

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique  
Université Mentouri - Constantine  
Faculté des Sciences  
Département des Sciences de la Nature et de la Vie

N° de Série :

N° d'ordre :

Mémoire  
Pour l'obtention du Diplôme de Magistère en  
**Biochimie et microbiologie appliquées**

Présenté par :  
M<sup>elle</sup> Merabti Ryma

Thème

**Isolement et caractérisation de souches levuriennes  
amylolytiques à partir de sol saharien algérien**

Soutenue le : 14 /07/2006

Devant le jury

Mr BOULAHROUF A.  
Mme MERAIHI Z.  
Mme MECHAKRA A.  
Mr BENHIZIA Y.

Prof., Université Mentouri – Constantine  
Prof., Université Mentouri – Constantine  
M.C., Université Mentouri – Constantine  
M.C., Université Mentouri – Constantine

**Président**  
**Rapporteur**  
**Examineur**  
**Examineur**

*Année universitaire*  
*2005-2006*

## ***Remerciements***

*Je tiens à remercier madame Meraihi Z, Professeur à l'université de Constantine, d'avoir encadré et suivi ce travail.*

*De même, je remercie Monsieur Boulahrouf A, Professeur à l'université de Constantine, qui me fait l'honneur de présider le jury.*

*Mes remerciements s'adressent également à Madame Mechakra A., Maître de conférences à l'université de Constantine et à Monsieur Benhizia Y., Maître de conférences à l'université de Constantine, d'avoir accepté de juger ce mémoire.*

*J'exprime aussi ma grande gratitude envers toutes les personnes, ayant contribué de prêt ou de loin, à la réalisation de ce modeste travail.*

## Liste des figures

<b>Figure 1</b> : Division de cellules levuriennes par bourgeonnement (Kwon-Chung et Bennett, 1992).....	4
<b>Figure 2</b> : Filamentisation des levures (Guiraud ,1998).....	4
<b>Figure 3</b> : Structure tridimensionnelle de l' $\alpha$ - amylase d'après Kraulis (1991).....	14
<b>Figure4</b> : Mécanisme catalytique des hydrolases glycosyliques (Nielsen et al.,2001).....	16
<b>Figure 5</b> : Courbe étalon des cellules.....	30
<b>Figure 6</b> : Test de sélection de souche amylolytique. Développement de zones de lyse pour.....	37
les souches S <sub>1</sub> (A), S <sub>4</sub> (B)et S <sub>5</sub> (C)	
<b>Figure 7</b> : Diamètres des zones de lyse des souches amylolytiques S <sub>1</sub> , S <sub>4</sub> et S <sub>5</sub> .....	38
<b>Figure 8</b> : Aspect macroscopique de la culture de la souche S <sub>5</sub> .....	40
<b>Figure9</b> : Aspect des cellules de la souche S <sub>5</sub> . Grossissement x 40 .....	40
<b>Figure 10</b> : Aspect des asques de la souche S <sub>5</sub> . Grossissement x 100.....	40
<b>Figure 11</b> : Détermination de la concentration optimale de l'extrait soluble en farine.....	42
de déchets de dattes, pour la production de l' $\alpha$ -amylase par <i>Lipomyces sp.</i>	
<b>Figure 12</b> :Evolution cinétique de la croissance, de l'activité amylasique , de la consommation.....	44
des sucres et du pH au cours de la fermentation du milieu de culture par <i>Lipomyces sp</i>	
<b>Figure 13</b> : Profil cinétique des protéines et du pH.....	46
<b>Figure 14</b> : Effet du pH sur l'activité de l' $\alpha$ -amylase de <i>Lipomyces sp</i> .....	48
<b>Figure 15</b> : Effet de la température sur l'activité de l' $\alpha$ -amylase de <i>Lipomyces sp</i> .....	50
<b>Figure 16</b> : Etude de la thermostabilité de l' $\alpha$ -amylase de <i>Lipomyces sp</i> .....	50

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1 :</b> Importance de certains oligoéléments et vitamines pour la croissance des levures.....	6
(Walker, 2000 et Lourens et Reid,2002).	
<b>Tableau 2 :</b> Classification des levures (Kreger-Van., 1984).....	9
<b>Tableau 3 :</b> Applications industrielles de l'alpha- amylase.....	20
<b>Tableau 4 :</b> Quelques caractéristiques de l'α-amylase levurienne (Panchal, 1990).....	22
<b>Tableau 5 :</b> Composition chimique de la farine de datte.....	42
<b>Tableau 6 :</b> Bilan de la précipitation au sulfate d'ammonium de l'α-amylase de <i>Lipomyces sp</i> .....	48

## *Abréviations*

**DNSA**: L'acide 3, 5 dinitrosalicylique

**EDTA**: L'éthylène-diamine tetra acetate

**h** : Heure

**MA** : Malt Agar

**ME** : Malt Extract

**PDA** : Potato Dexros Agar

**S** : Souche isolée

**TAA** : Taka-amylase A

**YG** : Yeast Glucose

**YM** : Yeast Malt

## Sommaire

<b>Introduction</b> .....	1
---------------------------	---

### **Revue bibliographique**

#### **1. LES LEVURES**

1.1. Généralités sur les levures.....	3
1.2. Habitats .....	3
1.3. Levure et nutrition.....	3
1.3.1. Source de carbone.....	5
1.3.2. Source d'azote.....	5
1.3.3. Oligoéléments et facteurs de croissance.....	5
1.4. Besoins physicochimiques.....	7
1.4.1. Température.....	7
1.4.2. pH.....	7
1.4.3. L'aération.....	7
1.4.4. Pression osmotique et activité de l'eau.....	7
1.5. Isolement des levures.....	8
1.6. Classification et identification des levures.....	8
1.6.1. Classification .....	8
1.6.2. Techniques d'identification.....	10
1.6.2.1. Etude des caractères culturaux .....	10
1.6.2.2. Etude des caractères morphologiques cellulaires.....	10
1.6.2.3. Caractéristiques biochimiques et physiologiques.....	11

#### **2. L' $\alpha$ -AMYLASE.....**

2.1. Nomenclature .....	13
2.2. Mode d'action.....	13
2.3. Structure de l' $\alpha$ amylase.....	15
2.4. Mécanisme d'action.....	17
2.5. Caractéristiques de l' $\alpha$ amylase.....	18
2.6. Régulation de la synthèse de l' $\alpha$ amylase.....	19

2.7. L' $\alpha$ amylase et industrie .....	21
2.8.L' $\alpha$ -amylas d'origine levurienne.....	23

## **Matériels et méthodes**

### **1. ISOLEMENT ET SELECTION DE SOUCHES LEVURIENNES PRODUCTRICES**

#### **D' $\alpha$ -AMYLASE**

1.1. Echantillonnage.....	24
1.2. Milieu d'isolement.....	24
1.3. Isolement.....	24
1.4. Conservation.....	24
1.5. Sélection d'une souche à activité alpha- amylasique.....	25

### **2. IDENTIFICATION .....**

.....	26
-------	----

2.1. Etude des caractères cultureux.....	26
2.2. Etude des caractères morphologiques cellulaires.....	26
2.3. Etude des caractères biochimiques et physiologiques.....	27

### **3. PRODUCTION DE L' $\alpha$ -AMYLASE**

3.1. Milieu de base .....	29
3.2. Composition chimique des déchets de dattes .....	29
3.3. Préparation du milieu de base.....	31
3.4.Inoculum.....	31
3.5. Conduite de la fermentation.....	31
3.6. Manipulations effectuées après la fermentation.....	32
3.7.Cinétique de production de l' $\alpha$ -amylase par la souche sélectionnée.....	34

3.8. Purification partielle de l'enzyme.....	34
3.9. Etude de quelques propriétés physico-chimiques de l' $\alpha$ -amylase partiellement purifiée.....	35

## Résultats et discussion

1. Isolement des souches.....	36
2. Sélection de souches amylolytiques.....	36
3. Identification du genre de la souche amylolytique (S5).....	39
3.1. Etude des Caractères culturaux.....	39
3.2. Etude des caractères morphologiques cellulaires.....	39
3.3. Caractéristiques biochimiques et physiologiques.....	39
4. Production de l' $\alpha$ -amylase de <i>Lipomyces sp</i> .....	43
4.1. Cinétiques de croissance et de production de l' $\alpha$ -amylase par <i>Lipomyces sp</i> .....	43
• Cinétique de croissance de la levure <i>Lipomyces sp</i> .....	43
• Cinétique de production de l' $\alpha$ -amylase de la levure <i>Lipomyces sp</i> .....	45
4.2. Evolution du pH et des protéines au cours de la fermentation .....	47
5. Purification partielle de l' $\alpha$ -amylase de <i>Lipomyces sp</i> .....	49
6. Etude de quelques caractéristiques de l' $\alpha$ -amylase de <i>Lipomyces sp</i> partiellement purifiée .....	49
6.1. Effet du pH sur l'activité de l' $\alpha$ -amylase .....	49
6.2. Effet de la température sur l'activité de l' $\alpha$ -amylase.....	51
6.3. Etude de la thermostabilité de l' $\alpha$ -amylase partiellement purifiée.....	52
<b>Conclusion générale</b> .....	54
<b>Références</b> .....	56

## Annexes



## *Introduction générale*

Durant les trois dernières décennies, les microorganismes ont apporté une contribution significative dans certains domaines industriels et en particulier agroalimentaires. Diverses industries dépendent en grande partie de leurs métabolites (Ibukun et Akindumila, 1998 et Abu et al., 2005). De plus, les microorganismes thermophiles constituent un vaste réservoir de catalyseurs biologiques, actifs et non dénaturés à des températures élevées, résistant à des températures comprises entre 60 et 80°C (Vieille et Zeikus, 2001). Parmi ces enzymes, on recense les protéases, les cellulases et les amylases thermostables qui sont d'une grande importance en biotechnologie (Scriban et al., 1999). En effet, elles ont des applications commerciales diversifiées, dans l'industrie du textile, du papier, de l'amidon et dans la production de sucres (Bolton et al., 1997 et Cordeiro et al., 2002).

Les amylases (domaine de notre étude), proviennent de différentes sources (plantes, animaux et microorganismes), cependant celles d'origine microbienne sont les plus utilisées industriellement (Burhan et al., 2003).

L'intérêt pour les amylases fongiques (moisissures et levures), a augmenté ces dernières années, où plusieurs investigations sont menées sur les enzymes amylolytiques extracellulaires secrétées par les genres *Aspergillus*, *Rhizopus* (Ramashandran et al., 2004 et Ait-kaki, 2004) *Lipomyces*, *Saccharomycopsis* et *Schwanniomyces* (De mot et Verachtert, 1985). Aussi, la première partie de notre travail, est consacrée à la sélection et à la caractérisation de souches levuriennes productrices d' $\alpha$ -amylase thermostable, isolées à partir de sol saharien (palmeraie Biskra). La seconde partie consiste à produire l' $\alpha$ -amylase par des souches performantes capables de fermenter un substrat naturel, la farine de déchets de dattes (source de carbone et d'énergie).

L'utilisation de déchets, en particulier les déchets agricoles (la paille de riz, les déchets d'oranges et de dattes), a fait l'objet d'études pour la production microbienne de protéines (Dunlap, 1975), d'enzymes, de catalase exocellulaire d'*Aspergillus phoenocis* (Kacem Chaouche, 2005) et d' $\alpha$ -amylase d'*Aspergillus oryzae* (Bennamoun, 2001). Cependant, ils doivent répondre aux critères suivants : non toxiques, abondants, totalement régénérables, à bon marché et capables de favoriser la croissance et la multiplication rapide des microorganismes (Dunlap, 1975).

En Algérie, la culture du palmier dattier est pratiquée au niveau de 17 wilayas. La production nationale des dattes, pour l'année 2002, est estimée à 4.2 millions de quintaux (degllet noir, qualité exportée ; les dattes molles et les dattes sèches) (Anonyme, 2003). La préparation de farines de dattes constituera, par sa richesse en sucres (teneur en sucres totaux estimée en moyenne à 76% (Cook and Fur, 1953)), un excellent milieu de fermentation pour la production de l' $\alpha$ -amylase par les souches isolées. Cependant, l'enrichissement du milieu s'avère nécessaire afin de constituer un milieu équilibré et favorable au développement des levures.

Par ailleurs, une étude cinétique de la production de l' $\alpha$ -amylase par les souches sélectionnées sera entreprise. Elle sera suivie par une purification partielle, afin d'étudier quelques propriétés physico-chimiques de l'enzyme (effet du pH, de la température et étude de la thermostabilité).

## **1. LES LEVURES**

### **1.1. Généralités sur les levures**

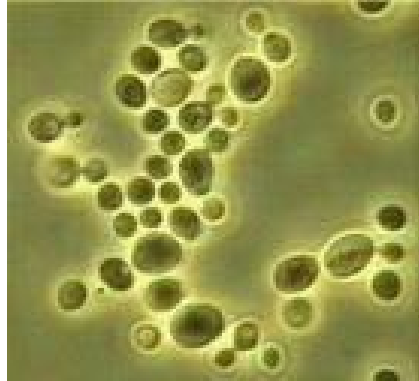
Les levures sont des champignons unicellulaires sur une partie ou sur l'ensemble de leur cycle végétatif. Certaines peuvent former des associations cellulaires, ou se présenter sous forme filamenteuse à certains stades de leur vie (Bouix et Leveau, 1991) (Figure 2). Elles se reproduisent par bourgeonnement ou par fission binaire (Kreger-Van, 1984) (Figure 1). Leurs cellules sont généralement ovoïdes et leur taille varie de quelques microns à 30 microns (Bouix et Leveau, 1991). Les levures se différencient nettement des bactéries par leur structure cellulaire eucaryote, le cytoplasme contient les organites habituels des végétaux supérieurs non photosynthétiques (Guiraud, 1998).

