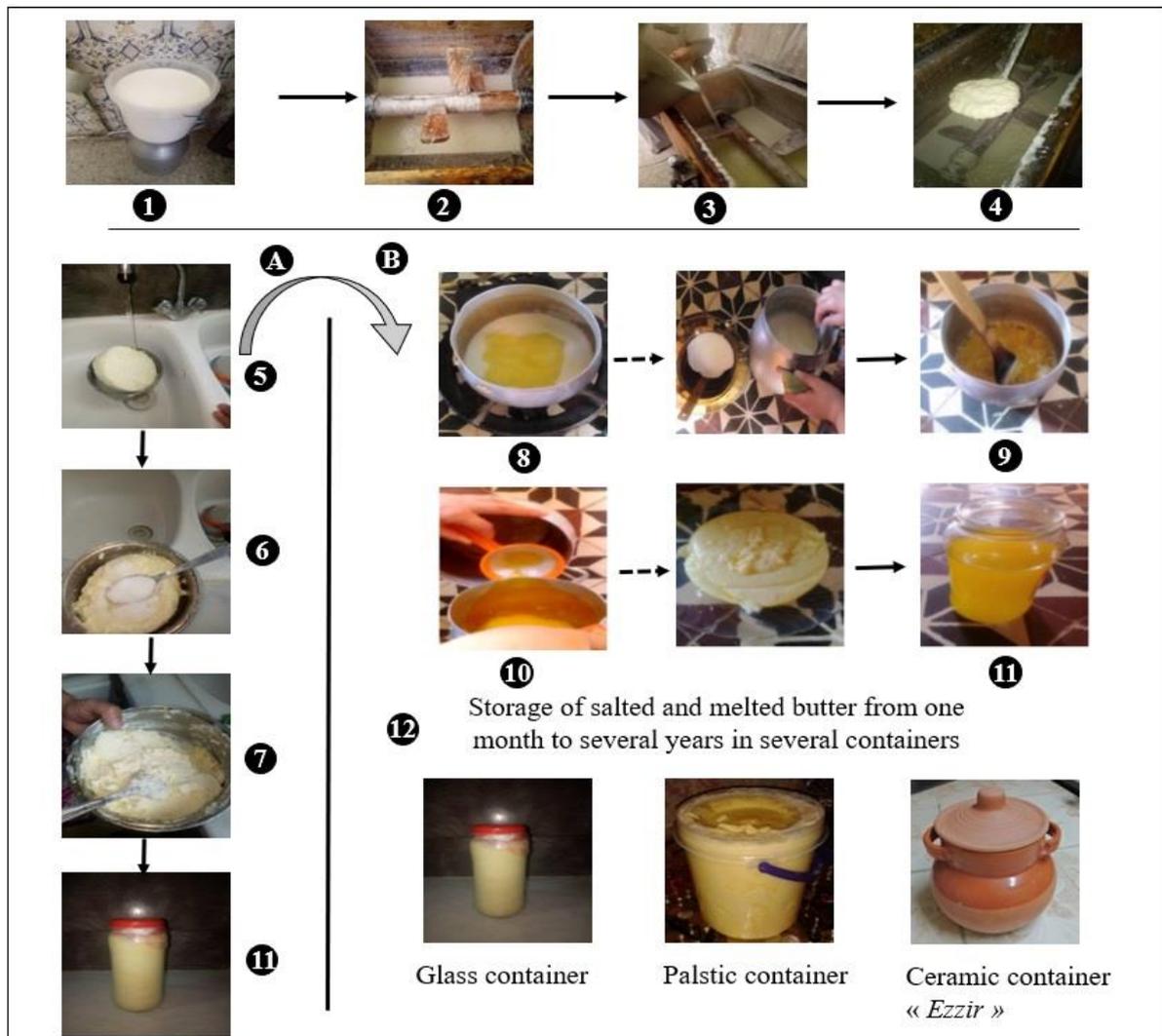


Figure 3. Photographs showing the different steps of traditional *Smen/Dhan* manufacturing



Figure 4. Different tools used for Rayeb churning (a: traditional *Chekoua* made from goat skin, b<sub>1</sub>-b<sub>2</sub>: traditional churn in wood, c: electric churn)

### 3.4 *Smen/Dhan* Consumption

Regarding the use of *Smen/Dhan* in the local culture, and based on the answers of the surveyed population, the majority of the respondents used it for meal preparation and also consumed it alone. The consumption has different objectives, *i.e.*, improving the taste and aroma of some traditional dishes or therapeutic purposes. Regarding culinary usage, people use *Smen/Dhan* with maturation age between 1 month to 2 years. Its characteristic taste depends on maturation time and this taste is stronger with a long maturation period. It is usually used at the end of cooking as a flavoring agent in some traditional dishes such as *couscous*,

*chekhchoukha* and *trida*, for cooking meat, and for preparation of traditional cakes such as *makrout*, *baklawa*, *mberdja*, and *rfis*. This is in agreement with previous work that stated that ripened *Smen*, because it has a strong rancid and salty characteristic taste, is mostly used as a condiment to enhance the flavor of some traditional Moroccan dishes (Benkerroum, & Tamime, 2004).

According to the results of this study, traditional *Smen/Dhan* ripened for more than two years is used for therapeutic purposes. This practice is much more observed in southern regions of Algeria, where it is occasionally drunk with coffee to treat cough. This practice was also reported for *Ghee* by Alganesh and Yetenayet (2017) who indicated that traditionally made *Ghee* stored for more than a year was recommended to treat chronic coughs. *Smen/Dhan* is also used to treat injuries, burns, migraine, headache, injury, hemorrhoids, flu and eczema with a superficial application. We also noted that some farmers use *Smen/Dhan* to treat trauma and injuries of their cows and other animals. The same applications in traditional medicine are also seen with Indian *Ghee* (Gandhi, & Lal, 2015). The therapeutic effects of *Smen/Dhan* have not been studied so far but concerning *Ghee*, Ahmad and Saleem (2020) showed that it has a high concentration of conjugated linoleic acid which possess antioxidant, anticarcinogenic, antidiabetic and antiatherogenic properties (Chinnadurai, Kanwl, Tyagi, Stanton & Ross, 2013).



Figure 5. Photographs of some traditional foods (A, B, C, D) and pastries (E, F, G, H) prepared with *Smen/Dhan* matured for 1 to 24 months

#### 4. Conclusion

Through this study, it was found that *Smen/Dhan* is an important product in the Eastern and Southern Algerian culture. It represents an ethnic food with a specific know-how and is part of Algerian eating habits. *Smen/Dhan* is prepared by housewives and takes an important place at the family level. This product is used for self-consumption, and it can be commercialized to provide an income for the family. Unfortunately, its marketing is generally in informal circuits because *Smen/Dhan* has not yet received any quality label despite its importance in traditional cooking and medicine. Therefore, it would be of great interest to create cooperatives that could market this product in a formal way while guaranteeing a better quality with a specific quality label. It could help local producers improving overall product quality and safety as well as to promote the gastronomic heritage of Algeria. Because the Algerian *Smen/Dhan* is a fermented food, it would be of great interest to study its microbial diversity and identify the key microorganisms involved in its sensory characteristics to better control fermentation processes and, thus, its quality attributes.

#### Funding

This work, which was conducted in the framework of the ProMedFoods project ‘Promotion of local Mediterranean fermented foods through a better knowledge and management of microbial resources’, was funded through the ARIMNet2 2016 Call by the following funding agencies: ANR (France), MERS (Algeria), ELGO-DEMETER (Greece), MIPAF (Italy), INIA (Spain) and MHESR (Tunisia). ARIMNet2 (ERA-NET) has received funding from the European Union’s Seventh Framework Programme for research, technological development and demonstration under grant agreement no. 618127.

## Acknowledgements

The authors are grateful to the interviewed people, especially housewives who took part and gave up their time to this survey.

## Article publication agreement

All authors have revised the final version and confirmed the publication in this journal.

## Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

## References

- Abd-El Salam, M., & Benkerroum, N. (2006). North African Brined Cheeses. *In Brined Cheeses*.  
<https://doi.org/10.1002/9780470995860.ch5>
- Afsaneh, M., Hosseinpour, H., & Mina, A. (2016). Investigation of quality, advantages and disadvantages, processing and characteristics of ghee, *Indian Journal of Fundamental Applied Life Sciences*, 6, 1-7. Retrieved from  
<http://www.cibtech.org/sp.ed/jls/2016/02/01-JLS-S2-JUNE-001-MINA-INVESTIGATION.pdf>
- Ahmad, N., & Saleem, M. (2020). Characterisation of cow and buffalo ghee using fluorescence spectroscopy. *International Journal of Dairy Technology*, 73, 191-201. <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12632>
- Alganesh, T. G., & Yetenayet, B. T. (2017). Traditional butter and ghee production, processing and handling in Ethiopia. *African Journal of Food Science*, 11(4), 95-105. <https://doi.org/10.5897/AJFS2016.1544>
- Bekhouche, F., Merabti, R., & Bailly, J. (2013). Lemzeiet traditional couscous manufacture from fermented wheat (Algeria): investigation of the process and estimation of the technological and nutritional quality. *African Journal of Food Science and Technology*, 4(8), 167-75. <http://dx.doi.org/10.14303/ajfst.2013.032>
- Benkerroum, N., & Tamime, A. Y. (2004). Technology transfer of some Moroccan traditional dairy products (lben, jben and smen) to small industrial scale. *Food Microbiology*, 21, 399-413. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2003.08.006>
- Bensalah, F., Labtar, A., Delorme, C., & Renault, P. (2011). Occurrence, isolation and DNA identification of streptococcus thermophilus involved in Algerian traditional butter "Smen". *African Journal of Biotechnology*, 10(75), 17251-17257. <https://doi.org/10.5897/AJB11.2462>
- Chaudhary, B. N., Vaghela, K. D., Mehta, B. M., Jain, A. K., Darji, V. B., & Aparnathi, K. D. (2019). Development of a Rapid Qualitative Test Using Ferriin Dye for Detection of Rancid Ghee Mixed with Fresh Ghee. *Journal of Food Chemistry Nanotechnology*, 5(3), 49-55. <https://doi.org/10.17756/jfcn.2019-071>
- Chinnadurai, K., Kanwal, H. K., Tyagi, A. K., Stanton, C., & Ross, P. (2013). High conjugated linoleic acid enriched ghee (clarified butter) increases the antioxidant and antiatherogenic potency in female Wistar rats. *Lipids in Health and Disease*, 12, 121-129. <https://doi.org/10.1186/1476-511X-12-121>
- Dhurvey, Y. R., Kawtikwar, P. S., & Sakarkar, D. M. (2012). Evaluation of Physicochemical Properties of Cow Ghee before and after Hydrogenation. *International Journal ChemTech Research*, 4(1), 185-189. Retrieved from [http://www.sphinxesai.com/2012/chem/CHEM/CT=31\(185-189\)JM12.pdf](http://www.sphinxesai.com/2012/chem/CHEM/CT=31(185-189)JM12.pdf)
- El Sheikha, A. F., & Hu, D. M. (2020). Molecular techniques reveal more secrets of fermented foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 60, 11-32. <https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1506906>
- Faid, M., Larpent, J. P., Adrian, Y., Chabard, J. L., Tantaoui-Elaraki, A., & El Marrakchi, A. (1993). Industrial scale production of Moroccan samn. *Journal of the society of Dairy Technology*, 46, 9-11. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.1993.tb00851.x>
- Gagaoua, M., & Boudechicha, H. R. (2018). Ethnic meat products of the North African and Mediterranean countries. *Journal of Ethnic Foods*, 5, 83-98. <https://doi.org/10.1016/j.jef.2018.02.004>
- Gandhi, K., & Lal, D. (2018). Potential of Herbal Nutraceuticals in Ghee: A Review. *Research & Reviews: Journal of Dairy Science and Technology*, 4, 1-5. <https://doi.org/10.37591/rjodst.v4i2.412>
- Guessas, B., Adjoudj, F., Hadadji, M., & Kihal, M. (2012). Isolation and identification of lactic acid bacteria from Dhan, a traditional butter and their major technological traits. *World Applied Sciences Journal*, 17(4), 480-488. Retrieved from [http://www.idosi.org/wasj/wasj17\(4\)12/11.pdf](http://www.idosi.org/wasj/wasj17(4)12/11.pdf)

- Hazra, T., & Parmar, P. (2014). Natural Antioxidant Use in Ghee-A Mini Review. *Journal of Food Research and Technology*, 2(3), 101-105. Retrieved from [http://jakraya.com/journal/pdf/5-jfirtArticle\\_2.pdf](http://jakraya.com/journal/pdf/5-jfirtArticle_2.pdf)
- Hutkins, R. W. (2006). Microbiology and Technology of Fermented Foods. <https://doi.org/10.1002/9780470277515>
- Idoui, T., Benhamada, N., & Leghouchi, E. (2010). Microbial quality, physicochemical characteristics and fatty acid composition of a traditional butter produced from cows' milk in East Algeria. *GRASAS Y ACEITES*, 61(3), 232-236. <https://doi.org/10.3989/gya.110209>
- Illingworth, D., Patil, G. R., & Tamime, A. Y. (2009). Anhydrous Milk Fat Manufacture and Fractionation. In *Dairy Fats and Related Products*. <https://doi.org/10.1002/9781444316223>
- Iradukunda, C., Aida, W. M. W., Ouafi, A. T., Barkouch, Y., & Boussaid, A. (2018). Aroma profile of a traditionally fermented butter (smen). *Journal of Dairy Research*, 85, 114-120. <https://doi.org/10.1017/S0022029917000796>
- Johansen, P. G., Owusu-Kwarteng, J., Parkouda, C., Padonou, S. W., & Jespersen, L. (2019). Occurrence and Importance of Yeasts in Indigenous Fermented Food and Beverages Produced in Sub-Saharan Africa. *Frontiers in Microbiology*, 10, 1789. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01789>
- Kacem, M., & Karam, N. E. (2006). Physicochemical and microbiological study of "shmen", a traditional butter made from camel milk in the Sahara (Algeria): isolation and identification of lactic acid bacteria and yeasts. *GRASAS Y ACEITES*, 57(2), 198-204. <https://doi.org/10.3989/gya.2006.v57.i2.37>
- Mortensen, B. K. (2011). Anhydrous Milk Fat/Butter Oil and Ghee. In *Encyclopedia of dairy sciences* (2nd Ed.), London, UK: Elsevier Ltd.
- Pieniak, Z., Verbeke, W., Vanhonacker, F., Guerrero, L., & Hersleth, M. (2009). Association between traditional food consumption and motives for food choice in six European countries. *Appetite*, 53, 101-108. <https://doi.org/10.1016/j.appet.2009.05.019>
- Puniya, A. K. (2015). Fermented Milk and Dairy Products. New York: CRC Press. <https://doi.org/10.1201/b18987>
- Rajorhia, G. S. (1993). GHEE. In *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*. London: Academic Press Ltd.
- Sakili, D., & Isoual, D. (2003). Les bactéries lactiques dans l'élaboration du Smen marocain, Académie d'Agriculture de France. Retrieved from <https://www.academieagriculture.fr/sites/default/files/publications/notes/2016/les-bacteries-lactiques-dans-l-elaboration-du-smen-marocain-par-dahmane-sakili-et-driss-issoual/2003notesbacterieslactiques.pdf>
- Sserunjogi, M. L., Abrahamsen, R. K., & Narvhus, J. A. (1998). Current Knowledge of Ghee and Related Products. *International Dairy Journal*, 8, 677-688. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(98\)00106-X](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(98)00106-X)
- Tantaoui-Elaraki, A., & El Marrakchi, A. (1987). Study of Moroccan dairy products: lben and smen. *MIRCEN Journal*, 3, 211-220. <https://doi.org/10.1007/BF00933574>
- Zamfir, M., Vancanneyt, M., Makras, L., Vaningelgem, F., Lefebvre, K., Pot, B., Swings, J., & De Vuyst, L. (2006). Biodiversity of lactic acid bacteria in Romanian dairy products. *Systematic and Applied Microbiology*, 29, 487-495. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2005.10.002>

## Copyrights

Copyright for this article is retained by the author(s), with first publication rights granted to the journal.

This is an open-access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).



## Article

# Deciphering the Microbiota and Volatile Profiles of Algerian *Smen*, a Traditional Fermented Butter

Rania Boussekine <sup>1</sup>, Farida Bekhouche <sup>1</sup>, Stella Debaets <sup>2</sup>, Anne Thierry <sup>3</sup>, Marie-Bernadette Maillard <sup>3</sup>,  
Hélène Falentin <sup>3</sup>, Audrey Pawtowski <sup>2</sup>, Malika Barkat <sup>1</sup>, Monika Coton <sup>2</sup> and Jérôme Mounier <sup>2,\*</sup>

<sup>1</sup> Laboratoire de Biotechnologie et Qualité des Aliments (BIOQUAL), Institut de la Nutrition, de l'Alimentation et des Technologies Agro-Alimentaires (INATAA), Université Frères Mentouri Constantine 1, Route de Ain-El-Bey, Constantine 25000, Algeria; rania.boussekine@umc.edu.dz (R.B.); bekhouché.farida@umc.edu.dz (F.B.); barkat.malika@umc.edu.dz (M.B.)

<sup>2</sup> Laboratoire Universitaire de Biodiversité et Ecologie Microbienne, INRAE, Univ Brest, F-29280 Plouzané, France; stella.debaets@univ-brest.fr (S.D.); audrey.pawtowski@univ-brest.fr (A.P.); monika.coton@univ-brest.fr (M.C.)

<sup>3</sup> STLO, Institut Agro, INRAE, F-35000 Rennes, France; anne.thierry@inrae.fr (A.T.); marie-bernadette.maillard@inrae.fr (M.-B.M.); helene.falentin@inrae.fr (H.F.)

\* Correspondence: jerome.mounier@univ-brest.fr; Tel.: +33-(0)2-90-91-51-21

**Abstract:** In Algeria, *Smen* is a fermented butter produced in households using empirical methods. *Smen* fermentation is driven by autochthonous microorganisms; it improves butter shelf-life and yields highly fragrant products used as ingredients in traditional dishes as well as in traditional medicine. The present study is aimed at investigating microbial diversity and dynamics during Algerian *Smen* fermentation using both culture-dependent and culture-independent approaches, as well as by monitoring volatile organic compound production. To reach this goal, fifteen *Smen* samples (final products) produced in households from different regions in Algeria were collected and analyzed. In addition, microbial and volatile compound dynamics at the different stages of *Smen* manufacturing were investigated for one *Smen* preparation. The results showed that *Smen* is a microbiologically safe product, as all hygiene and safety criteria were respected. The dominant microorganisms identified by both techniques were LAB and yeasts. *Lactococcus* spp. and *Streptococcus thermophilus* were the main bacterial species involved in spontaneous raw milk fermentation preceding butter-making, while lactobacilli and enterococci were the only bacteria found to be viable during *Smen* maturation. Regarding fungal diversity, yeast species were only recovered from two mature *Smen* samples by culturing, while different species (e.g., *Geotrichum candidum*, *Moniliella* sp.) were identified in all samples by the culture-independent approach. Using microbial analysis of a single batch, many of these were found viable during manufacturing. Concerning the volatile profiles, they were highly diverse and characterized by a high prevalence of short chain fatty acids, methylketones, and esters. Correlation analysis between microbial diversity and volatile profiles showed that several yeast (*Moniliella* sp., *K. marxianus*) and LAB (e.g., *Lactococcus* spp., *S. thermophilus*) species were strongly correlated with one or more volatile organic compound families, including several ethyl esters and methyl ketones that can be linked to pleasant, sweetly floral, fruity, buttery, and creamy odors. This study clearly identified key microorganisms involved in *Smen* fermentation and maturation that could be used in the future for better fermentation control and improvement of quality attributes.

**Keywords:** *Smen*; microbiota; lactic acid bacteria; yeasts; metabarcoding; volatile organic compounds



**Citation:** Boussekine, R.; Bekhouche, F.; Debaets, S.; Thierry, A.; Maillard, M.-B.; Falentin, H.; Pawtowski, A.; Barkat, M.; Coton, M.; Mounier, J. Deciphering the Microbiota and Volatile Profiles of Algerian *Smen*, a Traditional Fermented Butter. *Microorganisms* **2022**, *10*, 736. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10040736>

Academic Editor: Denis Roy

Received: 8 March 2022

Accepted: 26 March 2022

Published: 29 March 2022

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduction

Fermented foods constitute one of the most important diet components in many communities around the world, and represent about one-third of diets worldwide [1,2]. Traditional fermentation was empirically developed centuries ago by ancient human communities, and was used together with smoking, drying, and salting processes to preserve

foods for human consumption as well as to provide new organoleptic or nutritional qualities to the final products [3,4]. This constituted a crucial step in human food culture history [1]. Fermented food products harbour complex microbial communities composed of bacteria, yeast, and/or filamentous fungi. These may be naturally present or deliberately added as starter or secondary cultures. This microbiota, with their continuously evolving and successive microbial community structures, play a central role in product-manufacturing [5]. The subtleties of the character of fermented foods as well as product shelf-life and safety are largely determined by microbiota composition, evolution, and functions [6].

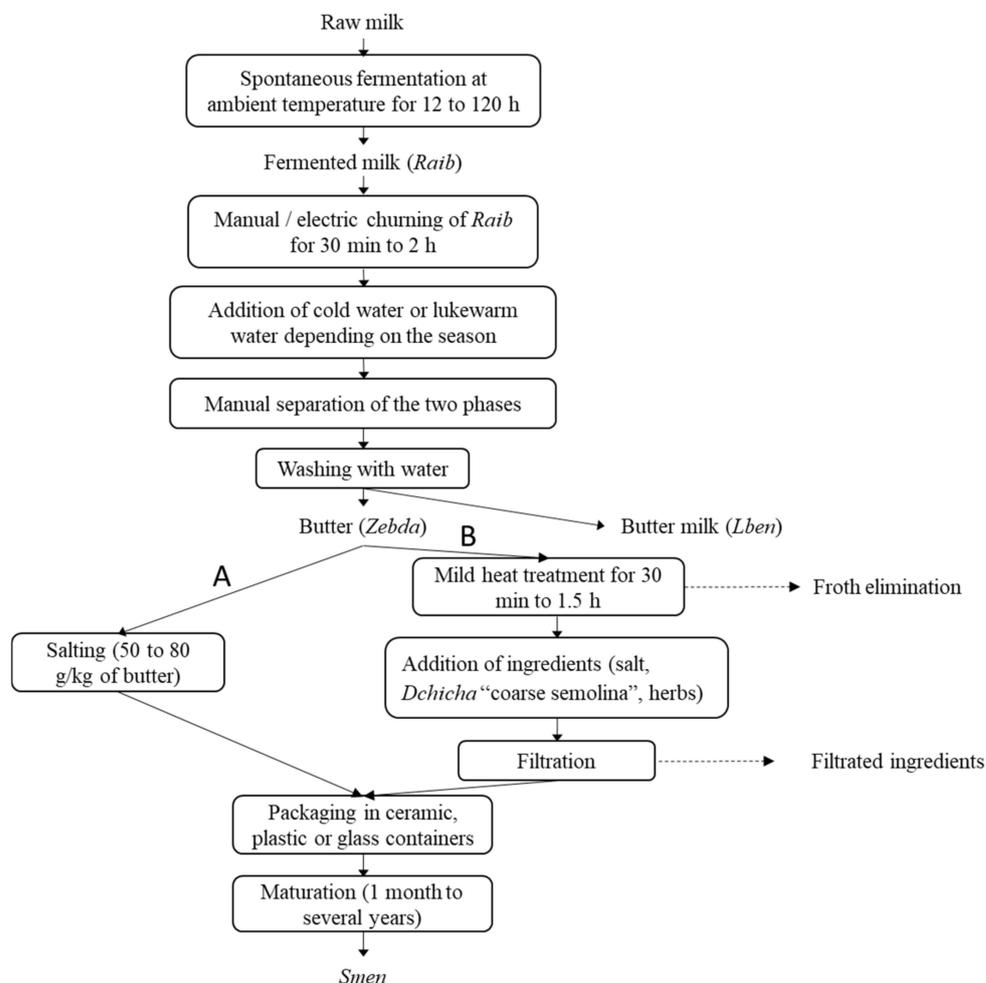
Many fermented foods and beverages are produced worldwide; however, many of them have not yet been subjected to scientific study, and the biological and microbiological bases of their fermentation processes are poorly understood [7]. Understanding their microbial diversity could lead to the identification of quality biomarkers, and this knowledge could be exploited to design specific starter cultures to produce safer and higher quality foods [8].

Africa is a very large reservoir of fermented foods derived from a wide variety of raw materials including crops, cereals, oil seeds, roots, and milk [8,9]. These fermentation methods are often carried out at small scales and in households without the use of starters, and are therefore naturally driven. Among African countries, North African countries share many traditional foods which have been passed from one generation to another [10], such as *Smen*. *Smen* is a traditional fermented butter made from raw whole milk (cow, goat, or ewe's milk either alone or as a mixture) by traditional methods [11]. Produced in Mahgreb countries, it is defined as a rancid butter obtained from raw salted butter (8% to 10%) made from spontaneously acidified milk (*Raib*) and matured in the dark under anaerobic cool conditions (13 to 15 °C) for a period of 1 to 12 months, and sometimes for even longer time periods [10,11]. This fermented butter is highly aromatic, and is especially used to improve the taste of many traditional dishes, in particular meat and pastries [11,12]. Products that are matured for long time-periods are used in traditional medicine for treating ailments such as coughs [11]. It is worth noting that the name (*Smen* or *Dhan* in Algeria, *Smen* in Morocco, *Semna* in Egypt, and *Samin* in Sudan) and preparation method can differ from one country to another.

In Algeria, *Smen* preparation methods vary from one region to another, and two main preparation modes are used (Figure 1). The first method consists of butter salting with a salt concentration between 50 and 80 g/kg of butter, and the second method consists of heat treatment of the butter followed by addition of one or more ingredients, including salt, coarse semolina, and herbs. After packing in a traditional ceramic container or other containers, a maturation step is applied, with a duration varying from one month to several years [11].

This fermented butter has been the subject of many scientific studies [12–17]. However, no detailed studies have ever characterized its microbial diversity, including both bacteria and fungi, using culture-dependent and culture-independent methods. Indeed, in the studies cited above, description of microbial diversity was achieved using culture-dependent methods and focused mainly on lactic acid bacteria and in a few cases yeast diversity. It is well established that culture-dependent methods are time-consuming, although they can reveal a large number of species in many ecosystems, including food-associated ones. In addition, only the cultivable microbiota are obtained with the selected media; it should be noted that certain microorganisms may be in a viable but non-cultivable state, and thus go undetected [18]. On the other hand, culture-independent methods are readily used to monitor evolving microbial populations over space or time and to understand microbial biodiversity in an ecosystem without using culture media [5]. It is worth mentioning that culture-dependent methods remain crucial for understanding the molecular adaptations of microbial guilds, especially those with potential biotechnological applications [19]. Moreover, use of combined approaches is of clear interest to fully understand and preserve microbiological diversity within a given ecosystem. In this context, the aim of the present study was to investigate for the first time the microbial diversity and dynamics involved in

Algerian *Smen* fermentation by applying both culture-dependent and culture-independent approaches, as well as to identify the volatile organic compounds produced. To reach this goal, fifteen *Smen* samples (final product) produced in households were collected from different Algerian regions, while *Smen* microbial and volatile compound dynamics were investigated for one household preparation.



**Figure 1.** Flow diagram showing the traditional *Smen* production process according to the salting (A) and heat-treatment (B) methods.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Sampling

#### 2.1.1. Collected *Smen* Samples

A total of fifteen samples were collected from households in different regions of Algeria (Batna, Biskra, El Oued, Jijel, Khenchela, Setif and Ouargla). The collected samples were prepared according to traditional methods, as previously described [11]; all information gathered on these products, including maturation age and milk type, is provided in Table 1. Samples were transported and stored at 4 °C for culture-dependent microbial analyses, and portions of each sample were stored at −20 °C for further analysis, including culture-independent microbial analysis.

**Table 1.** Description of collected *Smen* samples.

Samples	Milk Origin	Maturation Time	Region	Preparation Method	Storage Temperature
B1	Cow	10 years	Batna	Salting	Ambient
B3	Cow	<1 year	Batna	Salting	Ambient
B4	Cow	<1 year	Batna	Salting	Ambient
B5	Goat	2 years	Batna	Salting	Ambient
Bi3	Ewe and goat	<1 year	Biskra	Heat-treatment	Refrigerated
E10	Goat	1 year	El Oued	Heat-treatment	Ambient
Jn	Cow	<3 months	Jijel	Heat-treatment	Ambient
K1	Goat	6 months	Khenchela	Salting	Ambient
K2	Goat	10 months	Khenchela	Salting	Ambient
O1	Goat	1 year	Ouargla	Heat-treatment	Refrigerated
O3	Goat	1 year	Ouargla	Heat-treatment	Ambient
S1	Cow	6 months	Setif	Salting	Ambient
S2	Cow	2 months	Setif	Salting	Ambient
S3	Cow	1 months	Setif	Salting	Ambient
S5	Cow	2 years	Setif	Salting	Ambient

### 2.1.2. Dynamic Follow-Up of a *Smen* Preparation

In order to follow the microbial diversity and dynamics at different *Smen* preparation stages, *Smen* was prepared in a household in the region of Setif using locally produced butter from fresh raw milk in a small dairy. To prepare butter, 30 L of raw cow's milk was spontaneously fermented at ambient temperature for 48 h. After milk coagulation, the coagulum (called *Raib*) was churned with a traditional churn for 55 min. During churning, warm milk was added to the mixture in order to favor agglomeration of butter grains. At the end of churning, butter was recovered using a perforated ladle; the butter yield was about 750 g. Then, at the household, butter was washed several times to remove buttermilk and impurity traces. The washed butter was salted with two tablespoons (approximately 6%) of salt, well homogenized, and covered for one week to remove water, then packaged in a glass recipient and left at room temperature for a further maturation period of six months.

Different samples were collected during manufacture, i.e., raw milk, *Raib*, added milk during churning, butter, added salt, and *Smen* after one, two, three, and six months of maturation. In addition, churn and container surfaces were sampled using a wet swabbing technique. To do this, a sterile cotton swab was moistened by immersion in 10 mL of saline solution (0.9% NaCl) in a 20 mL sterile container and the swab was rubbed on the sampling site. All samples were transported at 4 °C and analyzed directly in the laboratory using culture-dependent microbiological analyses. Milk, *Raib* and swab suspensions were centrifugated at 4000 × g for 10 min and the cell pellet was stored at −20 °C for further analysis. For the other samples, an aliquot was directly stored at −20 °C for further analysis.

## 2.2. Microbiological Analyses

### 2.2.1. Safety and Hygienic Quality

Microbiological analyses of butter and *Smen* samples were performed on the aqueous phase as previously described [20], with minor modifications. Briefly, each sample was fragmented using a sterile knife and 2.5 g was placed in a tube with 2.1 mL of 1/4 Ringer's solution (2.25 g/L NaCl, 0.105 g/L KCl, 0.12 g/L CaCl<sub>2</sub>, 0.2 g/L NaHCO<sub>3</sub>). After vigorous homogenization, the mixture was incubated at 40 °C until fusion, and separation of the two phases was then carried out by centrifugation for 10 min at 3500 rpm. The aqueous phase was recovered with a pipette and used for serial dilutions. Milk and *Raib* samples were serially diluted in 1/4 Ringer's solution, and inoculated on appropriate media.