### **1.2. Habitats**

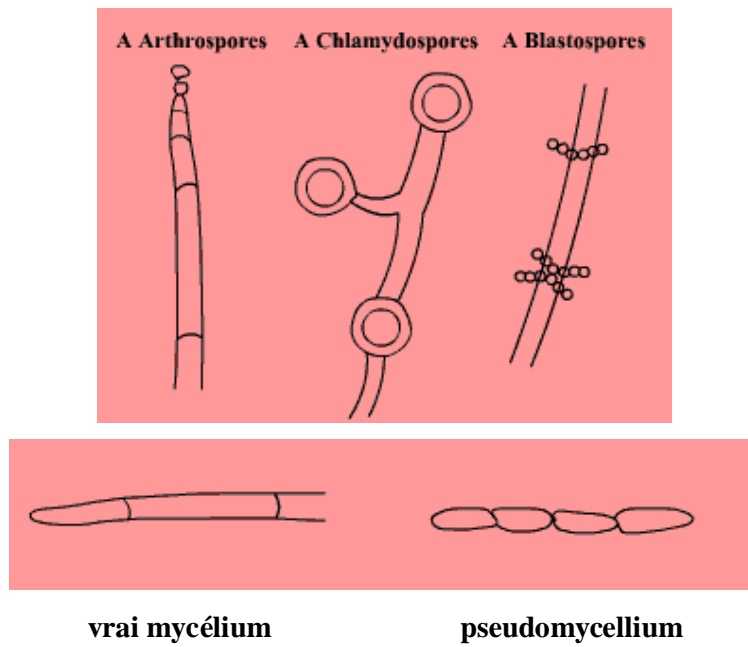
Dans la nature, les levures se trouvent principalement sur les végétaux riches en sucres directement assimilables (Bouix et Leveau, 1991). D'autres, se développent au niveau des eaux douces et profondes associées au plancton (Van Uden et Fell, 1968 et Ahearn, 1973). Par ailleurs, une large variété de levures vit dans le sol, plus ou moins représentative de la flore levurienne associée aux plantes, champignons et animaux vivants à la surface. Néanmoins, pour d'autres espèces, le sol demeure leur seul habitat (Phaff et Starmer., 1987).

### **1.3. Levure et nutrition**

Les levures présentent une diversité métabolique dans la façon de production et de consommation de l'énergie des substrats dégradés. La connaissance des mécanismes de régulation fondamentaux est non seulement valable dans la compréhension des principes généraux du métabolisme, mais également elle est d'une grande importance en biotechnologie (Ostergaard *et al.*, 2000).



**Figure 1** : Division de cellules levuriennes par bourgeonnement (Kwon-Chung et Bennett, 1992)



**Figure 2** : Filamentation des levures (Guiraud,1998)

### **1.3.1. Source de carbone**

Il est maintenant bien établi que la plupart des levures utilisent des sucres comme source principale de carbone et par conséquent d'énergie. D'autres levures particulières utilisent des sources de carbone non conventionnelles (éthanol, glycérol) (Barnett, 1976 et Tamaki et Hama, 1982). Cependant, leur croissance sur des substrats non-glucidiques les oblige à synthétiser des sucres exigés pour la biosynthèse macromoléculaire, en particulier celle des polysaccharides complexes (Walker *et al.*, 1997).

### **1.3.2. Source d'azote**

Comme les levures ne peuvent pas fixer l'azote libre, elles dépendent de ses formes oxydées ou réduites pour la synthèse des composés azotés structuraux et fonctionnels de la cellule (Babjeva *et al.*, 1977). La plupart des levures sont capables d'assimiler différentes sources d'azote organiques et inorganiques dans la biosynthèse des acides aminés, des protéines, des acides nucléiques et des vitamines (Guiraud, 1998). L'assimilation des ions d'ammonium (fournis dans le milieu ou dérivés du catabolisme d'autres composés azotés) est largement répandue chez les levures. Cependant, d'autres espèces levuriennes se caractérisent par une capacité à utiliser les nitrates et d'autres composés, comme source d'azote (Walker *et al.*, 1997).

### **1.3.3. Oligoéléments et facteurs de croissance**

Comme la plupart des microorganismes, les levures ont besoin d'éléments nutritifs pour assurer un développement adéquat. Il s'agit de sels minéraux et d'oligoéléments nécessaires à de très faibles concentrations (Larpen et Sanglier, 1992 et Boiron, 1996). De plus, d'autres facteurs leur sont essentiels, comme les vitamines (la biotine, la thiamine et l'acide pantothenique). Ces facteurs interviennent lors des réactions enzymatiques, comme éléments constitutifs de coenzymes variés (Rivière, 1975 et Botton *et al.*, 1990) (Tableau 1).

**Tableau 1** : Importance de certains oligoéléments et vitamines pour la croissance des levures (Walker, 2000 et Lourens et Reid,2002).

<b>Oligoéléments et facteurs de croissance</b>	<b>Rôle joué</b>
Magnésium	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Stabilité et perméabilité des membranes.</li> <li>- Protection de la cellule contre les facteurs négatifs, tels que le choc thermique et la toxicité de l'éthanol.</li> </ul>
Manganèse	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Il appuis la synthèse de la thiamine et des protéines, ce qui contribue a l'augmentation de la biomasse.</li> </ul>
Zinc	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Cœnzymes pour certains enzymes.</li> <li>- Contribution à la synthèse de la riboflavine et certaines protéines.</li> </ul>
Biotine	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Essentielle dans les réaction de carboxylation et de décarboxylation.</li> <li>- Production des alcools et des esthers.</li> </ul>
Thiamine	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Synthèse de l'isoleucine et de la valine.</li> </ul>
Acide pantothénique	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Synthèse de l'Acétyl –COA .</li> <li>- Production des acides gras et des acides aminés.</li> </ul>

## **1.4. Besoins physicochimiques**

### **1.4.1. La température**

Les températures d'incubation, sont généralement proches de celles qui permettent la propagation des levures dans leurs environnements naturels et se situent entre 25°C et 30°C. Toutefois, ces températures ne sont pas rigoureusement les températures optimales de croissance que les levures trouvent dans certains habitats, à savoir les régions à températures constamment basses ou élevées (Vishniac et Hempfling, 1979).

### **1.4.2. Le pH**

Les levures présentent une tolérance élevée aux pH extrêmes. Elles tolèrent des gammes très larges allant de 2.4 à 8.6. Entre ces valeurs, le pH intracellulaire est compris entre 5.8 et 6.8 (Bouix et Leveau, 1991). Cependant, Phaff et ses collaborateurs (1978) ont noté que la plupart des levures connues, ont une bonne croissance à des pH proches de 3.

### **1.4.3. L'aération**

Les levures peuvent être classées selon leur mode de production énergétique, utilisant la respiration ou la fermentation. Il est important de noter que ces processus sont principalement réglés par des facteurs environnementaux (Walker *et al.*, 1997). En effet, toutes les levures sont capables de se développer en présence d'oxygène, il n'y a pas de levures anaérobies strictes, certaines sont aérobies strictes et d'autres sont aéro-anaérobies facultatives (Bouix et Leveau, 1991).

### **1.4.4. Pression osmotique et activité de l'eau**

L'effet de la pression osmotique varie d'une souche à l'autre. La plupart des souches ne peuvent se développer pour des activités de l'eau inférieures à 0,90, mais certaines tolèrent des pressions osmotiques plus élevées correspondant à une activité de l'eau de l'ordre de 0,60, mais avec un métabolisme lent (Leveau et Bouix, 1979).

### **1.5. Isolement des levures**

Les levures sont sujets à la concurrence sur les milieux d'isolement par une reproduction rapide des populations bactériennes, et à l'inhibition par des produits du métabolisme bactérien (Allen *et al.*, 1987). Leur étude demande l'emploi de milieux sélectifs dotés de propriétés antibactériennes et si possible antimoisissures (Guiraud,1998). Pour l'isolement des levures, la plupart des investigateurs ont employé des milieux organiques complexes, contenant des ingrédients comme l'extrait de malt, l'extrait de levure et le peptone, en combinaison avec le glucose (Hagler et Mendonca,1981).

### **1.6. Classification et identification des levures**

#### **1.6.1. Classification**

La classification de référence est actuellement celle de Kreger-Van, (1984) qui présente des changements sensibles par rapport à la précédente classification de Lodder, (1971). En particulier, de nouveaux critères taxonomiques sont pris en considération pour permettre des études plus rigoureuses. Il s'agit d'un groupe hétérogène, qui d'un point de vue taxonomique, comprend une soixantaine de genres et près de 500 espèces (Kreger-Van, 1984). Les levures se divisent en 3 grandes classes :

- Les ascomycètes : genres sexués, où les produits de la méiose ou ascospores sont endogènes et enfermés dans une structure issue du zygote : l'asque.
- Les basidiomycètes : genres sexués, où les produits de la méiose ou basidiospores ( chez les levures sont souvent appelés ballistospores) sont exogènes et émis à l'extérieur du zygote.
- Les deutéromycètes ou levures imparfaites : genres asexués ne se multipliant que par reproduction végétative.



**Tableau 2 :** Classification des levures (Kreger-Van., 1984)

Les levures ascomycètes	Les levures basidiomycètes	Les levures imparfaites
<p><b>Saccharomycetaceae</b></p> <p><b>1. Schizosaccharomycetoidea</b>  <i>Schizosaccharomyces</i></p> <p><b>2. Saccharomycetoidea</b>  <i>Ambrosiozyma</i>  <i>Arthroascus</i>  <i>Arxiozyma</i>  <i>Citeromyces</i>  <i>Clavispora</i>  <i>Cyniclomyces</i>  <i>Debaryomyces</i>  <i>Dekkera</i>  <i>Guilliermonedella</i>  <i>Hansenula</i>  <i>Issatchenkia</i>  <i>Kluyveromyces</i>  <i>Lodderomyces</i>  <i>Pachysolen</i>  <i>Pachytichospora</i>  <i>Pichia</i>  <i>Saccharomyces</i>  <i>Saccharomycopsis</i>  <i>Schwanniomyces</i>  <i>Sporopachydermia</i>  <i>Stephanoascus</i>  <i>Torulaspora</i>  <i>Wickerhamiella</i>  <i>Wingea</i>  <i>Yarrowia</i>  <i>Zygosaccharomyces</i></p> <p><b>3. Lipomycetoidea</b>  <i>Lipomyces</i></p> <p><b>4. Nadsonioidea</b>  <i>Hanseniaspora</i>  <i>Nadsonia</i>  <i>Saccharomyces</i>  <i>Wickerhamia</i></p> <p><b>5. Spermophthoraceae</b>  <i>Coccidiascus</i>  <i>Metschnikowia</i>  <i>Nematospora</i></p>	<p><b>Levures formant des teliospores</b>  <i>Leucosporidium</i>  <i>Rhodospodium</i>  <i>Sporidiobolus</i></p> <p><b>Filobasidiaceae</b>  <i>Filobasidiella</i>  <i>Filobasidium</i></p> <p><b>Levures non classées</b>  <i>Sterigmatosporidium</i></p>	<p><b>Sporobolomycetaceae</b>  <i>Bullera</i>  <i>Sporobolomyces</i></p> <p><b>Cryptococcaceae</b>  <i>Aciculoconidium</i>  <i>Brettanomyces</i>  <i>Candida</i>  <i>Cryptococcus</i>  <i>Eeniella</i>  <i>Fellomyces</i>  <i>Kloeckera</i>  <i>Malassezia</i>  <i>Oosporidium</i>  <i>Phaffia</i>  <i>Rhodotorula</i>  <i>Schizoblastosporion</i>  <i>Sterigmatomyces</i>  <i>Sympodiomyces</i>  <i>Trichosporon</i>  <i>Trigonopsis</i></p>

## **1.6.2. Techniques d'identification**

Les levures se distinguent des autres champignons par une taxonomie basée à la fois sur des caractères cultureux, morphologiques, sexuels et physiologiques. En effet, les critères d'identification n'ont pas tous la même importance, ils doivent être utilisés dans un ordre bien déterminé (Bouix et Leveau, 1991).

### **1.6.2.1. Etude des caractères cultureux**

Cette étude est effectuée à partir d'ensemencement sur milieux liquides et solides. Le but est d'examiner l'aspect, la forme, la couleur et la consistance des cultures (Guiraud, 1998).

Les caractères cultureux ainsi étudiés sont :

- La forme des colonies ;
- La coupe des colonies ;
- L'aspect de la culture sur gélose inclinée ;
- L'aspect de la culture sur milieu liquide ;
- La couleur,....

### **1.6.2.2. Etude des caractères morphologiques cellulaires**

Les critères utilisés dans la description des levures sont ceux décrits par; Wickerham, (1951), Van der Walt, (1970), Van der Walt et Yarrow, (1984).

- **Morphologie cellulaire normale et mode de reproduction végétative**

Ces caractères sont étudiés par des examens microscopiques, permettant de définir la forme, l'arrangement et le mode de division des cellules, ainsi que de mesurer leur taille en utilisant un oculaire micrométrique.

- **Aptitude à la filamentation**

Certaines espèces peuvent former des filaments de type mycélien. Ces filaments sont parfois mis en évidence par l'examen microscopique précédant. La recherche systématique de l'aptitude à la filamentation d'une souche, doit cependant s'effectuer après une culture sur un milieu spécifique (Figure 2).

- **Morphologies particulières**

Dans des milieux pauvres et sous tension d'oxygène réduite, la formation de chlamydospores et de ballistospores est observée. Leur recherche s'effectue à partir de milieux spécifiques. (Figure 2)

- **Caractéristiques sexuelles**

La formation d'ascospores est un critère taxonomique très important. Différents milieux de sporulation sont utilisés, pour mettre en évidence les asques, leur forme, la couleur et le nombre de spores par asque.

### **1.6.2.3. Caractéristiques biochimiques et physiologiques**

Les principaux critères physiologiques utilisés dans la classification des levures, sont la fermentation et l'assimilation de différents substrats (Kreger-van Rij, 1984 et Lodder, 1970).

- **Fermentation des sucres**

La description standard des levures se base sur la capacité à fermenter certains sucres, examinés dans des tubes de Durham pendant une période fixe. La caractérisation de la fermentation qu'elle soit vigoureuse, bonne, lente ou faible, dépend de la quantité de gaz dégagé dans le tube d'insertion (Kreger-van Rij, 1984).

- **Assimilation des composés carbonés**

L'importance de l'assimilation des substrats carbonés comme critère pour la distinction des levures est soulignée par Wickerham et Burton, (1948) et Wickerham, (1951). Ces composés sont choisis pour leur intérêt distinctif, bien que la connaissance détaillée de leur utilisation, du point de vue biochimique, fait souvent défaut (Ostergaard *et al.*, 2000).

• **Assimilation des sources azotées**

Les levures assimilent généralement l'ammonium, les peptones, les acides aminés et parfois l'urée. Certains substrats azotés comme les nitrates, les nitrites, l'éthylamine, la cadavérine, l'urée, etc... ne sont utilisés que par certaines espèces ; propriété spécifique pour leur identification (Guiraud, 1998).

## 2 .L'α-AMYLASE

L' α- amylase est une enzyme ubiquitaire, synthétisée dans tous les genres de la vie (Janecek 1994, 1997). Elle appartient à la famille des glycosides hydrolases nommée GH13, regroupant maintenant plus de 1700 enzymes (Coutinho et Henrissat, 1999), contenant également les cyclodextrines glucanotransferases (CGTases) et les pullulanases (Henrissat, 1991). Chez les mammifères, l'α -amylase est présente principalement dans les sécrétions salivaires et pancréatiques. Celle d'origine microbienne (bactéries, moisissures et levures) est exocellulaire, exceptées certaines espèces comme *Bacillus subtilis* et *Pishia burtonii* (Moulin *et al.*, 1978 et Mantsala *et al.*, 1979).

### 2.1. Nomenclature

§ **Nom codifié** : EC 3.2.1.1

§ **Nom commun** : α-amylase

§ **D'autres nom (s)**: glycogénase, α-amylase; endoamylase; Taka-amylase A, maxilase..

§ **Nom systématique**: 1,4 – alpha -D-glucane,4 glucano hydrolase

(Schwimmer et Balls,1949, Fischer et Stein, 1960 et Manners,1962)

### 2.2. Mode d'action

L'α-amylase d'origine végétale, animale ou microbienne, agit sur les polysaccharides (amidon, glycogène) et les oligosaccharides. Elle hydrolyse les liaisons glucosidiques (α-1,4) de l'amidon et des substrats relatifs (Heslot, 1996). Son action peut se faire de différentes façons ;

- Une attaque aléatoire, en coupant les liaisons (α-1,4 ) à partir de l'extrémité non réductrice . Il en résultera, principalement, la formation de glucose, de maltose et surtout d'α –dextrines (Scriban,1999).



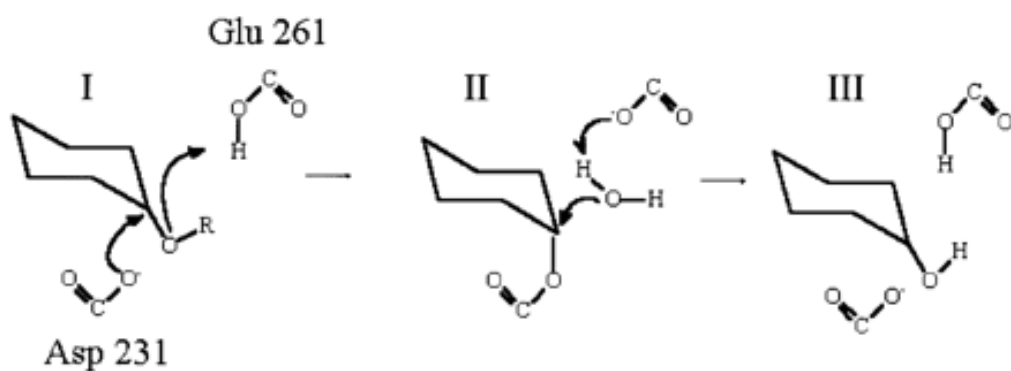
**Figure 3 :** Structure tridimensionnelle de l' $\alpha$  – amylase d'après Kraulis (1991) : les trois domaines, ainsi que les ions de calcium et de chlorure, sont représentés : domaine A de couleur rouge, domaine B, jaune et domaine C, pourpre. L'ion de calcium (sphère bleue) et l'ion de chlorure (sphère jaune).

- Mécanisme uni-chaine où l' $\alpha$ -amylase dégrade une chaîne avant de passer à l'autre. Cette action est due à la formation du complexe actif avec le premier substrat. L'enzyme catalyse la réaction et ne forme pas de complexes actifs, jusqu'à l'achèvement de la dégradation de la première chaîne (Berry et Paterson, 1990).
- Mécanisme multi-chaine, la dégradation des chaînes est simultanée (Pazur et Marchetti, 1992).
- Attaque multiple ou répétitive, le déplacement de l'enzyme, fixée tout au long de la chaîne, conduit à plusieurs hydrolyses avant la dissociation du complexe enzyme-substrat (Nakatani, 1996 et Kandra *et al.*, 1997).

### 2.3. Structure de l' $\alpha$ amylase

L' $\alpha$ -amylase fongique est une glycoprotéine, comportant trois domaines globulaires (A, B, et C) et dont la partie glucidique est formée principalement, de D-mannose, D-glucose, D-galactose, D-xylose, et D-glucosamine (Stefanofa et Emanuilova, 1992). La chaîne polypeptidique est constituée de 471 à 483 résidus d'acide aminés, avec 4 ou 5 ponts disulfures (Heslot, 1996). Le domaine A, forme un tonneau ( $\beta / \alpha$ )<sub>8</sub> et porte le site actif à la partie C-terminale des feuillets  $\beta$ . Le domaine B, forme une boucle à partir du milieu du domaine A et constitue une sorte de « couvercle » au-dessus du site actif. Quand au domaine C, il constitue un tonneau de 8 feuillets  $\beta$  antiparallèles (Matsuura *et al.*, 1984 et Boel *et al.*, 1990). En plus de ces trois domaines, certaines  $\alpha$ -amylases, telles que l' $\alpha$ -amylase de *Streptomyces limosus*, ont un domaine supplémentaire (domaine E) à leur extrémité C-terminale, jouant un rôle dans l'adsorption de l'amidon (Long *et al.*, 1987) (Figure 3).

Par ailleurs, la structure primaire de la Taka amylase A (TAA), est considérée comme étant la plus petite des enzymes dégradant l'amidon. Il est probable que chacun des trois domaines de la TAA soit essentiel pour la fonctionnalité de l' $\alpha$ -amylase. Yamane et ses collaborateurs (1984), Nakada ses collaborateurs (1990), Sogaard ses collaborateurs (1991) et Lin ses collaborateurs (1997), ont montré que la coupure de l'extrémité C-terminale sur les



**Figure 4 :** Mécanisme catalytique des hydrolases glycosyliques (Nielsen et *al.*, 2001): (1) Protonation de l'oxygène glycosidique par le donneur d'hydrogène (Glu 261) et attaque sur le glucose (C1) par le nucléophile (Asp 231). Départ de la fin réductrice du substrat. (2) L'activation d'une molécule d'eau, clivage de la liaison covalente C1 Asp 231. (3) Régénération des états initiaux de protonation.



$\alpha$ - amylases de différentes origines (bactérienne, fongique, animale et végétale), n'affecte pas l'activité amylolytique originelle. D'autres études, ont rapporté que quelques coupures affectent leur thermostabilité (Nakada *et al.*, 1990 et Vihinen *et al.*, 1994 et Marco *et al.*, 1996).

Buisson et ses collaborateurs (1987), ont décrit un site de fixation de l'ion  $\text{Ca}^{2+}$  dans l'enzyme du pancréas du porc. L'ion se lie entre les domaines A et B et joue un rôle stabilisateur du site actif. Selon Boel et ses collaborateurs (1990), ce site à forte affinité, existe aussi dans l' $\alpha$ -amylase d' *Aspergillus oryzae*, mais il en existe un deuxième, d'affinité plus faible, localisé au rond de la poche de fixation du substrat. L'existence de ce deuxième site explique que le calcium exerce un effet inhibiteur de l'activité enzymatique à haute concentration (Boel *et al.*, 1990). Pour certaines  $\alpha$ -amylases, la présence d'un site de fixation du  $\text{Cl}^-$  est également signalée (Graham, 1996 et Hwang *et al.*, 1997) et pour d'autres, l'ion  $\text{Zn}^{2+}$  (Comi *et al.*, 2000).

#### **2.4 . Mécanisme d'action**

Le site actif se compose d'un nombre important de groupements chargés, dont trois acides aminés essentiels à l'activité catalytique de l' $\alpha$ -amylase : Asp 231, Glu 261 et Asp 328 (McCarter et Withers, 1996, Uitdehaag *et al.*, 1999). La réaction catalytique est réalisée en trois étapes (Sinnot, 1990, McCarter et Withers, 1994, Davies et Henrissat, 1995 et McCarter et Withers, 1996) (Figure 4) :

- 1- Protonation de l'oxygène glycosidique par le donneur de proton (Glu 261). Celle-ci, est suivie d'une attaque nucléophile, sur le C1 du résidu du sucre en position 1 par l'Asp 231 et départ de la pièce d'aglycone (Davies *et al.*, 1997).
- 2- Activation d'une molécule d'eau, vraisemblablement par le maintien du Glu 261 déprotonné (Nielsen *et al.*, 2001).
- 3 - Hydrolyse du lien covalent entre l'oxygène nucléophile de l'Asp 231 et le C1 du résidu du sucre en position 1, permettant l'accomplissement du cycle catalytique (Nielsen *et al.*, 2001).

## **2.5. Caractéristiques de l' $\alpha$ amylase**

### **2.5.1. Poids moléculaire**

Le poids moléculaire des  $\alpha$ - amylases varie d'une origine à l'autre et d'une espèce à l'autre. Il est compris entre 40.000 et 90.000 daltons (Schombury et Salzmann, 1991). Celui des  $\alpha$ - amylases levuriennes, s'échelonne entre 40.000 et 70.000 daltons (Panchal, 1990).

### **2.5.2. Température optimum**

Selon l'origine et les espèces, les  $\alpha$ - amylases ont des températures optimales comprises entre 40°C et 90°C (Schombury et Salzmann, 1991). En effet, l'alpha amylase bactérienne est réputée pour sa grande thermostabilité, celle de *Bacillus amyloliquefaciens* est caractérisée par un optimum de température qui, selon les applications va de 70°C à 90°C, alors que l'alpha amylase fongique est d'une thermostabilité assez faible, son optimum se situe entre 50°C et 55°C (Sicard, 1982). L'alpha amylase levurienne a des optimums de température, allant de 40°C à 60°C et parfois même 70°C pour certaines espèces comme *Lipomyces starkeyi* (Panchal, 1990).

### **2.5.3. pH optimum**

L'  $\alpha$ -amylase est très sensible au pH. Par conséquent, le choix du pH optimum est très essentiel pour la production de cette enzyme (McMahon *et al.*, 1999). Selon Kindle, (1983), l'optimum d'activité peut être obtenu à des pH compris entre 4 et 8. Les  $\alpha$ -amylases bactériennes, ont un optimum supérieur à la neutralité, alors que les fongiques, ont des pH optimum compris entre 4 et 5 (Larpent *et al.*, 1992). Pour les levures, l'enzymes requiert selon les espèces des pH entre 4 et 6 (Panchal, 1990).

### **2.5.4. Effecteurs**

Toutes les  $\alpha$ - amylases, exigent la liaison à au moins un ion calcium, pour le maintien de leur intégrité et leur stabilité structurale (Vallee *et al.*, 1959, Steer et Levitzki, 1973). Cependant, à une concentration supérieure à 20mM, le calcium devient inhibiteur (Boel *et al.*, 1990).

Certaines alpha- amylases, sont allostériquement activées par la fixation d'un ion chlorure. Levitzki et Steer (1974), ont rendu compte d'un emplacement de l'ion  $\text{Cl}^-$  qui effectue un changement de conformation et augmente aussi l'activité de l'enzyme. D'autres ions, tels que le  $\text{Ba}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Ag}^+$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  et le  $\text{Zn}^{2+}$  ont été rapportés comme stimulateurs et activateurs de l' $\alpha$ -amylase (Schomburg et Salzmänn, 1991). De plus, l'histidine, le mercaptoéthanol et le dithiothriol sont aussi considérés comme des activateurs (Kekos *et al.*, 1983, Bealin *et al.*, 1990).

Par ailleurs, l' $\alpha$ - amylase peut être sensible à plusieurs agents inhibiteurs : l'EDTA (agent chélateur du calcium), l'urée et certains composants amides (Toraballa et Eitingon, 1967). L'effet des métaux et de l'EDTA sur l'activité est étudié sur l' $\alpha$ -amylase d'origine levurienne de *Cryptococcus. sp.* Les métaux lourds comme  $\text{Hg}^{2+}$  (25%),  $\text{Ag}^+$  (51%),  $\text{Cu}^{2+}$  (52%) et  $\text{Zn}^{2+}$  (87.6%) inhibent l'activité enzymatique (Lefuji *et al.*, 1996). Par contre les ions  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  et l'EDTA n'ont aucune influence sur l'enzyme à une concentration de 1Mm (Lefuji *et al.*, 1996). D'autres éléments, ont une action négative sur l'activité amylasique : l'iodoacétate, l'acide ascorbique, l'isopanol et le maltotriitol (Schomburg et Salzmänn, 1991)

## **2.6. Régulation de la synthèse de l' $\alpha$ amylase**

La répression catabolique de l'expression des gènes est un système de normalisation fondamental et omniprésent, à fin de répondre aux changements de disponibilité nutritive (Chung *et al.*, 1998). Des études (Bhella et Altossar, 1987), ont démontré que la biosynthèse de l' $\alpha$ -amylase est régulée uniquement par répression au cours de la transcription et/ou au cours de la traduction.