Concerning hygienic quality assessment, total aerobic mesophilic bacteria were enumerated on plate count agar (Condalab, Madrid, Spain) after incubation at 30 °C for 72 h [21], while total and thermotolerant coliforms were enumerated using violet red bile lactose agar (Condalab, Spain) after incubation at 37 and 44 °C for 48 h, respectively [22].

Sulfite reducing anaerobic bacteria were enumerated on meat liver agar (Condalab, Madrid, Spain) after incubation at 37 °C for 48 h [23].

Coagulase positive staphylococci were enumerated on Baird Parker agar (Condalab, Madrid, Spain) after incubation at 37 °C for 24 h followed by confirmation of typical colonies of *Staphylococcus aureus* after microscopic characterization, Gram staining, catalase, and DNase production tests [24]. *Salmonella* detection was performed as follows: briefly, 25 g of each sample was homogenized with 225 mL of buffered peptone water (Condalab, Madrid, Spain) and incubated at 37 °C for 18 h followed by an enrichment in Müller–Kauffmann tetrathionate and selenite cystine broths at 37 °C and 45 °C for 24 h. Enrichment cultures were then plated on Hektoen agar and brilliant green bile lactose agar (Condalab, Madrid, Spain) and incubated at 37 °C for 24 h [25].

### 2.2.2. Enumeration and Isolation of Lactic Acid Bacteria and Yeasts

Lactic acid bacteria (LAB) were enumerated on MRS agar (Condalab, Madrid, Spain) and incubated anaerobically at 30 °C for 72 h, while yeast and molds were enumerated on Sabouraud chloramphenicol agar (Condalab, Madrid, Spain) incubated at 25 °C for 3 to 7 days. LAB and yeast colonies were randomly picked from agar plates containing between 30 and 300 colonies, then purified by successively restreaking them twice using the same medium. In addition, presumptive LAB isolates were subjected to microscopic observation, Gram staining, and catalase tests. Overall, a total of 121 lactic acid bacteria and 102 yeast isolates were obtained from the studied samples. Isolates were stored at −20 °C in MRS for lactic acid bacteria and BHI broth containing 30% (*v/v*) glycerol for yeast prior to molecular identifications.

### 2.2.3. Identification of Lactic Acid Bacteria and Yeast Isolates

M13 RAPD-PCR fingerprinting was first used for isolate dereplication based on their respective band patterns. Freshly grown colonies scraped from MRS or Sabouraud dextrose agar and incubated as described above, were suspended in 200 µL sterile water and stored at −20 °C. Total DNA was extracted using the FastDNA Spin kit following manufacturer's instructions (MP Biomedicals, Illkirch-Graffenstaden, France). RAPD-PCR fingerprinting was performed using M13 primer (5'-GAGGGTGGCGGCTCT-3') [26]. DNA amplification was carried out in an Analytik Jena thermal cycler using the following conditions: 95 °C for 5 min; 45 cycle; 95 °C for 1 min, 36 °C for 1 min, and a final extension at 72 °C for 4 min. PCR sample aliquots (10 µL) were analyzed using 1.2% (*w/v*) agarose gels (Promega, Charbonnières-les-Bains, France) in 1X TAE buffer at 120 V for 1.33 h and then visualized with Midori Green staining (Nippon Genetics, Düren, Germany). RAPD band patterns were analyzed using the BioNumerics software (version 6.6; Applied Maths) and 1–3 representative isolates (82 LAB and 48 yeast isolates) of each band pattern were selected for sequencing.

Selected LAB isolates were identified by 16S rRNA gene sequencing [27] using the primers 16S-F (5'-CCGAATTCGTCGACAACAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') and 16S-R (5'-CCCAGGATCAAGCTTACGGCTACCTTGTACGACTT-3') while yeast identification was performed by sequencing of the D1/D2 region of the 26S rRNA gene [28] with NL1 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3') and NL4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3') primers. PCR products were verified by agarose gel electrophoresis (0.8% *m/v* in 1X TAE buffer), and were sequenced by Eurofins sequencing platform (Eurofins Genomics, Ebersberg, Germany) using the same primers. The sequences were assembled into contigs using DNA baser software and the sequences were compared with the GenBank database using the "Basic Local Alignment Search Tool" (BLAST) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>, accessed on 1 December 2021) for assignment to the closest known relatives.

### 2.3. Metataxonomic Analysis of Bacterial and Fungal Communities

#### 2.3.1. Sample Preparation and DNA Extraction

Prior to DNA extraction from *Smen* or butter samples, a 20-g aliquot was solubilized with 90 mL of 2% trisodium citrate previously heated to 42 °C, then the mixture was homogenized for 3 min in a Stomacher Bag® (Interscience, Saint Nom la Bretèche, France). Aliquots of 50 mL were centrifuged at 8420 × g for 15 min at 4 °C and the supernatant and fat layer were removed. For milk and *Raib* samples, pellets stored at −20 °C and obtained as described above were solubilized in 10 mL of 2% trisodium citrate previously heated at 42 °C and vortexed vigorously, and the mixture was then centrifuged at 8420 × g for 15 min at 4 °C. Pellets from swab samples stored at −20 °C were processed directly.

Total DNA extraction was performed using the DNeasy® Blood and Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Germany) with an additional enzymatic lysis step as described by Penland et al. [29]. Briefly, after thawing pellets at room temperature, they were resuspended in 400 µL of lysis buffer (Tris-HCl 20 mM at pH 8.0, EDTA 2 mM, 1% Triton X-100 supplemented with 20 mg/mL lysozyme and 50 U mutanolysin). Rnase A (10 µL from a 1 mg/mL stock solution) and lyticase (10 µL at 200 U) were added separately to each sample. Samples were then incubated at 37 °C for 2 h and the mixture was gently shaken at regular time-intervals. After enzymatic treatment, a mechanical lysis step was performed after addition of 300 mg of zirconium beads using a bead mill (MM400, Retsch GmbH, Haan, Germany) set to a speed of 30 Hz for 1 min. A final treatment with proteinase K (20 mg/mL) was applied for 1 h at 54 °C. Remaining extraction and purification steps were performed according to the manufacturer's instructions. DNA quantification was performed with Nanodrop spectrophotometer and DNA was stored at −20 °C.

#### 2.3.2. PCR and Metagenetic Sequencing Conditions

PCR was carried out using the primers S-D-bact-0341-b-S-17 (5'-CCTACGGGNGG CWGCAG-3') and S-D-BAct-0785-a-A-21 (5'-GACTACHVGGGTATCTAATCC-3') to amplify the V3–V4 regions of the bacterial 16S rRNA [30]. For fungi, ITS3f (5'-GCATCGATGAA GAACGCAGC-3') and ITS4\_Kyo1 (5'-TCCTCCGCTTWTGTGTGC-3') primers were used to amplify the ITS2 region [31].

Amplifications and sequencing steps were successively performed in the same run at the Genome Quebec sequencing platform (McGill University, Montreal, QC, Canada) using Illumina Miseq PE300 230 technology to generate 2 × 300 bp reads. The sequences obtained in this study were submitted to DDBJ\EMBL\GenBank under the accession numbers provided in Tables S6 and S7.

#### 2.3.3. Bioinformatic and Phylogenetic Analysis

Sequence data were analyzed using the FROGS pipelines (Find Rapidly OTU with Galaxy Solution) with the Galaxy platform (<https://galaxy.migale.inra.fr/>, accessed on 26 March 2020). Paired-end reads were first merged using Flash, then reads were clustered into OTUs using the SWARM algorithm, with an aggregation distance of 3. Chimera removal was performed using the UCHIME method on the VSEARCH tool. Prior to taxonomic affiliation, an abundance filter was applied to screen sequence clusters; sequences with relative abundance below  $5 \times 10^{-5}$  were excluded. Finally, assignment was performed using the 16S SILVA Pintail100–138 and ITS UNITE Fungi 8.2 databases for 16S and ITS data, respectively [32]. Multi-affiliations were corrected using the NCBI website. OTU affiliated with chloroplast and mitochondrial sequences were removed from the 16S dataset.

#### 2.3.4. Biodiversity and Statistical Analysis

Alpha and beta diversity analyses were performed using the QIIME 2 pipeline [33] and the Calypso software tool v8.84 [34] after normalization to the lowest sequence number in a sample and total sum normalization of count data combined with square root transformation (Hellinger transformation). Principal Coordinate Analysis (PCoA) based on Bray–Curtis distances was performed to compare biodiversity distribution at the OTU

level between different categories (milk origin, geographical region, preparation method). Statistical differences between groups were evaluated using an Adonis test. Furthermore, the linear discriminant analysis (LDA) effect size (LEfSe) algorithm was applied to identify the representative bacterial and fungal taxa of each fermentation stage as well as of each collected sample.

#### 2.4. Physicochemical Analysis

pH was measured using a pH meter. For *Smen* and butter samples, 10 g was melted and thoroughly mixed, then the electrode was directly placed into the sample. Milk and *Raib* pH were measured by inserting the electrode into 10 mL samples. These measurements were performed in triplicate. Moisture content was determined by heating 5 g of each *Smen* sample in a 103 °C oven until a constant weight was reached. For acid index, 2.5 g of *Smen* sample was dissolved in a mixture of diethyl ether/ethanol (1:1, *v/v*) previously neutralized with a KOH solution (0.1 N). The mixture was then titrated with KOH solution (0.5 N) in the presence of phenolphthalein as a pH indicator [35].

Determination of salt content was performed as follows: 5 g of each sample was solubilized in 100 mL of boiling water and titrated with silver nitrate solution at 55 °C in the presence of potassium chromate as an indicator [36]. Titratable acidity for milk and *Raib* was determined using the AOAC method; 25 mL of each sample was titrated with a solution of NaOH (0.11 N) in the presence of phenolphthalein as an indicator [37].

Volatile compounds were analyzed by headspace (HS) gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) using a Turbomatrix HS-40 trap, Clarus 680 gas chromatograph, and Clarus 600 T quadrupole mass spectrometer (PerkinElmer, Courtaboeuf, France). Samples of  $2.5 \pm 0.05$  g were placed in 20 mL vials (Perkin Elmer vial) and stored at  $-20$  °C until analysis. Compounds were eluted on an Elite WAX ETR column (30 m  $\times$  0.25 mm  $\times$  0.25  $\mu$ m; Perkin Elmer, Waltham, MA, USA), with helium as the mobile phase, in the following conditions: initial temperature 35 °C maintained for 10 min, then increased at 5 °C/min up to 230 °C. The MS was operated within a mass range of *m/z* 29–206 and detection was by ionization impact at 70 eV [38].

Volatile compounds were identified by comparison to retention indexes, mass spectral data of standards, and from the NIST 2008 Mass Spectral Library data (Scientific Instrument Services, Ringoes, NJ, USA). GC-MS data were processed as described by Pogačić et al. [38]. Volatile compounds were quantified using the abundance of one selected mass fragment (*m/z*) in arbitrary units.

Differences between volatile profiles for each sample were investigated by comparing the abundance of identified compounds using principal component analysis under R software. Hierarchical clustering of the identified compounds was performed in order to investigate their abundance and dynamics in each sample using Ward's minimum variance linkage and the Euclidian distance method with R software.

#### 2.5. Correlation Analyses between Microbial Diversity and Volatile Profiles

In order to define the relationship between microbial diversity and aroma production, a Spearman rank correlation test was performed between the culture-independent and volatile compound data; *p* values were adjusted using Benjamini–Hochberg correction and significance level was set at 0.05 [39]. Results for species showing at least one significant correlation were visualized on a heat-map with hierarchical clustering using Ward's minimum variance linkage and the Euclidean distance method. Correlations with *p* > 0.05 were considered null and set to *r* = 0. All analyses were performed with R software using the FactoMiner, Factoextra, Hmisc, Psych, and ggplots packages [40,41].

### 3. Results

#### 3.1. Microbial Diversity and Biochemical Profiles of *Smen* Samples Produced in Algerian Households

##### 3.1.1. Safety and Hygienic Quality

The fifteen *Smen* samples satisfied all tested safety and hygienic quality criteria as coagulase-positive staphylococci counts were below  $2 \log_{10}$  CFU/g, *Salmonella* spp. were absent, and total and thermotolerant coliforms as well as sulfite-reducing anaerobic bacteria were below their respective detection thresholds (Table 2). Total aerobic mesophilic bacteria were only detected in seven samples. All samples except O1 were produced using the salting method; counts varied between 3.2 and  $5.4 \log_{10}$  CFU/g. Lactic acid bacteria were enumerated for the same seven samples, with counts reaching up to  $6.7 \log_{10}$  CFU/g. Among these samples, two were characterized by the presence of yeasts, with counts up to  $4.7 \log_{10}$  CFU/g.

**Table 2.** Physicochemical properties and microbial counts (log<sub>10</sub> CFU/g) of the fifteen different *Smen* samples produced in Algerian households.

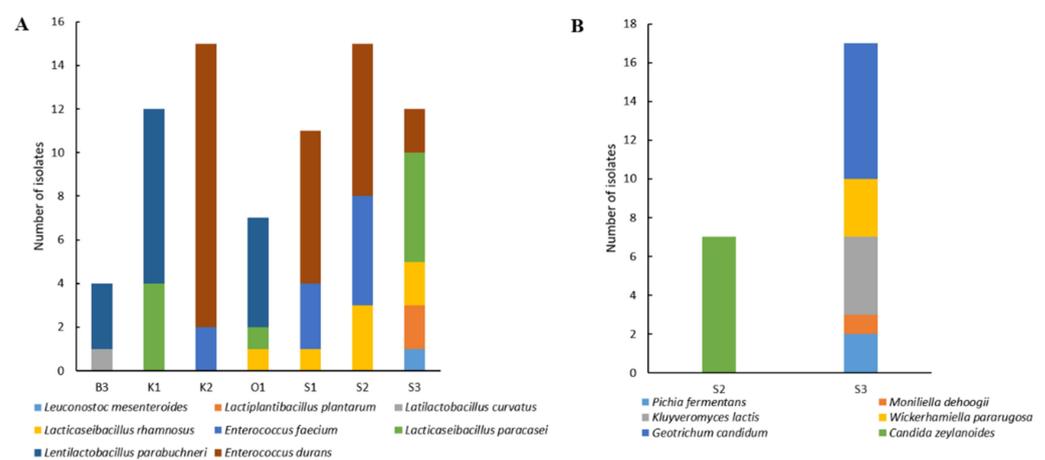
Samples	pH	Moisture (%)	Acid Index (mg KOH/g)	Salt Content (%)	Total Aerobic Mesophilic Bacteria	Total Coliforms	Thermo-Tolerant Coliforms	LAB <sup>1</sup>	Yeast and Molds	Coagulase-Positive Staphylococci	<i>Salmonella</i> spp.	Sulphite-Reducing Anaerobic Bacteria
B1	3.1 ± 0.0	19.9	153.7 ± 1.7	ND <sup>1</sup>	<1	<1	<1	<1	<2	<2	n.d. <sup>3</sup>	n.d.
B3	3.5 ± 0.0	12.2	35.9 ± 0.0	ND	4.5	<1	<1	2.3	<2	<2	n.d.	n.d.
B4	3.4 ± 0.0	12	40.3 ± 0.1	ND	<1	<1	<1	<1	<2	<2	n.d.	n.d.
B5	3.6 ± 0.0	12.6	31.4 ± 0.0	ND	<1	<1	<1	<1	<2	<2	n.d.	n.d.
Bi3	3.8 ± 0.0	0.8	19.1 ± 1.1	ND	<1	<1	<1	<1	<2	<2	n.d.	n.d.
E10	ND	ND	ND	ND	<1	<1	<1	<1	<2	<2	n.d.	n.d.
Jn	4.3 ± 0.0	0	3.9 ± 0.1	0.1 ± 0.0	<1	<1	<1	<1	<2	<2	n.d.	n.d.
K1	3.3 ± 0.0	12.7	6.7 ± 0.0	3.3 ± 0.0	5.2	<1	<1	5.1	<2	<2	n.d.	n.d.
K2	3.8 ± 0.0	9.0	14.6 ± 1.5	2.2 ± 0.0	4.1	<1	<1	3.1	<2	<2	n.d.	n.d.
O1	5.2 ± 0.0	0	2.2 ± 0.0	0.1 ± 0.0	3.2	<1	<1	3.3	<2	<2	n.d.	n.d.
O3	ND	0	2.2 ± 0.0	ND	<1	<1	<1	<1	<2	<2	n.d.	n.d.
S1	3.3 ± 0.0	12.8	3.3 ± 0.0	7.4 ± 0.1	3.7	<1	<1	4.5	<2	<2	n.d.	n.d.
S2	3.6 ± 0.0	7.3	3.6 ± 0.0	3.9 ± 0.9	5.3	<1	<1	5.5	4.2	<2	n.d.	n.d.
S3	4.4 ± 0.0	10.5	4.4 ± 0.6	1.4 ± 0.0	5.4	<1	<1	6.7	4.7	<2	n.d.	n.d.
S5	ND	2.5	43.8 ± 1.9	ND	<1	<1	<1	<1	<2	<2	n.d.	n.d.

ND, Not Determined due to limited sample size; <sup>1</sup> LAB, lactic acid bacteria; n.d., not detected.

### 3.1.2. Lactic Acid Bacteria and Yeast Diversity Using Culture-Dependent Analysis

A total of 76 LAB and 25 yeast isolates were obtained from seven and two *Smen* samples, respectively. Following M13 RAPD-PCR dereplication, 52 LAB and nine yeast isolates representing the different band patterns and considered different strains, were identified to the species level by sequencing either the 16S rRNA or D1-D2 domain of the 26S rRNA genes, respectively.

As shown in Figure 2A, among LAB, enterococci and lactobacilli represented 51.31% and 47.36%, respectively, of the total isolates, and were thus clearly dominant. For enterococci, two species were identified, *Enterococcus faecium* and *Enterococcus durans*, which were dominant in three samples, S1, S2, and K2. Lactobacilli diversity was much higher and they dominated in the four remaining samples with, in decreasing order of frequency, *Lentilactobacillus parabuchneri*, *Lacticaseibacillus paracasei*, *Lacticaseibacillus rhamnosus*, *Lactiplantibacillus plantarum*, and *Latilactobacillus curvatus*. One *Leuconostoc mesenteroides* isolate was identified in one sample.



**Figure 2.** Bacterial (A) and fungal (B) diversity in *Smen* samples collected from Algerian households determined by culture-dependent analyses.

Concerning yeast diversity (Figure 2B), six species were identified. Sample S2 contained only one species, *Candida zeylanoides*, while five species were identified in the S3 sample. *Geotrichum candidum* was the most dominant, followed by *Wickerhamiella pararugosa*, *Kluyveromyces lactis*, *Pichia fermentans*, and *Moniliella dehoogii*.

### 3.1.3. Microbial Diversity Using Metagenetic Analyses

#### Bacterial Diversity

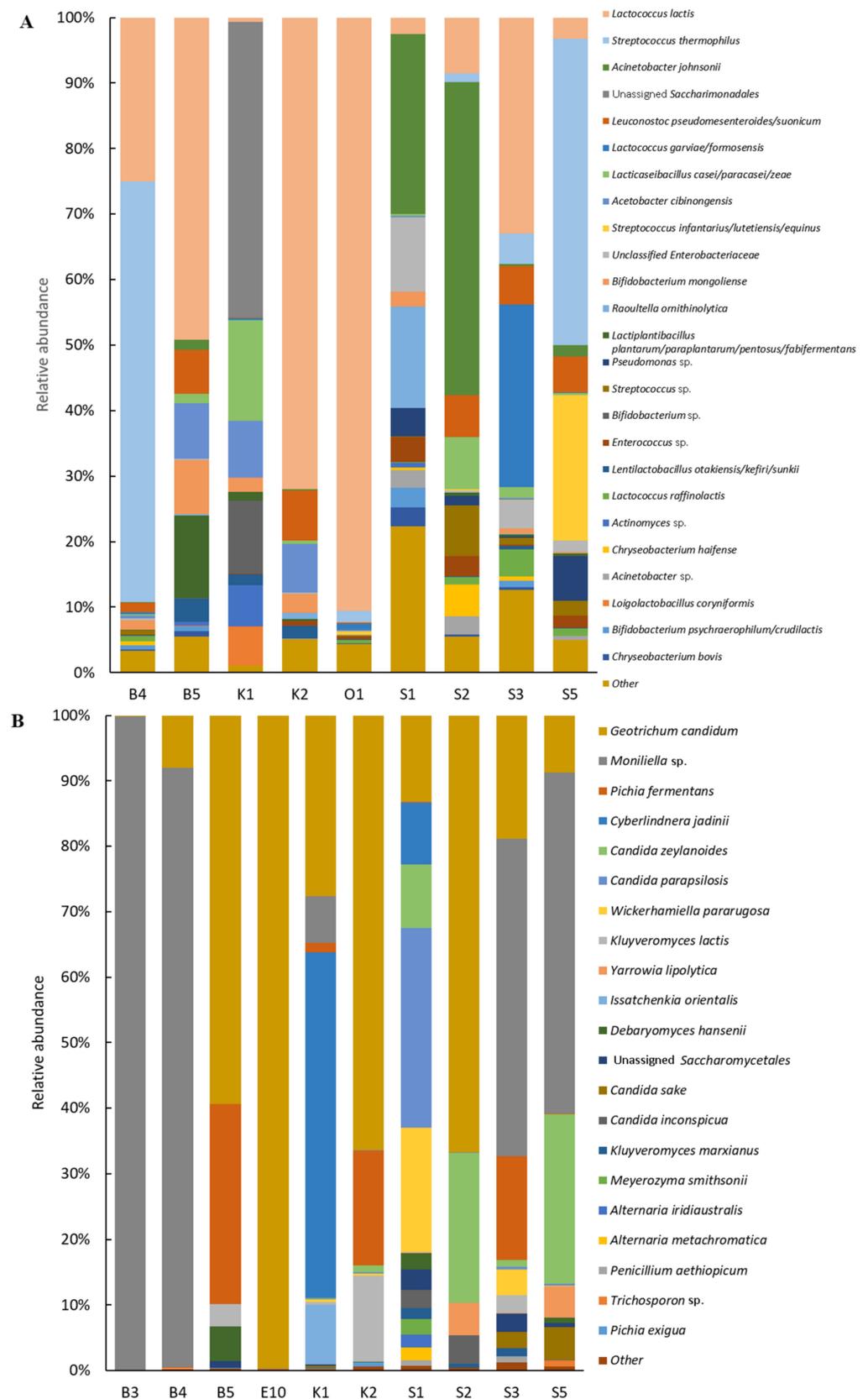
After total DNA extraction from the studied *Smen* samples, nine samples (B4, B5, K1, K2, O1, S1, S2, S3, S5) yielded sufficient DNA for metagenetic analysis. With the exception of O1, all samples were prepared using the salting method, and six (K1, K2, O1, S1, S2, S3) had bacterial populations detectable by culturing. From these nine *Smen* samples, a total of 297,203 quality filtered sequences were generated, which were clustered into 160 OTUs. After normalization to the lowest read number in a sample (17,291), the number of observed species (richness) ranged between 44 and 110, while the Chao1 index (estimated richness) ranged from 45 to 97.5, evenness from 0.15 to 0.69, the Shannon index from 0.56 to 3.14, and Simpson's index of diversity from 0.18 to 0.90 (Table S1). Significant differences within bacterial communities were found taking into account categorical variables that were correctly represented among the studied samples. Indeed, the Chao1 index was significantly higher in *Smen* samples made from cow's milk than in *Smen* obtained from goat's milk ( $p < 0.05$ ). In addition, the Chao1 and Simpson indices were significantly different ( $p < 0.05$ ) according to the region of origin, with those collected from Setif having the highest values for both indices. It is worth mentioning that all *Smen* samples from

the Setif region were made out of cow's milk. Finally, sample O1 (prepared using a heat-treatment method) harboured the lowest species richness, Chao1, and Simpson index.

Compositional analysis of *Smen* samples revealed that OTUs belonged to eight phyla, with *Bacillota* representing 67.5% of total sequences followed by *Pseudomonadota* (20.4%), *Actinomycetota* (5.7%), Candidate Phyla Radiation (CPR)/"Patescibacteria" (5%), and *Bacteroidota* (1.4%). As shown in Figure 3A, which represents the top 25 species distribution in all samples, *Smen* samples harboured complex bacterial communities. Overall, *Lactococcus lactis*, *Streptococcus thermophilus*, and *Acinetobacter johnsonii* were the main representative species. *L. lactis* was dominant in the B4, B5, K2, S3, and O1 samples, with a relative abundance of 25.0%, 49.2%, 72.0%, 33.0%, and 90.6%, respectively, although it was observed in smaller proportions in K1 (0.7%), S2 (8.5%), S1 (2.5%), and S5 (3.3%). Other *Lactococcus* species included *Lactococcus raffinolactis* and *Lactococcus garvieae/formosensis*, the latter having a high relative abundance in the S3 sample. *S. thermophilus* was present in five samples, B4, S3, S2, O1, and S5, and was dominant in B4 (64.2%) and S5 (46.7%). Another *Streptococcus* sp. related to *Streptococcus infantarius/lutetiensis/equinus* was identified in sample S5. *A. johnsonii* dominated in S1 and S2, with a relative abundance of 27.5 and 47.7%, respectively, while an unidentified member of the *Saccharimonadales* order belonging to the Candidate Phyla Radiation (CPR)/"Patescibacteria" was dominant in the K1 sample. In contrast to the culture-dependent results, lactobacilli and enterococci were not the most dominant taxa, although reads from several *Enterococcus* and *Lactobacillus* related-species were found to be part of the top 25 taxa present in these *Smen* samples. Other species encountered in the different samples, with mean relative abundances over 1% of total sequences, included *Bifidobacterium*, *Acetobacter*, an unassigned member of the *Enterobacteriaceae* family, *Pseudomonas*, *Raoultella*, *Enterococcus*, and *Chryseobacterium* spp.

Beta-diversity among *Smen* bacterial communities was investigated using PCoA based on Bray–Curtis distances; variance analysis of these distances was then performed using a multivariate permutation Adonis test. At the OTU level, milk origin was the only factor which significantly shaped bacterial communities ( $p < 0.05$ ,  $R^2 = 0.257$ ). It should be noted that the effect of *Smen* preparation methods on bacterial community structuring could not be evaluated as only one sample prepared according to that method was included in our dataset.

To further identify bacterial taxa which were over- or underrepresented in *Smen* produced from cow or goat milk, a linear discriminant analysis (LDA) coupled with effect size measurements (LEfSe) was performed at the genus, species, and OTU levels. Six genera, twelve species, and seventeen OTUs exhibited significantly different abundances depending on milk origin. Indeed, the microbiota of goat milk *Smen* were enriched in OTUs related to *Acinetobacter cibirongensis*, *Lentilactobacillus otakiensis/kefiri/sunkii*, and *Levilactobacillus brevis*, while those from cow's milk were enriched in OTUs from species of the genera *Streptococcus*, *Chryseobacterium*, *Pseudomonas*, *Enterococcus*, *Serratia*, *Acinetobacter*, *Kocuria*, and *Brachybacterium*.



**Figure 3.** Bacterial (A) and fungal (B) diversity in *Smen* samples from different Algerian households determined by a metagenetic approach.

### Fungal Diversity

The ITS2 region metabarcoding analysis generated a total of 646,883 quality-filtered sequences from ten samples (B3, B4, B5, E10, K1, K2, S1, S2, S3, S5) clustered into seventy OTUs. After rarefaction to the lowest number of sequences in a sample (50,092), richness ranged from 21 to 53, while the Chao1 index ranged from 19 to 54, evenness from 0.007 to 0.56, the Shannon index from 0.02 to 2.16 and Simpson's index of diversity from 0.004 to 0.83 (Table S2). Comparison of alpha-diversity indices according to categorical variables showed that the Shannon and Simpson indices were significantly different according to geographical origin, as samples collected from Setif and Khenchela presented the highest values. Sample E10, which was prepared using the heat-treatment method, harboured the lowest alpha-diversity indices.

Fungal communities from *Smen* samples were dominated by *Ascomycota* and *Basidiomycota* members, which represented 69.9 and 30.1% of total sequences, respectively. Figure 3B shows fungal species distribution in the different *Smen* samples. Overall, *Smen* mycobiota of each sample was dominated by one to five species. Interestingly, samples such as S1 and S3 were characterized by much higher diversity than the other samples, with respectively twelve and nine species (relative abundances over 1%). *G. candidum* was the only species found at high relative abundance (ranging from 8% to 99.7%) in all samples with the exception of sample B3, followed by *Moniliella* sp. (abundances over 1% in five out of ten samples). This species was the most dominant in samples where *G. candidum* relative abundance was low. Other abundant species included *P. fermentans*, *C. zeylanoides*, *K. lactis*, *Cyberlindnera jadinii*, and *W. pararugosa*.

Concerning beta-diversity analysis, as previously observed for bacterial communities, milk origin was the only factor which significantly shaped *Smen* mycobiota ( $p < 0.05$ ,  $R^2 = 0.258$ ). LefSe analysis at the OTU level showed that *Smen* prepared from goat milk were enriched in *Pichia exigua* and *K. lactis* OTUs, whereas an OTU related to *Y. lipolytica* was more prevalent in *Smen* made from cow's milk.