Chez les micro-organismes, le glucose ou d'autres sources de carbone rapidement métabolisables, répriment l'expression des gènes qui codent pour des enzymes liées au métabolisme d'autres sources de carbone (Chung *et al.*, 1998).

**Tableau 3 :** Applications industrielles de l'alpha- amylase

Industries	Applications	Références
Glucoserie	Solubilisation de l'amidon, accompagnée d'une chute importante de la viscosité (liquéfaction).	Sicard, (1982)
Sucrerie	Réduction de la viscosité des sirops de cannes à sucre, en hydrolysant les contaminants amylicés pour réussir le processus de cristallisation.	
Biscuiterie et panification	Amélioration des propriétés rhéologiques et fermentaires de la pâte, ainsi que le volume de la mie et la coloration de la croûte.	
Industrie textile	Le désencollage textile, qui permet d'éliminer la colle d'amidon qui enduit les fibres et les protège au cours du tissage.	
Papeterie	Liquéfaction de l'amidon pour préparer des sauces de couchage, permettant d'éliminer les irrégularités superficielles de la feuille.	
Détergents	Dégradation des taches à base d'amidon. Les oligosaccharides et les dextrines libérés de l'action hydrolytique sont solubles, par conséquent, la tache est physiquement découpée.	Igarashi <i>et al.</i> , (1998) Nielsen et Borchert, (2000)
Industrie pharmaceutique	-Agent anti-inflammatoire. -Un aide digestif (contre les dyspepsie et les fermentations intestinales). -Traitement du diabète et de l'obésité.	Nielsen et Borchert, (2000)

En effet, la répression catabolique de la production de l' $\alpha$ -amylase par le glucose à forte concentration, est mise en évidence chez *Aspergillus oryzae* (Morkeberg *et al.*, 1995), *Streptomyces kanamyceticus* (Flores *et al.*,1993), *Bacillus sp* (Kichakova, 1991) et notamment chez les levures *Lipomyces kononenkoae* (Sa- Correia et Van Uden, 1981) et *Schwanniomyces castelli* (Pasari *et al.*,1987).

Par ailleurs, l'amidon, le maltose et d'autres oligosaccharides, sont décrits comme inducteurs des amylases (Fabiana *et al.*,2001). L'amidon à 0.8% est le meilleur inducteur de l' $\alpha$ - amylase d'*Aspergillus oryzae* ( Bennamoun, 2001), car il provoque l'augmentation de la synthèse de l'enzyme de 270%. Néanmoins, dans certains cas, le maltose n'assure pas la production de niveaux élevés de l' $\alpha$ - amylase, car il est aisément hydrolysé en glucose et la production de l'enzyme est négativement affectée (Sadhukhan *et al.*,1992, Brock *et al.*,1994 et Ray *et al.*,1996). L'enrichissement des milieux de culture avec des analogues synthétiques inertes, tels que l' $\alpha$  methyl-D-glucoside, est considérée comme une alternative intéressante pour l'amélioration de la production de l'enzyme (Fabiana *et al.*,2001). De plus, certains disaccharides considérés comme inducteurs de la synthèse de l' $\alpha$ -amylase (le maltose, le fructose et le saccharose), peuvent avoir un effet répresseur lorsqu'ils atteignent des concentrations critiques (Vallier *et al.*,1977 et Yu *et al.*,1991).

## **2.7. L' $\alpha$ amylase et industrie**

L'amidon est un composé glucidique abondant et peu coûteux, dont la fonctionnalité et la valeur ajoutée peuvent être améliorées par un ensemble de modifications physiques, chimiques et/ou enzymatiques, afin de répondre à des besoins technologiques ou nutritionnels spécifiques (Buelon *et al.*, 1990).L' $\alpha$ - amylase par sa capacité à modifier un certains nombre des propriétés de l'amidon, participe à de nombreuses applications, permettant de fabriquer des sucres adaptés aux demandes spécifiques des utilisateurs en industrie alimentaire (Palmer, 1975). Actuellement, les  $\alpha$ -amylases microbiennes sont parmi les enzymes les plus utilisés dans les procédés industriels autres qu'alimentaires (industrie pharmaceutique, textile, papeterie et détergents), en raison de leur productivité et thermostabilité (Burhan *et al.*, 2003) (Tableau 3).

**Tableau 4** : Quelques caractéristiques de l'α-amylase levurienne (Panchal, 1990).

<b>Espèces</b>	<b>Poids moléculaire DA</b>	<b>pH optimum</b>	<b>Temperature optimum</b>
<i>Endomycopsis capsularis</i>	---	4.5	40-50°C
<i>Filobasidium capsuligenum</i>	64.000	5.6	55°C
<i>Lipomyces starkey</i>	76.000	4	70°C
<i>Lipomyces kononenkoa</i>	38.000	5.5	40°C
<i>Pichia polymorpha</i>	---	4	40°C
<i>Saccharomyces alluvius</i>	62.000	6.3	40°C
<i>Saccharomyces castelli</i>	40.000	6	60°C

## **2.8. L' $\alpha$ -amylase d'origine levurienne**

Les levures sont les organismes les plus employées dans la production de biomasse, à valeur nutritive élevée (Yanez *et al.*, 1972 et Imrie *et al.*, 1975). Leur capacité à assimiler une grande variété de substrats (les hexoses, les pentoses, et les polysaccharides) (Kanazawa *et al.*, 1975), est à l'origine de plusieurs investigations menées sur elles, dans le but de produire des acides organiques, des enzymes et en particulier l' $\alpha$ -amylase (Tableau 4).

## **1. ISOLEMENT ET SELECTION DE SOUCHES LEVURIENNES PRODUCTRICES D'α-AMYLASE**

### **Echantillonnage**

L'isolement est fait à partir d'échantillon de sol saharien algérien , récolté au niveau de la palmeraie de M'ghaiar (Biskra) (température maximale : 49.5°C, pluviosité annuelle : 120-150 mm ) Anonyme, (2003). Environ 100 g de sol sont prélevés et introduits dans un sachet en plastique stérile, puis emmenés au laboratoire et gardés au frais (4°C).

### **Milieu d'isolement**

Des lots de 10 g, sont introduits dans environ 90ml d'eau peptonée stérile. Les échantillons ainsi préparés, sont agités rigoureusement, puis placés au bain –Marie sous une agitation de 180 tours/min à 30°C pendant 18h ( Djoulde , 2004). Les différentes cultures sont isolées du sol par les méthodes classiques de dilutions décimales (Clarcket *et al.*,1958).

### **1.3. Isolement**

Les levures sont isolées sur milieu gélosé (Sabouraud et PDA). L'ensemencement est fait en surface, par étalement de 0.1ml de culture en stries transversales (Hammer *et al.*, 1998). Les boîtes sont ensuite incubées à 30°C, pendant 24 à 72h (Harrigon et Mc lace, 1976). Les colonies bien isolées, ont subi une coloration au bleu de méthylène, puis observées au microscope à l'objectif 40, pour vérifier la morphologie et l'homogénéité des cellules.

### **1.4. Conservation**

Les jeunes colonies levuriennes, sont aseptiquement transférées etensemencées sur gélose inclinée de Malt agar (MA) (Annexe 1) pendant 3 à 5 jours, pour permettre une croissance maximale . Les cultures pures sont alors stockées à 4°C.( Ul-Haq *et al.*, 2002).



### **1.5.Sélection d'une souche à activité amylasique**

La recherche de souches amylolytiques est réalisée sur les souches précédemment isolées, selon la méthode décrite par Tatsinkou et ses collaborateurs (2005). La sélection est effectuée sur milieu PDA (Annexe 1) à pH 5, additionné d'amidon soluble à 1%. Les boîtes sont incubées à 30°C pendant 24 à 72h. Après incubation, une solution de lugol est vaporisée sur la surface de la boîte, afin de mettre en évidence l'activité amylasique. Les souches à halo clair sur le pourtour, sont considérées comme productrices d'amylases. Le diamètre des zones de lyse, est pris en considération pour la sélection de la souche amylolytique la plus performante.

## **2. IDENTIFICATION**

L'identification est effectuée sur une des souches de levures précédemment isolées et considérée à activité amylolytique performante. Tout le procédé d'identification est menée selon les techniques décrites par Lodder, (1971) et Kreger-Van, (1984 ).

La souche sélectionnée est repiquée à partir de culture pure, conservée à 4°C sur milieu solide MA (Annexe 1) et incubée à 30°C pendant 24 à 48 h.

### **2.1. Etude des caractères cultureux**

Les caractéristiques culturelles sont observées, en examinant les cultures en milieu liquide et sur milieu solide incliné (les mêmes gélosés à 2%). Les milieux utilisés sont YM , YPG et YG (Annexe 1). Les cultures sont incubées pendant 3 jours à 25-28°C, examinées, puis laissées 4 semaines à la température du laboratoire, pour être ensuite réexaminées. Des observations sur l'aspect des cultures sur les deux milieux, ainsi que la couleur, la texture et la forme des colonies sont notées.

### **2.2. Etude des caractères morphologiques cellulaires**

Les caractères sont étudiés d'après des préparations microscopiques (objectif x40 puis x 100), effectuées entre lame et lamelle à l'état frais et en utilisant un colorant (le bleu de méthylène).

- **Morphologie cellulaire normale et mode de multiplication végétative**

Cette étude est menée sur les cultures ayant permis l'étude des caractères cultureux. L'étude microscopique permet de définir la forme, la taille (oculaire micrométrique), l'arrangement et le mode de division des cellules.

- **Formation de mycélium**

L'aptitude à la filamentation, est observée à partir d'une culture sur lame de microscope. Pour cela, du milieu PDA fondu (Annexe 1), est déposé à la pipette sur une lame de microscope préalablement stérilisée (dans une boîte de pétri). Lorsque le milieu est solidifié, la levure à examiner estensemencée en une strie longitudinale.

La lame est incubée dans la boîte de pétri, contenant un peu d'eau stérile, pour éviter la dessiccation du milieu. L'observation microscopique se fait après 3 à 5 jours (au grossissement x 40 ou x 100).

- **Caractéristiques sexuelles**

Plusieurs milieux de sporulation sont utilisés simultanément, afin de mettre en évidence la sporulation si la levure est ascoporogène. A cet effet, 3 milieux sont utilisés ; le milieu de Mac Clary, de Fowells et de Gordkowa (Annexe 1). Les milieux conditionnés en tubes inclinés, sont ensemencés en surface à partir d'une culture en phase exponentielle de 24 à 36 heures en milieu liquide (ME) (Annexe 1), puis incubés pendant huit jours à un mois à 20°C. Des préparations microscopiques sont régulièrement effectuées entre lame et lamelle, pour surveiller les cultures. La présence d'asques et leur forme, le nombre et la forme des ascospores, sont également notés.

### **2.3. Etude des caractères biochimiques et physiologiques**

Les caractéristiques biochimiques et physiologiques effectuées, sont la fermentation des substrats carbonés et l'assimilation des substrats azotés.

- **Fermentation des sucres**

Les sucres testés sont : le D- glucose, le maltose, le D-fructose, le saccharose, le lactose, le D- xylose, le D-galactose et l'amidon. La solution de base utilisée pour la fermentation des sucres, est le milieu eau de levure (extrait de levure à 0.5% dans l'eau), conditionné avec une cloche de Durham. Avant ensemencement, des solutions stériles des sucres à tester sont ajoutés dans ces tubes, de sorte que la concentration finale soit de 2% . Les tubes sont ensemencés avec une goutte d'une suspension de levure. Les cultures sont incubées à 25-28°C, pendant 48 heures à 3 semaines. Un sucre est fermenté, quand il y a présence de gaz dans la cloche (Wickerham et Burton ,1948 et Wickerham ,1951).

• **Assimilation des composés azotés**

La source d'azote testée est le nitrate de potassium. Ce test, est pratiqué selon la méthode auxanographique, avec un milieu synthétique sans azote. Lorsque les cellules sont réparties en boîte de pétri, la source d'azote est déposée à la surface du milieu solidifié, sous forme de quelques cristaux. Un témoin, est effectué avec du sulfate d'ammonium. L'incubation s'effectue pendant 3 jours à 25°C.

### **3. PRODUCTION DE L'α-AMYLASE**

#### **3.1. Milieu de base**

Le milieu choisi pour la culture de la levure sélectionnée, est à base des rebuts de dattes, ratatinées et desséchées avant maturité, qu'on appelle communément (Hchefs). Ces dattes dites de faible valeur marchande, proviennent des palmeraies de la région de Biskra. Après être lavées et dénoyautées, les dattes subissent un séchage naturel, puis elles sont réduites en poudre à l'aide d'un broyeur et d'un tamis (diamètre 0.5 mm).

#### **3.2. Composition chimique des déchets de dattes**

Un certain nombre de dosages, sont effectués sur l'extrait soluble de la farine de dattes préparée.

- **Détermination de la matière sèche**

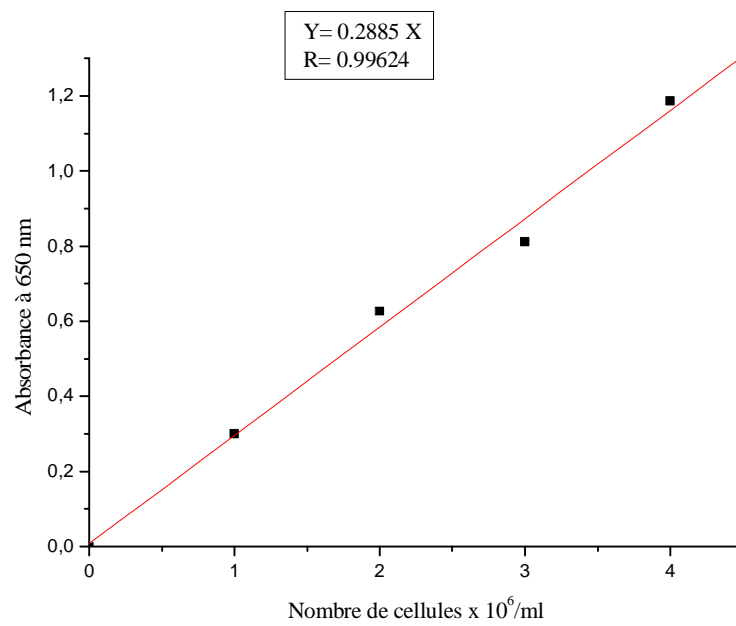
La matière sèche, est déterminée par séchage d'un échantillon de poids connu (2g) (Annexe 2), dans une étuve réglée à 105°C jusqu'à poids constant.