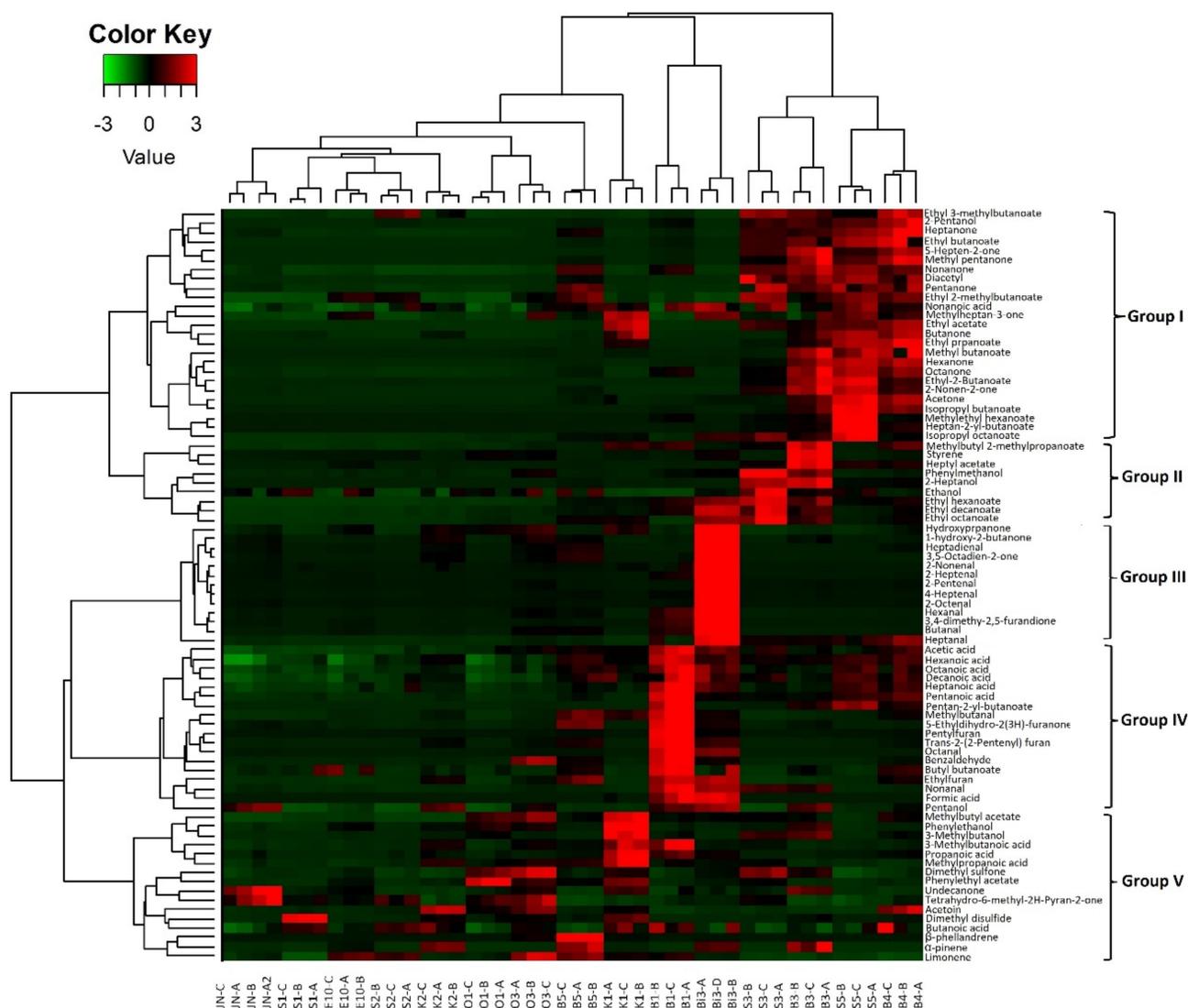
#### 3.1.4. Physico-Chemical Analysis and Volatile Profiles

The physico-chemical properties of the studied *Smen* samples are shown in Table 2. The pH values ranged between 5.2 and 3.1, and were generally below pH 4, higher pH values being found in <3 months old *Smen* samples. Moisture values did not exceed 19.9% and acid index values ranged between 2.2 and 153.7 mg KOH/g, with increased values in samples with increased maturation times. This was especially true for the B1 sample, which was matured for ten years. Salt content was variable and found between 7.4 and 0.1%, with the lowest values in two samples (i.e., Jn and O1) prepared using the heat-treatment method.

Volatile compound analyses by HS-GC-MS identified 81 compounds belonging to different families, i.e., esters (20), ketones (20), aldehydes (13), fatty acids (12), alcohols (7), furans (3), terpenes (3), styrene (1), and others (2) (Table S3 and Figure S1).

Based on the abundance distribution of volatile compounds for each sample, five different groups could be differentiated (Figure 4). A first group gathered 25 compounds, mainly ketones (twelve compounds, e.g., pentanone, diacetyl, hexanone) and esters (eleven compounds, e.g., ethyl butanoate, ethyl acetate, methyl butanoate). One alcohol (2-pentanol) and one fatty acid (nonanoic acid) was identified in this group. These compounds were abundant in the B3, B4, and S5 samples, while only twelve of them were present at high abundances in the S3 sample. Group II gathered nine compounds. Among them, three compounds were present at high abundances in sample B3, i.e., methylbutyl-2-methylpropanoate, styrene, and heptyl acetate. The remaining compounds corresponded to alcohols ( $n = 3$ ) and esters ( $n = 3$ ) and were abundant in both B3 and S3 samples. Group III gathered thirteen compounds present at high abundances in the B1 sample. These compounds included nine aldehydes (e.g., heptadienal and 2-nonenal) and four ketones (e.g., hydroxypropanone, and 3,5-octadien-2-one). Group IV gathered eighteen compounds which were much more abundant in the B1 sample. These mainly corresponded to fatty

acids ( $n = 7$ , e.g., acetic acid, hexanoic acid, octanoic acid) and aldehydes ( $n = 4$ ; e.g., benzaldehyde and nonanal). The same fatty acids, except for pentanoic acid, were abundant in the B3 sample, whereas ethylfuran, nonanal, formic acid, and pentanol were found at high abundances in both the B1 and B3 samples. Group V gathered sixteen compounds belonging to different families, i.e., ketones, esters, alcohols, fatty acids, terpenes, and others. In this group, the K1 sample was associated with methylbutyl acetate, phenylethanol, 3-methylbutanol, 3-methylbutanoic acid, propanoic acid, methylpropanoic acid, phenylethyl acetate, dimethylsulfone, and undecanone. Acetoin was related to the K2, B4 and O3 samples. In addition, the O3 sample was associated with dimethyl sulfone, phenylethyl acetate, undecanone, and tetrahydro-6-methyl-2H-pyran-2-one, while the O1 sample was associated with dimethyl sulfone and phenylethyl acetate and Jn was associated with two ketones, undecanone and tetrahydro-6-methyl-2H-pyran-2-one.



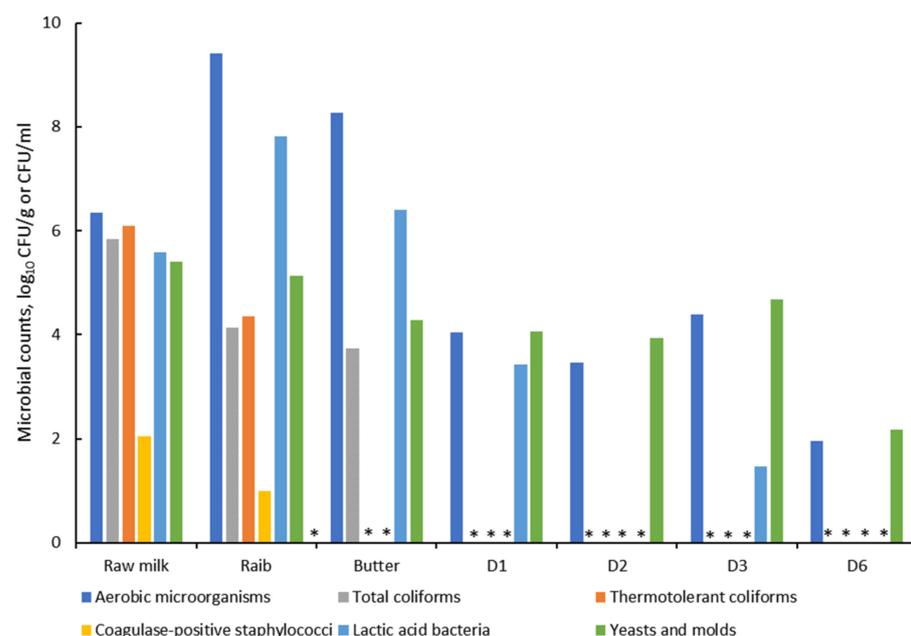
**Figure 4.** Normalized heat-map representation of volatile abundances in fifteen different *Smen* samples collected from Algerian households. Hierarchical clustering was performed using Ward's Linkage and Euclidean distance.

Terpenes were found at high abundances in the B5 sample, i.e.,  $\beta$ -phellandrene,  $\alpha$ -pinene, limonene. Limonene was found at high abundance in the O3 sample and at lower levels in E10 and S2.

### 3.2. Microbial Dynamics and Diversity and Biochemical Profiles throughout Different Preparation Stages of *Smen*

#### 3.2.1. Safety and Hygienic Quality

In the second part of this study, the microbial diversity and dynamics during *Smen* manufacture were investigated using culture-dependent and culture-independent approaches. As shown in Figure 5, there were important variations in microbial counts at the different *Smen* production stages. Concerning total aerobic microorganisms and LAB, their counts increased during raw milk fermentation to *Raib*, with counts reaching 9.42 and 7.81  $\log_{10}$  CFU/g, respectively. A slight decrease in the latter populations was observed in butter, followed by a gradual decrease during *Smen* maturation. It should be underlined that LAB were found at very low populations, i.e., 1.41  $\log_{10}$  CFU/g, in *Smen* matured for three months (D3), and were below the detection limit in *Smen* matured for two (D2) and six (D6) months. In contrast, yeast and mold counts remained stable during *Smen* manufacture up to three months of maturation, with counts ranging from 4 to 5  $\log_{10}$  CFU/g. For total and thermotolerant coliforms, counts were high in raw milk ( $\sim 6 \log_{10}$  CFU/mL), decreased in *Raib*, and were below detection thresholds in *Smen* matured for one month (D1) and butter for total coliforms and thermotolerant coliforms, respectively. Coagulase-positive staphylococci followed the same trend, with an initial 2  $\log_{10}$  CFU/mL population in raw milk, and were not detected after butter making. Noteworthily, *Salmonella* spp. and sulfite-reducing anaerobic bacteria were systematically absent during all *Smen* manufacturing steps.



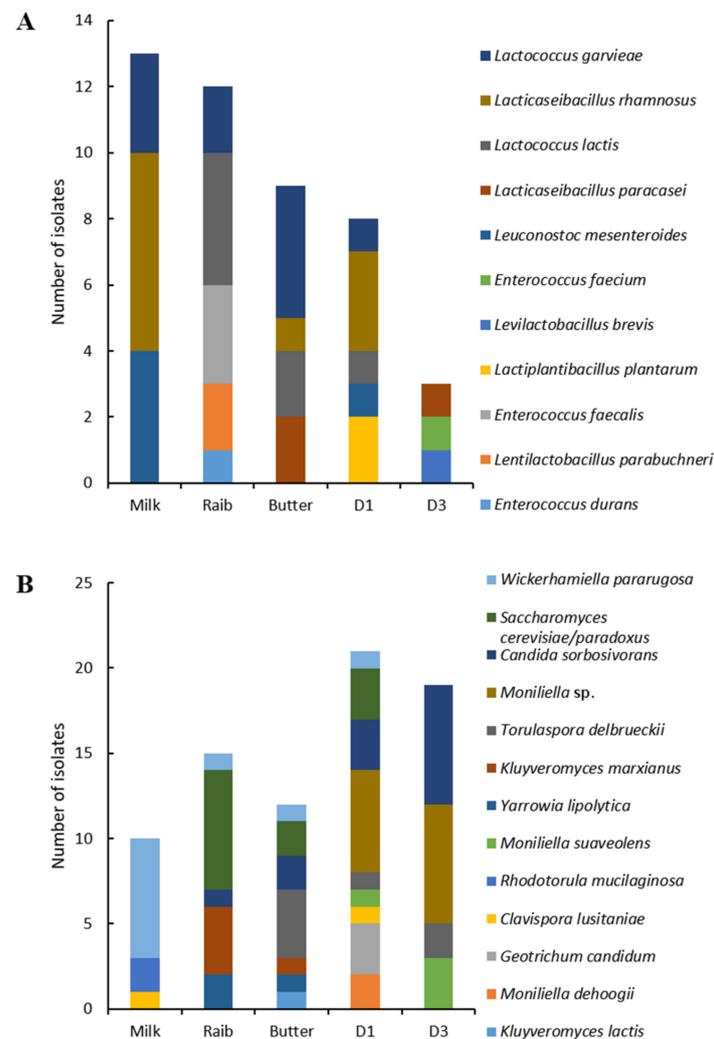
**Figure 5.** Microbial counts during the different preparation stages of *Smen* (D1, D2, D3, D6: *Smen* after one, two, three, and six months of maturation, respectively). \* indicates counts below the detection threshold.

#### 3.2.2. Lactic Acid Bacteria and Yeast Diversity Using Culture-Dependent Analysis

A total of 45 LAB and 77 yeast isolates were obtained from different preparation stages (raw milk, *Raib*, butter and *Smen/Dhan* with different maturation times, i.e., one and three months) of which 30 LAB and 39 yeast isolates representative of the different RAPD patterns were identified by sequencing.

Concerning LAB diversity, eleven species including enterococci, lactobacilli, leuconostoc, and lactococci were identified, i.e., *E. faecium*, *E. durans*, *Enterococcus faecalis*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus*, *Levilactobacillus brevis*, *L. paracasei*, *L. parabuchneri*, *L. mesenteroides*, *L. lactis*, and *L. garvieae*. Shifts in LAB communities were observed throughout the different *Smen* preparation stages (Figure 6A). Indeed, while *L. rhamnosus*, *L. mesenteroides*, and *L. garvieae*

dominated in raw milk, *L. lactis*, *L. garvieae*, *L. parabuchneri*, *E. faecalis*, and *E. durans* were dominant in *Raib* and *L. paracasei*, *L. lactis*, *L. rhamnosus* and *L. garvieae* were dominant in butter. The latter three species were found in one-month matured *Smen* along with *L. mesenteroides*, previously isolated from raw milk. Only three isolates were identified in three-month matured *Smen*, and belonged to the *L. brevis*, *E. faecium*, and *L. paracasei* species.



**Figure 6.** Bacterial (A) and fungal (B) diversity during the different preparation stages of *Smen* (D1, D3: *Smen* after one and three months of maturation, respectively) determined by the culture-dependent approach.

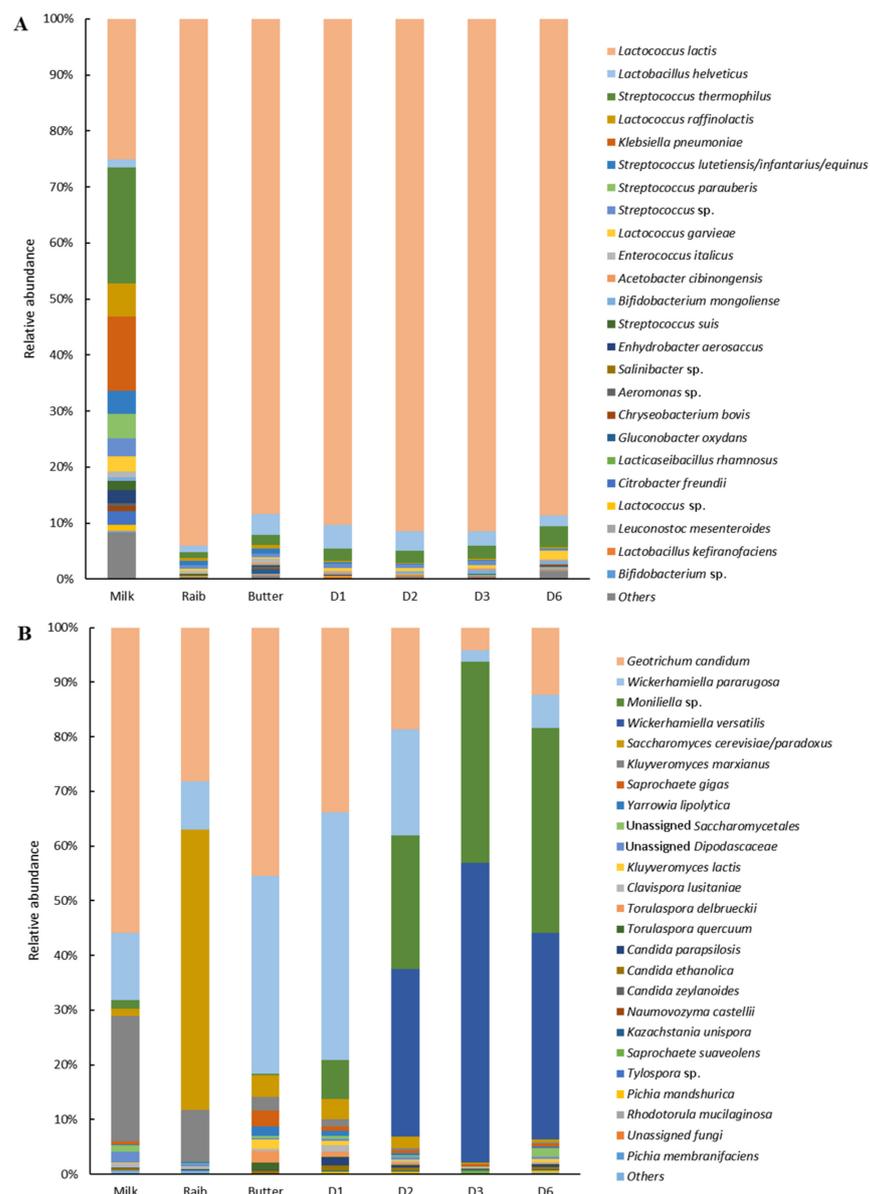
As shown in Figure 6B, yeast isolates collected throughout *Smen* manufacturing and maturation were assigned to thirteen different species, *Clavispora lusitaniae*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *W. pararugosa*, *Kluyveromyces marxianus*, *Saccharomyces cerevisiae/paradoxus*, *Y. lipolytica*, *Candida sorbosivorans*, *Torulopsis delbrueckii*, *K. lactis*, *G. candidum*, *M. dehoogii*, *Moniliella suaveolens*, and an unidentified *Moniliella* species. Noteworthily, the latter isolates which were dominant in one-month and three-month *Smen* samples likely correspond to a novel species, as their D1-D2 domain 26S rRNA gene sequences shared less than 95% similarity with *M. dehoogii*, the closest phylogenetic relative (data not shown). As previously observed for LAB, there were shifts in fungal communities during *Smen* manufacture and maturation. In raw milk, three dominant species were identified, *W. pararugosa*, *R. mucilaginosa*, *C. lusitaniae*, while in *Raib*, *R. mucilaginosa* and *C. lusitaniae* were no longer detected and instead the dominants yeasts were *S. cerevisiae* followed by *K. marxianus*, *Y. lipolytica*, *C. sorbosivorans*, and *W. pararugosa*. The butter mycobiota were quite similar to

that of *Raib* except that *T. delbrueckii* was detected in addition to the previously mentioned species. After one month of maturation, *Smen* harboured species previously found in raw milk, *Raib* and butter as well as other species that were not previously detected, i.e., *G. candidum* and *Moniliella* spp. Finally, *Smen* samples matured for three months were characterized by a high dominance of *Moniliella* spp. and *C. sorbosivorans*, while other species, e.g., *S. cerevisiae* and *G. candidum*, were no longer detected.

### 3.2.3. Microbial Diversity Using Culture-Independent Analysis Bacterial Diversity Using V3–V4 Metabarcoding Analysis

Metabarcoding analysis was performed at the different stages of *Smen* preparation. In addition, this analysis was applied on potent microbial reservoirs including added milk during churning, traditional churn surface, added salt and, *Smen* containers. The total number of filtered high-quality reads generated from all samples was 368,039; these were clustered into 104 OTUs. After rarefaction to the lowest sequence number in a sample (22,483), richness ranged between 53 to 75, while the Chao1 index ranged from 54 to 79, evenness from 0.12 to 0.64, the Shannon index from 0.67 to 3.95, and Simpson's index of diversity from 0.14 to 0.88 (Table S4). Considering only alpha-diversity indices of samples collected throughout *Smen* production and maturation, the raw milk bacterial microbiota were characterized by the highest species richness (75), Simpson index (0.88), evenness (0.64), and Shannon index (3.95). While species richness remained quite high after milk fermentation, with values between 53 (*Raib*) and 72 (butter), the Simpson, evenness and Shannon indexes of samples collected after milk fermentation, namely, *Raib*, butter and *Smen* after one, three, and six months maturation, decreased to values ranging from 0.14 to 0.24, 0.12 to 0.18, 0.67 and 1.1, respectively. This observation indicates that following raw milk fermentation, the bacterial microbiota of the latter samples were unequally distributed and less diverse, i.e., dominated by a relatively limited number of species.

This result was confirmed by the compositional analysis of samples throughout *Smen* manufacturing (Figure 7A). Indeed, raw milk harboured a complex bacterial community, with fourteen species present at a relative abundance >1%. These species corresponded on the one hand to members of the *Bacillota* phylum, including lactococci (*L. lactis*, *L. raffinolactis*, *L. garvieae*), streptococci (*S. thermophilus*, *Streptococcus lutetiensis/infantarius/equinus*, *Streptococcus parauberis*, *Streptococcus suis*), and to a lesser extent to enterococci (*Enterococcus italicus*) and lactobacilli (*Lactobacillus helveticus*). On the other hand, raw milk was characterized by the presence of members of the *Pseudomonadota* phylum either belonging to the *Enterobacterales* (i.e., *Klebsiella pneumoniae*, *Citrobacter freundii*) and *Pseudomonadales* order (i.e., *Enhydrobacter aerosaccus*). In contrast, the bacterial diversity of *Raib*, butter, and *Smen* samples during maturation was dominated by few species, with, in decreasing order of abundance, *L. lactis* (with relative abundances ranging from 88% to 91%), *L. helveticus*, and *S. thermophilus*. Other minor species (relative abundance < 1%) included those observed in raw milk, e.g., enterococci, other lactococci (i.e., *L. garvieae* and *L. raffinolactis*), lactobacilli species (i.e., *Lactobacillus kefirifaciens*) and *Leuconostoc* spp. (i.e., *L. mesenteroides*) as well as members of the *Pseudomonadota* phylum. Moreover, while bacterial species distribution in *Smen* containers was, as expected, quite similar to that of butter, *Smen* species distribution in milk added during churning, at the traditional churn surface, and in the added salt were quite different (Figure S2). In particular, the milk added during churning and the surface of the traditional churn were characterized by high relative abundances of *L. helveticus* and *L. raffinolactis* OTUs, respectively, whereas the salt bacterial community was dominated by OTUs related to *Haloparvum* and *Salinibacter* sp.



**Figure 7.** Bacterial (A) and fungal (B) diversity during *Smen* preparation stages (D1, D2, D3, D6: *Smen* after one, two, three, and six months of maturation, respectively) determined by a metagenetic approach.

#### Fungal Diversity Using ITS2 Metabarcoding Analysis

After filtering out low-quality and chimeric sequences, a total of 368,039 high-quality sequences were obtained and clustered into 78 OTUs. After rarefaction to the lowest number of sequences in a sample (39,443), the number of observed species (richness) ranged from 47 to 60, while the Chao1 index ranged from 49 to 90, evenness from 0.34 to 0.53, the Shannon index from 1.9 to 3.39, and Simpson's index of diversity from 0.64 to 0.82 (Table S5). Overall, comparison of alpha-indices from the different studied samples did not show any important variations, the only exception being the salt used for butter salting, which was characterized by a high Chao1 index (i.e., 90) compared to the other samples.

Regarding fungal diversity during *Smen* manufacturing steps, our results highlighted major shifts in the dominant fungi (Figure 7B). Indeed, while the raw milk mycobiota were dominated by *G. candidum*, *K. marxianus* and *W. pararugosa*, *Raib* was dominated by the latter three species as well as *S. cerevisiae/paradoxus*, which was present in raw milk at low relative abundance. In butter, both *G. candidum* and *W. pararugosa* remained dominant while

other species, including the other previously mentioned species as well as *C. lusitaniae*, *Saprochaete gigas*, *K. lactis*, *T. delbrueckii*, *Torulasporea quercuum*, and *Y. lipolytica*, were found at relative abundances over 1%. After one month maturation, the *Smen* mycobiota were quite similar to the one observed for butter, except that a *Moniliella* sp. was found at 7.2% relative abundance. After two, three, and six months maturation, the latter species became progressively dominant together with *Wickerhamiella versatilis*, while the relative abundance of *G. candidum* and *W. pararugosa* decreased. LefSe analysis at the OTU level confirmed that *Smen* samples were enriched with *Moniliella* sp. and *W. versatilis*-related OTUs. Interestingly, regarding potent fungal reservoirs encountered during *Smen* manufacturing (Figure S2), most harbored a high relative abundance of *G. candidum* (with the exception of the *Smen* containers) and *W. pararugosa*. In addition, the churning equipment and added milk during churning harboured high relative abundances of *S. gigas* and *K. marxianus*, while the salt and *Smen* containers appeared to be important sources of *Moniliella* sp. and to a lesser extent of *W. versatilis*.

### 3.2.4. Physico-Chemical Analysis and Volatile Profiles

Physico-chemical changes during *Smen* preparation are shown in Table 3. The pH value of raw milk was 6.7 and, after 48 h fermentation, *Raib* pH was 4.2 and associated with an increase in Dornic acidity from 16.3 to 47. After churning, butter pH slightly increased to 4.5, then, after *Smen* preparation and one month maturation, decreased by ~0.5 units to reach 4 and remained constant after six months maturation. The acid index value for butter was 6.7 mg KOH/g. It increased during *Smen* maturation and ranged between 10.1 and 21.1 mg KOH/g after one and six months, respectively. Moisture values slightly decreased before and after *Smen* preparation. They varied between 22.6% for butter and between 15.9% and 14.8% after one and six months' maturation, respectively. Prior to salting, butter contained 0.2% while after salting and one month maturation, it reached 1% before slowly increasing to 1.3% at the end of maturation.

**Table 3.** Physicochemical properties of samples collected during *Smen* manufacture stages.

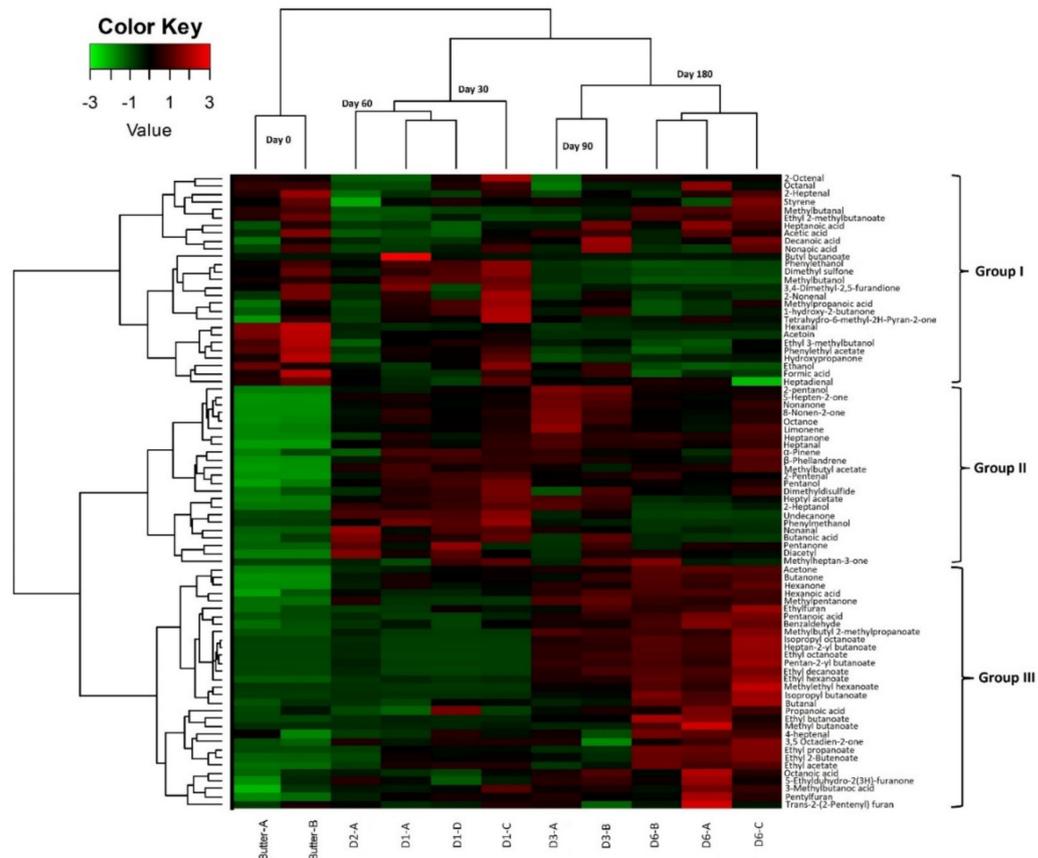
Sample	pH	Moisture (%)	Dornic Acidity (D°)	Salt Content (%)	Acid Index (mg KOH/g)
Milk	6.7 ± 0.0	ND	16.3 ± 0.0	ND	ND
Raib	4.2 ± 0.0	ND	47.0 ± 0.0	ND	ND
Butter	4.5 ± 0.1	22.6	ND	0.20 ± 0.0	6.7 ± 0.0
1-month <i>Smen</i> (D1)	4.0 ± 0.1	15.9	ND	1.10 ± 0.0	10.1 ± 1.1
2-month <i>Smen</i> (D2)	4.3 ± 0.1	15.1	ND	1.10 ± 0.0	18.4 ± 0.0
3-month <i>Smen</i> (D3)	4.1 ± 0.0	15.0	ND	1.20 ± 0.0	19.1 ± 1.1
6-month <i>Smen</i> (D6)	4.0 ± 0.0	14.8	ND	1.30 ± 0.1	21.1 ± 0.3

ND, Not Determined.

During *Smen* maturation, a large number of volatile compounds were generated (Figure S3). A total of 81 compounds were identified, as described above in Section 3.1.4. Sample projection using PCA (Figure S4) showed that the first two dimensions, which accounted for 44.10% and 21.02%, respectively, separated samples according to their maturation time (0 maturation time (butter) on the left to 180 days (D6) maturation on the right). As shown in Figure S4, the matured samples (D3, D6) were found in the right quadrant, while the other samples with 30 (D1) and 60 (D2) maturation days were identified in the upper quadrant. Butter samples formed a separate group in the lower left quadrant. The D3 and D6 samples were associated with many compounds, mainly esters ( $n = 16$ , e.g., methylbutyl acetate, ethyl acetate, methyl butanoate), ketones ( $n = 15$ , e.g., diacetyl, octanone, acetone) as well as other compounds such as alcohols ( $n = 2$ , e.g., 2 pentanol, pentanol), aldehydes ( $n = 5$ , e.g., butanal, benzaldehyde, heptanal), fatty acids ( $n = 6$ , e.g., heptanoic, hexanoic, decanoic acids), furans ( $n = 2$ , i.e., ethylfuran, pentylfuran), and terpenes ( $n = 3$ , i.e.,  $\alpha$ -pinene,  $\beta$ -phellandrene, limonene), while the D1 and D2 samples were specifically associated with certain alcohols (methylbutanol, phenylethanol, ethanol), aldehydes (hep-

tadienal, 2 nonenal), esters (phenylethyl acetate, ethyl-3-methyl butanoate), fatty acids (formic acid), and ketones (dimethyl-2,5- furandione, hydroxypropanone, acetoin, dimethyl sulfone). On the other hand, the butter sample was linked to heptanal, methylbutanal, ethyl 2-methylbutanoate, and acetic acid.