- **Dosage de la matière azotée totale**

La méthode utilisée est celle de Kjeldhal (Afnor, 1986). L'échantillon est minéralisé par l'acide sulfurique concentré à chaud, en présence d'un catalyseur approprié. L'azote organique est transformé en sulfate d'ammonium puis en ammoniac . Ce dernier, déplacé par la lessive de soude, est récupéré dans une solution d'acide borique ou d'acide sulfurique (Nishio et Nagai, 1981) (Annexe 4).

- **Dosage des sucres totaux**

Les sucres totaux sont déterminés par la méthode au « phenol-sulfuric acid » (Dubois *et al.*, 1956). Les oses sont dégradés en présence d'acide sulfurique concentré en composés de la famille des dérivés furfuriques . Ces produits se condensent avec le phénol pour donner un complexe jaune orangé, son apparition sera suivie, par mesure de la densité optique (Annexe 3).



**Figure 5** : Courbe étalon des cellules

• **Dosage de la matière grasse totale**

La technique utilisée, est celle de Wisseman (Lecoq,1965). Après une hydrolyse acide, la matière grasse est extraite à l'éther de pétrole dans un appareil de Soxhlet. Lorsque le solvant est évaporé, les extraits lipidiques sont séchés puis pesés (Annexe5 ).

• **Mesure de pH**

Après solubilisation de la farine de dattes dans l'eau distillée et après centrifugation et filtration , le pH de la solution est déterminé.

**3.3. Préparation du milieu de base**

Le milieu est préparé à différentes concentrations en farine de dattes (de 1 à 5%), afin de déterminer la concentration optimale pour la production de l' $\alpha$ -amylase. En effet, la farine de dattes est mise en solution dans de l'eau distillée, sous une agitation continue pendant 45 minutes. La suspension est filtrée à travers un tissu, puis centrifugée à 5000 g durant 10 minutes. Après décantation, le surnageant est récupéré.

Par ailleurs, le milieu de base est supplémenté par des sources azotées organique (l'extrait de levure à 0.5% ) et inorganique (le sulfate d'ammonium à 0.2%) et par l'amidon (à 1%) , substrat inducteur. Le pH est ensuite ajusté à 5 (Ul-Haq *et al.* ,2002).

**3.4. Inoculum**

La souche de levure conservée au réfrigérateur à une température de 4°C,est repiquée, puis mise à incuber à 30°C pendant 72 heures. Une suspension de la souche (dans de l'eau distillée stérile), est ensuite préparée à partir de la courbe étalon des cellules (Figure 5).

**3.5. Conduite de la fermentation**

Les cultures sont réalisées dans des erlens-meyers de 250 ml à raison de 50 ml par erlen, puis stérilisées à 110°C pendant 20 minutes. Après refroidissement, l'ensemencement des milieux de culture est effectué avec une suspension de cellules, à raison de  $2.6 \times 10^6$  cellules/ml. Les erlens-meyers sont ensemencés et incubés à 30°C, dans un bain-Marie agitateur (180 tours/min) pendant 72 heures (Ul-haq *et al.*, 2002). Les expérimentations sont réalisées en 3 essais.

### **3.6. Manipulations effectuées après la fermentation**

Différents mesures et dosages sont effectués après fermentation :

- **Mesure du pH**

Le pH de l'extrait enzymatique est mesuré à l'aide d'un pH-mètre.

- **Mesure de la biomasse**

Le poids sec de la biomasse est déterminé à la fin des fermentations, après filtration sur papier Whatman n° 2 et rinçage à l'eau distillée. La biomasse est séchée dans une étuve réglée à 105°C jusqu'à poids constant (Nishio et Nagai, 1981 et Pedersen et Nielsen, 2000).

- **Dosage de l'activité  $\alpha$ -amylasique**

L'activité  $\alpha$ -amylasique est mesurée selon la méthode de Bernfeld (1955), dont le principe est basé sur la mesure du pouvoir réducteur lors de l'hydrolyse de l'amidon. Le dosage du sucre réducteur est déterminé par une réaction colorimétrique, due à la présence de l'acide 3,5- dinitrosalicylique. L'activité enzymatique est exprimée par l'unité internationale, correspondant à une micromole de maltose libéré par minute, à 40°C et à pH 5 et par millilitre.

#### **Réactifs**

##### **DNSA :**

- Dissoudre 1 g d'acide 3,5- dinitrosalicylique, dans 20ml de NaOH 2N et 50 ml d'eau distillée.
- Ajouter 30 g de tartrate double de sodium et de potassium. Compléter à 100 ml avec de l'eau distillée.
- Filtrer. Le réactif de DNSA doit être conservé à l'abri de la lumière et au frais à 4°C.

##### **Substrat :**

Dissoudre 1 g d'amidon soluble dans 100 ml de tampon phosphate 0.1 M , pH 5.



### **Protocole**

- Ajouter à 0,5 ml d'une solution de l'extrait enzymatique, 0,5 ml de substrat.
- Incuber à 40°C pendant 30 minutes. L'extrait enzymatique utilisé dans le blanc, doit être dénaturé préalablement, à 100°C pendant 10-15 minutes.
- Arrêter la réaction par addition de 1 ml de DNSA.
- Chauffer le mélange pendant 5 minutes dans un bain-Marie à 100°C, pour le développement de la couleur.
- Refroidir dans un bain de glace et ajouter 10ml d'eau distillée.
- Lire l'absorbance à 540 nm avec un spectrophotomètre.
- La concentration des sucres réducteurs correspondant (maltose libéré sous l'action de l' $\alpha$ -amylase), est déterminée à partir d'une courbe étalon (Annexe7).

#### **• Dosage de protéines**

Les protéines sont dosées par la méthode de Lowry et ses collaborateurs (1951). Cette méthode, a pour principe de mesurer la densité optique de la coloration bleue du complexe Folin-ciocalteu (acide phosphomolybdo-tungstique), réduit en présence de protéines . La méthode de Lowry est la résultante de deux réactions :

a) Réaction de Biuret qui, en présence de sulfate de cuivre et en milieu alcalin, permet le dosage des liaisons peptidiques des protéines.

b) Réaction du réactif de Folin sur la tyrosine, le tryptophane et dans une moindre mesure la cystine, la cystéine et l'histidine. Elle entraîne une réduction, par perte d'un à trois atomes d'oxygène et la fixation du cuivre par chélation, facilitant ainsi le transfert d'électrons vers ce réactif.

**Protocole :** ( Voir annexe 6).

- **Dosage des glucides** (La méthode décrite précédemment) (Annexe3).

### **3.7. Cinétique de production de l' $\alpha$ -amylase par la souche sélectionnée**

L'étude de la cinétique de production de l' $\alpha$ -amylase, est réalisée en erlens- meyers de 250 ml à raison de 50ml de milieu de base par erlen . Après stérilisation et ensemencement ( $2.6 \times 10^6$  cellules/ml), les erlens sont ensuite incubés à 30°C pendant 100 heures, sous une agitation de 180tours/min. Des prélèvements sont effectués régulièrement (chaque 2 heures), à partir des 3 essais expérimentaux réalisés. Après récupération de la biomasse, par filtration sur papier Whatman n° 2, les paramètres suivants sont mesurés :

- pH
- activité  $\alpha$ -amylasique
- concentration des protéines
- concentration des sucres totaux.

### **3.8. Purification partielle de l'enzyme**

Cette purification est effectuée dans le but de concentrer et de purifier l'extrait brut, pour permettre l'étude de quelques caractéristiques physico-chimiques de l'enzyme.

#### **• Préparation de l'extrait brut**

La fermentation est réalisée dans des erlens- meyers de 500 ml, à raison de 100 ml de milieu de base par erlen. Après incubation à 30°C, avec une agitation de 180 tours/min pendant 78 heures, l'extrait brut est récupéré par filtration sur papier Whatman n° 2.

#### **• Précipitation au sulfate d'ammonium**

L'enzyme brute est précipitée avec du sulfate d'ammonium. L'échantillon est saturé, par un gradient variant de 5% à 80%. La précipitation est effectuée dans un bain de glace, sous agitation continue, afin d'éviter la dénaturation de l'enzyme. Les protéines précipitées, sont récupérées par centrifugation à 8000g, pendant 20 minutes à 4°C (Ramachandran *et al.*, 2004). Les fractions sont suspendues dans du tampon phosphate 0.1 M pH5, puis dialysées une nuit uniquement contre le même tampon. L'activité spécifique de l'enzyme est estimée dans toutes les fractions récoltées.

### **3.9. Etude de quelques propriétés physico-chimiques de l' $\alpha$ -amylase partiellement purifiée**

- **Effet du pH**

La détermination du pH optimum est réalisée, avec des tampons variant de 2 à 4 (citrate- phosphate) et de 5 à 8 (phosphate).

- **Effet de la température**

L'effet de la température sur l'activité enzymatique, est étudié dans un intervalle variant de 20°C à 80°C.

- **Etude de la thermostabilité**

La thermostabilité est déterminée par mesure de l'activité enzymatique résiduelle, après incubation de l'extrait enzymatique à différentes températures (60 °C, 70°C, 80°C et 90°C), dans un intervalle de temps de 0 à 150 minutes.

## **1. Isolement des souches**

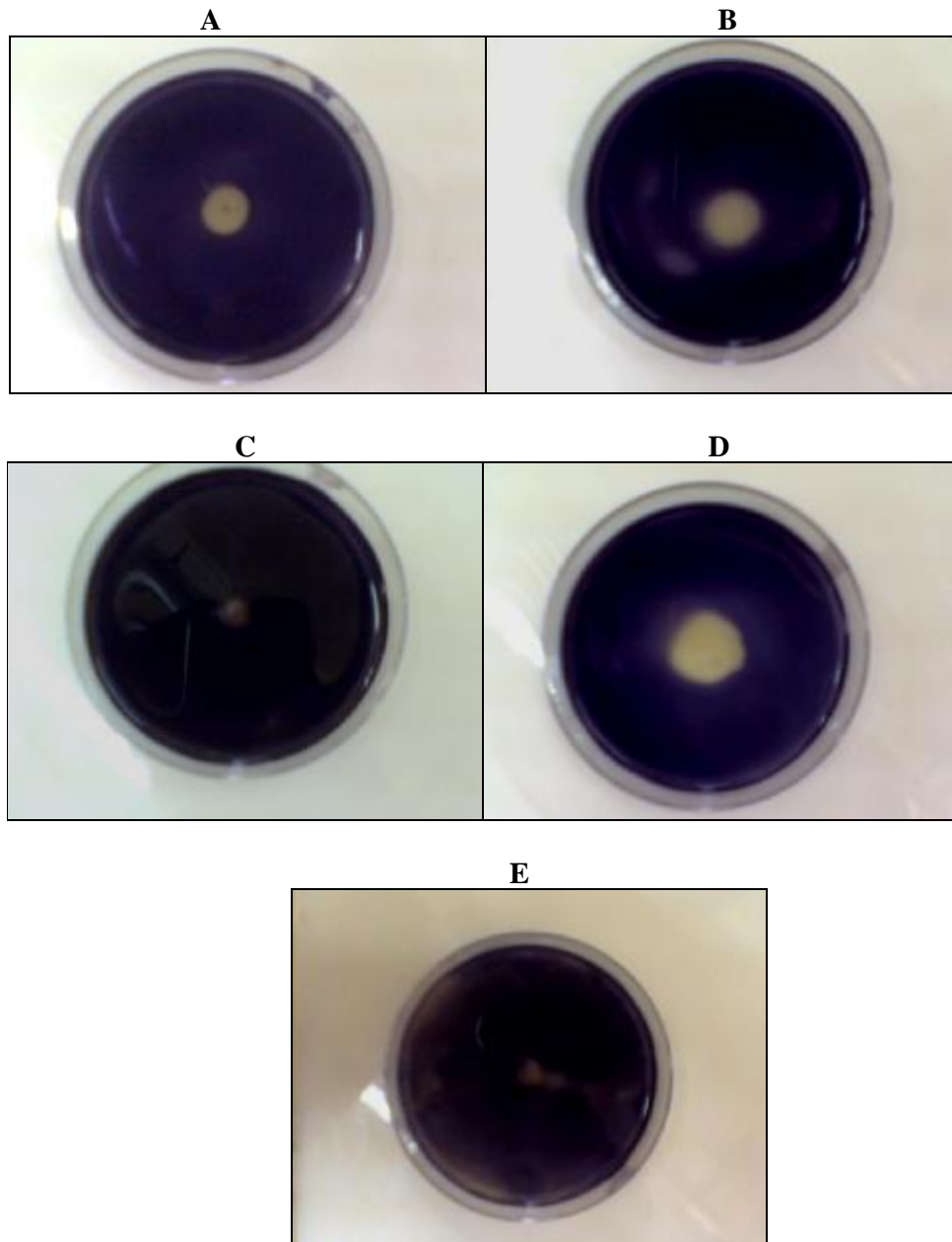
L'isolement des levures, à partir d'échantillon de sol saharien (palmeraie de Biskra), a permis de répertorier cinq souches (**S1, S2, S3, S4 et S5**). L'estimation du nombre total des levures de  $10^5$  à  $10^6$ /g de sol, suggère qu'elles représentent un nombre très faible, comparé à celui des bactéries et des moisissures de l'ordre de  $4 \times 10^6$  à  $7 \times 10^7$ /g de sol (Phaff et Starmer, 1987).