In order to investigate volatile compound dynamics during maturation, a heatmap representation was performed presenting the 81 volatile compounds by hierarchical clustering analysis (Figure 8). We were able to define three different clusters. The first group included 27 compounds: seven aldehydes (e.g., 2 octenal, 2 heptenal, hexanal), six fatty acids (e.g., heptanoic acid, decanoic acid, acetic acid), and five ketones (e.g., hydroxypropanone, acetoin, 1- hydroxy-2-butanone) together with four esters, three alcohols, one sulfone, and styrene. Certain aldehydes (2 octenal, octanal, 2 heptenal, hexanal, heptadienal) were found to be more abundant in raw butter, and their abundance gradually decreased between the first and third month of maturation. However, their abundance increased (except for hexanal) at six months maturation along with an increase in branched esters, free fatty acids, and styrene (methylbutanal, ethyl 2- methylbutanoate, butyl butanoate, heptanoic acid, acetic acid, nonanoic acid,). A slight decrease in acetoin, hydroxypropanone, phenylethyl acetate, ethanol, and formic acid was noted at the end of maturation compared to raw butter. The first month of maturation (D1) was characterized by the abundance of several compounds, mainly ketones ( $n = 3$ ), esters ( $n = 2$ ), aldehydes ( $n = 3$ ), and alcohols ( $n = 3$ ). Group II gathered 23 compounds, mainly ketones, i.e., 5-hepten-2-one, nonanone, 8-nonen-2-one, and octanone, the abundance of which increased from the first month of *Smen* maturation and continued to slightly increase to the end of maturation. The same trend was observed for 2-pentanol, limonene, heptanal,  $\alpha$ -pinene,  $\beta$ -phellandrene, and methylbutyl acetate. At the mid-maturation stage (30 and 60 days), several compounds, i.e., pentanone, diacetyl, methylheptan-3-one, pentanol, 2-heptanol, nonanal, 2-heptanal, butanoic acid, heptyl acetate, phenylmethanol, undecanone, and dimethyl disulfide, presented their highest abundance before slightly decreasing at the end of maturation (90 days and 180 days). Finally, group III gathered 31 compounds including fourteen esters (e.g., isopropyl octanoate, ethyl octanoate, methylethyl hexanoate), six ketones (e.g., acetone, butanone, hexanone), five fatty acids (e.g., hexanoic acid, pentanoic acid, propanoic acid), three aldehydes (benzaldehyde, butanal, 4- heptenal), and three furans (ethylfuran, pentylfuran, trans-2,2-pentyl furan). The abundance of these compounds was the highest at the end of maturation.

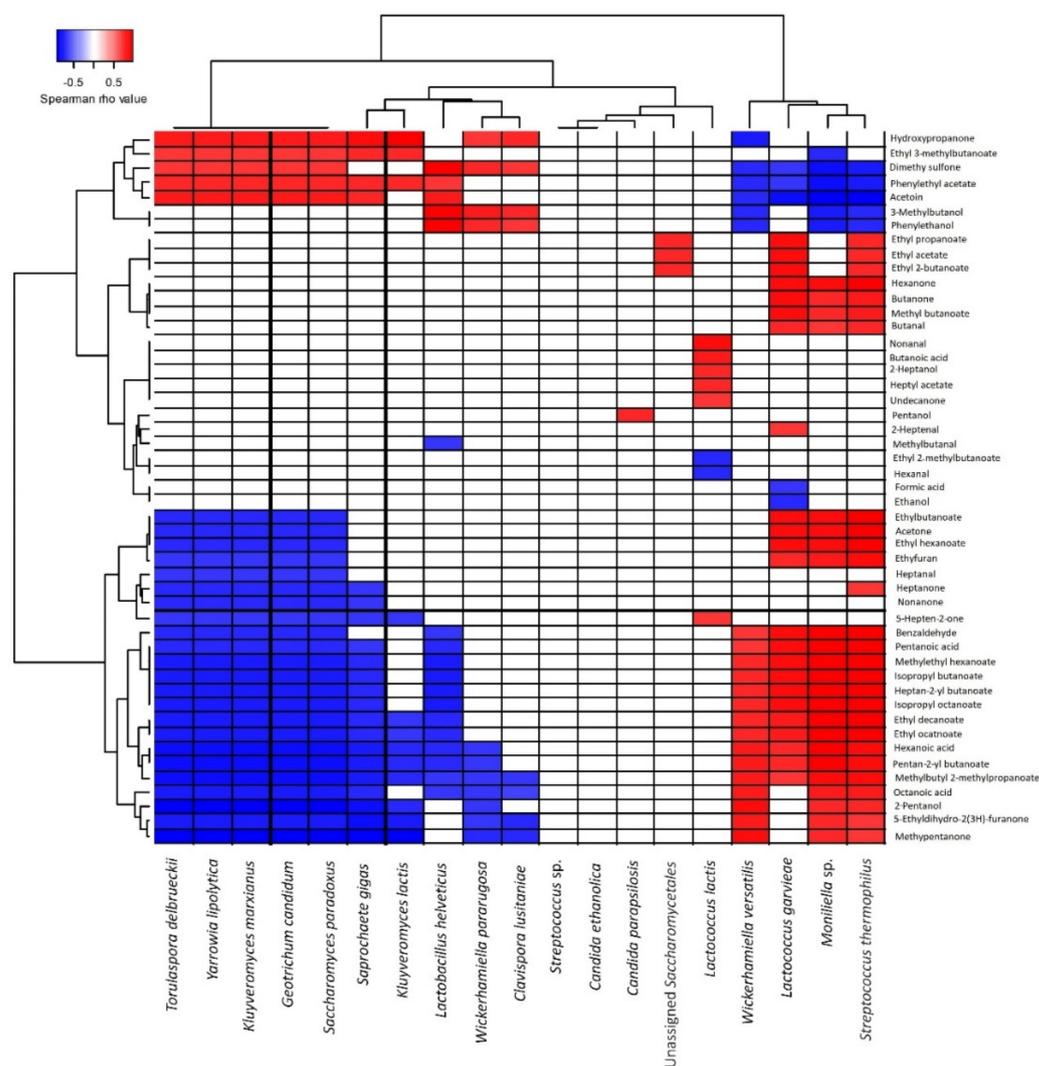


**Figure 8.** Normalized heat-map representation of volatile abundances during *Smen* maturation. Hierarchical clustering was performed using Ward's Linkage and Euclidean distance. (D1, D2, D3, D6: *Smen* after one, two, three, and six months of maturation, respectively).

### 3.2.5. Correlation between Volatile Profiles and Microbiota during Maturation

To better understand the nature of the correlations between volatile compounds and microbial species, Spearman's correlations were calculated between the two parameters, i.e., volatile profiles and independent microbial data for which a relative abundance cut-off was set to >0.5%. Different profiles could be differentiated (Figure 9). Nine species presented strong negative correlations ( $r > 0.7$ ) with esters i.e., *L. helveticus* ( $n = 9$ ), *G. candidum* ( $n = 12$ ), *S. cerevisiae/paradoxus* ( $n = 12$ ), *K. marxianus* ( $n = 10$ ), *S. gigas* ( $n = 9$ ), *Y. lipolytica* ( $n = 11$ ), *C. lusitaniae* ( $n = 4$ ), *K. lactis* ( $n = 4$ ), and *T. delbrueckii* ( $n = 10$ ), while opposite correlations were observed for *L. garvieae* ( $n = 14$ ), *S. thermophilus* ( $n = 11$ ), *W. versatilis* ( $n = 8$ ), and *Moniliella* sp. ( $n = 12$ ). On the other hand, *Y. lipolytica* and *T. delbrueckii* showed a high positive correlation with phenylethyl acetate ( $r > 0.8$ ). By comparison, three species showed the highest correlations with different esters ( $r > 0.9$ ): *Moniliella* sp. with ten esters and *L. garvieae* and *S. thermophilus* with eight different esters.

*Moniliella* sp. and *W. versatilis* were the only species that showed strong positive correlations ( $r > 0.8$ ) with fatty acids, i.e., octanoic acid, pentanoic acid, and hexanoic acid, while other species showed strong negative correlations with the same fatty acids. Regarding acetoin production, it was related to *L. helveticus*, *G. candidum*, *K. marxianus*, *S. gigas*, *Y. lipolytica* and *T. delbrueckii*. Several species showed strong positive correlation with certain ketones, i.e., *Moniliella* sp. and *K. marxianus*. The production of 2-pentanol was related to *S. thermophilus* ( $r = 0.96$ ), *Moniliella* sp. ( $r = 0.8$ ), and *W. versatilis* ( $r = 0.88$ ). On the other hand, for dimethyl sulfone, positive correlations were noted for *L. helveticus*, *K. marxianus*, *Y. lipolytica*, *C. lusitaniae*, and *T. delbrueckii*.



**Figure 9.** Spearman correlation matrices between microbial species composition and volatile compounds during *Smen* maturation (butter and *Smen* samples matured for one to six months). Only significant correlations are shown ( $p < 0.05$ ). Positive correlations are indicated in red while negative ones are indicated in blue.

#### 4. Discussion

In the present study, the microbial diversity and dynamics as well as physico-chemical and volatile profiles of Algerian *Smen*, a spontaneously fermented butter produced using empirical methods, were investigated using several microbial, molecular and biochemical methods. To the best of our knowledge, this is the first time such an extensive study has been carried out on this fermented product.

Regarding *Smen* safety and hygiene, the present study confirmed, in agreement with a previous study [13], that *Smen* is a safe product, as all tested hygiene and safety criteria were satisfactory. This result is not surprising, as several hurdles during the *Smen* manufacturing process are encountered and contribute to its safety and salubrity. Indeed, spontaneous fermentation of raw milk to *Raib* by LAB leads to competition-exclusion phenomena as well as production of antimicrobial compounds (e.g., lactic acid) and a pH decrease. D Products are also rich in free fatty acids, the latter showing an increase during the maturation process. In the present study, the impact of these hurdles on microbial counts, and in particular on coagulase-positive staphylococci and total and thermotolerant coliforms, was clearly noticeable throughout the different *Smen* preparation stages. Indeed, coagulase-positive staphylococci, thermotolerant coliforms, and total coliforms were all below the

detection threshold in butter and one-month matured *Smen*, respectively. It is worth noting that, among the fifteen products collected from Algerian households, all were satisfactory regarding hygiene and safety criteria and only two samples harboured viable yeasts with counts of  $\sim 4 \log_{10}$  CFU/g, while seven samples harboured viable bacteria with counts quite similar to LAB, mainly identified as enterococci and lactobacilli. While lactobacilli are generally recognized as safe, enterococci, especially *E. faecium*, have a paradoxical status, as they are responsible for nosocomial infections and can transfer antibiotic resistance genes and can play a positive role in many fermented foods as well, including dairy products [42]. In this regard, it would be of interest to investigate *Smen* enterococci isolates for virulence genes and their acquired antibiotic resistance properties, as well as to go further in the taxonomical identification of *E. faecium* isolates, in order to determine whether they belong to clade A (hospital associated) or B (community associated), the latter clade being recently reassigned to *Enterococcus lactis* [43].

Regarding *Smen* microbial diversity, two separate complementary studies were undertaken using both culture-dependent and metagenetic approaches. First, the microbial diversity and volatile profiles of *Smen* samples collected from different households were investigated. As expected, there were important differences in the results obtained by each microbiological approach, as culture-dependent approaches revealed certain lactobacilli and enterococci as well as yeast species, in agreement with previous studies [44–48] in samples matured for up to one year, with counts up to  $\sim 6$  and  $\sim 4 \log_{10}$  CFU/g, respectively. In contrast, metagenetic analysis, because it is based on total DNA either derived from live and dead cells, provided a general overview of microbial species that left their DNA signature during *Smen* manufacture and maturation. In *Smen* samples (those where sufficient DNA quantity was extracted for downstream metagenetic analysis), bacterial communities were found to be quite diverse, with *L. lactis*, *S. thermophilus*, and/or *A. johnsonii*, being the main representative species. *L. lactis* and *S. thermophilus* were previously identified as the main species involved in the spontaneous fermentation of raw milk to *Raib*, called *Rayeb* in Morocco, which can be consumed as is, processed further to a traditional white cheese called *Jben*, or churned to obtain buttermilk (Moroccan and Algerian *Iben*, Tunisian *leben*, Egyptian, Iraqi and Lebanese *laban*) and raw butter (*Zebda*), the latter being used for *Smen* production [16,17,49–52]. Concerning *A. johnsonii*, identified at a high relative abundance in two samples (S1 and S2), together with other Gram-negative species belonging to the *Pseudomonadota* phylum and enterococci, their higher relative abundances, when compared to LAB species, is likely the result of either a fermentation deviation during spontaneous milk fermentation or the use of spoiled raw milk, and/or of poor hygiene quality, as this species is considered a major milk spoilage species [53].

For the first time, the present study provided an overview of *Smen* mycobiota, which have been systematically overlooked to date. While most identified species (e.g., *G. candidum*, *C. zeylanoides*, *K. lactis*) are regularly encountered in raw milk and dairy products [54–57], an interesting finding was the high prevalence of *Moniliella* spp., a black yeast from the *Basidiomycota* phylum. Members of this genus are generally considered as food spoilage agents in acidic and/or low  $a_w$  foods, including fat-rich dairy products [58,59]. Its presence in *Smen* is not surprising, as this genus comprises species which are considered acid-resistant, xerophilic, and fermentative; as demonstrated in the second part of this study, *Moniliella* sp. can grow during *Smen* maturation. Interestingly, the type species of *Moniliella* *spatulata* (CBS 241.79) was originally isolated from Indian *Ghee* made from buffalo milk [60].

The investigation of the volatile profiles of *Smen* collected from households led to the identification of 81 compounds belonging to different families, mainly derived from fat metabolism; most of them were similar to those previously detected in Moroccan *Smen* [12,61]. Indeed, as previously reported [12], in addition to short chain ( $C_4$  to  $C_{10}$ ) fatty acids, which are important contributors to *Smen* aromatic profiles, key compounds included methylketones and esters, particularly butanoic and hexanoic ethyl esters and 2-pentanone. Enterococci (e.g., *E. faecalis* and *E. durans*) [62], lactobacilli (e.g., *L. paracasei*,

*L. plantarum*, *L. rhamnosus*) [63,64], and yeast (e.g., *C. zeylanoides*, *G. candidum*, *M. dehoogii*, *W. pararugosa*) [47,65,66] species isolated in the present study have been previously shown to possess lipase and esterase activities. Thus, through lipolysis and conversion of free fatty acids to other compounds (e.g., short-chain fatty acids, methylketones, and ethyl esters), they likely contribute to *Smen* maturation during storage, as further discussed below. Moreover, as for Moroccan *Smen* [12], these products displayed diverse volatile profiles with no clear clustering according to maturation time, milk origin, or preparation method. This result is not surprising given the fact that *Smen* manufacturing processes can vary from one household to another and these processes rely on the activity of complex microbial communities composed of autochthonous microorganisms.

Several hypotheses driven by the aforementioned results were confirmed in the second part of this study by following microbial community and volatile profile dynamics during different stages of *Smen* manufacture and maturation. It was found that *L. lactis* dominated immediately after raw milk fermentation, as confirmed by both the culture-dependent and culture-independent analyses. It then became progressively subdominant after churning and subsequent maturation, as shown by the culture-dependent approach, while cultivable bacteria in matured *Smen* belonged to lactobacilli and enterococci. This result clearly highlighted that the strong dominance of *L. lactis*, revealed using a metagenetic approach, in *Smen* collected from households could be the result of a bias due to the presence of VBNC, or more likely, dead cells, as *L. lactis* can be isolated on MRS medium; a similar observation concerning discrepancies between culture-dependent and metagenetic results regarding *L. lactis* prevalence in dairy products was reported for Pélardon cheese [29]. To overcome this potential bias, the use of a DNA stain (e.g., propidium monoazide) which can bind to DNA from dead cells, thus rendering it inaccessible for PCR amplification, could have been useful. There was another discrepancy between the results of the culture-dependent and culture-independent approaches regarding *G. candidum* prevalence; while this species was found to dominate in *Raib* by metagenetic analysis, it was not isolated. We have no clear explanation for this result.

The results of this part of this study defined the possible technological/functional roles played by bacterial and fungal species encountered during *Smen* manufacturing and maturation. In the studied batch, *L. lactis* and to a lesser extent *S. thermophilus* and *L. helveticus* were the main bacterial species involved in raw milk spontaneous fermentation to *Raib*. During this process, lactose is fermented into lactate, while citrate can be metabolized by wild *L. lactis* to CO<sub>2</sub>, acetic acid, and  $\alpha$ -acetolactate. The latter can be enzymatically transformed into acetoin or chemically degraded to diacetyl, which has buttery and creamy notes [61]. In raw butter, acetate and acetoin were found at high abundances, while diacetyl was present at higher abundances in *Smen* matured for one month. During maturation, *Smen* was progressively enriched in short-chain fatty acids, including even-numbered (e.g., butanoic, hexanoic, octanoic and decanoic acids) and odd-numbered (e.g., pentanoic, heptanoic, nonanoic) fatty acids. These compounds are characterized by strong odors described as fatty, rancid buttery, ripened cheese, whey-flowery, cheesy-musty, rancid buttery, and soapy [61]. The increase in fatty acid abundance can be attributed to residual milk lipase activity as well as to the lipase and esterase activities of LAB and more importantly yeasts. In this regard, strong positive correlations were found between fatty acids and *W. versatilis* and *Moniliella* sp. In addition to short-chain fatty acids, ethyl esters, i.e., ethyl acetate, ethyl butanoate, and ethyl hexanoate, were the most dominant identified compounds in *Smen*, especially at the end of maturation. Ethyl esters, which have pleasant, sweetly floral, and fruity odors [61], can be formed via two different reactions catalyzed by microbial esterases/lipases, namely, esterification and alcoholysis. This explains the decrease in abundances of alcohols such as ethanol, methylbutanol, and phenylethanol at the early stages of maturation and the increase in ester abundances at the end. Strong positive correlations were noted between ethyl esters and *L. helveticus*, *L. garvieae*, *S. thermophilus*, *Moniliella* sp. and *W. versatilis*, all of which are already known for their esterase activities [67–70]. The second-most abundant compounds were ketones.

Their abundance increased after the first month of maturation. Ketones are produced through oxidation of fatty acids to  $\beta$ -ketoacids and decarboxylation [71]. These compounds, which have fruity, floral, and musty notes, were strongly correlated with *K. marxianus* and *Moniliella* sp. Nevertheless, to the best of our knowledge, *K. marxianus* is not a ketone producer [72]. *Moniliella* spp. are able to produce  $\gamma$ -decalactone and other  $\gamma$ -lactones and  $\delta$ -lactones [73], however, nothing is known regarding their ability to produce methyl ketones. In contrast, *G. candidum*, which was identified at high relative abundance using metagenetics, is a very well-known ketone producer [65].

## 5. Conclusions

In conclusion, the present study provided new knowledge about the microbial diversity, dynamics, and volatile profiles of Algerian *Smen* and identified the key microorganisms during *Smen* manufacturing and maturation as well as their relation with volatile compound production. The diversity and abundances of the volatile compounds identified here were highly related to maturation time and lipolysis degree as well as to their autochthonous microbiota. This knowledge and the collection of microorganisms built through this study could be useful to select LAB and yeast strains to design future specific starter and non-starter cultures for *Raib* and *Smen* production at a larger scale, e.g., cooperatives of local producers to better control these fermentation processes and improve *Smen* quality attributes [11].

**Supplementary Materials:** The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/microorganisms10040736/s1>, Table S1: Alpha-diversity indices of bacterial communities from *Smen* samples collected in different households, Table S2: Alpha-diversity indices of fungal communities from *Smen* samples collected in different households, Table S3: Volatile compounds identified in different *Smen* samples using HS-GC-MS, Table S4: Alpha-diversity indices of bacterial communities from *Smen* samples throughout the different preparation stages of *Smen*, Table S5: Alpha-diversity indices of fungal communities from *Smen* samples throughout the different preparation stages of *Smen*, Table S6: Accession numbers of metabarcoding sequences (16S), Table S7: Accession numbers of metabarcoding sequences (ITS), Figure S1: Examples of chromatograms obtained using headspace (HS) gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) of *Smen* samples collected in different households, Figure S2: Bacterial (A) and fungal (B) diversity in potent microbial reservoirs encountered during *Smen* manufacturing revealed using a metagenetic approach, Figure S3: Examples of chromatograms obtained using headspace (HS) gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) of *Smen* during maturation, Figure S4: PCA plots of volatile compounds from the 81 volatile compounds detected throughout *Smen* maturation. PCA plot of individuals (A) and variables (B) showing principal component 1 (Dim1, 44.10%) versus 2 (Dim2, 21.02%).

**Author Contributions:** F.B. and J.M. were responsible for conceptualization, study design, and funding application; R.B. collected samples and performed all experimental work except volatilome analysis under F.B., J.M., M.C., S.D., A.P. and M.B. supervision; A.T. and M.-B.M. analyzed *Smen* volatilome; R.B. performed metagenetic reads processing under H.F. supervision; R.B., J.M., M.C., A.T., M.B. performed data statistical analysis; R.B., J.M. and F.B. drafted the manuscript. All authors contributed to the final revision and approved the submission. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This work, which was conducted in the framework of the ProMed Foods project ‘Promotion of local Mediterranean fermented foods through a better knowledge and management of microbial resources’, was funded through the ARIMNet2 2016 Call by the following funding agencies: ANR (France), MERS (Algeria), ELGO-DEMETER (Greece), MIPAF (Italy), INIA (Spain), and MHESR (Tunisia). ARIMNet2 (ERA-NET) has received funding from the European Union’s Seventh Framework Programme for research, technological development, and demonstration under grant agreement no. 618127.

**Institutional Review Board Statement:** Not applicable.

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** Original Research sequence data have been deposited in the Sequence Read Archive (SRA) database at the NCBI under accession PRJNA775076.

**Acknowledgments:** The authors wish to address their special gratitude to the Algerian Ministry of Higher Education and Scientific Research for the attribution of a scholarship within the Algerian–French cooperation program PROFAS B+. We are also grateful to the INRAE MIGALE bioinformatics facility (MIGALE, INRAE, 2020. Migale bioinformatics Facility, doi: 10.15454/1.5572390655343293E12) for providing computing and storage resources. Finally, we are grateful to the participating households for providing the samples and to the milkman for welcoming us to his dairy and for participating in the elaboration of the butter sample.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Tamang, J.P.; Kailasapathy, K. *Fermented Foods and Beverages of the World*; CRC Press, Taylor and Francis Group: New York, NY, USA, 2010.
2. El Sheikha, A.F.; Hu, D.-M. Molecular techniques reveal more secrets of fermented foods. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2018**, *60*, 11–32. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Blandino, A.; Al-Aseeri, M.E.; Pandiella, S.S.; Cantero, D.; Webb, C. Cereal-based fermented foods and beverages. *Food Res. Int.* **2003**, *36*, 527–543. [[CrossRef](#)]
4. Schoustra, S.E.; Kasase, C.; Toarta, C.; Kassen, R.; Poulain, A.J. Microbial Community Structure of Three Traditional Zambian Fermented Products: Mabisi, Chibwantu and Munkoyo. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e63948. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Giraffa, G. Studying the dynamics of microbial populations during food fermentation. *FEMS Microbiol. Rev.* **2004**, *28*, 251–260. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Cocolin, L.; Ercolini, D. Zooming into Food-Associated Microbial Consortia: A ‘Cultural’ Evolution. *Curr. Opin. Food Sci.* **2015**, *2*, 43–50. [[CrossRef](#)]
7. Tamang, J.P.; Thapa, N.; Tamang, B.; Rai, A.; Chettri, R. Microorganisms in Fermented Foods and Beverages. In *Health Benefits of Fermented Foods and Beverages*; Tamang, J.P., Ed.; CRC Press, Taylor and Francis Group: New York, NY, USA, 2015; pp. 2–87.
8. Diaz, M.; Kellingray, L.; Akinyemi, N.; Adefiranye, O.O.; Olaonipekun, A.B.; Bayili, G.R.; Ibezim, J.; Du Plessis, A.S.; Houngbédji, M.; Kanya, D.; et al. Comparison of the microbial composition of African fermented foods using amplicon sequencing. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 13863. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Wafula, E.N.; Franz, C.M.; Rohn, S.; Huch, M.; Mathara, J.M.; Trierweiler, B. Fermentation of African indigenous leafy vegetables to lower post-harvest losses, maintain quality and increase product safety. *Afr. J. Hortic. Sci.* **2016**, *9*, 1–13.
10. Benkerroum, N. Traditional Fermented Foods of North African Countries: Technology and Food Safety Challenges with Regard to Microbiological Risks. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2013**, *12*, 54–89. [[CrossRef](#)]
11. Boussekine, R.; Merabti, R.; Barkat, M.; Becila, F.-Z.; Belhoula, N.; Mounier, J.; Bekhouche, F. Traditional Fermented Butter Smen/Dhan: Current Knowledge, Production and Consumption in Algeria. *J. Food Res.* **2020**, *9*, 71–82. [[CrossRef](#)]
12. Iradukunda, C.; Aida, W.M.W.; Ouafi, A.T.; Barkouch, Y.; Boussaid, A. Aroma profile of a traditionally fermented butter (smen). *J. Dairy Res.* **2018**, *85*, 114–120. [[CrossRef](#)]
13. El Marrakchi, A.; Tantaoui-Elarraki, A.; El Mane, A.; Tifrit, L. La flore microbienne du smen marocain I. Flore naturelle et flore d’intérêt hygiénique. *Le Lait* **1988**, *68*, 205–217. [[CrossRef](#)]
14. Triqui, R.; Guth, H. Potent odorants in “Smen”, a traditional fermented butter product. *Eur. Food Res. Technol.* **2001**, *212*, 292–295. [[CrossRef](#)]
15. Bensalah, F.; Labtar, A.; Delorme, C.; Renault, P. Occurrence, isolation and DNA identification of *Streptococcus thermophilus* involved in algerian traditional butter ‘Smen’. *Afr. J. Biotechnol.* **2011**, *10*, 17251–17257. [[CrossRef](#)]
16. Bettache, G.; Fatma, A.; Miloud, H.; Mebrouk, K. Isolation and identification of lactic acid bacteria from Dhan, a traditional butter and their major technological traits. *World Appl. Sci. J.* **2012**, *17*, 480–488.
17. Labtar, A.; Larouci, S.; Guermouche, A.; Bensalah, F. Study on molecular identification of lactic acid bacteria from fermented milks and “Smen” (a traditional steppe butter) and their enzyme producing attributes. *SAJEB* **2019**, *9*, 95–103. [[CrossRef](#)]
18. Ongol, M.P.; Asano, K. Main microorganisms involved in the fermentation of Ugandan ghee. *Int. J. Food Microbiol.* **2009**, *133*, 286–291. [[CrossRef](#)]
19. Bezuidt, O.; Gomri, M.A.; Pierneef, R.; Van Goethem, M.; Kharroub, K.; Cowan, D.; Makhalanyane, T.P. Draft genome sequence of *Thermoactinomyces* sp. strain AS95 isolated from a Sebkhia in Thamelah, Algeria. *Stand. Genom. Sci.* **2016**, *11*, 1–6. [[CrossRef](#)]
20. Idoui, T.; Karam, N.E. Lactic acid bacteria from Jijel’s traditional butter: Isolation, identification and major technological traits. *Grasas Aceites* **2008**, *59*, 361–367. [[CrossRef](#)]
21. ISO 4833:2003; Microbiology of Food and Animal Feeding Stuffs—Horizontal Method for the Enumeration of Microorganisms—Colony-Count Technique at 30 Degrees C. ISO: Geneva, Switzerland. Available online: <https://www.iso.org/standard/34524.html> (accessed on 21 March 2021).

22. ISO 4832:2006; Microbiology of Food and Animal Feeding Stuff—Horizontal Method for the Enumeration of Coliforms—Colony-Count Technique. ISO: Geneva, Switzerland. Available online: <https://www.iso.org/standard/38280.html> (accessed on 21 March 2021).
23. ISO 7937:2004; Microbiology of Food and Animal Feeding Stuff—Horizontal Method for the Enumeration of *Clostridium Perfringens*—Colony-Count Technique. ISO: Geneva, Switzerland. Available online: <https://standards.iteh.ai/catalog/standards/cen/4f03b11b-ed0-4640-ad00-7169594d489b/en-iso-7937-2004> (accessed on 21 March 2021).
24. ISO 6888-1:1999; Microbiology of Food and Animal Feeding Stuff Horizontal Method for the Enumeration of Coagulase Positive Staphylococci (*Staphylococcus aureus* and Other Species)—Part 1: Technique Using Baird-Parker Agar Medium. ISO: Geneva, Switzerland. Available online: <https://www.iso.org/standard/23036.html> (accessed on 21 March 2021).
25. Salmonella, A.G. *Food Microbiology Protocols*; Spencer, J.F.T., Ragout de Spencer, A.L., Eds.; Humana Press Inc.: Totowa, NJ, USA, 2001; pp. 113–118.
26. Guinebretiere, M.H.; Nguyen-The, C. Sources of *Bacillus cereus* contamination in a pasteurized zucchini puree processing line, differentiated by two PCR-based methods. *FEMS Microbiol. Ecol.* **2003**, *43*, 207–215. [[CrossRef](#)]
27. Weisburg, W.G.; Barns, S.M.; Pelletier, D.A.; Lane, D.J. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.* **1991**, *173*, 697–703. [[CrossRef](#)]
28. Kurtzman, C.P.; Robnett, C.J. Identification of clinically important ascomycetous yeasts based on nucleotide divergence in the 5' end of the large-subunit (26S) ribosomal DNA gene. *J. Clin. Microbiol.* **1997**, *35*, 1216–1223. [[CrossRef](#)]
29. Penland, M.; Falentin, H.; Parayre, S.; Pawtowski, A.; Maillard, M.-B.; Thierry, A.; Mounier, J.; Coton, M.; Deutsch, S.-M. Linking Pélardon artisanal goat cheese microbial communities to aroma compounds during cheese-making and ripening. *Int. J. Food Microbiol.* **2021**, *345*, 109130. [[CrossRef](#)]
30. Klindworth, A.; Pruesse, E.; Schweer, T.; Peplies, J.; Quast, C.; Horn, M.; Glöckner, F.O. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Res.* **2013**, *41*, e1. [[CrossRef](#)]
31. Toju, H.; Tanabe, A.; Yamamoto, S.; Sato, H. High-Coverage ITS Primers for the DNA-Based Identification of Ascomycetes and Basidiomycetes in Environmental Samples. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e40863. [[CrossRef](#)]
32. Escudí, F.; Auer, L.; Bernard, M.; Mariadassou, M.; Cauquil, L.; Vidal, K.; Maman, S.; Hernandez-Raquet, G.; Combes, S.; Pascal, G. FROGS: Find, Rapidly, OTUs with Galaxy Solution. *Bioinformatics* **2018**, *34*, 1287–1294. [[CrossRef](#)]
33. Caporaso, J.G.; Kuczynski, J.; Stombaugh, J.; Bittinger, K.; Bushman, F.D.; Costello, E.K.; Fierer, N.; Gonzalez Peña, A.; Goodrich, J.K.; Gordon, J.I.; et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat. Methods* **2010**, *7*, 335–336. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Zakrzewski, M.; Proietti, C.; Ellis, J.; Hasan, S.; Brion, M.-J.; Berger, B.; Krause, L. Calypso: A user-friendly web-server for mining and visualizing microbiome–environment interactions. *Bioinformatics* **2016**, *33*, 782–783. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Paquot, C. *IUPAC Standard Methods for the Analysis of Oils, Fats and Derivatives*, 6th ed.; Pergamon Press: Oxford, UK, 1979.
36. Wolff, J.P. *Manuel d'Analyse des Corps Gras*; Azoulay: Paris, France, 1968.
37. AOAC. *Official Methods of Analysis*, 12th ed.; Association of Official Analytical Chemists: Washington, DC, USA, 1975.
38. Pogačić, T.; Maillard, M.-B.; Leclerc, A.; Hervé, C.; Chuat, V.; Yee, A.L.; Valence, F.; Thierry, A. A methodological approach to screen diverse cheese-related bacteria for their ability to produce aroma compounds. *Food Microbiol.* **2015**, *46*, 145–153. [[CrossRef](#)]
39. Benjamini, Y.; Hochberg, Y. Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *J. R. Stat. Soc. Ser. B Methodol.* **1995**, *57*, 289–300. Available online: <http://www.jstor.org/stable/2346101> (accessed on 21 March 2022). [[CrossRef](#)]
40. Lê, S.; Josse, J.; Husson, F. “FactoMineR: An R Package for Multivariate Analysis”. *J. Stat. Softw.* **2008**, *25*, 1–18. [[CrossRef](#)]
41. Wickham, H. *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*, 2nd ed.; Springer International Publishing: Berlin/Heidelberg, Germany, 2016.
42. Ogier, J.C.; Serron, P. Safety assessment of dairy microorganisms: The Enterococcus genus. *Int. J. Food Microbiol.* **2008**, *126*, 291–301. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Daza, M.V.B.; Cortimiglia, C.; Bassi, D.; Cocconcelli, P.S. Genome-based studies indicate that the Enterococcus faecium Clade B strains belong to Enterococcus lactis species and lack of the hospital infection associated markers. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2021**, *71*, 004948. [[CrossRef](#)]
44. Sakili, D.; Isoual, D. *Les Bactéries Lactiques dans l'élaboration du Smen Marocain*; Académie d'Agriculture de France: Paris, France, 2003.
45. Savadogo, A.; Traore, A. La flore microbienne et les propriétés fonctionnelles des yaourts et laits fermentés. *Int. J. Biol. Chem. Sci.* **2012**, *5*, 2057. [[CrossRef](#)]
46. Berthoud, H.; Wüthrich, D.; Bruggmann, R.; Wechsler, D.; Fröhlich-Wyder, M.-T.; Irmeler, S. Development of new methods for the quantitative detection and typing of *Lactobacillus parabuchneri* in dairy products. *Int. Dairy J.* **2017**, *70*, 65–71. [[CrossRef](#)]
47. Da Rosa, P.D.; Mattanna, P.; Carboni, D.; Amorim, L.; Richards, N.; Valente, P. *Candida zeylanoides* as a new yeast model for lipid metabolism studies: Effect of nitrogen sources on fatty acid accumulation. *Folia Microbiol.* **2014**, *59*, 477–484. [[CrossRef](#)]
48. Čanak, I.; Berkics, A.; Bajcsi, N.; Kovacs, M.; Belak, A.; Teparić, R.; Maraz, A.; Mrša, V. Purification and Characterization of a Novel Cold-Active Lipase from the Yeast *Candida zeylanoides*. *Microb. Physiol.* **2015**, *25*, 403–411. [[CrossRef](#)]
49. Tantaoui-Elaraki, A.; El Marrakchi, A. Study of Moroccan Dairy Products: Lben and Smen. *Mircen J.* **1987**, *3*, 211–220. [[CrossRef](#)]

50. Abd-El-Malek, Y. Traditional Egyptian dairy fermentations. In *Global Impact of Food Microbiology (GIAM). State of the Art: GIAM and Its Relevance to Development in Developing Countries*; Stantan, W.R., Da Silva, E.J., Eds.; University of Malaya Press: Kuala Lumpur, Malaysia, 1978; pp. 198–208.
51. Ben Amor, K.; Cornelieus, C.; Mahjoub, A.; Thonart, P. Identification de La Flore Lactique Du Lait Fermenté Traditionnel Tunisien (Lben) et Évaluation Des Composés Aromatisants. *Microb. Hyg. Alim.* **1998**, *10*, 31–36.
52. Hamama, A.; Ha, D. Improvements of the manufacture of traditional fermented products in Morocco: Case of jben (moroccan traditional fresh cheese). In *Emerging Technology Series, Food Processing Technologies for Africa*; UNIDO: Vienna, Austria, 1997; pp. 85–102.
53. Schmidt, V.S.; Kaufmann, V.; Kulozik, U.; Scherer, S.; Wenning, M. Microbial biodiversity, quality and shelf life of microfiltered and pasteurized extended shelf life (ESL) milk from Germany, Austria and Switzerland. *Int. J. Food Microbiol.* **2012**, *154*, 1–9. [[CrossRef](#)]
54. Delavenne, E.; Mounier, J.; Déniel, F.; Barbier, G.; Le Blay, G. Biodiversity of antifungal lactic acid bacteria isolated from raw milk samples from cow, ewe and goat over one-year period. *Int. J. Food Microbiol.* **2012**, *155*, 185–190. [[CrossRef](#)]
55. Wouters, J.T.; Ayad, E.H.; Hugenholtz, J.; Smit, G. Microbes from raw milk for fermented dairy products. *Int. Dairy J.* **2002**, *12*, 91–109. [[CrossRef](#)]
56. Gardini, F.; Tofalo, R.; Belletti, N.; Iucci, L.; Suzzi, G.; Torriani, S.; Guerzoni, M.; Lanciotti, R. Characterization of yeasts involved in the ripening of Pecorino Crotonese cheese. *Food Microbiol.* **2006**, *23*, 641–648. [[CrossRef](#)]
57. Sessou, P.; Keisam, S.; Tuikhar, N.; Gagara, M.; Farougou, S.; Jeyaram, K. High-Throughput Illumina MiSeq amplicon sequencing of yeast communities associated with indigenous dairy products from republics of benin and niger. *Front. Microbiol.* **2019**, *10*, 594. [[CrossRef](#)]
58. Rosa, C.A.; Jindamorakot, S.; Limtong, S.; Nakase, T.; Lachance, M.-A.; Fidalgo-Jiménez, A.; Daniel, H.-M.; Pagnocca, F.C.; Inácio, J.; Morais, P.B. Synonymy of the yeast genera *Moniliella* and *Trichosporonoides* and proposal of *Moniliella fonsecae* sp. nov. and five new species combinations. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2009**, *59*, 425–429. [[CrossRef](#)]
59. Nakayama, M.; Hosoya, K.; Shimizu-Imanishi, Y.; Chibana, H.; Yaguchi, T. Development of Rapid Identification and Risk Analysis of *Moniliella* spp. in Acidic Processed Foods. *Biocontrol Sci.* **2016**, *21*, 73–80. [[CrossRef](#)]
60. De Hoog, G.S. Taxonomic review of *Moniliella*, *Trichosporonoides* and *Hyalodendron*. In *The Black Yeasts, II: Moniliella and Allied Genera*; Institute of the Royal Netherlands: Amsterdam, The Netherlands, 1979; pp. 1–36.
61. Sarhir, S.T.; Amanpour, A.; Bouseta, A.; Selli, S. Fingerprint of aroma-active compounds and odor activity values in a traditional Moroccan fermented butter “Smen” using GC–MS–Olfactometry. *J. Food Compos. Anal.* **2021**, *96*, 103761. [[CrossRef](#)]
62. Serio, A.; Chaves-López, C.; Paparella, A.; Suzzi, G. Evaluation of metabolic activities of enterococci isolated from Pecorino Abruzzese cheese. *Int. Dairy J.* **2010**, *20*, 459–464. [[CrossRef](#)]
63. García-Cano, I.; Rocha-Mendoza, D.; Ortega-Anaya, J.; Wang, K.; Kosmerl, E.; Jiménez-Flores, R. Lactic acid bacteria isolated from dairy products as potential producers of lipolytic, proteolytic and antibacterial proteins. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2019**, *103*, 5243–5257. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Oliszewski, R.; Medina, R.B.; Gonzalez, S.N.; Perezchaia, A.; Chaia, A.B.P. Esterase activities of indigenous lactic acid bacteria from Argentinean goats’ milk and cheeses. *Food Chem.* **2007**, *101*, 1446–1450. [[CrossRef](#)]
65. Boutrou, R.; Guéguen, M. Interests in *Geotrichum candidum* for cheese technology. *Int. J. Food Microbiol.* **2005**, *102*, 1–20. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Sakpuntoon, V.; Angchuan, J.; Boontham, W.; Khunnamwong, P.; Boonmak, C.; Srisuk, N. Grease Waste as a Reservoir of Lipase-Producing Yeast and Description of *Limtongella siamensis* gen. nov., sp. nov. *Microorganisms* **2019**, *8*, 27. [[CrossRef](#)]
67. Collins, Y.F.; McSweeney, P.L.H.; Wilkinson, M.G. Lipolysis and free fatty acid catabolism in cheese: A review of current knowledge. *Int. Dairy J.* **2003**, *13*, 841–866. [[CrossRef](#)]
68. Fernández, E.; Alegría, A.; Delgado, S.; Mayo, B. Phenotypic, genetic and technological characterization of *Lactococcus garvieae* strains isolated from a raw milk cheese. *Int. Dairy J.* **2010**, *20*, 142–148. [[CrossRef](#)]
69. Kalantzopoulos, G.; Tsakalidou, E.; Manolopoulou, E. Proteinase, peptidase and esterase activities of cell-free extracts from wild strains of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* isolated from traditional Greek yogurt. *J. Dairy Res.* **1990**, *57*, 593–601. [[CrossRef](#)]
70. Higuchi, T.; Aoki, T.; Uchida, K. Esterase activity in soy sauce Moromi as a factor hydrolyzing flavor esters. *J. Ferment. Bioeng.* **1991**, *71*, 163–167. [[CrossRef](#)]
71. McSweeney, P.L.; Sousa, M.J. Biochemical pathways for the production of flavour compounds in cheeses during ripening: A review. *Le Lait.* **2000**, *80*, 293–324. [[CrossRef](#)]
72. Padilla, B.; Belloch, C.; López-Díez, J.J.; Flores, M.; Manzanares, P. Potential impact of dairy yeasts on the typical flavour of traditional ewes’ and goats’ cheeses. *Int. Dairy J.* **2014**, *35*, 122–129. [[CrossRef](#)]
73. Laufenberg, G.; Rosato, P.; Kunz, B. Adding value to vegetable waste: Oil press cakes as substrates for microbial decalactone production. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2004**, *106*, 207–217. [[CrossRef](#)]

# *Annexes*

Annexe 1. Questionnaire

Université des frères MENTOURI (Constantine)  
Institut de la Nutrition, de l'Alimentation et des Technologies Agro-  
Alimentaires Département : Science alimentaire



**Questionnaire sur le procédé de fabrication de *Dhan* traditionnel**

Questionnaire n°:.....

Date: ..... / ..... / .....

Lieu de l'enquête: .....

Dans le cadre de ma thèse de doctorat, j'effectue une enquête sur les méthodes de fabrication et de conservation traditionnelles de *Dhan* Algérien (beurre fermenté), voulez-vous collaborer à enrichir ce travail en répandant au questionnaire suivant ?

Nous demandons de bien vouloir répondre à toutes les questions suivantes ; vos réponses seront un élément essentiel à la réussite cette étude.

**I. Identité des ménages**

- Nom et Prénom :.....
- Age: ..... ans
- Sexe : Féminin  Masculin
- Numéro de téléphone : .....
- Lieu de résidence : Wilaya..... Commune.....
- Adresse :
- Région : Urbaine  Rurale
- Etes- vous originaire de la région ? Oui  Non
- Situation professionnelle :.....
- Situation familiale : Célibataire  Marié(e)  divorcé (e)  Veuf (ve)

Q1- Connaissez-vous *Dhan* traditionnel ? Oui  Non

Q2- Fabriquez-vous ce produit actuellement ? Oui  Non

Si Non : achetez-vous le *Dhan* prêt à l'emploi ? Oui  Non

Q3- Quel est le nom de produit selon votre région ?.....

Q4- Utilisez-vous ce produit ? Oui  Non

Si oui, quel est le type de *Dhan*? chèvre  vache  brebis  camelin  Autre

**II. Matière première**

**II.1 Origine de la matière première**

Beurre fermier  Beurre pasteurisé  Margarine  Autre   
Q6- Le beurre utilisé est-il préparé à la maison ? Oui  Non

- Si non, citez la source

Q6-1- Quel est le type de lait utilisé pour sa préparation ?

Cru  Pasteurisé  stérile  Reconstitué  Autres

Q6-2- quelle est l'origine de ce lait ?

Vache  Brebis  Chèvre  Camelin  Mélange (Citer)

Q6-3- Le lait utilisé a-t-il subi un traitement thermique ? Oui  Non

## II.2. Préparation de la matière première

Q7- Quelles sont les conditions de la coagulation de lait ?

Temps : .....

Température : .....

Q8- Ajoutez-vous des additifs pour favoriser la coagulation ou la fermentation ?

Oui  Non

- Si oui, citez-les?

Q9- Quel est l'outil utilisé pour le barattage ?

Q10- Quel est le temps de barattage ?

Q11- comment récupérez-vous le beurre ?

Q12- Le beurre préparé, est-il utilisé immédiatement pour la préparation de *Dhan*?

Oui  Non

- Si non pour quoi?

Citez la durée, et la température de conservation.....

## III. Préparation de Dhan

### III.1. Traitement de beurre avant fermentation :

Q13- Est-ce que le beurre est lavé avant préparation de *Dhan* ? Oui  Non

Si oui pour quoi ?.....

Q14- est ce que le beurre subit d'un traitement thermique avant la fermentation ? Oui  Non

- Si oui, citez le couple :

Temps: .....

Température: .....

- Si non, Malaxez-vous le beurre avant fermentation ? Oui  Non

- Si oui, pour quoi?.....

Q15- Ajoutez-vous des ingrédients au beurre ?

Si oui, citez le type et la quantité, et le moment d'ajout.....

.....  
 Q16- Selon vous, pourquoi vous les ajoutez ?

Q17- Complétez le tableau suivant :

	Beurre subit un traitement thermique	Beurre subit d'un malaxage
Quantité de beurre	.....	.....
Eléments éliminés	.....	.....
-Quantité de sel -Moment d'ajout	..... Avant :...../Après :.....	..... Avant :...../Après :.....
-Autres ingrédients -Moment d'ajout	..... Avant :...../Après :.....	..... Avant :...../Après :.....

**III. 2. Processus de fermentation**

Q18- La fermentation se déroule dans un récipient en :

Verre  céramique  plastique  Autre

- Pourquoi .....  
 ....

Q19- Fermez-vous le récipient ? Oui  Non

- Pourquoi .....  
 ....

Q20- Quels sont les conditions de fermentation ?

- à l'obscurité  à la lumière

- Pourquoi ?

.....

- La durée :

.....

- Température :.....

Q21- Quelle est la méthode utilisée pour la récupération de *Dhan*?

.....  
 .....

.....  
 - S'il subit d'un traitement thermique, citez la durée et la température :

.....  
 .....

Q22- Est ce qu'il y a des parties qui sont éliminées ?  Oui  Non

- Si oui, quels sont.....

- Vous les utilisez pour autres choses? .....

**VI. Mode de conservation de *Dhan***

Q23- *Dhan* se conserve dans un récipient en :

Verre  céramique  plastique  Autre

- Pourquoi .....

Q24- Quelles sont les conditions de conservation ?

- Température: .....
- Temps: .....
- Aération: .....
- Endroit : .....

**Q25-** Donnez une description du produit prêt à l'utilisation ?

- goût: .....
- couleur: .....
- odeur: .....

**Q26-** Quelles sont les problèmes rencontrés lors de la préparation et/ou la conservation ?

.....

**V. Mode de consommation de Dhan**

**Q27-** *Dhan* est consommé :

Ajouté dans les plats traditionnels  Autres

**Q28-** Le but d'utilisation de *Dhan* est :

- Améliorer le goût
- Apporter plus d'arômes
- Améliorer la qualité nutritionnelle
- Autre

**Q29-** Ce produit traditionnel (*Dhan*) est-il commercialisé ? Oui  Non

Si, oui par qui ? .....

## Annexe 2.

- **Préparation d'une solution Ringer ¼**

Ingrédients en grammes pour un litre d'eau distillée.

- Chlorure de sodium (NaCl) 2,25
- Chlorure de potassium (KCl) 0,105
- Chlorure de calcium anhydre (CaCl<sub>2</sub>) 0,12
- Bicarbonate de sodium 0,05 (NaHCO<sub>3</sub>)

Autoclaver à 121°C pendant 15 minutes, 1 barre.

- **Préparation d'une solution saline physiologique**

Ingrédients en grammes pour un litre d'eau distillée.

- Chlorure de sodium (NaCl) 9

Autoclaver à 121°C pendant 15 minutes, 1 barre.

- **Préparation d'une émulsion de jaune d'œuf**

- Tremper des œufs frais 10 minute environ dans l'éthanol absolu
- Briser les coquilles aseptiquement et séparer les jaunes du blanc
- Mélanger les jaunes avec 35 mL d'une solution saline physiologique

- **Coloration de Gram**

- Préparer un frottis d'une culture bactérienne pure ;
- Recouvrir le frottis de violet de gentiane, laisser agir 1 min, rincer à l'eau distillée ;
- Verser le Lugol et laisser agir pendant 1 min, rincer à l'eau distillée ;
- Décolorer avec l'alcool à 95°C, entre 15 à 30sec, rincer avec l'eau distillée
- Recolorer avec la fuchsine pendant 1 min, rincer à l'eau distillée.

- **Préparation de tampon de lyse**

TRIS HCl 20 mM, pH 8	PM: 157,6g	3,152g
EDTA 2mM	PM: 292,24g	0,584g
Triton x100 1%		1mL
Eau distillée	qsp	100 mL

Autoclaver 20min à 120°C.

Annexe 3. Caractères macroscopiques et microscopiques des isolats de BL des échantillons de *Smen* collectés (B3/K1/K2/O1/S1/S2/S3)

Code	Caractères macroscopiques	Caractères microscopiques
B3BL14G	Petite, ronde, bombée, lisse, opaque, brillante	Gram+, Catalase-, court bâtonnet en chaînette
B3BL14p	Petite, 0,6 mm de diamètre, ronde, bombée, lisse, opaque, brillante	Gram+, Catalase-, court bâtonnet en chaînette
B3BL15	1 mm de diamètre, ronde, bombée, brillante, blanc cassé, lisse, crémeuse	Gram+, Catalase-, bacille incurvé
B3BL3	2,3 mm de diamètre, ronde, bombée, blanche, brillante, lisse	Gram+, Catalase-, bâtonnet en amas et en chaînette
K1BL	0,7 mm de diamètre, ronde, blanche, brillante, opaque	Gram+, Catalase-, bacille long
K1BL12'	0,2 mm de diamètre, petite colonie, ronde, bombée, blanc cassé, brillante, translucide, crémeuse	Gram+, Catalase-, bacille long
K1BL12a	3 mm de diamètre, ronde à bord irrégulier, bombée, brillante, blanche, opaque, crémeuse	Gram+, Catalase-, bacille long
K1BL12b	0,5 mm de diamètre, ronde, bombée, blanche, brillante, opaque, crémeuse	Gram+, Catalase-, bacille long
K1BL2b'	1,9 mm de diamètre, bombée, blanche, opaque, brillante, crémeuse	Gram+, Catalase-, bâtonnet long
K1BL2ba	2 mm de diamètre, blanche, ronde, bombée, brillante, opaque, muqueuse	Gram+, Catalase-, bacille long en chaînette
K1BL4a	2 mm de diamètre, ronde à bord irrégulier, bombée, blanche, opaque, crémeuse	Gram+, Catalase-, court bâtonnet en chaînette
K1BL5a	1,5 mm de diamètre, ronde à bord irrégulier, bombée, brillante, blanc cassé à blanche, muqueuse, opaque,	Gram+, Catalase -, bacille long, isolé et en amas
K1BL7a	2 mm de diamètre, blanche, ronde, bombée, brillante, opaque, muqueuse	Gram+, Catalase-, court bâtonnet en amas
K1BL7a'	2 mm de diamètre, blanche, ronde, bombée, brillante, opaque, muqueuse	Gram+, Catalase-, court bâtonnet en amas
K1BL8b	2 mm de diamètre, blanche, ronde, bombée, opaque, muqueuse	Gram+, Catalase -, court bâtonnet
K1BLba	1,3 mm de diamètre, ronde, bombée, blanche, opaque	Gram+, Catalase-, bacille long
K2BL1	Punctiforme bombée, crémeuse, beige, translucide	Gram+, Catalase-, coques en amas
K2BL12	Punctiforme bombée, crémeuse, beige, translucide	Gram+, Catalase-, coques en diplo
K2BL13	Punctiforme bombée, crémeuse, beige, translucide	Gram+, Catalase-, coques en amas
K2BL16	Punctiforme bombée, crémeuse, beige, translucide	Gram+, Catalase-, coques en diplo
K2BL18	0,1 mm de diamètre, bombée, crémeuse, beige	Gram+, catalase-, coques en diplo
K2BL2	Punctiforme), bombée, crémeuse, beige, translucide	Gram+, Catalase-, coques en amas et en diplo
K2BL20	Punctiforme, translucide, lisse, brillante, beige	Gram+, catalase-, coccobacille/ coque
K2BL22	Punctiforme, bombée, crémeuse, beige, translucide	Gram+, Catalase-, coques en amas et en diplo
K2BL25	Punctiforme, bombée, crémeuse, beige, translucide	Gram+, Catalase-, coques en amas et en diplo
K2BL3	Punctiforme, bombée, crémeuse, beige, translucide	Gram+, Catalase-, coques en amas et en diplo
K2BL4	Punctiforme, bombée, crémeuse, beige, translucide	Gram+, Catalase-, coques en amas et en diplo
K2BL5	Punctiforme, bombée, crémeuse, beige, translucide	Gram+, Catalase-, coques en amas et en diplo
K2BL8	Punctiforme, bombée, crémeuse, beige, translucide	Gram+, Catalase-, coques en amas et en diplo
O1BL4a	4,1 mm, blanche, bombée, crémeuse, brillante, opaque	Gram+, catalase-, bâtonnet en chaînette et isolé
O1BL4G	2 mm de diamètre, blanche, opaque, brillante, muqueuse	Gram+, Catalase-, cout bâtonnet en diplo et en amas
O1BL4p	Petite, ronde, bombée, translucide, lisse	Gram+, Catalase-, court bâtonnet
O1BL7	1,1 mm de diamètre, blanche, ronde, bombée, opaque, brillante, lisse	Gram+, Catalase-, court bâtonnet
O1BL8m	Moyenne, blanche, bombée, opaque, brillante, ronde, lisse	Gram+, Catalase-, court bâtonnet
O1BL8p	Petite, blanche, bombée, opaque, brillante, ronde, lisse	Gram+, Catalase-, court bâtonnet
O1BLt10	Petite, blanche, bombée, opaque, brillante, ronde, lisse	Gram+, Catalase-, court bacille
S1BL1	Punctiforme, bombée, crémeuse, beige, translucide	Gram+, Catalase-, coques en amas
S1BL10	Punctiforme, bombée, crémeuse, beige, translucide	Gram+, Catalase-, coques en amas
S1BL12	Punctiforme, bombée, crémeuse, beige, translucide	Gram+, Catalase-, coques en amas
S1BL14a	4,1 mm, blanche, bombée, crémeuse, brillante, opaque	Gram+, catalase-, bâtonnet en chaînette et isolé
S1BL14b	1 mm, ronde, translucide, beige, brillante, bombée	Gram+, Catalase-, coques isolées, en diplo et en amas
S1BL2	Punctiforme, bombée, crémeuse, beige, translucide	Gram+, Catalase-, coques en amas
S1BL4	1 mm, ronde, translucide, beige, brillante, bombée	Gram+, Catalase-, coques isolées, en diplo et en amas

## Annexes

S1BL5	Punctiforme, bombée, crémeuse, beige, translucide	Gram+, catalase-, coques en amas et en diplo
S1BL6	Punctiforme, bombée, crémeuse, beige, translucide	Gram+, catalase-, coques en amas et en diplo
S1BL8	Punctiforme, bombée, crémeuse, beige, translucide	Gram+, catalase-, coques en amas et en diplo
S1BL9	1 mm, ronde, translucide, beige, brillante, bombée	Gram+, catalase-, coques isolées, en diplo et en amas
S2BL10	1 mm, ronde, translucide, beige, brillante, bombée	Gram+, catalase-, coques isolées, en diplo et en amas
S2BL11	4,1 mm, blanche, bombée, crémeuse, brillante, opaque	Gram+, catalase-, bâtonnet en chaînette et isolé
S2BL12	Punctiforme, bombée, crémeuse, beige, translucide	Gram+, catalase-, coques en amas et en diplo
S2BL13	4,1 mm, blanche, bombée, crémeuse, brillante, opaque	Gram+, catalase-, bâtonnet en chaînette et isolé
S2BL14	Punctiforme, bombée, crémeuse, beige, translucide	Gram+, catalase-, coques en amas et en diplo
S2BL15	Punctiforme, bombée, crémeuse, beige, translucide	Gram+, catalase-, coques en amas et en diplo
S2BL17	Punctiforme, bombée, crémeuse, beige, translucide	Gram+, catalase-, coques en amas et en diplo
S2BL2	1 mm, ronde, translucide, beige, brillante, bombée	Gram+, catalase-, coques isolées, en diplo et en amas
S2BL20	Punctiforme, bombée, crémeuse, beige, translucide	Gram+, catalase-, coques en amas et en diplo
S2BL3	Punctiforme, bombée, crémeuse, beige, translucide	Gram+, catalase-, coques en amas et en diplo
S2BL4	1 mm, ronde, translucide, beige, brillante, bombée	Gram+, catalase-, coques isolées, en diplo et en amas
S2BL6	1 mm, ronde, translucide, beige, brillante, bombée	Gram+, Catalase-, coques isolées, en diplo et en amas
S2BL7	Punctiforme, bombée, crémeuse, beige, translucide	Gram+, Catalase-, coques en amas et en diplo
S2BL8	4,1 mm, blanche, bombée, crémeuse, brillante, opaque	Gram+, catalase-, bâtonnet en chaînette et isolé
S2BL9	Punctiforme, bombée, crémeuse, beige, translucide	Gram+, Catalase-, coques en amas et en diplo
S3BL10a	4,1 mm, blanche, bombée, crémeuse, brillante, opaque	Gram+, catalase-, bâtonnet en chaînette et isolé
S3BL10b	4,1 mm, blanche, bombée, crémeuse, brillante, opaque	Gram+, catalase-, bâtonnet en chaînette et isolé
S3BL14a	Punctiforme, translucide, lisse, brillante, beige	Gram+, catalase-, diplocoque
S3BL14b	2 mm, ronde, bombée, blanche, brillante, opaque, lisse	Gram+, Catalase-, bacille long en chaînette
S3BL15'	Punctiforme, bombée, crémeuse, beige, translucide	Gram+, catalase-, bacille long en chaînette
S3BL15a	1,3 mm, ronde, bombée, blanche, brillante, lisse	Gram+, Catalase-, coque, en paire ou en chaînette
S3BL15b'	Petite, ronde, blanche, lenticulaire	Gram+, catalase-, coque, en paire ou en chaînette
S3BL2a	2 mm, ronde, blanche, bombée, opaque, brillante, lisse	Gram+, Catalase-, court bâtonnet en amas
S3BL2b	2 mm, ronde, blanche, bombée, opaque, brillante, lisse	Gram+, Catalase-, court bâtonnet en amas
S3BL7a	3 mm, ronde, bombée, blanche, brillante, lisse, convexe	Gram+, catalase-, bacille long en chaînette
S3BL7b	2,2 mm, ronde, bombée, blanche, brillante, lisse	Gram+, catalase-, bacille long en chaînette
S3BL9	4,1 mm, blanche, bombée, crémeuse, brillante, opaque	Gram+, catalase-, bâtonnet en chaînette et isolé

## Annexes

### Annexe 4. Caractères macroscopiques et microscopiques des isolats de levures des échantillons de *Smen* collectés (S2/S3)

Code	Caractères macroscopiques	Caractères microscopiques
S2L1	Grande colonie, arrondie, bombée, lisse, blanche	Ovoïde, division par bourgeonnement
S2L2	Grande colonie, arrondie, bombée, lisse, blanche	Ovoïde, division par bourgeonnement
S2L3	Grande colonie, arrondie, bombée, lisse, blanche	Ovoïde, division par bourgeonnement
S2L4	Grande colonie, arrondie, bombée, lisse, blanche	Ovoïde, division par bourgeonnement
S2L5	Grande colonie, arrondie, bombée, lisse, blanche	Ovoïde, division par bourgeonnement
S2L7	Grande colonie, arrondie, bombée, lisse, blanche	Ovoïde, division par bourgeonnement
S2L8	Grande colonie, arrondie, bombée, lisse, blanche	Ovoïde, division par bourgeonnement
S3L1	Petite colonie, arrondie, bombée, lisse, blanche	Arrondie, division par bourgeonnement
S3L10	Grande colonie, arrondie, bombée, lisse, blanche	Ovoïde, division par bourgeonnement
S3L11	Grande colonie, plissée, rigoureuse	Hyphe cloisonné, avec fragmentation du mycélium
S3L2	Petite colonie, plissé, rigoureuse, beige	Ovoïde, bourgeonnement, multilatéral
S3L3	Petite colonie, arrondie, bombé, lisse, blanche	Arrondie, division par bourgeonnement
S3L4	Grande colonie, plissé, rigoureuse	Ovoïde, division par bourgeonnement
S3L5	Grande colonie, arrondie, bombé, lisse, blanche	Ovoïde, division par bourgeonnement
S3L7	Grande colonie, arrondie, plate, lisse, crème à blanc cassé	Ovoïde, bourgeonnement multilatéral
S3L8	Colonie moyenne, arrondie, bombée, lisse, blanche	Ovoïde, division par bourgeonnement
S3L9	Petite colonie, arrondie, bombée, lisse, blanche	Ovoïde, bourgeonnement multilatéral
S3m2	Colonies blanches et feutrées, d'aspect filamenteux, plate, pourtour finement frangé	Hyphe cloisonnées ramifié, présence de spore asexué résultant de la fragmentation d'hyphe
S3m3	Colonies blanches et feutrées, d'aspect filamenteux, plate, pourtour finement frangé	Hyphe cloisonnées ramifié, présence de spore asexué résultant de la fragmentation d'hyphe
S3m4	Colonie beige à vert clair, aspect levuriforme duveteux, plate	Hyphe cloisonnées ramifié, présence de spore asexué résultant de la fragmentation d'hyphe
S3m6	Colonie blanc cassé à beige, cotonneux, plate	Hyphe cloisonnées ramifié, présence de spore asexué résultant de la fragmentation d'hyphe
S3m7	Colonie blanches et feutrées, d'aspect filamenteux, plate, pourtour finement frangé	Hyphe cloisonnées ramifié, présence de spore asexué résultant de la fragmentation d'hyphe
S3m8	Colonie blanches et feutrées, d'aspect filamenteux, plate, pourtour finement frangé	Hyphe cloisonnées ramifié, présence de spore asexué résultant de la fragmentation d'hyphe
S3m9	Colonie blanches et feutrées, d'aspect filamenteux, plate, pourtour finement frangé	Hyphe cloisonnées ramifié, présence de spore asexué résultant de la fragmentation d'hyphe