Dans des conditions favorables, les levures peuvent se multiplier dans certains sols, mais l'élévation de leur nombre est habituellement suivie d'une diminution marquée (Lund, 1954). De plus, la région de Biskra est caractérisée par un climat aride [une pluviosité annuelle de 120 à 150 mm et des températures élevées, pouvant atteindre les 50°C en saison estivale] (Anonyme, 2003). Par ailleurs, un pH du sol, relativement neutre 6.78, favorise une reproduction rapide des populations bactériennes (Allen *et al.*, 1987) au dépens de celle des levures, dont la croissance est optimale à des pH acides (Phaff *et al.*, 1978). Malgré ces conditions extrêmes, quelques souches levuriennes arrivent à résister, ce qui explique le faible taux de souches obtenues. Cette survie, est probablement favorisée pour la forme sporulante, où il a été mis en évidence la capacité des levures capsulées (*Lipomyces*, *Cryptococcus*, *Rhodotorula*) à survivre dans les habitats pauvres en aliments et pendant les périodes de dessiccation (Golubev *et al.*, 1984).

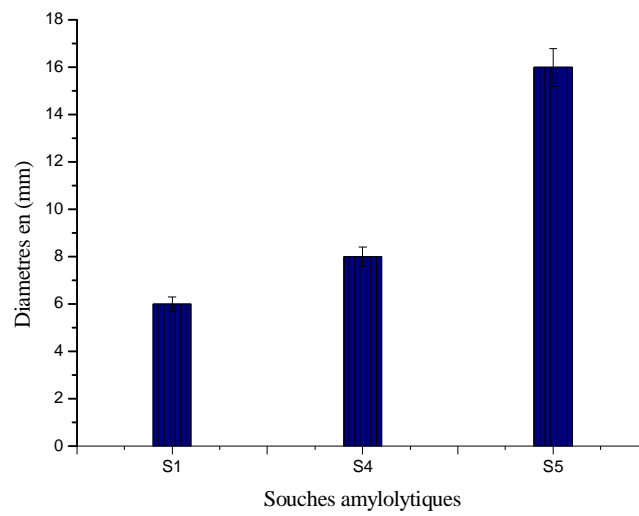
Par ailleurs, la présence ou la croissance de certaines espèces peut être liée au dépôt des résidus d'animaux ou de plantes (Phaff et Starmer, 1987) et à la structure du sol (son contenu organique, sa porosité etc...), qui exercent un effet sur leur distribution (Phaff et Starmer, 1987).

## **2. Sélection de souches amylolytiques**

Parmi les cinq souches levuriennes isolées, nous devons sélectionner la souche la plus performante, pour la production de l' $\alpha$ -amylase. Ces souches, sont testées sur milieu PDA à 1% d'amidon. Les souches S1, S4 et S5 ont développé des zones de lyse (halo clair) sur ce milieu sélectif, cependant S2 et S3 n'en possèdent pas. Parmi les 3 souches levuriennes amylolytiques, la souche S5 se distingue par une activité amylolytique élevée (Figures 6 et 7).



**Figure 6:** Test de sélection de souches amylolytiques. Développement de zones de lyse pour les souches S1(A), S4 (B)et S5(C), après 48 h d'incubation à 30°C et à pH 5



**Figure7 :** Diamètre des zones de lyse des souches amyolytiques S1, S4 et S5 ( après 48 h d'incubation à 30°C et à pH 5)

### **3. Identification du genre de la souche amylolytique S5**

L'identification du genre de la souche S5, isolée à partir de sol saharien (palmeraie de Biskra), est basée sur les clefs de détermination de Kreger-Van, (1984).

#### **3.1. Etude des Caractères cultureux**

L'étude des caractères cultureux de la souche sélectionnée, a pu ressortir les caractères suivants :

- Colonies arrondies, crémeuses, de couleur blanche à beige clair (Figure 8).
- Culture abondante sur gélose inclinée .
- La culture sur milieu liquide présente un anneau .

#### **3.2. Etude des caractères morphologiques cellulaires**

L'étude des caractères morphologiques a donné les résultats suivants :

- La forme des cellules est arrondie à ovoïde (Figure 9).
- La taille des cellules est environ de 4  $\mu\text{m}$  .
- La division cellulaire se fait par bourgeonnement unipolaire ou bipolaire (Figure 9).
- Absence de pseudomycélium.
- Sporulation : formation d'asque , contenant de 1 à 6 spores (Figure 10).
- L'asque est de forme arrondie et lisse .
- Les spores ne sont pas libérées.

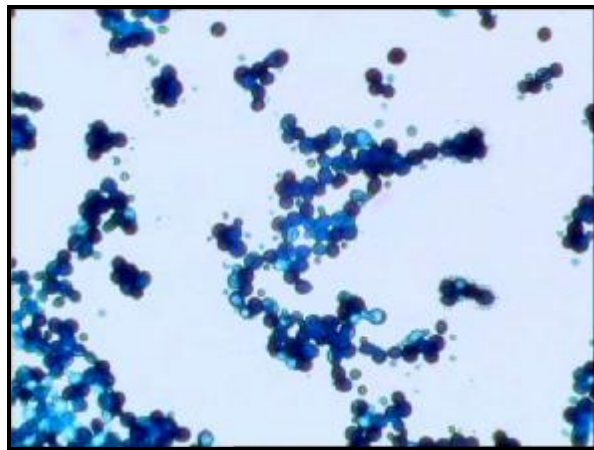
#### **3.3. Caractéristiques biochimiques et physiologiques**

- **Fermentation des sucres**

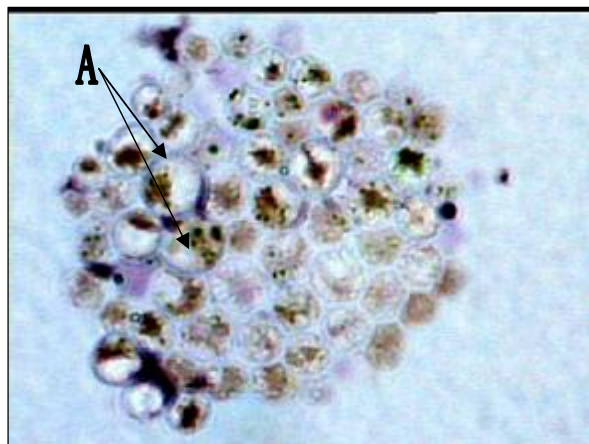
La souche S5 ne présente aucune aptitude à fermenter l'ensemble des sucres testés ( D-glucose, maltose, D-fructose, saccharose, lactose, D- xylose, D-galactose et amidon), car nous n'avons pas décelé de gaz dans la cloche de Durham.



**Figure 8** : Aspect macroscopique et cultural de la souche S5  
(après 72h d'incubation à 30°C et à pH 5)



**Figure 9** : Aspect des cellules de la souche S5 .Grossissement x 40.



**Figure 10** : Aspect des asques de la souche S5 ,(A) asques. Grossissement x 100.



- **Assimilation des substrats azotés**

La souche présente une assimilation positive pour le sulfate d'ammonium et le nitrate de potassium. On enregistre une croissance, où ces éléments sont utilisés séparément comme source d'azote.

### **Conclusion**

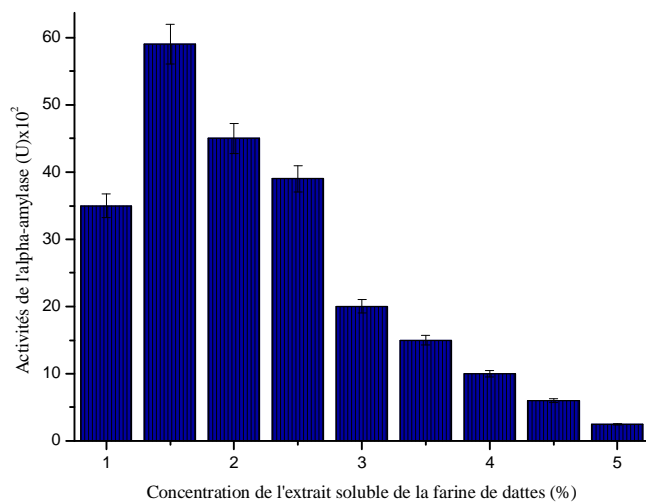
L'analyse des résultats obtenus, montre que la souche levurienne S5 semble s'apparenter au genre *Lipomyces*. En effet, les différents caractères présentés par la souche S5, se rapprochent énormément des caractéristiques décrites par Kreger-Van, (1984).

De plus, le métabolisme exclusivement respiratoire (Gancedo et Serrano, 1989), ainsi que le processus caractéristique de formation des asques, correspondent à ceux cités par Sloof, (1970), Babjeva et Gorin, (1975) et Gancedo et Serrano, (1989) pour ce genre.

Par ailleurs, plusieurs études ont rapporté que le sol est l'habitat typique pour ce genre (Kelly *et al.*, 1985, Prieto *et al.*, 1995, Eksteen *et al.*, 2003 et Kang *et al.*, 2004), à caractère amylolytique (Phaff et Starmer, 1987). La détermination de l'espèce, exige des tests d'assimilation d'autres substrats carbonés spécifiques, ainsi que des techniques d'identification plus poussées, comme la biologie moléculaire et l'étude protéomique caractéristique de chaque espèce.

**Tableau 5 :** Composition chimique de la farine de dattes

Paramètres	Concentration en%
Matière sèche	81.5
Azote total	0.56
<b>Sucres totaux</b>	<b>71.31</b>
Matière grasse	0.54



**Figure 11 :** Détermination de la concentration optimale de l'extrait soluble en farine de déchets de dattes, pour la production de l' $\alpha$ -amylase par *Lipomyces sp.*

#### **4. Production de l' $\alpha$ -amylase par *Lipomyces sp***

Avant d'entamer la fermentation pour la production de l'enzyme, il est important de déterminer la composition chimique du substrat, l'extrait soluble de la farine de dattes. L'analyse chimique montre que les sucres totaux, représentent 71.31 % du poids de la farine, avec un taux d'azote relativement faible (0.56%) (Tableau 4 ). Cette teneur en sucre se rapproche de celles citées par Cook et Fur, (1953),(76%) et par Kacem Chaouche,(2005) (74.76%).

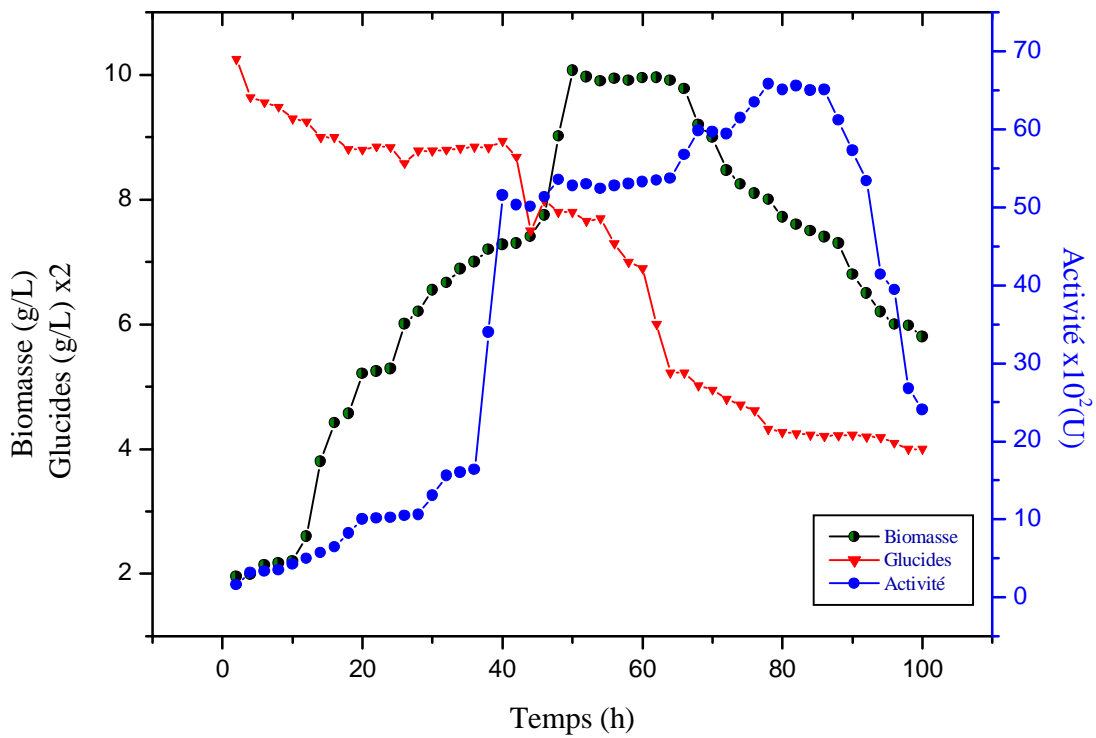
L'enrichissement du milieu avec de l'azote est nécessaire, afin d'équilibrer le milieu (rapport C/N supérieur ou égal à 18) et de favoriser un développement adéquat des levures (Botton, 1990). L'utilisation de source azotée organique et inorganique, est essentielle aussi bien pour la production de l' $\alpha$ -amylase que pour la croissance de la levure (Ul-Haq *et al* .,2002). A cet effet, le sulfate d'ammonium à 0.2% et l'extrait de levure à 0.5%, sont ajoutés respectivement, comme source d'azote et de facteurs de croissance, suivis de l'addition de l'amidon à 1%, comme substrat inducteur (Ul-Haq *et al* .,2002). La concentration de 1.5% en farine de dattes, a permis une production optimale de l'enzyme, aussi elle a été choisie pour la suite du travail (Figure 11) .