**Annexe 5.** Dénombrement des différents groupes microbiens (UFC/g/ UFC/mL) des échantillons prélevés durant la préparation du *Smen/Dhan*

<b>Microorganismes recherchés (UFC/ ml) ; (UFC/g)</b>	<b>Lait</b>	<b>Raib</b>	<b>beurre</b>	<b>D1</b>	<b>D2</b>	<b>D3</b>	<b>D6</b>
FTAM	2,27x10 <sup>6</sup>	2,64x10 <sup>9</sup>	1,88x10 <sup>8</sup>	1,1x10 <sup>4</sup>	2,91x10 <sup>3</sup>	2,4x10 <sup>4</sup>	9x10 <sup>1</sup>
Coliformes fécaux	1,28x10 <sup>6</sup>	2,3x10 <sup>4</sup>	<10	<10	<10	<10	<10
Coliformes totaux	6,95x10 <sup>5</sup>	1,4x10 <sup>4</sup>	5,5x10 <sup>3</sup>	<10	<10	<10	<10
<i>Staphylococcus aureus</i>	1,1x10 <sup>2</sup>	1x10 <sup>1</sup>	<10 <sup>1</sup>	<10 <sup>1</sup>	<10 <sup>1</sup>	<10 <sup>1</sup>	<10 <sup>1</sup>
Clostridium sulfite-réducteurs	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>Salmonella spp.</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
BL	3,9x10 <sup>5</sup>	6,5x10 <sup>7</sup>	2,55x10 <sup>6</sup>	2,7x10 <sup>3</sup>	<10	3x10 <sup>1</sup>	<10
Levures et moisissures	2,6x10 <sup>5</sup>	1,36x10 <sup>5</sup>	1,9x10 <sup>4</sup>	1,18x10 <sup>4</sup>	8,7x10 <sup>3</sup>	4,8x10 <sup>4</sup>	1,5x10 <sup>2</sup>

Annexe 6. Caractères macroscopiques et microscopiques des isolats de BL des échantillons prélevés au cours de la préparation du *Smen*

Code	Caractères macroscopiques	Caractères microscopiques
E1LBL24	1,2 mm de diamètre, ronde, blanc cassé à beige, bombée, translucide, lisse, brillante	Gram+, catalase-, coccobacille en amas
E1LBL17	Petite colonie, ronde, bombée, brillante, blanc cassé à beige, translucide, crémeuse	Gram+, catalase-, coccobacille en amas
E1LBL9	Colonie moyenne, ronde, bombée, blanche, brillante, opaque, crémeuse	Gram+, catalase-, bâtonnet en chaînette et isolé
E1LBLm	Petite à moyenne, ronde, bombée, brillante, blanche, opaque, crémeuse	Gram+, catalase-, coccobacille en amas
E1LBL6ma	Colonie moyenne, 1 mm de diamètre, ronde, bombée, blanche, opaque, brillante, muqueuse,	Gram+, catalase-, coques en amas et en chaînettes
E1LBL7	Colonie moyenne, ronde, bombée, blanche, brillante, opaque, crémeuse	Gram+, catalase-, bâtonnet en chaînette et isolé
E1LBLt5	Petite colonie, ronde, bombée, brillante, translucide, lisse, blanc cassé, crémeuse	Gram+, catalase-, court bacille en diplo et en amas
E1LBL15	Colonie moyenne, ronde, bombée, blanche, brillante, opaque, crémeuse	Gram+, catalase-, bâtonnet en chaînette et isolé
E1LBL6mb	Colonie moyenne, 1 mm de diamètre, ronde, bombée, blanche, opaque, brillante, muqueuse,	Gram+, catalase-, coques en amas et en chaînettes
E1LBLm5b	Colonie moyenne, 1 mm de diamètre, ronde, bombée, blanche, opaque, brillante, muqueuse,	Gram+, catalase-, coques en amas et en chaînettes
E1LBLt2	Colonie moyenne, ronde, bombée, blanche, brillante, opaque, crémeuse	Gram+, catalase-, bâtonnet en chaînette et isolé
E1LBLt9	1 mm de diamètre, ronde, bombée, brillante, blanche à blanc cassé, lisse, crémeuse	Gram+, catalase-, coques en amas et en chaînettes
E1LBLm5b	1 mm de diamètre, ronde, bombée, brillante, blanche à blanc cassé, lisse, crémeuse	Gram+, catalase-, coques en amas et en chaînettes
E1LBL19	Moyenne colonie, 1,2 mm de diamètre, ronde, blanc cassé à beige, bombée, translucide, lisse, brillante	Gram+, catalase-, coccobacille en amas
E1RBL23	Punctiforme, blanc cassé, brillante, translucide	Gram+, catalase-, coques en amas, diplocoques en amas et isolé
E1RBL12'	(0,1 mm de diamètre), bombée, brillante, blanc cassé à beige, opaque	Gram+, catalase-, coques en amas
E1RBL12	Petite colonie, ronde, bombée, blanc cassé à beige, translucide à opaque	Gram+, catalase-, diplocoques en amas
E1RBL4	Petite colonie, bombée, brillante, opaque, beige à blanc cassé	Gram+, catalase-, coque en amas, diplocoque en amas et isolé
E1RBL5	Petite colonie, bombée, brillante, blanc cassé à beige, ronde	Gram+, catalase-, coques en diplo et en amas
E1RBL24	Moyenne colonie, 1,2 mm de diamètre, ronde, blanc cassé à beige, bombée, translucide, lisse, brillante	Gram+, catalase-, coccobacille en amas
E1RBL1	Colonie moyenne, bombée, brillante, blanc cassé à beige, ronde	Gram+, catalase-, coques en amas
E1RBL11a	Petite, 0,7 mm de diamètre, ronde, blanche, brillante, opaque	Gram+, catalase-, bacille long
E1RBL1b	Petite, beige à blanc cassé, brillante, bombée, translucide	Gram+, catalase-, coques en amas
E1RBL11b	Petite, 0,7 mm de diamètre, ronde, blanche, brillante, opaque	Gram+, catalase-, bacille long
E1RBLA2	Colonie moyenne, bombée, brillante, blanc cassé à beige, ronde	Gram+, catalase-, coques en amas
E1RBL15	Moyenne colonie, 1,2 mm de diamètre, ronde, blanc cassé à beige, bombée, translucide, lisse, brillante	Gram+, catalase-, coccobacille en amas
E1RBL12	Petite colonie, ronde, bombée, blanc cassé à beige, translucide à opaque	Gram+, catalase-, diplocoques en amas
E1RBL23	Punctiforme, blanc cassé, brillante, translucide	Gram+, catalase-, coques en amas, diplocoques en amas et isolé
E1D3BL1	2,9 mm, ronde, légèrement bombée, blanche à blanc cassé, brillante, opaque, lisse, crémeuse	Gram+, catalase-, bâtonnet long, isolé et en amas
E1D3BL2	Petite colonie, 0,2 mm de diamètre, ronde, translucide, blanc cassé, brillante, lisse, crémeuse	Gram+, catalase-, coccobacille en diplo et en amas
E1D3BL3	1,2 mm, ronde, bombée, blanche, brillante, opaque, lisse, crémeuse	Gram+, catalase-, bâtonnet long en amas
E1BeBL4	Moyenne colonie, 1,2 mm de diamètre, ronde, blanc cassé à beige, bombée, translucide, lisse, brillante	Gram+, catalase-, coccobacille en amas
E1BeBL18	Grande colonie, ronde, bombée, blanche, brillante, crémeuse, opaque	Gram+, Catalase-, court bâtonnet en amas
E1BeBL12	Grande colonie, ronde, bombée, blanche, brillante, crémeuse, opaque	Gram+, Catalase-, court bâtonnet en amas
E1BeBL17	Colonie moyenne, ronde, brillante, bombée, blanche à blanc cassé, crémeuse	Gram+, Catalase -, des coques en amas
E1BeBL6	Moyenne colonie, 1,2 mm de diamètre, ronde, blanc cassé à beige, bombée, translucide, lisse, brillante	Gram+, catalase-, coccobacille en amas
E1BeBL19	Moyenne colonie, 1,2 mm de diamètre, ronde, blanc cassé à beige, bombée, translucide, lisse, brillante	Gram+, catalase-, coccobacille en amas
E1BeBL14	Colonie petite, ronde, bombée, blanc cassé, crémeuse, brillante	Gram+, Catalase -, coques en chaînette et en amas
E1BeBL5	Moyenne colonie, 1,2 mm de diamètre, ronde, blanc cassé à beige, bombée, translucide, lisse, brillante	Gram+, catalase-, coccobacille en amas
E1BeBL13	Colonie moyenne, ronde, bombée, blanche, brillante, opaque, crémeuse	Gram+, catalase-, Bâtonnet en chaînette et isolé
E1D1BL8'	Moyenne colonie, 1,2 mm de diamètre, ronde, blanc cassé à beige, bombée, translucide, lisse, brillante	Gram+, catalase-, coccobacille en amas
E1D1BL10a	3mm, ronde, bombée, blanche, brillante, lisse, convexe	Gram+, Catalase-, bâtonnet long, isolés ou en chaînette
E1D1BL1'	Colonie moyenne, ronde, bombée, blanche, brillante, opaque, crémeuse	Gram+, catalase-, Bâtonnet en chaînette et isolé

## Annexes

E1D1BL10b	Colonie moyenne, 1 mm de diamètre, ronde, bombée, blanche, opaque, brillante, muqueuse,	Gram+, catalase-, coques en amas et en chainettes
E1D1BL8	3mm, ronde, bombée, blanche, brillante, lisse, convexe	Gram+, Catalase-, bâtonnet long, isolés ou en chainette
E1D1BL3'	Colonie moyenne, ronde, bombée, blanche, brillante, opaque, crémeuse	Gram+, catalase-, Bâtonnet en chainette et isolé
E1D1BL1	Colonie petite, ronde, bombée, blanc cassé, crémeuse, brillante	Gram+, Catalase -, coques en chainette et en amas
E1D1BL3	Colonie moyenne, ronde, bombée, blanche, brillante, opaque, crémeuse	Gram+, catalase-, Bâtonnet en chainette et isolé

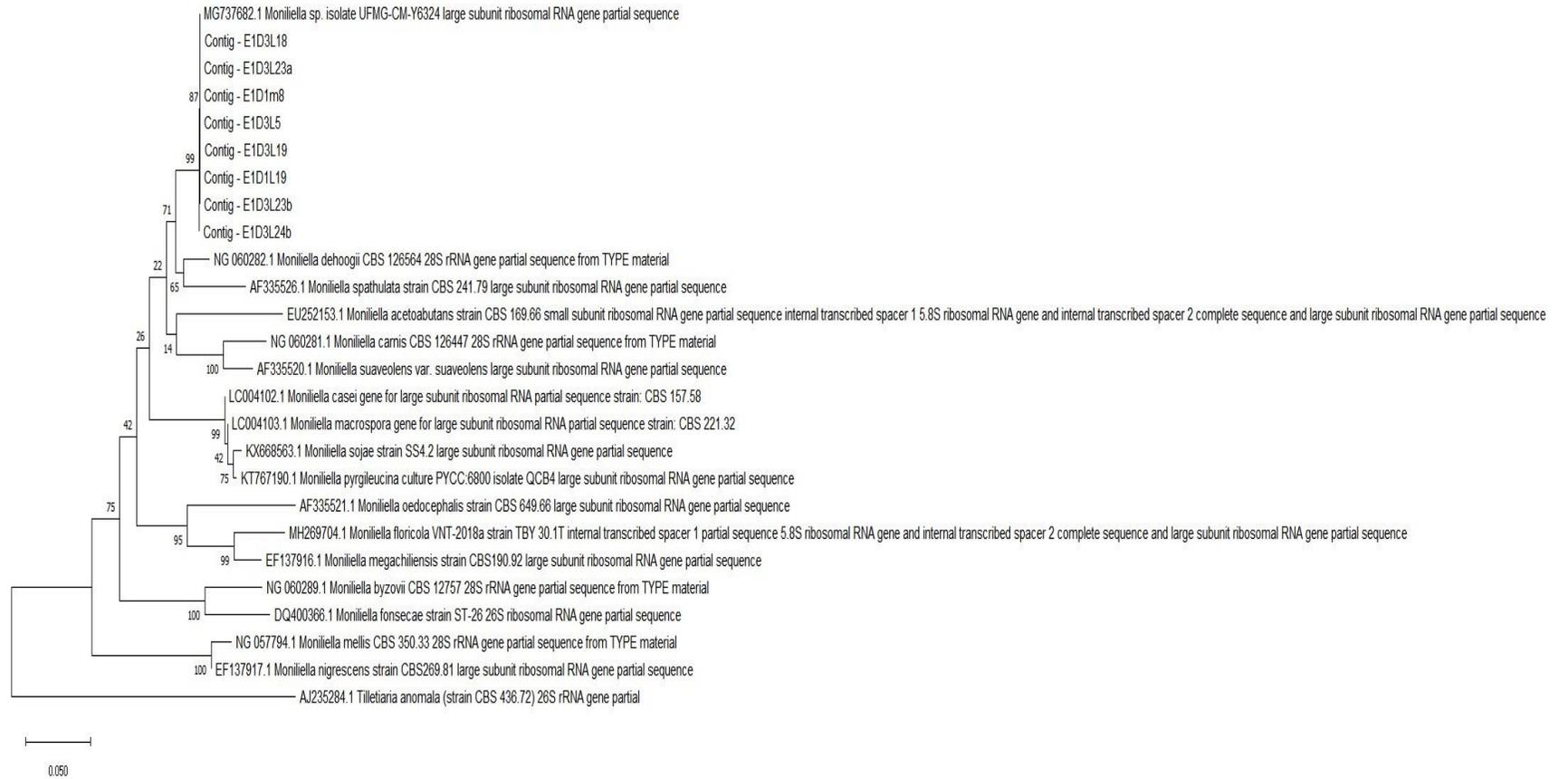
### Annexe 7. Caractères macroscopiques et microscopiques des isolats de levures des échantillons prélevés au cours de la préparation du *Smen*

Code	Caractères macroscopiques	Caractères microscopiques
E1BeL1	1,8 mm de diamètre, ronde, brillante, bombée, lisse, muqueuse, opaque, blanc cassé	Ronde, division par bourgeonnement
E1BeL10	3 mm de diamètre, ronde, blanc cassé, bombée, brillante, lisse, muqueuse, opaque	Ovoïde, division par bourgeonnement
E1BeL11	1,1 mm de diamètre, ronde, brillante, bombée, blanche à blanc cassé, lisse, muqueuse	Ronde, division par bourgeonnement
E1BeL12	1,6 mm de diamètre, ronde, brillante, bombée, lisse, opaque, muqueuse, blanc cassé	Ovoïde, division par bourgeonnement
E1BeL2	2,5 mm de diamètre, ronde, blanche, bombée, brillante, lisse, muqueuse, opaque	Ovoïde, division par bourgeonnement
E1BeL3	1 mm de diamètre, ronde, bombée, brillante, opaque, blanc cassé, lisse, muqueuse	Ovoïde, division par bourgeonnement
E1BeL4	1 mm de diamètre, ronde, bombée, brillante, opaque, blanc cassé, lisse, muqueuse	Ovoïde, division par bourgeonnement
E1BeL5	1 mm de diamètre, ronde, bombée, brillante, opaque, blanc cassé, lisse, muqueuse	Ovoïde, division par bourgeonnement
E1BeL6	2 mm de diamètre, ronde, bombée, opaque, brillante, blanc cassé, lisse, crémeuse	Sphéroïdale, division par bourgeonnement
E1BeL7	3 mm de diamètre, ronde, plate, opaque, matte, blanc cassé, lisse, muqueuse	Ovoïde à arrondies, division par bourgeonnement
E1BeL8	3 mm de diamètre, ronde, plate à centre surélevé, blanc cassé, opaque, lisse, crémeuse	Sphériques, ellipsoïdales à allongées, division par bourgeonnement
E1BeL9	3 mm de diamètre, ronde, plate, opaque, matte, blanc cassé, lisse, muqueuse	Ovoïde à arrondies, division par bourgeonnement
E1D1L1	1 mm de diamètre, moyenne, blanche, opaque, bombée, crémeuse, brillante	Ronde, division par bourgeonnement
E1D1L10	1,7 mm de diamètre, moyenne, blanche, brillante, bombée à centre surélevé, opaque	Ronde, division par bourgeonnement
E1D1L11	2 mm de diamètre, brillante, blanc cassé, plate	Cellule ovoïde à allongée, division par bourgeonnement
E1D1L13	0,8 mm de diamètre, moyenne à petite, blanche, opaque, bombée, crémeuse, brillante	Ovoïde, division par bourgeonnement
E1D1L15	3 mm de diamètre, grande colonie, bombée à centre surélevé, opaque, matte	Présence de pseudohyphe, cloisonné, cellule allongée
E1D1L16	1,1 mm de diamètre, petite colonie, blanche, bombée, opaque, brillante	Ovoïde, division par bourgeonnement
E1D1L17	2,5 mm de diamètre, grande, blanche, bombée, brillante, opaque, muqueuse,	Ronde, division par bourgeonnement
E1D1L18	2 mm de diamètre, forme irrégulière, présence de filament autour le bord, matte, crème à beige, rigoureuse	Présence de pseudohyphe, cloisonné, cellule allongée
E1D1L19	2 mm de diamètre, forme irrégulière, présence de filament autour le bord, matte, crème à beige, rigoureuse	Présence de pseudohyphe, cloisonné, cellule allongée
E1D1L2	3 mm de diamètre, Grande, blanche, opaque, plate à centre surélevé, crémeuse	Ovoïde à arrondies, division par bourgeonnement
E1D1L3	1 mm de diamètre, colonie moyenne, bombée, opaque, blanche, crémeuse, brillante	Ronde, division par bourgeonnement
E1D1L4	1 mm de diamètre, moyenne, bombée, blanc cassé, opaque, brillante	Ovoïde à arrondies, division par bourgeonnement
E1D1L5	2,7 mm de diamètre, blanche, bombée à centre surélevé, matte, opaque, crémeuse	Ovoïde à arrondies, division par bourgeonnement
E1D1L7	2,5 mm de diamètre, grande, blanche, bombée, brillante, opaque, muqueuse,	Ronde, division par bourgeonnement
E1D1m2	2 mm de diamètre, forme irrégulière, présence de filament autour le bord, matte, crème à beige, rigoureuse	Présence de pseudohyphe, cloisonné, cellule allongée
E1D1m3	2 mm de diamètre, forme irrégulière, présence de filament autour le bord, matte, crème à beige, rigoureuse	Présence de pseudohyphe, cloisonné, cellules allongée
E1D1m4	Colonies blanches et feutrées, d'aspect filamenteux, plate, pourtour finement frangé	Hyphe cloisonnées ramifié, présence de spore asexué résultant de la fragmentation d'hyphe
E1D1m5	Colonies blanches et feutrées, d'aspect filamenteux, plate, pourtour finement frangé	Hyphe cloisonnées ramifié, présence de spore asexué résultant de la fragmentation d'hyphe
E1D1m6	Colonies blanches et feutrées, d'aspect filamenteux, plate, pourtour finement frangé	Hyphe cloisonnées ramifié, présence de spore asexué résultant de la fragmentation d'hyphe
E1D1m7	2 mm de diamètre, forme irrégulière, présence de filament autour le bord, matte, crème à beige, rigoureuse	Présence de pseudohyphe, cloisonné, cellule allongée
E1D1m8	2 mm de diamètre, forme irrégulière, présence de filament autour le bord, matte, crème à beige, rigoureuse	Présence de pseudohyphe, cloisonné, cellules allongée
E1D1m8	2 mm de diamètre, forme irrégulière, présence de filament autour le bord, matte, crème à beige, rigoureuse	Présence de pseudohyphe, cloisonné, cellule allongée
E1D3L1	4 mm de diamètre, ronde, bombée, lisse, brillante, blanche, opaque, crémeuse	Ronde, division par bourgeonnement
E1D3L10	4 mm de diamètre, ronde, bombée, brillante, lisse, opaque, crémeuse	Ronde, division par bourgeonnement

## Annexes

E1D3L13	Grande colonie, plissé, rigoureuse, crème à beige, matte	Cellule ovoïde à allongée, division par bourgeonnement
E1D3L14	Grande colonie, plissé, rigoureuse, blanc cassé, matte	Cellule ovoïde à allongée, division par bourgeonnement
E1D3L16	2 mm de diamètre, forme irrégulière, bord filamenteux, matte, crème à beige, rigoureuse	Présence de pseudohyphe, cloisonné, cellules allongée
E1D3L18	2 mm de diamètre, forme irrégulière, bord filamenteux	Présence de pseudohyphe, cloisonné, cellules allongée
E1D3L19	2 mm de diamètre, ronde à bord irrégulier, blanc cassé, matte, opaque, bord filamenteux	Présence de pseudohyphe, cloisonné, cellules allongée
E1D3L2	Grande colonie, forme irrégulière, blanc cassé, matte, rigoureuse, plissé	Cellule ovoïde à allongée, division par bourgeonnement
E1D3L21	Colonie moyenne, forme irrégulière à bord dentelé, présence de filament autour le bord, matte, crème à beige	Ovoïde, division par bourgeonnement
E1D3L22	2 mm de diamètre, ronde à bord irrégulier, blanc cassé, matte, opaque, bord filamenteux	Ronde, division par bourgeonnement
E1D3L23a	2 mm de diamètre, forme irrégulière, présence de filament autour le bord, matte, crème à beige, rigoureuse	Présence de pseudohyphe, cloisonné, cellule allongée
E1D3L23b	2 mm de diamètre, forme irrégulière, présence de filament autour le bord, matte, crème à beige, rigoureuse	Présence de pseudohyphe, cloisonné, cellules allongée
E1D3L24b	2 mm de diamètre, forme irrégulière, présence de filament autour le bord, matte, crème à beige, rigoureuse	Présence de pseudohyphe, cloisonné, cellule allongée
E1D3L3	2 mm de diamètre, forme irrégulier, crème à beige, matte, bord irrégulier filamenteux, rigoureuse, sèche, opaque	Présence de pseudohyphe, cloisonné, cellules allongée
E1D3L4	4 mm de diamètre, grande colonie, ronde, bombée, brillante, lisse, opaque, crémeuse	Arrondie, division par bourgeonnement
E1D3L5	1,7 mm de diamètre, ronde à bord irrégulier avec présence de filament, opaque, matte, rigoureuse	Présence de pseudohyphe, cloisonné, cellules allongée
E1D3L6	1,8 mm de diamètre, ronde, blanche, bombée, brillante, lisse, opaque	Arrondie, division par bourgeonnement
E1D3L7	4 mm de diamètre, crème à beige, opaque, matte, rigoureuse, plissé	Arrondie, division par bourgeonnement
E1D3L8	3,5 mm de diamètre, ronde, brillante, blanche, lisse, opaque, muqueuse	Arrondie, division par bourgeonnement
E1LL12	Petite colonie, punctiforme, blanche, matte, lisse, crémeuse	Ovoïde, division par bourgeonnement
E1LL14	1,7 mm de diamètre, ronde, bombée, blanche, brillante, lisse, muqueuse	Ovoïde, division par bourgeonnement
E1LL15	3 mm de diamètre, ronde, bombée, brillante, blanche à blanc cassé, lisse, muqueuse	Arrondie, division par bourgeonnement
E1LL21	1 mm de diamètre, ronde, bombée, blanche à blanc cassé, matte, opaque	Ovoïde, division par bourgeonnement
E1LL22	2,1 mm de diamètre, ronde, bombée, matte, orange foncé, muqueuse	Cellules sphériques à allongées, division par bourgeonnement
E1LL4	1 mm de diamètre, plate à centre surélevé, blanche, lisse, crémeuse,	Ovoïde, division par bourgeonnement
E1LL5	1 mm de diamètre, ronde, bombée, blanche, matte, crémeuse	Ovoïde, division par bourgeonnement
E1LL6	2 mm de diamètre, ronde, bombée, petite, brillante, lisse, opaque, muqueuse	Cellules sphériques à allongées, division par bourgeonnement
E1LL7	1,2 mm de diamètre, ronde, bombée, blanche à blanc cassé, brillante, lisse, crémeuse	Ovoïde, division par bourgeonnement
E1LL9	1,7 mm de diamètre, plate à centre surélevé, matte, blanc cassé, lisse, muqueuse	Ovoïde, division par bourgeonnement
E1RL1	3,7 mm de diamètre, ronde, plate à centre surélevé, blanc cassé, matte, opaque, crémeuse	Ovoïde à arrondies, division par bourgeonnement
E1RL10	5 mm de diamètre, grande, blanc cassé, matte, plate à centre surélevé	Ovoïde à arrondies, division par bourgeonnement
E1RL11	2,5 mm de diamètre, ronde, brillante, blanc cassé,	Sphéroïdale, division par bourgeonnement
E1RL12	3,8 mm de diamètre, ronde, plate, opaque, blanc cassé, matte, lisse, crémeuse	Ronde, division par bourgeonnement
E1RL13	2 mm de diamètre, ronde, bombée, matte, blanche	Ovoïde à arrondies, division par bourgeonnement
E1RL14	2 mm de diamètre, bombée, ronde, opaque, brillante, lisse, opaque, crémeuse	Ovoïde à arrondies, division par bourgeonnement
E1RL15	1 à 2 mm de diamètre, ronde, brillante, blanc cassé,	Sphéroïdale, division par bourgeonnement
E1RL2	2,3 mm de diamètre, ronde, blanc cassé, brillante, crémeuse	Sphéroïdale, division par bourgeonnement
E1RL3	2 mm de diamètre, ronde, plate à centre surélevé, blanche à blanc cassé, matte	Ovoïde à arrondies, division par bourgeonnement
E1RL4	2 mm de diamètre, ronde, plate à centre surélevé, blanc cassé, matte, opaque, crémeuse, lisse	Ovoïde à arrondies, division par bourgeonnement
E1RL5	1,7 mm de diamètre, ronde, bombée, brillante, blanc cassé, crémeuse, lisse	Sphéroïdale, division par bourgeonnement
E1RL6	1 mm de diamètre, ronde, brillante, blanche, brillante, crémeuse	Ovoïde, division par bourgeonnement
E1RL7	3 mm de diamètre, Ronde, plate à centre surélevé, blanche, matte, crémeuse,	Sphériques, ellipsoïdales à allongées, division par bourgeonnement
E1RL8	1,2 mm de diamètre, ronde, blanc cassé, matte, crémeuse	Sphériques, ellipsoïdales à allongées, division par bourgeonnement
E1RL9	3 mm de diamètre, ronde, plate à centre surélevé (centre bombée), blanc cassé, crémeuse, lisse, opaque, matte	Ovoïde à arrondies, division par bourgeonnement

**Annexe 8.** Arbre phylogénétique basé sur l'identification de la région D1-D2 de l'ARN26S, présentant la position du *Moniliella sp.* avec d'autres taxons apparentés



## Annexe 9. Résultats des alignements des séquences des gènes de l'ARNr 16S des souches de BL étudiées avec la banque des données GenBank

Isolats	Espèces	Espèces les plus proches	Identité (%)	Numéro
<b>B3BL14G</b>	<i>Lentilactobacillus parabuchneri</i>	<i>Lentilactobacillus parabuchneri</i> strain HBUAS56106	99,87	MW700852
<b>B3BL14p</b>	<i>Lentilactobacillus parabuchneri</i>	<i>Lentilactobacillus parabuchneri</i> strain HBUAS56106	99,93	MW692090
<b>B3BL15</b>	<i>Latilactobacillus curvatus</i>	<i>Latilactobacillus curvatus</i> strain CBA3617	99,86	MW692806
<b>E1BeBL14</b>	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> strain NM155-6	99,93	MW584092
<b>E1BeBL17</b>	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> strain NM155-6	99,93	MW584093
<b>E1BeBL18</b>	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> strain CICC6034	95,92	MW692841
<b>E1D1BL1</b>	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i> Lp02	99,87	MW701350
<b>E1D1BL10</b>	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> IMAU:10239	99,86	MW692849
<b>E1D1BL10b</b>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> strain HBUAS56120	99,93	MW584094
<b>E1D1BL3</b>	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i> strain LV108	99,87	MW694950
<b>E1D1BL3*</b>	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i> strain LV108	99,87	MW693205
<b>E1D1BL8</b>	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> strain a26	99,93	MW693210
<b>E1D3BL1</b>	<i>Levilactobacillus brevis</i>	<i>Levilactobacillus brevis</i> strain C23	99,93	MW694742
<b>E1LBL17</b>	<i>Lactococcus garvieae</i>	<i>Lactococcus garvieae</i> strain JJN1	99,93	MW584095
<b>E1LBL19</b>	<i>Lactococcus garvieae</i>	<i>Lactococcus garvieae</i> strain JJN1	100	MW584096
<b>E1LBL24</b>	<i>Lactococcus garvieae</i>	<i>Lactococcus garvieae</i> strain JJN1	100	MW584097
<b>E<sub>1</sub>LBL6ma</b>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> HBUAS56120	99,79	MW584098
<b>E1LBL6mb</b>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> HBUAS56120	99,93	MW584099
<b>E1LBL9</b>	<i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i>	<i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i> strain LV108	99,93	MW697230
<b>E1LBLm</b>	<i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i>	<i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i> strain BIO6870	99,87	MW697231
<b>E1LBLm5b</b>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> strain CCMMB1074	100	MW584100
<b>E1LBLt5</b>	<i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i>	<i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i> strain LV108	99,93	MW584101
<b>E1LBLt9</b>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> strain GCM 11042	95,14	MW584102
<b>E1RBL1</b>	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Lactococcus lactis</i> strain CJNU 3001	99,93	MW584102
<b>E1RBL11a</b>	<i>Lentilactobacillus parabuchneri</i>	<i>Lentilactobacillus parabuchneri</i> strain NM62-2	99,93	MW697232
<b>E1RBL11b</b>	<i>Lentilactobacillus parabuchneri</i>	<i>Lentilactobacillus parabuchneri</i> strain NM62-2	99,93	MW697233
<b>E1RBL12</b>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i> strain TH4125	100	MW584103
<b>E1RBL12*</b>	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> strain NM155-6	100	MW584104
<b>E1RBL1b</b>	<i>Enterococcus durans</i>	<i>Enterococcus durans</i> strain 4928STDY7071430	100	MW584105