Cependant, la production et l'activité enzymatique, sont sensiblement influencées par la composition du milieu (Ibukun et Akindumila, 1998 et Iwakolun *et al.*, 2001). L'optimisation des paramètres de production de l' $\alpha$ -amylase par la levure *lipomyces sp*, cultivée sur un substrat à base d'extrait soluble de dattes, est donc souhaitable afin d'augmenter le rendement en enzyme.

##### **4.1. Cinétiques de croissance et de production de l' $\alpha$ -amylase par *Lipomyces sp*.**

###### **• Cinétique de croissance de la levure *Lipomyces sp*.**

La levure *Lipomyces sp*, présente une cinétique classique de croissance microbienne avec ces 4 phases. En effet, la croissance commence par une phase de latence de 12 h, permettant une adaptation de la souche au milieu de culture (Figure 12). A la fin de cette dernière, on assiste à un démarrage de la croissance à partir de la 14<sup>ème</sup> heure, où la biomasse passe de 2.6 à 3.8 g/L. L'évolution rapide de la reproduction cellulaire, caractérisée par une phase d'accélération, puis une phase exponentielle, permet d'atteindre



**Figure 12** : Evolution cinétique de la croissance, de l'activité amylasique , de la consommation des sucres et du pH au cours de la fermentation par *Lipomyces sp.*(30 C°- pH 5)

un maximum de croissance ou de biomasse de 10.07 g/L, au bout de 50 h de fermentation (Figure 12). Les profils de dégradation des sucres et de la croissance, sont en parfaite synergie, notamment en phase exponentielle, où on observe une diminution rapide de la concentration des sucres (de 8.83 à 6 g/L).

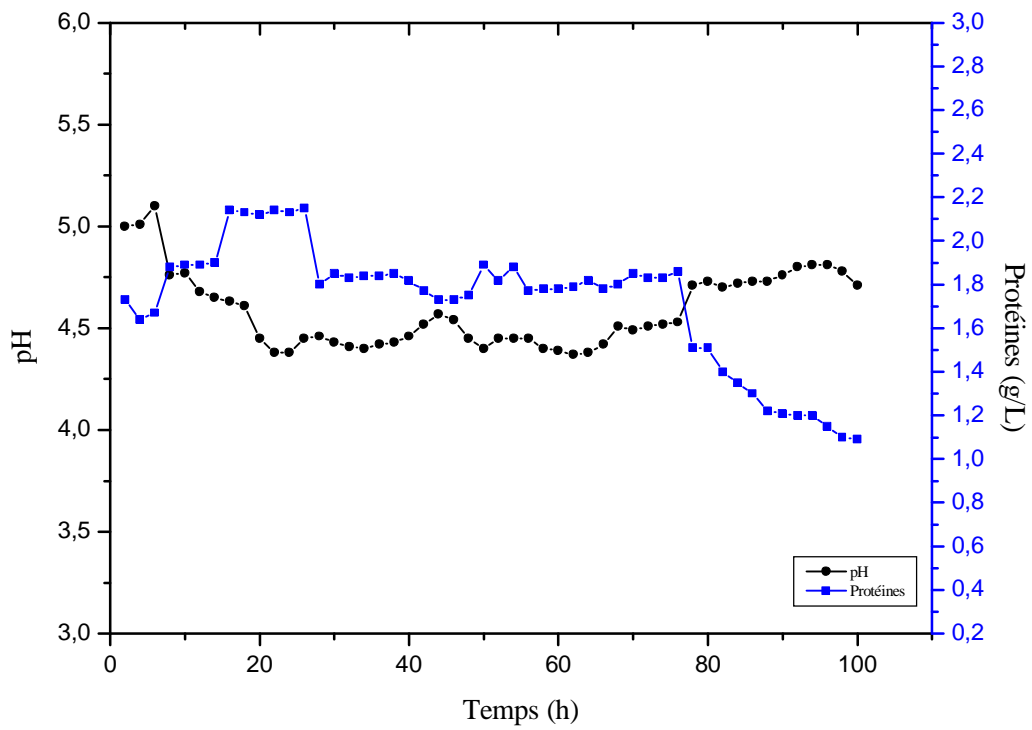
A partir de la 50<sup>ème</sup> heure, la croissance se ralentit, puis arrive la phase stationnaire d'une durée de 14 heures, où on assiste à une légère baisse de la biomasse (de 10.07 à 9.91 g/L). Suite aux conditions défavorables du milieu (épuisement en source d'énergie et accumulation de produits d'excrétion du métabolisme), la biomasse cesse d'augmenter et commence sa décroissance à partir de la 66<sup>ème</sup> heure. Elle passe de 9.91 à 5.8 g/L à la fin de la fermentation, suite à une lyse cellulaire (Scriban., 1999).

- **Cinétique de production de l' $\alpha$ -amylase de la levure *Lipomyces sp.***

La cinétique de production de l' $\alpha$ -amylase de *Lipomyces sp.*, est décrite dans la figure 12. La synthèse de l'enzyme commence dès le début de la fermentation, mais en faible quantité (158U). La production de l' $\alpha$ -amylase augmente avec la croissance cellulaire. Ce type de profil, a été rapporté par Tatsinkou et ses collaborateurs (2005) et par Kocher et Katyal (2003), pour des levures ascomycètes cultivées respectivement, sur des milieux à base de blé et de pomme de terre.

L'activité amylolytique augmente de façon importante durant la phase exponentielle et stationnaire, où elle passe de 571U à 5678U, après 66 heures de fermentation. On note globalement une similitude entre l'augmentation de l'activité enzymatique et la dégradation des glucides, ce qui laisse suggérer que l' $\alpha$ -amylase est produite au dépens de la dégradation de l'amidon et des oligosaccharides. Le même constat a été signalé par Djoulde (2004), suite à la fermentation du manioc par sa propre microflore (levures, moisissures et bactéries).

A partir de la 70<sup>ème</sup> heure, l'activité de l'enzyme poursuit sa progression et atteint son maximum à la 78<sup>ème</sup> heure (6582U), malgré le déclin observé dans la croissance. Ceci est probablement expliquée d'une part, par l'augmentation de la concentration du maltose (suite à la dégradation des petits dextrines non détectées par le DNSA et d'autre part, par la hausse du pH, favorisant une activité optimale (De mot et Verachtert, 1985). La diminution de l'activité enzymatique commence dès la 90<sup>ème</sup> heure, jusqu'à une valeur minimale de 2407U à la fin de la fermentation (Figure 12).



**Figure 13** : Profil cinétique des protéines et du pH.

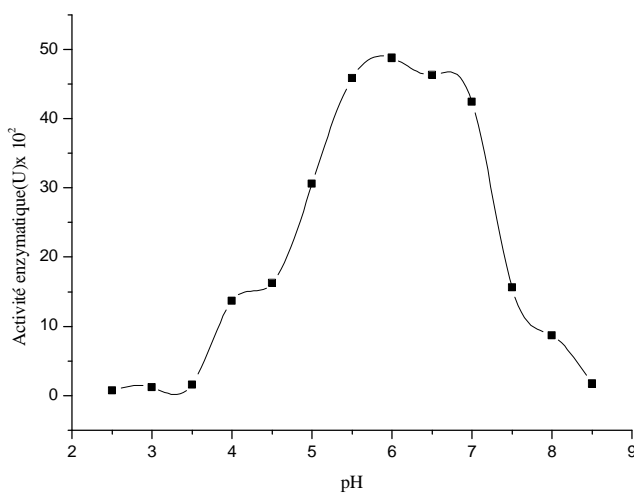
#### **4.2. Evolution du pH et des protéines au cours de la fermentation**

L'évolution du pH au cours de la fermentation est représentée par la figure 13. Le pH initial de 5, commence à augmenter pendant les 6 premières heures de fermentation. Cette hausse, est suivie d'une diminution progressive, jusqu'à atteindre une valeur minimale de 4.38. Cette baisse, est due probablement à la formation d'acides organiques (acides succinique, acétique, fumarique, propionique, valérique etc...), suite à la dégradation des glucides (Gancedo et Serrano, 1989). Cependant, le pH se stabilise entre 24 et 76 h. Cet effet est dû à la dégradation des protéines, qui libère des acides aminés puis les ions ammonium dans le milieu (Botton *et al.*, 1990). A la fin de la fermentation, la diminution de la synthèse des acides organiques dans le milieu et la lyse cellulaire, provoquent une augmentation de 4.49 à 4.81 (Leveau et Bouix, 1999).

Par ailleurs, le taux de protéines prend une légère hausse pendant la phase exponentielle de la fermentation (variation de 1.73 à 1.83 g/L), expliquée par la synthèse d'enzymes et en particulier des hydrolases (Arnaud et Guiraud, 1999). Cette progression est en parfaite synergie avec les cinétiques de croissance et de production de l' $\alpha$ -amylase par *lipomyces sp*, précédemment décrites, durant les 26 heures premières de fermentation (Figures 12 et 13). Pendant la phase stationnaire et le début de la phase de décroissance (de 28 à 76h) (Figure 13), le taux de protéines est quasiment stable. Ensuite, nous assistons à une diminution, qui se stabilise à une concentration minimale de 1.09 g/L. Cette chute est probablement due à l'action protéolytique des protéases, libérées lors de la lyse cellulaire (Leveau et Bouix, 1999).

**Tableau 6** : Bilan de la précipitation au sulfate d'ammonium de l' $\alpha$ -amylase de *Lipomyces sp*

Etapes de purification	Volume (ml)	Activité Totale(U)	Protéines Totales(mg)	Activité Spécifique(U/mg)	Degrés de purification	Rendement
Extrait brut	500	6500	807	8.05	1	100%
30%	10	948.15	67.83	13.97	1.73	14.58%
<b>50%</b>	10	<b>5023.2</b>	<b>156</b>	<b>32.2</b>	<b>4</b>	<b>77.3%</b>
60 %	10	135	52	2.59	0.32	2%



**Figure 14** : Effet du pH sur l'activité de l' $\alpha$ -amylase de *Lipomyces sp.* (fraction précipitée par le sulfate d'ammonium 50%).



## **5. Purification partielle de l' $\alpha$ - amylase de *Lipomyces sp***

L'  $\alpha$ -amylase de *Lipomyces sp* est fractionnée par différentes concentrations de sulfate d'ammonium (Tableau 6 ). La fraction saturée à 50 %, a donné un rendement maximal en enzyme de 77.3%, avec un degré de purification de 4 . Pour l'  $\alpha$  –amylase de la levure *Filobasidium capsuligenum*, De Mot et Verachtert (1985), ont obtenu un rendement supérieur de 98,8% et un taux de purification de 2, avec une saturation de 80%. L' enzyme de la moisissure *Aspergillus oryzae*, est précipitée à 70%, avec un taux de purification de 2.08 (Ramachandran *et al.*, 2004). Cette différence est probablement expliquée par l'existence d'isoenzymes, due à la différence d'espèces.

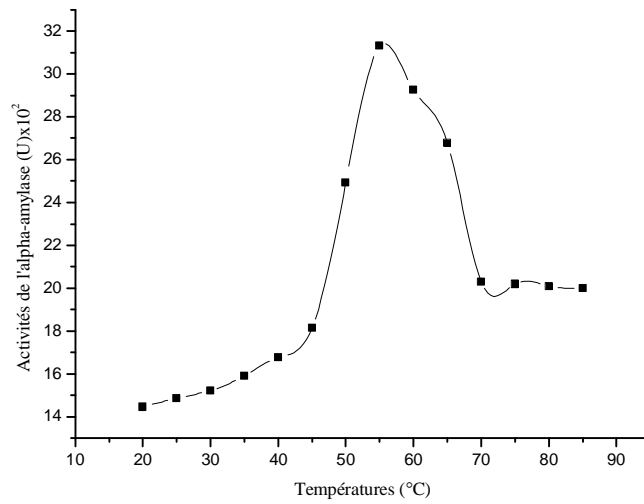
Aussi, l'activité spécifique obtenue (32.2) U/mg), est proche de celle trouvée par Bennamoun, (2001) (35.30 U/mg) et inférieure à celle obtenue par Ramachandran et ses collaborateurs (2004) (78.1 U/mg), travaillant sur l'  $\alpha$ -amylase d'*Aspergillus oryzae* . Ces activités spécifiques, se traduisent par des degrés de purification plutôt faibles ( dans le cas de notre enzyme, il est de 4), qui peuvent être améliorés par des techniques de purification plus affinées, si l'enzyme est destinée pour un usage alimentaire ou pharmaceutique.

## **6. Etude de quelques caractéristiques de l' $\alpha$ -amylase de *Lipomyces sp* partiellement purifiée**

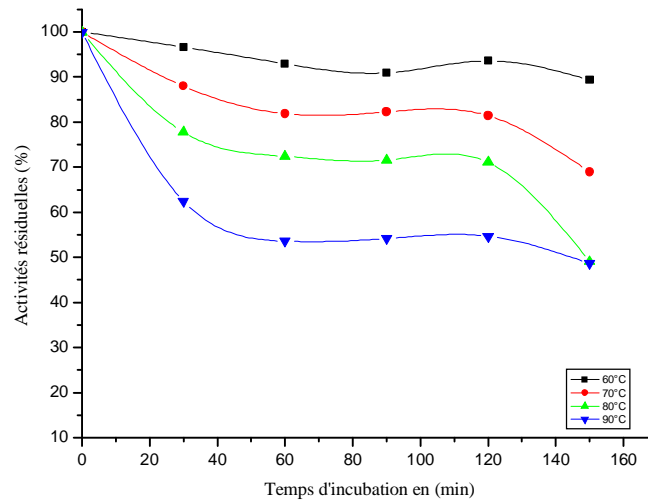
### **6.1. Effet du pH sur l'activité de l' $\alpha$ -amylase**

L'activité amylasique de *lipomyces sp*, se manifeste à des pH compris entre 5.5 et 6.5 et avec un maximum à pH 6. On remarque une nette réduction de l'activité à partir du pH 7.5. Lorsque le pH atteint la valeur de 8.5, 96% de l'activité de l'enzyme sont perdus (Figure 14). L'analyse de la variance (ANOVA) des résultats obtenus (Annexe 8), révèle que le pH exerce un effet significatif sur l'activité enzymatique de l'  $\alpha$ -amylase partiellement purifiée ( $P < 0.05$ ).