## Annexes

<b>E1RBL23</b>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Enterococcus faecalis strain P190052</i>	100	MW584106
<b>E1RBL24</b>	<i>Lactococcus garvieae</i>	<i>Lactococcus garvieae strain JJJN1</i>	100	MW584107
<b>E1RBL4</b>	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Lactococcus lactis strain NM155-6</i>	99,93	MW584108
<b>E1RBL5</b>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Enterococcus faecalis strain TH4125</i>	100	MW584109
<b>K1BL</b>	<i>Lentilactobacillus parabuchneri</i>	<i>Lentilactobacillus parabuchneri strain HBUAS56106</i>	99,93	MW698734
<b>K1BL12b</b>	<i>Lentilactobacillus parabuchneri</i>	<i>Lentilactobacillus parabuchneri strain HBUAS56106</i>	99,87	MW697446
<b>K1BL2b*</b>	<i>Lentilactobacillus parabuchneri</i>	<i>Lentilactobacillus parabuchneri strain HBUAS56106</i>	99,93	MW697447
<b>K1BL2ba</b>	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>	<i>Lacticaseibacillus paracasei strain Lp02</i>	99,89	MW697448
<b>K1BL4a</b>	<i>Lentilactobacillus parabuchneri</i>	<i>Lentilactobacillus parabuchneri strain HBUAS56106</i>	99,87	MW697449
<b>K1BL5a</b>	<i>Lentilactobacillus parabuchneri</i>	<i>Lentilactobacillus parabuchneri strain HBUAS56106</i>	99,93	MW697450
<b>K1BL7a*</b>	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>	<i>Lacticaseibacillus paracasei strain Lp02</i>	99,93	MW697451
<b>K1BLba</b>	<i>Lentilactobacillus parabuchneri</i>	<i>Lentilactobacillus parabuchneri strain HBUAS56106</i>	99,93	MW697452
<b>K2BL1</b>	<i>Enterococcus durans</i>	<i>Enterococcus durans strain 4599</i>	99,79	MW584110
<b>K2BL12</b>	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Enterococcus faecium strain FS 86</i>	99,9	MW584111
<b>K2BL13</b>	<i>Enterococcus durans</i>	<i>Enterococcus durans strain 4928STDY7071430</i>	100	MW584112
<b>K2BL16</b>	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Enterococcus faecium strain VV Eswe-R</i>	100	MW584113
<b>K2BL18</b>	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Enterococcus faecium strain NM157-3</i>	99,93	MW584114
<b>K2BL2</b>	<i>Enterococcus durans</i>	<i>Enterococcus durans strain 4928STDY7071430</i>	100	MW584115
<b>K2BL22</b>	<i>Enterococcus durans</i>	<i>Enterococcus durans strain 4928STDY7071430</i>	100	MW584116
<b>K2BL25</b>	<i>Enterococcus durans</i>	<i>Enterococcus durans strain NM156-5</i>	100	MW584117
<b>K2BL3</b>	<i>Enterococcus durans</i>	<i>Enterococcus durans strain NM156-5</i>	100	MW584118
<b>K2BL4</b>	<i>Enterococcus durans</i>	<i>Enterococcus durans strain 4541</i>	99,93	MW584119
<b>K2BL5</b>	<i>Enterococcus durans</i>	<i>Enterococcus durans strain NM156-5</i>	100	MW584120
<b>K2BL8</b>	<i>Enterococcus durans</i>	<i>Enterococcus durans strain 4928STDY7071430</i>	100	MW584121
<b>O1BL4G</b>	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>	<i>Lacticaseibacillus paracasei strain Lp02</i>	99,86	MW698188
<b>O1BL4p</b>	<i>Lentilactobacillus parabuchneri</i>	<i>Lentilactobacillus parabuchneri strain HBUAS56106</i>	99,93	MW698189
<b>O1BL7</b>	<i>Lentilactobacillus parabuchneri</i>	<i>Lentilactobacillus parabuchneri strain HBUAS56106</i>	99,86	MW698190
<b>O1BL8m</b>	<i>Lentilactobacillus parabuchneri</i>	<i>Lentilactobacillus parabuchneri strain HBUAS56106</i>	99,87	MW698191
<b>O1BL8p</b>	<i>Lentilactobacillus parabuchneri</i>	<i>Lentilactobacillus parabuchneri strain HBUAS56106</i>	99,93	MW698192
<b>S1BL14a</b>	<i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i>	<i>Lacticaseibacillus rhamnosus strain LV108</i>	99,86	MW698198
<b>S1BL14b</b>	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Enterococcus faecium strain VVEswe-R</i>	99,80	MW584123

*Annexes*

<b>S1BL4</b>	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Enterococcus faecium strain VVEswe-R</i>	99,93	MW584124
<b>S1BL5</b>	<i>Enterococcus durans</i>	<i>Enterococcus durans strain NM156-5</i>	100	MW584125
<b>S1BL6</b>	<i>Enterococcus durans</i>	<i>Enterococcus durans strain NM156-5</i>	100	MW584126
<b>S1BL8</b>	<i>Enterococcus durans</i>	<i>Enterococcus durans strain 4928STDY7071430</i>	99,93	MW584127
<b>S1BL9</b>	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Enterococcus faecium strain VVEswe-R</i>	99,93	MW584128
<b>S2BL12</b>	<i>Enterococcus durans</i>	<i>Enterococcus durans strain NM156-5</i>	100	MW584129
<b>S2BL14</b>	<i>Enterococcus durans</i>	<i>Enterococcus durans strain NM156-5</i>	100	MW584130
<b>S2BL15</b>	<i>Enterococcus durans</i>	<i>Enterococcus durans strain 4928STDY7071430</i>	100	MW584131
<b>S2BL17</b>	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Enterococcus faecium strain NM157-3</i>	99,93	MW584132
<b>S2BL20</b>	<i>Enterococcus durans</i>	<i>Enterococcus durans strain NM156-5</i>	100	MW527422
<b>S2BL3</b>	<i>Enterococcus durans</i>	<i>Enterococcus durans strain NM156-5</i>	100	MW584134
<b>S2BL6</b>	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Enterococcus faecium isolate E2079</i>	100	MW584135
<b>S2BL7</b>	<i>Enterococcus durans</i>	<i>Enterococcus durans strain 4928STDY7071430</i>	100	MW584136
<b>S2BL9</b>	<i>Enterococcus durans</i>	<i>Enterococcus durans strain EDD2</i>	99,79	MW584137
<b>S3BL10b</b>	<i>Lactocaseibacillus rhamnosus</i>	<i>Lactocaseibacillus rhamnosus strain LV108</i>	99,93	MW698199
<b>S3BL14b</b>	<i>Lactocaseibacillus paracasei</i>	<i>Lactocaseibacillus paracasei strain TD062</i>	99,93	MW698200
<b>S3BL15*</b>	<i>Enterococcus durans</i>	<i>Enterococcus durans strain NM156-5</i>	100	MW584138
<b>S3BL15a</b>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides HBUAS56120</i>	100	MW584139
<b>S3BL15b*</b>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides HBUAS56120</i>	100	MW584140
<b>S3BL2a</b>	<i>Lactocaseibacillus paracasei</i>	<i>Lactocaseibacillus paracasei Lp02</i>	99,86	MW698201
<b>S3BL7a</b>	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	<i>Lactiplantibacillus plantarum strain 12_3</i>	99,59	MW698202
<b>S3BL9</b>	<i>Lactocaseibacillus rhamnosus</i>	<i>Lactocaseibacillus rhamnosus strain LV108</i>	99,87	MW698203

**Annexe 10.** Résultats des alignements des séquences des régions D1-D2 de l'ARNr26S des souches de levures étudiées avec la banque des données GenBank

Isolats	Espèces	Espèces les plus proches	Identité (%)	Numéro d'accension
<b>E1BeL10</b>	<i>Torulaspota delbrueckii</i>	<i>Torulaspota delbrueckii</i> isolate W5	100	MW587717
<b>E1BeL12</b>	<i>Kluyveromyces lactis</i>	<i>Kluyveromyces lactis</i> strain CBS 2105	100	MW587718
<b>E1BeL2</b>	<i>Torulaspota delbrueckii</i>	<i>Torulaspota delbrueckii</i> isolate W5	100	MW587715
<b>E1BeL5</b>	<i>Torulaspota delbrueckii</i>	<i>Torulaspota delbrueckii</i> isolate MCZ02	100	MW587716
<b>E1D1L1</b>	<i>Candida sorbosivorans</i>	<i>Candida sorbosivorans</i> strain DMic 113940	100	MW587719
<b>E1D1L10</b>	<i>Clavispora lusitaniae</i>	<i>Clavispora lusitaniae</i> strain AgL21	100	MW699669
<b>E1D1L17</b>	<i>Candida sorbosivorans</i>	<i>Moniliella dehoogii</i> strain CBS 126564	98,38	MW603827
<b>E1D1L18</b>	<i>Moniliella</i> sp.	<i>Moniliella</i> sp. isolate UFMG-CM-Y6324	100	MW587723
<b>E1D1L19</b>	<i>Moniliella</i> sp.	<i>Moniliella</i> sp. isolate UFMG-CM-Y6324	100	MW589484
<b>E1D1L2</b>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> isolate A3	100	MW587720
<b>E1D1L3</b>	<i>Candida sorbosivorans</i>	<i>Candida sorbosivorans</i> strain CEC C219	100	MW587721
<b>E1D1L7</b>	<i>Candida sorbosivarans</i>	<i>Candida sorbosivorans</i> strain DMic	100	MW587722
<b>E1D1m2</b>	<i>Moniliella</i> sp.	<i>Moniliella</i> sp. isolate UFMG-CM-Y6324	100	MW589485
<b>E1D1m8</b>	<i>Moniliella</i> sp.	<i>Moniliella</i> sp. isolate UFMG-CM-Y6324	100	MW589486
<b>E1D3L1</b>	<i>Candida sorbosivorans</i>	<i>Candida sorbosivorans</i> strain CBS 6201	100	MW587724
<b>E1D3L14</b>	<i>Moniliella suaveolens</i>	<i>Moniliella suaveolens</i> var. <i>nigra</i> strain CBS 120.67	99,32	MW603829
<b>E1D3L18</b>	<i>Moniliella</i> sp.	<i>Moniliella</i> sp. isolate UFMG-CM-Y6324	100	MW589488
<b>E1D3L19</b>	<i>Moniliella</i> sp.	<i>Moniliella</i> sp. isolate UFMG-CM-Y6324	100	MW589489
<b>E1D3L2</b>	<i>Moniliella suaveolens</i>	<i>Moniliella suaveolens</i> var. <i>nigra</i> strain CBS 120.67	98,98	MW603828
<b>E1D3L23a</b>	<i>Moniliella</i> sp.	<i>Moniliella</i> sp. isolate UFMG-CM-Y6324	100	MW589490
<b>E1D3L23b</b>	<i>Moniliella</i> sp.	<i>Moniliella</i> sp. isolate UFMG-CM-Y6324	100	MW589491
<b>E1D3L24b</b>	<i>Moniliella</i> sp.	<i>Moniliella</i> sp. isolate UFMG-CM-Y6324	100	MW703697
<b>E1D3L4</b>	<i>Candida sorbosivorans</i>	<i>Candida sorbosivorans</i> strain CEC C219	100	MW587725
<b>E1D3L5</b>	<i>Moniliella</i> sp.	<i>Moniliella</i> sp. isolate UFMG-CM-Y6324	100	MW589487
<b>E1D3L6</b>	<i>Candida sorbosivorans</i>	<i>Candida sorbosivorans</i> strain CEC C219	100	MW587726
<b>E1D3L8</b>	<i>Candida sorbosivarans</i>	<i>Candida sorbosivorans</i> strain CEC C219	100	MW587727
<b>E1LL14</b>	<i>Wickerhamiella pararugosa</i>	<i>Wickerhamiella pararugosa</i> strain CBS 1948	99,83	MW587730

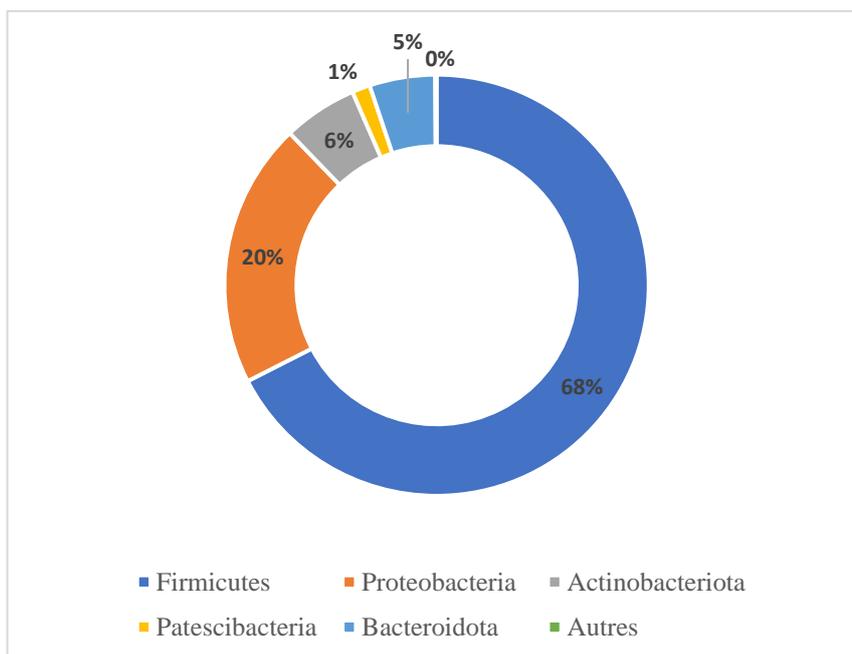
*Annexes*

<b>E1LL15</b>	<i>Clavispora lusitaniae</i>	<i>Clavispora lusitaniae</i> strain EXOC7	100	MW587731
<b>E1LL21</b>	<i>Wickerhamiella pararugosa</i>	<i>Wickerhamiella pararugosa</i> strain CBS 1948	100	MW587732
<b>E1LL5</b>	<i>Wickerhamiella pararugosa</i>	<i>Wickerhamiella pararugosa</i> strain CBS 1948	100	MW587728
<b>E1LL6</b>	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> strain SXAU-002	100	MW587729
<b>E1RL10</b>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> isolate A3	100	MW587737
<b>E1RL11</b>	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	<i>Kluyveromyces marxianus</i> strain CCT 7735	100	MW587738
<b>E1RL14</b>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> isolate A3	100	MW587739
<b>E1RL15</b>	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	<i>Kluyveromyces marxianus</i> strain CCT 7735	100	MW587740
<b>E1RL2</b>	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	<i>Kluyveromyces marxianus</i> strain CCT 7735	100	MW587733
<b>E1RL5</b>	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	<i>Kluyveromyces marxianus</i> strain CCT 7735	100	MW587734
<b>E1RL6</b>	<i>Wickerhamiella pararugosa</i>	<i>Wickerhamiella pararugosa</i> strain CBS 1948	100	MW587735
<b>E1RL7</b>	<i>Yarrowia lipolytica</i>	<i>Yarrowia lipolytica</i> strain CBS 6124	100	MW587736
<b>S2L5</b>	<i>Candida zeylanoides</i>	<i>Candida zeylanoides</i> culture CBS:947	99,67	MW587741
<b>S2L7</b>	<i>Candida zeylanoides</i>	<i>Candida zeylanoides</i> culture CBS:948	100	MW587742
<b>S2L8</b>	<i>Candida zeylanoides</i>	<i>Candida zeylanoides</i> strain CBS1922HF	100	MW587743
<b>S3L11</b>	<i>Wickerhamiella pararugosa</i>	<i>Wickerhamiella pararugosa</i> strain CBS 1948	100	MW587748
<b>S3L2</b>	<i>Moniliella dehoogii</i>	<i>Moniliella dehoogii</i> strain CBS 126564	98,80	MW587744
<b>S3L3</b>	<i>Wickerhamiella pararugosa</i>	<i>Wickerhamiella pararugosa</i> strain NM 2b cl	99,65	MW587745
<b>S3L7</b>	<i>Pichia fermentans</i>	<i>Pichia fermentans</i> strain M17.2	100	MW587746
<b>S3L8</b>	<i>Kluyveromyces lactis</i>	<i>Kluyveromyces lactis</i> strain CBS 2105	99,83	MW587747
<b>S3m2</b>	<i>Galactomyces geotrichum</i>	<i>Galactomyces geotrichum</i> strain LMA-20	99,48	MW587749

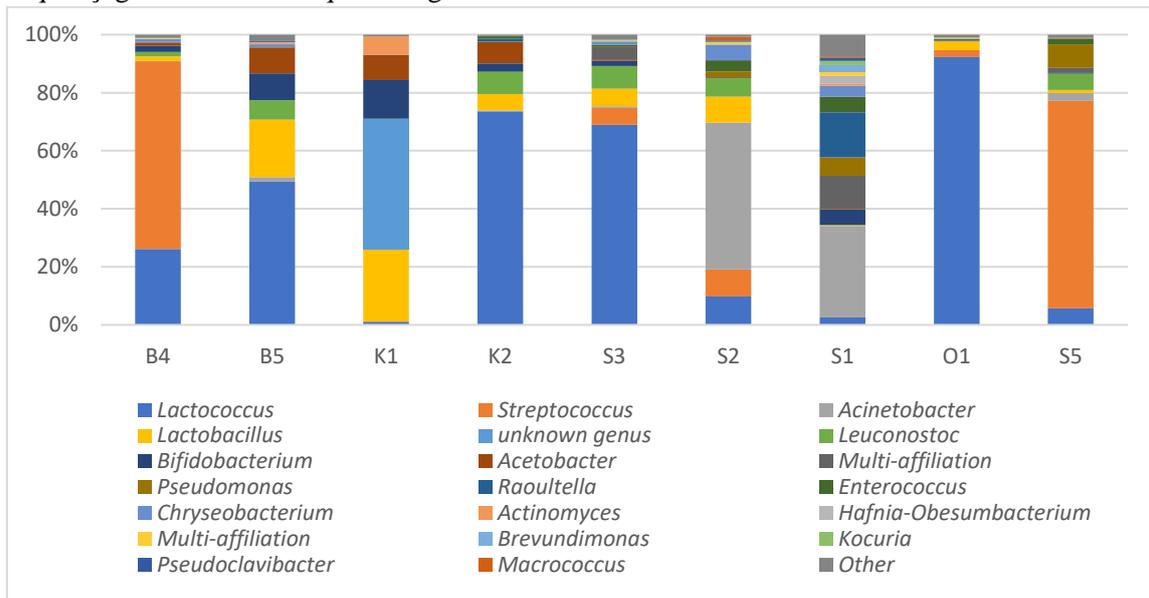
**Annexe 11.** Composition globale de la communauté bactérienne (nombre) des échantillons de *Smen* collectés par séquençage Illumina-MiSeq de la région V3-V4 de l'ARNr16S

Echantillons	Domaine	Phylum	Classe	Ordre	Famille	Genre	Espèces	Séquences
B4	1	7	9	19	31	39	55	38254
B5	1	6	7	18	27	37	50	44444
K1	1	6	7	14	18	23	33	32724
K2	1	6	7	14	23	28	36	27339
S3	1	6	7	16	28	37	57	31066
S2	1	5	6	16	28	39	51	35678
S1	1	5	6	18	33	45	62	30623
O1	1	5	6	12	19	23	30	17291
S5	1	5	6	16	29	41	56	39784

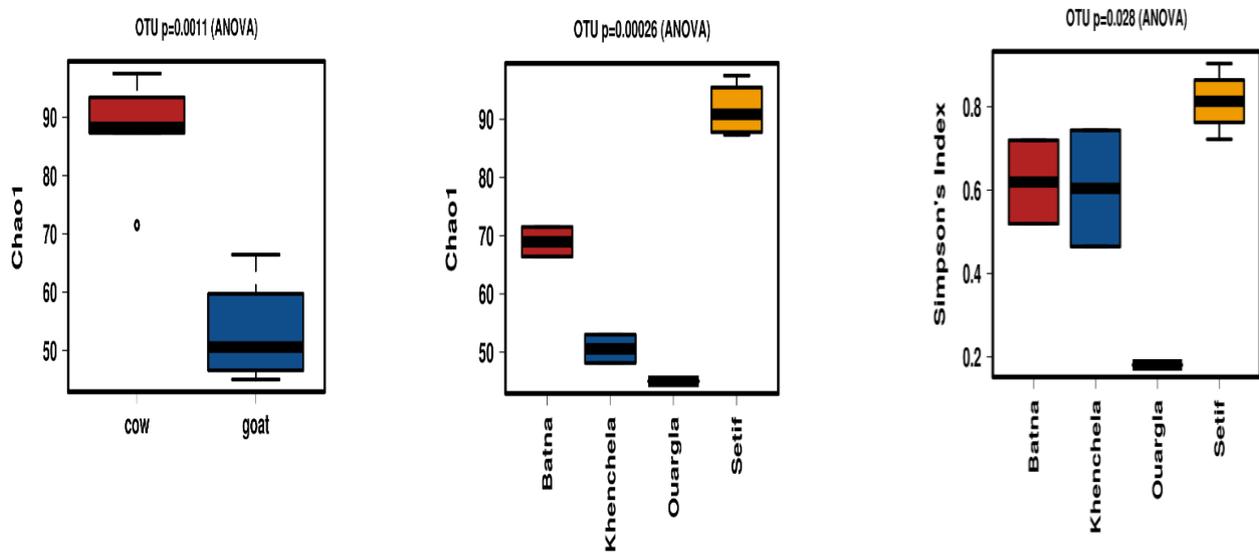
**Annexe 12.** Pourcentage des phylas bactériens identifiés dans les échantillons de *Smen/Dhan* collectés par séquençage Illumina-MiSeq de la région V3-V4 de l'ARNr16S



**Annexe 13.** Diversité bactérienne au niveau des genres des échantillons de *Smen/Dhan* collectés par séquençage Illumina-Miseq de la région V3-V4 de l'ARNr16S



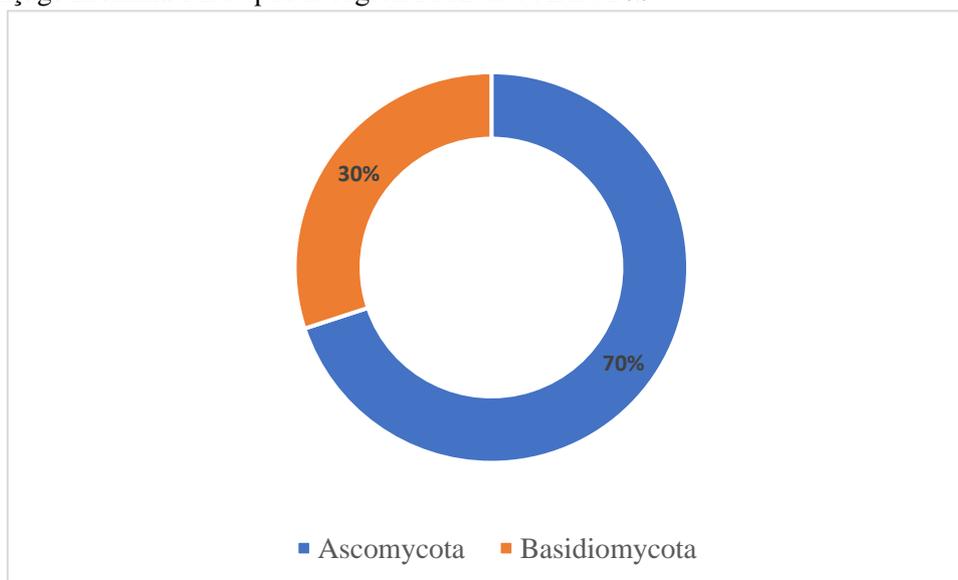
**Annexe 14.** Indices d'alpha-diversité des communautés bactériennes basés sur les données de séquençage du métabarcoding des régions V3-V4 de l'ARN16.  $p < 0,05$



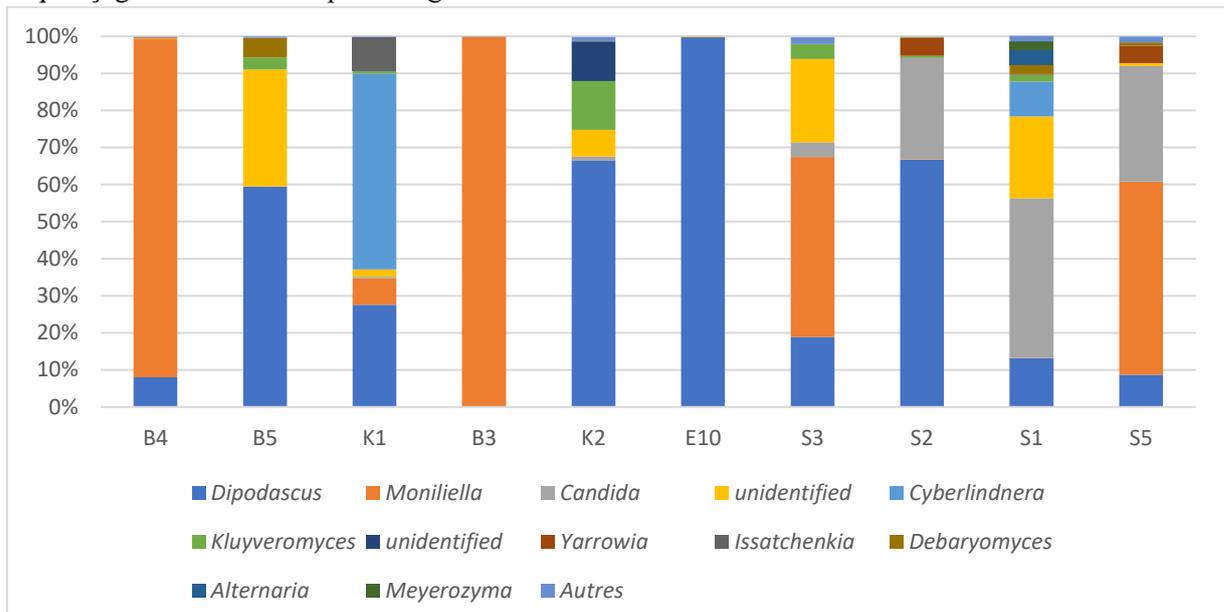
**Annexe 15.** Composition globale de la communauté fongique (nombre) des échantillons de *Smen* collectés par séquençage Illumina-MiSeq de l'ARNr26S

Echantillons	Domaine	Phylum	Classe	Ordre	Famille	Genres	Espèces	Sequences
B4	1	3	6	8	13	19	20	56811
B5	1	3	7	8	15	21	23	71857
K1	1	3	6	7	14	24	31	58292
B3	1	2	4	4	9	11	11	58911
K2	1	2	4	5	12	19	23	63728
E10	1	2	4	5	12	16	18	93028
S3	1	3	7	8	14	24	31	59501
S2	1	3	7	8	14	22	27	71892
S1	1	3	9	12	19	31	38	62256
S5	1	3	7	9	15	23	30	50092

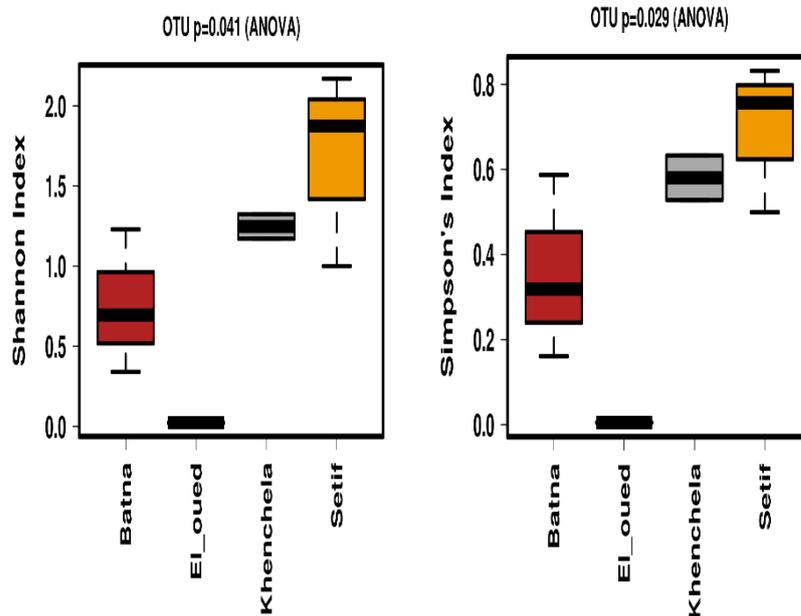
**Annexe 16.** Pourcentage des phylas fongiques identifiés dans les échantillons de *Smen/Dhan* collectés par séquençage Illumina-MiSeq de la région ITS2 de l'ARNr26S



**Annexe 17.** Diversité fongique au niveau des genres des échantillons de *Smen/Dhan* collectés par séquençage Illumina-Miseq de la région ITS2 de l'ARNr26S



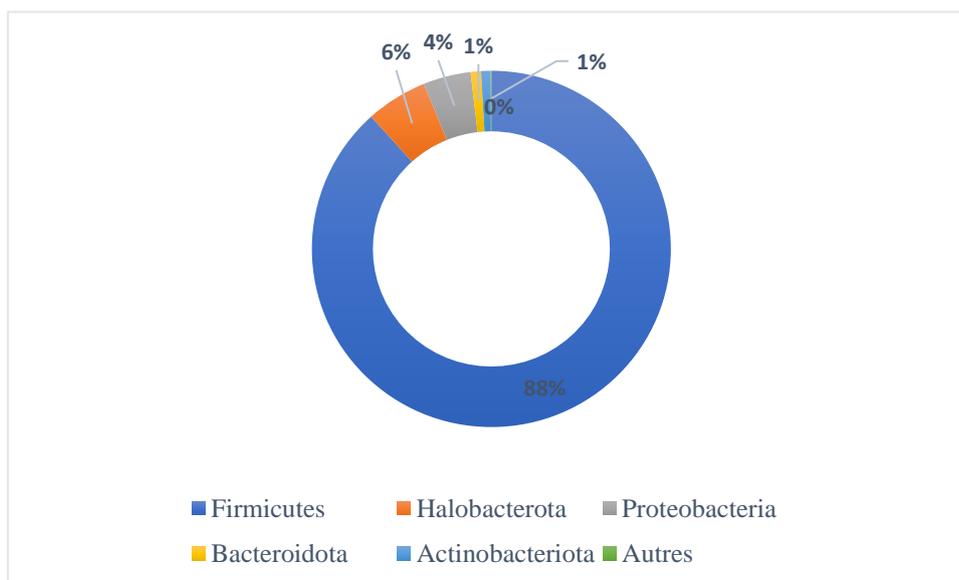
**Annexe 18.** Indices d'alpha-diversité des communautés fongiques basés sur les données de séquençage du métabarcoding de la région ITS2.  $p < 0,05$



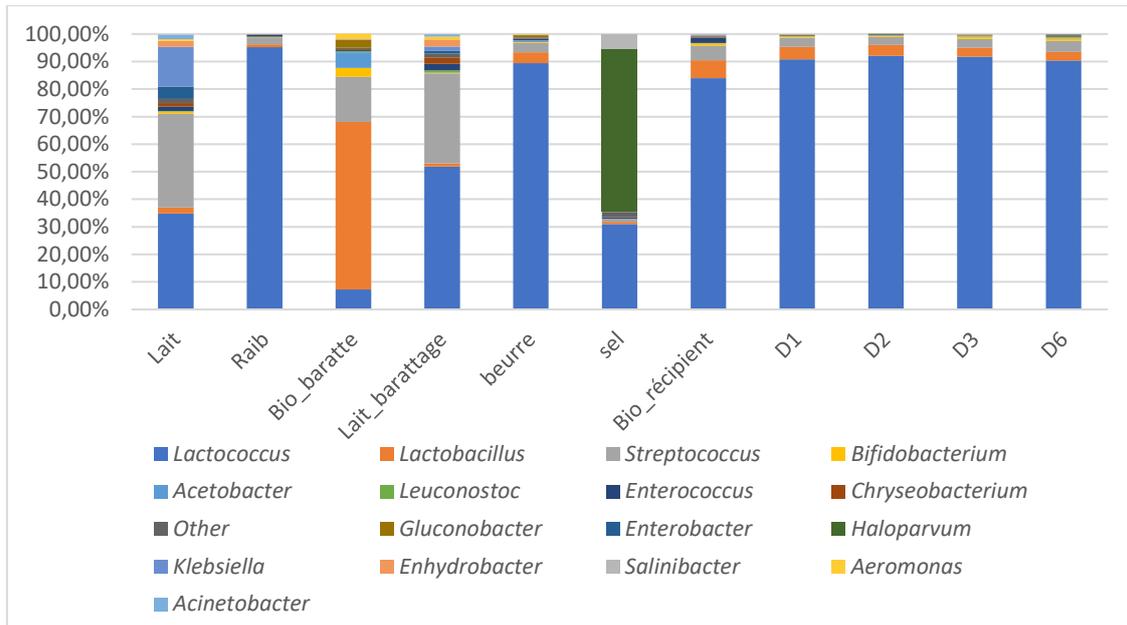
**Annexe 19.** Composition globale de la communauté bactériennes (nombre) des échantillons prélevés durant la préparation de *Smen/Dhan* par séquençage Illumina-Miseq de la région V3-V4 de l'ARNr16S

Echantillons	Domaine	Phylum	Classe	Ordre	Famille	Genre	Espèce	Séquences
Lait	1	5	6	11	18	26	36	28486
Raib	1	5	6	10	17	23	32	35391
Bio_Baratte	1	5	7	12	19	25	35	24458
Lait_Barattage	1	5	6	11	19	25	35	22483
Beurre	2	6	8	14	21	28	40	35871
Sel	2	6	8	14	21	29	35	35787
Bio_récipient	1	5	6	11	18	26	35	38169
D1	1	5	7	11	17	21	31	33972
D2	1	5	7	11	17	21	33	33553
D3	1	5	7	12	18	24	36	45310
D6	1	5	7	12	18	23	35	34559

**Annexe 20.** Pourcentage des phylas bactériens identifiés dans les échantillons prélevés durant la préparation de *Smen/Dhan* par séquençage Illumina-MiSeq de la région V3-V4 de l'ARNr16S



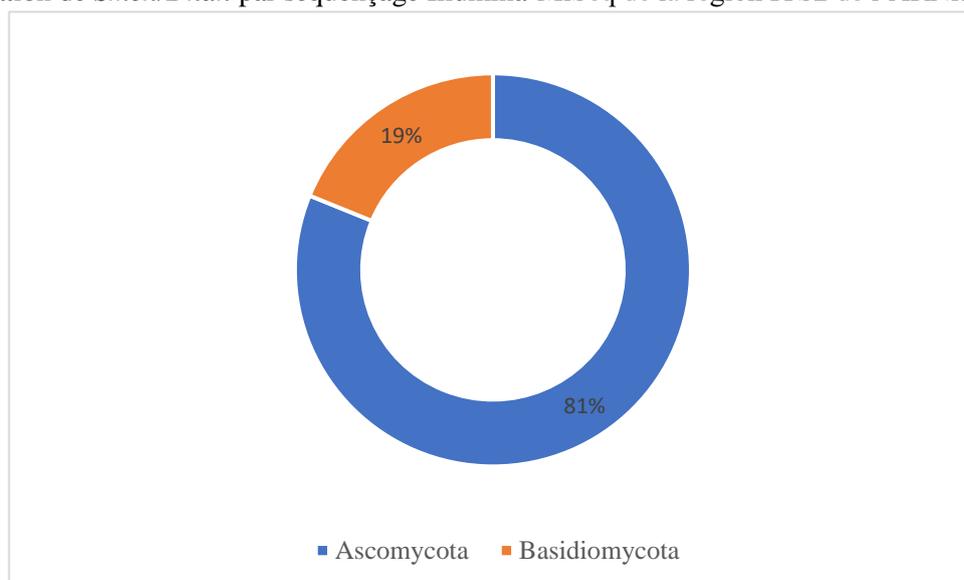
**Annexe 21.** Diversité bactérienne au niveau des genres des échantillons prélevés durant la préparation du *Smen/Dhan* par séquençage Illumina-Miseq de la région V3-V4 de l'ARNr16S



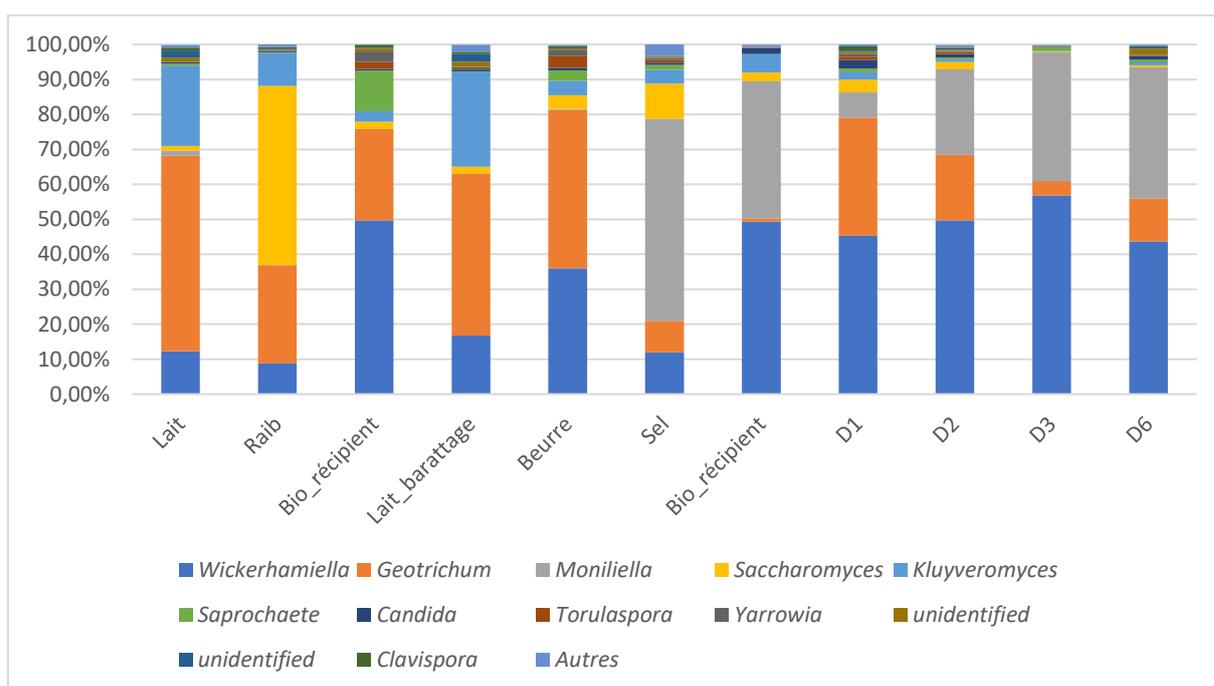
**Annexe 22.** Composition globale de la communauté fongique (nombre) des échantillons prélevés durant la préparation de *Smen/Dhan* par séquençage Illumina-Miseq de la région ITS2 de l'ARNr26S

Echantillon	Domaine	Phylum	Classe	Ordre	Famille	Genre	Espèce	Séquence
Lait	1	3	7	8	15	30	35	72344
Raib	1	3	5	6	12	26	32	52467
Bio_Baratte	1	3	6	6	12	26	32	58281
Lait_Barattage	1	3	7	7	14	28	34	53856
Beurre	1	3	6	6	12	27	33	73174
Sel	1	4	7	8	18	29	35	50619
Bio_Récipient	1	3	5	6	13	23	27	47894
D1	1	3	5	6	13	28	35	65497
D2	1	3	6	6	13	27	34	49925
D3	1	3	5	6	13	26	33	62494
D6	1	3	5	6	13	27	35	47788

**Annexe 23.** Pourcentage des phylas fongiques identifiés dans les échantillons prélevés durant la préparation de *Smen/Dhan* par séquençage Illumina-MiSeq de la région ITS2 de l'ARNr26S



**Annexe 24.** Diversité fongique au niveau des genres des échantillons prélevés durant la préparation du *Smen/Dhan* par séquençage Illumina-MiSeq de la région ITS2 de l'ARNr26S



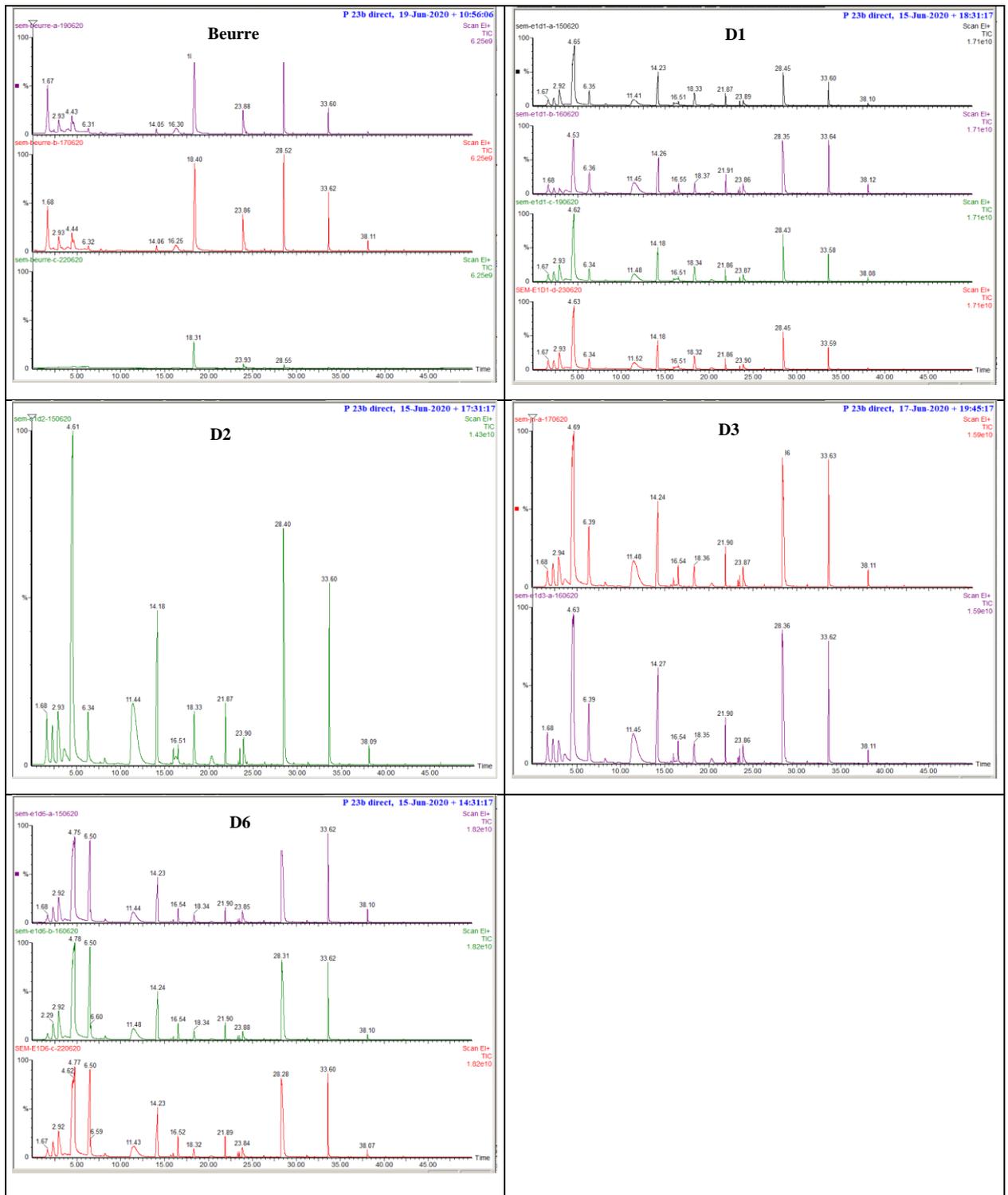
**Annexe 25.** Numéros d'accèsion des séquences de métabarcoding (16S)

Echantillons	Type d'échantillon	ID library	Numéro d'accèsion
B4	Fermented butter	lib372829	SAMN23005575
B5	Fermented butter	lib372830	SAMN23102035
K1	Fermented butter	lib372831	SAMN23102456
K2	Fermented butter	lib372832	SAMN23102457
S3	Fermented butter	lib372833	SAMN23102498
S2	Fermented butter	lib372834	SAMN23102499
S1	Fermented butter	lib372835	SAMN23131947
O1	Fermented butter	lib372828	SAMN22962632
S5	Fermented butter	lib372836	SAMN22962633
Milk	Milk	lib372837	SAMN22962648
Raib	Raib	lib372838	SAMN22962661
Bio churn	Bio churn	lib372839	SAMN22962662
Butter	Butter	lib372841	SAMN22962670
Salt	Salt	lib372842	SAMN22963470
Bio recepiant	Bio recepiant	lib372839	SAMN22968376
D1	Fermented butter	lib372844	SAMN22968413
D3	Fermented butter	lib372846	SAMN22968438
D6	Fermented butter	lib372847	SAMN23005371
Milk churn	Milk	lib372840	SAMN23133887
D2	Fermented butter	lib372845	SAMN22968425

**Annexe 26.** Numéros d'accèsion des séquences de métabarcoding (ITS)

Echantillon	Type d'échantillon	ID library	Numéro d'accèsion
B4	Fermented butter	lib373096	SAMN22602011
B5	Fermented butter	lib373097	SAMN22645107
K1	Fermented butter	lib373098	SAMN22645411
K2	Fermented butter	lib373099	SAMN22645454
B3	Fermented butter	lib373115	SAMN22739177
S3	Fermented butter	lib373100	SAMN22739247
E10	Fermented butter	lib373116	SAMN22741321
S2	Fermented butter	lib373101	SAMN22744425
S1	Fermented butter	lib373102	SAMN22746555
S5	Fermented butter	lib373103	SAMN22785408
Milk	Milk	lib373104	SAMN22837352
Raib	Raib	lib373105	SAMN22837353
Bio churn	Bio churn	lib373106	SAMN22837354
Butter	Butter	lib373108	SAMN22837355
Salt	Salt	lib373109	SAMN22837356
Bio recipiant	Bio recepiant	lib373110	SAMN22837357
D1	Fermented butter	lib373111	SAMN22837358
Milk churn	Milk churn	lib373107	SAMN22895715

**Annexe 27.** Chromatogrammes des échantillons de la dynamique de la maturation de *Smen* analysés par HS-GC-MS



# *Résumés*

في الجزائر، يتم تحضير مجموعة متنوعة من منتجات الألبان المخمرة بشكل تقليدي، هذه المنتجات هي جزء من التراث الجزائري ولها أهمية ثقافية، طبية واقتصادية كبيرة. من بين هذه المنتجات السمن أو الدهان هو عبارة عن زبدة مخمرة بشكل طبيعي بالطرق التقليدية. تعد معرفة هذا المنتج من حيث الخصائص التكنولوجية، الفيزيائية والكيميائية أيضا الميكروبيولوجية ذات أهمية علمية بالغة من أجل التحكم في الصفات الصحية والحسية لهذا المنتج ولكن أيضا في النهاية من أجل تثمينه. الجزء الأول من هذه الدراسة هو تحديد مكان واستخدام هذا المنتج التقليدي في الثقافة المحلية والتعرف على الطرق المستخدمة في تحضيره. للقيام بذلك، تم إجراء تحقيق باستخدام استبيان ومقابلة شمل 880 أسرة في 7 مناطق من الجزائر (شمال شرق وجنوب شرق الجزائر). أظهرت النتائج أن هذا المنتج معروف من قبل غالبية السكان الذين شملهم التحقيق وان تحضيره يتم على مستوى الأسرة وفقاً للطرق التقليدية. إن إنتاج السمن مخصص بشكل أساسي للاستهلاك المنزلي أو يتم تسويقه بشكل غير رسمي. على العموم تحضير السمن يتم باستخدام طريقتين مختلفتين حسب المنطقة: في باتنة، خنشلة وسطيف تُملح الزبدة ثم تخزن أما في كل من ولاية بسكرة، جيجل، الوادي وورقلة، يتم اضافة كمية ضئيلة من الملح ومكونات اخرى الى الزبدة؛ ثم يتم تنويعها تصفيته وتعبئتها في حاوية تقليدية من الطين (الزير). يمكن ان تتراوح مدة النضج من شهر إلى عدة سنوات. يستخدم السمن لتحسين ذوق وتعطير بعض الأطباق التقليدية (الكسكس/ أخرى)، وكذلك في الطب التقليدي. في الجزء الثاني من هذا العمل، تطرقنا الى دراسة التنوع الميكروبي وتأثيره على النضج الطبيعي للسمن. تم جمع 15 عينة من السمن المنتجة على المستوى المنزلي من مناطق مختلفة من الجزائر وتم تحضير عينة واحدة وفقاً للطريقة التقليدية. سمحت طرق العزل المعتمدة بتقييم الجودة الصحية للعينات، متبوعاً بالتعريف الجزيئي لبكتيريا حمض اللاكتيك (rRNA16S) والخمائر (منطقة rRNA D1-D2 ل rRNA26S). تم أيضاً إجراء طرق العزل الغير معتمدة (métabarcoding) عن طريق تسلسل Illumina-Miseq، والتي تستهدف منطقة V3-V4 من rRNA16S (بكتيريا حمض اللاكتيك) ومنطقة ITS2 من rRNA26S (الخميرة)، من أجل تحديد الأنواع الميكروبية التي تترك بصماتها الحينية (الحمض النووي). أظهرت النتائج التي تم الحصول عليها أن هذا المنتج مرضي من ناحية الجودة الصحية وأنه لا يشكل أي خطر على صحة المستهلك. نتائج التحديد الجزيئي لبكتيريا حمض اللاكتيك وعزلات الخميرة أظهرت أن العينات تحتوي على تنوع ميكروبي متعدد. من إجمالي عدد عزلات بكتيريا حمض اللاكتيك (121)، تم التعرف الجزيئي ل 82 سلالة والذي كشف عن انتمائها الى 11 نوعاً من 4 أجناس، بالنسبة لسلالات الخميرة المعزولة (102) فقد تم اختيار 48 سلالة من اجل التعرف الجزيئي والذي أظهر عن انتمائها ل 15 نوعاً من 11 جنساً. تم ملاحظة اختلافات كبيرة بين تقنيتي العزل المستخدمة، بحيث كشفت طرق العزل الغير معتمدة عن الأنواع الأكثر سيادة (*Lactococcus lactis*; *Streptococcus salivarius*) والتي لم يتم عزلها بطرق العزل المعتمدة التي أظهرت أن أنواع العصيات اللبنية lactobacilles والمكورات المعوية entérocoques كانت الأكثر سيادة في عينات السمن التي تم جمعها. فيما يتعلق بالتنوع الفطري، فقد اظهرت النتائج بان انواع عديدة من الخمائر قد شاركت في تحضير ونضج السمن، وقد تم تحديد معظمها من خلال تقنيتي العزل المستعملة في هذه الدراسة (*Geotrichum candidum*, *Wickerhamiella pararugosa*, *Kluyveromyces lactis*, *Yarrowia lipolytica*, *Kluyveromyces marxianus*, *Torulaspora delbrueckii*, *Clavispora lusitaniae* et *Rhodotorula mucilaginosa*). بالإضافة إلى هذه النتائج، فقد تم عزل نوع جديد غير معروف *Moniliella sp.*، بحيث يمثل تسلسل الجينات (D1/ D2-rRNA26S) تشابهاً بنسبة 95٪ مع *Moniliella dehoogii* الذي يمثل قريبه النسبي. أخيراً، الجزء الثالث من هذا العمل هو تحليل المحتوى العطري بواسطة GC-MS، والذي تم إجراؤه لإظهار طبيعة وديناميكيات المركبات العضوية المتطايرة (VOCs)، التي يتم إنتاجها أثناء النضج، وتسليط الضوء على العلاقات المتبادلة بينها والتنوع الميكروبي. تم تحديد 81 مركباً عضوياً متطابقاً ينتمون إلى عائلات مختلفة: استرات (20)، كيتونات (20)، ألدهيدات (13)، أحماض دهنية (12)، كحول (7)، فيوران (3)، تريين (2)، ستيرين (1) ومركبات أخرى (3). ارتبطت طبيعة هذه المركبات المتطايرة ووفرتها ارتباطاً وثيقاً بوقت النضج ودرجة تحلل الدهون وكذلك طبيعة الكائنات الحية الدقيقة التي لوحظت العديد من الارتباطات الإيجابية بين المركبات المتطايرة والأنواع المحددة. السمن او الدهان هو انتاج المنطقة اسمه العرقي ومعرفته تنتقل عبر الأجيال. لذلك سيكون من المثير للاهتمام إنشاء تعاونيات يمكنها تسويق هذا المنتج بطريقة رسمية، مع تسمية خاصة محددة. تمكن من مساعدة المنتجين المحليين على تحسين جودة وسلامة المنتج. سيكون اختيار سلالات معينة من بكتيريا حمض اللاكتيك والخمائر لإنتاج سلالات مخصصة لتصنيع السمن على نطاق صناعي مثيراً للاهتمام للتحصل على خصائص ذات جودة عالية.

**الكلمات المفتاحية:** السمن الدهان، تحقيق، الزبدة المخمرة التقليدية، ميكروبيوتا، بكتيريا حمض اللاكتيك، الخمائر، طرق العزل المعتمدة، ميتاجينيتيك، المركبات المتطايرة.

In Algeria, a wide variety of fermented dairy products are traditionally prepared, these products are part of the Algerian heritage and represents a cultural, medicinal and economic importance. Among these products, *Smen* or *Dhan* is a naturally fermented butter made by traditional methods. A Better knowledge of this product in terms of technological, physicochemical and microbiological know-how represents a scientific interest in order to control its health and organoleptic qualities and also for its valorization. The first part of this study was to investigate the place and use of this product in the Algerian culture as well as to identify the traditional methods used for its preparation. A survey was conducted on 880 households in 7 regions of the South and East of Algeria. The results revealed that this product is known by the majority of the surveyed population and prepared at household level according to empirical methods. The production of *Smen* is mainly intended for home consumption or marketed informally. Two different preparation modes are used depending on the surveyed regions. Households from Batna, Khenchela and Setif proceed directly with butter salting, while in the Biskra, Jijel, El Oued and Ouargla regions, a different process is used which first involves a heat-treatment of the butter followed by the addition of one or more ingredients. After packing in a traditional ceramic container (*Ezzir*) and other containers, a maturation step is applied with a long duration varying from one month to several years. This product is consumed as an additive to enhance the taste and aroma of some traditional dishes (*couscous*/other) and is also used in traditional medicine. In the second part of this work, we studied the microbial diversity and its implication in the *Smen* maturation. To reach this goal, 15 *Smen* samples (final products) produced in households were collected from different regions in Algeria, while microbial dynamics were investigated for one *Smen* preparation. The culture-dependent approach allowed the evaluation of the hygienic and sanitary quality, and the molecular identification of lactic acid bacteria (rRNA16S) and yeasts (D1-D2-rRNA26S region). The culture-independent technique (metabarcoding) using illumina-Miseq sequencing, targeting the V3-V4 region of RNA16S (BL) and the ITS2 region of RNA26S (yeasts), was also carried out, in order to identify microbial species that leave their genetic fingerprints (DNA). Results showed that all hygiene and safety criteria were satisfactory for these *Smen* products. Molecular identification of LAB and yeasts isolates showed that the samples were highly diverse in microflora. Among the total isolates LAB (121), 82 strains were chosen for molecular identification, the results showed that they belong to 11 species and 4 genera. regarding yeast isolates (102), 48 strains were identified to belong to 15 species and 11 genera. Significant divergences were observed between the two techniques used, the independent culture revealed the most imposing species (*Lactococcus lactis* and *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*), these later were not isolated by dependent culture approach, which revealed that the species of lactobacilli and enterococci were the most represented in the collected *Smen* samples. Regarding fungal diversity, several key species involved in *Smen* manufacturing and maturation were identified by the two approaches, i.e., *Geotrichum candidum*, *Wickerhamiella pararugosa*, *Kluyveromyces lactis*, *Yarrowia lipolytica*, *Kluyveromyces marxianus*, *Torulaspora delbrueckii*, *Clavispora lusitaniae* et *Rhodotorula mucilaginosa*. In addition to these results, a new species of *Moniliella* sp., was isolated which sequence gene (D1/D2-rRNA26S) represents 95% of similarity with *Moniliella dehoogii* its closest phylogenetic. Finally, the third part of this work was the analysis of volatile compounds by GC-MS and their dynamic during *Smen* maturation, as well as to highlight the nature of correlations between the volatile compounds and microbial diversity. 81 volatile organic compounds belonging to different families have been identified: Esters (20), ketones (20), aldehydes (13), fatty acids (12), alcohols (7), furans (3), terpenes (2), styrene (1) and other compounds (3). Volatile compound diversity and their abundances were highly related to maturation time and lipolysis degree as well as to the nature of autochthonous microbiota for which several correlations were noted between volatile compounds and identified species.

*Smen/Dhan* is a territory product with an ethnic name and know-how passed down through generations. It would therefore be very interesting to create cooperatives that could market this product in a formal way, with a specific property label. It could help local producers to improve the quality and safety of the product. The selection of some LAB and yeast strains for *Smen* on an industrial scale, would also be interesting for its quality attributes.

**Keywords:** *Smen/Dhan*, survey, traditional fermented butter, microbiota, lactic acid bacteria, yeasts, culture dependent, metabarcoding, volatile compounds.

En Algérie une grande variété de produits laitiers fermentés sont préparés traditionnellement, ces produits font partie de l'héritage algérien et ont une grande importance culturelle, médicinale et économique. Parmi ces produits, *Smen* ou *Dhan* est un beurre fermenté naturellement par des méthodes traditionnelles. Une meilleure connaissance de ce produit tant sur l'aspect savoir-faire technologique, physico-chimique que microbiologique présente donc un intérêt scientifique afin de maîtriser ses qualités sanitaires et organoleptiques mais aussi à terme pour sa valorisation. La première partie de la présente étude était de définir la place et l'utilisation de ce produit traditionnelle dans la culture locale et identifier les méthodes utilisées pour sa préparation. Pour cela, une enquête à l'aide d'un questionnaire et par interview, a été menée auprès de 880 ménages, dans 7 wilayas (Nord-Est ; Sud-Est algérien). Les résultats ont montré que ce produit est connu par la majorité de la population enquêtée et préparé au niveau des ménages selon des méthodes empiriques. La production du *smen* est destinée surtout pour l'autoconsommation ou commercialisé de façon informelle. Deux méthodes différentes de préparations de *smen* sont utilisées selon les régions : A Batna, Khenchela et Sétif, le beurre est salé puis entreposé ; alors qu'à Biskra, Jijel, El Oued et Ouargla, le beurre additionné de sel et d'autres ingrédients ; chauffé, clarifié et conditionné dans un récipient traditionnel en terre cuite (Ezzir). L'étape de sa maturation peut durer un mois à plusieurs années. Ce produit est très aromatique et utilisé pour agrémente certains plats (*couscous*/autres), et pour la médecine traditionnelle. Dans la deuxième partie de ce travail, nous avons étudié la diversité microbienne et son implication dans la maturation naturelle du *smen*. 15 échantillons de *Smen/Dhan* collectés auprès des ménages et un échantillon préparé selon le savoir-faire traditionnel ont fait l'objet de cette étude. L'approche de culture-dépendante a permis l'évaluation de la qualité hygiénique et sanitaire, puis l'identification moléculaire des bactéries lactiques (ARNr16S) et des levures (région D1-D2-ARNr26S). La technique de culture-indépendante (métabarcoding) par séquençage illumina-Miseq, en ciblant la région V3-V4 de l'ARN16S (BL) et la région ITS2 de l'ARN26S (levures), a aussi été réalisée, afin d'identifier les espèces microbiennes qui laissent leurs empreintes génétiques (ADN). Les résultats obtenus, ont montré que la qualité hygiénique et sanitaire était satisfaisante pour ce produit. L'identification moléculaire des isolats de BL et des levures a montré que les échantillons étaient dotés d'un microbiote diversifié. Parmi le nombre total d'isolats de BL (121), 82 souches ont fait l'objet d'une identification moléculaire qui a révélé 11 espèces de 4 genres. 102 souches de levures ont été isolées et 48 identifiées à 15 espèces de 11 genres. Des divergences importantes ont été observées entre les deux techniques de culture utilisées, la culture-indépendante a dévoilé les espèces les plus imposantes (*Lactococcus lactis* et *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus*) et non isolées par culture dépendante. Cette dernière a révélé que les espèces de lactobacilles et d'entérocoques étaient les plus représentées dans les échantillons de *Smen* collectés. Concernant la diversité fongique, plusieurs espèces de levures ont été impliquées dans la préparation et la maturation de *Smen*, la plupart d'entre elles ont été identifiées par les deux techniques de culture (*Geotrichum candidum*, *Wickerhamiella pararugosa*, *Kluyveromyces lactis*, *Yarrowia lipolytica*, *Kluyveromyces marxianus*, *Torulaspora delbrueckii*, *Clavispora lusitaniae* et *Rhodotorula mucilaginosa*). En plus de ces résultats, l'isolement d'une *Moniliella sp.*, non identifié et correspond probablement à une nouvelle espèce ; sa séquence de gènes (D1/D2-ARNr26S) représente 95% de similitude avec *Moniliella dehoogii* son plus proche phylogénétique. Enfin la troisième partie de ce travail était l'analyse du profil aromatique par GC-MS, réalisée pour démontrer la nature et la dynamique des composés organiques volatils (COV), produit au cours de la maturation, et faire ressortir les corrélations entre eux et la diversité microbienne. 81 composés organiques volatils appartenant à différentes familles ont été identifiés : esters (20), cétones (20), aldéhydes (13), acides gras (12), alcools (7), furanes (3), terpènes (2), styrène (1) et autres composés (3). La nature des composés volatils et leurs abondances étaient fortement liées avec le temps de la maturation et le degré de la lipolyse ainsi que la nature du microbiote autochtone pour lequel plusieurs corrélations positives ont été notées.

*Smen/Dhan* est un produit de terroir, d'appellation ethnique et d'un savoir-faire transmis à travers les générations. Il serait donc très intéressant de créer des coopératives qui pourraient commercialiser ce produit de manière formelle, avec un label de propriété spécifique. Il pourrait aider les producteurs locaux à améliorer la qualité et la sécurité du produit. La sélection de certaines souches de BL et de levures pour la production de starters destinés à la fabrication du *Smen* à l'échelle industrielle, serait aussi intéressante pour ses attributs de qualité.

**Mots-clés :** *Smen/Dhan*, enquête, beurre fermenté traditionnel, microbiote, bactéries lactiques, levures, culture dépendantes, métabarcoding, composés volatils.