Par ailleurs, Kelly et ses collaborateurs (1985) et Prieto et ses collaborateurs (1995), rapportent pour l'enzyme du même genre, un pH optimum acide : 4 -4.5 pour *Lipomyces starkeyi* et 4.5-5.0 pour *Lipomyces kononenkoae* . Cependant, ces résultats s'identifient à ceux trouvés par Kang et ses collaborateurs (2004), pour *Lipomyces starkeyi* et notamment à ceux d'autres levures ascomycètes, telles que *Cryptococcus sp* (Lefuji, 1996) et *Schwanniomyces alluvius* (Moranelli *et al.*, 1987). Ces différences sont probablement dues à



**Figure 15** : Effet de la température sur l'activité de l' $\alpha$ -amylase de *Lipomyces sp.*



**Figure 16** : Etude de la thermostabilité de l' $\alpha$ -amylase de *Lipomyces sp.* (fraction précipitée par le sulfate d'ammonium 50%).

la variation de la composition en acides aminés, où chaque  $\alpha$ -amylase, pour une activité optimale, développe un état de protonation spécifique.

En conclusion, l' $\alpha$ -amylase de *Lipomyces sp* a un pH optimum de 6, semblable à celui des  $\alpha$ -amylases fongiques, mais différent de celui des  $\alpha$ -amylases bactériennes, qui ont plutôt des pH optimum alcalins (pH 8) (De Souza et Martins, 2000 et Cordeiro *et al.*, 2002).

## **6.2. Effet de la température sur l'activité de l' $\alpha$ -amylase**

L'influence de la température sur l'activité de l' $\alpha$ -amylase de *Lipomyces sp*, est testée dans une gamme de 20 à 85°C. L'enzyme présente une activité maximale à une température de 55°C (Figure 15). De 20 à 45°C, l'activité reste relativement faible (Figure 15). Elle chute brutalement lorsque la température passe de 65°C à 70°C et reste stationnaire au delà de 70°C. L'étude statistique par analyse de la variance (ANOVA) des résultats (Annexe 9), montre que la température exerce un effet significatif sur l'activité de l' $\alpha$ -amylase ( $P < 0.05$ ).

Par ailleurs, les études menées sur les espèces levuriennes du même genre (*Lipomyces kononenkoae* et *Lipomyces starkeyi*), montrent que leurs  $\alpha$ -amylases ont respectivement, des températures optimales de 60 et 70°C (Kelly *et al.*, 1985, Prieto *et al.*, 1995 et Eksteen *et al.*, 2003). Cependant, pour la dernière souche, Kang et ses collaborateurs (2004), signalent une température optimale de 40°C. De plus, l'optimum de l'activité de l' $\alpha$ -amylase de *Lipomyces sp* est supérieur à celui d'autres levures : *Cryptococcus flavus* (Wanderley *et al.*, 2004), *Filobasidium capsuligenum* (De mot et Verachtert, 1985) et *Schwanniomyces alluvius* (Moranelli *et al.*, 1987), dont les activités optimales se manifestent à 50°C.

Comparés à l'enzyme des moisissures et de bactéries productrices d' $\alpha$ -amylases, nos résultats sont très proches des  $\alpha$ -amylases d'*Aspergillus oryzae* (Bennamoun, 2001), d'*Aspergillus tamarii* (Moreira *et al.*, 2004), d'*Aspergillus flavus* (Khoo *et al.*, 1995) et de *Bacillus sp* (De Souza et Martins, 2000).

Le climat aride, caractéristique du site d'isolement, est certainement à l'origine du comportement thermique de l' $\alpha$ -amylase de notre souche. Nous pouvons conclure que *Lipomyces sp* a un potentiel de produire une  $\alpha$ -amylase thermostable, que l'on peut qualifier de thermophile ; puisque son activité est maintenue dans un intervalle de 60°C à 80°C et ne l'est plus au dessous de 40°C, caractéristique des enzymes thermophiles (Vieille et Zeikus, 2001).

### **6.3. Etude de la thermostabilité de l' $\alpha$ -amylase partiellement purifiée**

L'étude de la stabilité thermique de l' $\alpha$ -amylase partiellement purifiée, est testée avec 4 températures différentes : 60°C, 70°C, 80°C et 90°C. L'enzyme résiste à 60°C, pendant 150 min d'incubation ( Figure 16).

A 70°C, l'enzyme est pratiquement stable et perd 31 % de son activité, pour un traitement de 2 heures et demie. Une exposition de l'enzyme à des températures de 80°C et 90°C pendant 90 min, fait perdre à l'enzyme respectivement, 29% et 46% de son activité initiale. La demi-vie de l'enzyme à 80°C est de 150 min et à 90°C, elle est de 130 min .

Ce profil de thermostabilité de l' $\alpha$ -amylase, est comparable à celui de la levure *Lipomyces kononenkoae* et de certaines bactéries telle que *Bacillus sp* (Prieto *et al.*, 1995 et Cordeiro *et al.*, 2002). Cependant, il est différent de celui des levures non productrices d'  $\alpha$ -amylases thermostables (Barbier, 1997), exceptées celles qui sont génétiquement modifiées. En effet, Moranelli et ses collaborateurs (1987), rapportent que l' $\alpha$ -amylase de *Schwanniomyces alluvius* est très thermolabile. De plus, la thermorésistance de notre enzyme dépasse largement les valeurs rapportées par Lefuji (1996), pour *Cryptococcus sp*, 20% et 10% d'activités résiduelles, après 30 min d'incubation, respectivement à 80°C et à 90°C.

Ces différences, s'expliquent probablement par l'origine des espèces et par les conditions environnementales , qui font que les souches développent des mécanismes de lutte et d'adaptation, spécifiques à leur niche écologique . En effet, l' $\alpha$ -amylase de la moisissure *Rhizopus oryzae*, isolée du blé de la même région, montre une stabilité relativement semblable à la notre : des demi- vies de 150 min à 80°C et de 90 min à 90°C (Ait kaki, 2004).

Différents mécanismes expliquent cette thermostabilité : la composition en acides aminés, le nombre de pont S-S (Matsumura *et al.*, 1989), les interactions hydrophobes (Dill ,1990) les liaisons hydrogènes et la présence de métaux tel que les ions  $Ca^{2+}$ (Boel *et al.*, 1990). D'autres paramètres extrinsèques, comme les sels et le substrat influencent également la stabilité (Vieille et Zeikus, 2001). Par ailleurs, des études sur les protéines eucaryotes naturellement glycosylées (Vieille et Zeikus, 2001), ont prouvé que la glycosylation pourrait exprimer une stabilisation thermique significative. La thermostabilité de notre enzyme s'explique probablement par l'un ou l'ensemble des facteurs évoqués.

**Conclusion :**

L' $\alpha$ -amylase de la levure *Lipomyces sp* est une enzyme thermostable : résiste à la température de 60°C pendant 150 min. A 70°C, elle perd 17% de son activité pour une durée de 90min . Son exposition à 80°C et à 90°C , pendant 90 min, fait perdre à l'enzyme respectivement, 29% et 46% de son activité initiale.

Au vu de ces performances thermiques, l' $\alpha$ -amylase de la levure *Lipomyces sp* peut être qualifiée d'enzyme thermostable et être proposée pour une application industrielle.

## *Conclusion générale*

Notre étude comporte deux axes de recherche. Le premier concerne la sélection et la caractérisation de souches levuriennes amylolytiques isolées du sol (palmeraie de Biskra). La seconde partie est consacrée à la production de l' $\alpha$ -amylase par fermentation d'un milieu naturel (déchets de dattes) .

En effet, l'isolement des levures, a permis de répertorier **5 souches (S1, S2, S3, S4 et S5)**. Pour la sélection, nous avons utilisé un milieu PDA à 1% d'amidon . Seules les souches S1, S4 et S5 ont révélé des activités amylolytiques. Cependant, la souche S5 s'avère plus performante. Elle a ensuite subi des tests pour sa caractérisation : études morphologique, biochimique et physiologique. Elle semble appartenir au genre *Lipomyces*.

Par ailleurs, le milieu de fermentation ,à base d'extrait soluble de la farine de dattes (**1.5%**), est utilisé pour la production de l' $\alpha$ -amylase de *Lipomyces sp*. Une analyse de la composition chimique de l'extrait est effectuée. Celle-ci montre que les sucres totaux représentent (**71.31%**) du poids de la farine, avec un taux d'azote de **0.56%**. L'enrichissement du milieu avec de l'azote s'avère donc nécessaire, afin de l'équilibrer et de le rendre favorable au développement et à la production de l' $\alpha$ -amylase par *Lipomyces sp* . Pour cela , le milieu est supplémenté par le sulfate d'ammonium (**0.2%**) et l'extrait de levure (**0.5%**) (sources d'azote et de facteurs de croissance) et par l'amidon (**1%**) (substrat inducteur).

L'étude cinétique, de la production de l' $\alpha$ -amylase sur ce milieu, révèle que la production enzymatique atteint son maximum de **6582 U** après **78 heures** de fermentation. Néanmoins, l'optimisation du milieu de production de l'enzyme à partir d'extrait soluble de dattes, est souhaitable afin d'augmenter davantage le rendement.

L'  $\alpha$ -amylase de *Lipomyces sp* est fractionnée par différentes concentrations de sulfate d'ammonium. La fraction saturée à **50 %**, a donné un rendement maximal de **77.3%** et un degré de purification de **4**. L'enzyme partiellement purifiée a un **pH optimum de 6** et une activité maximale à **55°C**.

L'étude de la stabilité thermique de l' $\alpha$ -amylase partiellement purifiée, est testée par un traitement thermique à 60°C, 70°C, 80°C et 90°C. L'enzyme est pratiquement stable à 60°C et à 70°C. Une exposition de l'enzyme à des températures de 80°C et 90°C pendant 90 min, fait perdre à l'enzyme respectivement, 29% et 46% de son activité initiale. La demi-vie de l' $\alpha$ -amylase à **80°C** est de **150 min** et elle est de **130 min** à **90°C**. Ces résultats révèlent que l' $\alpha$ -amylase de *Lipomyces sp* est **thermostable** et peut être utilisée industriellement.

Ces résultats ouvrent de nouvelles perspectives :

- Une identification de l'espèce de la souche isolée (par des tests d'assimilation d'autres substrats et par les techniques de la biologie moléculaire).
- Une optimisation du milieu de production de l' $\alpha$ -amylase, à base de déchets de dattes, afin d'augmenter le rendement en enzyme.
- Une purification plus poussée de l'enzyme pour une éventuelle utilisation de l' $\alpha$ -amylase en industries alimentaires ou pharmaceutique est recommandée (une électrophorèse SDS , chromatographie d'exclusion moléculaire etc...).
- Une augmentation de la stabilité thermique, ainsi qu'un recyclage de l'enzyme, par des techniques d'immobilisation.

- Abu E.A ., Ado S. A and James D. B.** (2005) .Raw starch degrading amylase production by mixed culture of *Aspergillus niger* and *Saccharomyces cerevisiae* grown on sorghum pomace. African Journal of Biotechnology. 4 (8), p : 785-790.
- Ahearn D.G.** (1973). Estuarine Microbial Ecology : The Belle W. *In* . Marine Science 1, p: 433-440.University of South Carolina Press, Columbia, South Carolina.
- Ait Kaki A .** (2004). Isolement de la moisissure *Rhizopus oryzae* et optimisation d'un milieu à base de lactosérum pour la production de l' $\alpha$ -amylase. Thèse de Magister. Faculté des Sciences, Université Mentouri de Constantine.
- Allen N. H and Ahearn D.G ..** (1987). Ecology of Aquatic Yeasts *In*: Rose A.H., Harisson J.S. (eds), The yeasts, V1, Biology of yeast. 2<sup>nd</sup> Edition. p: 123-174. Academic Press. London.
- Anonyme,** (2003). Données chiffrées N°4, les palmiers dattiers en Algérie, sous direction des statistiques agricoles, Ministère de l'agriculture et du développement rural. (Algérie).
- Anonyme,** (2003). Météo France. Statistiques. Biskra (Algérie).
- Arnaud A et Guiraud J. P.**(1999). Le métabolisme microbien. *Ds*. Scriban .R. Biotechnologie. 5<sup>ème</sup> édition. Techniques et Documentation – Lavoisier (éd.).p : 91-96.
- Babieva I.P. and Gorin S.E .**(1975). Aantonie van Leeuwenhoek .41: 185.
- Babjeva I .P., Moavad K .H and Marchenko A. I.**(1977). Microbiologia. 46, p :270.
- Barbier G .** (1997). Les enzymes des micro-organismes « extrêmophiles » : une nouvelle source en cours d'exploration. *Ds*: Larreta-Garde V. (ed.) Les enzymes en agroalimentaire, Tec et Doc Lavoisier, Paris. p : 308-347
- Barnett L .A** (1976).*In* “Advances in Carbohydrates Chemistry and Biochemistry (R.S.Tipson And D.Horton, eds), Academic Press, New York. 32, p : 125-234,
- Bealin K . F., Kelly C .T and Fogarty W .M .** (1990). Biochem. Soc . Trans, 18, p: 310-311.
- Bennamoun L .** (2001) Production de l' $\alpha$ -amylase par *Aspergillus oryzae* cultivée sur un milieu à base de déchets d'oranges. Optimisation du milieu de culture, purification partielle et étude des propriétés physico-chimiques de l'enzyme. Thèse de Magister. Faculté des Sciences, Université Mentouri de Constantine.
- Bernfeld P.** (1955). Amylases *In*: Clowck S. P., Kaplan N. O. (ed.), Methods in enzymology. 1, p : 149-157. Academic press, New York.
- Berry D . R and Paterson .A.**(1990). Enzymes in food industry *In*: Sucking C.J.(ed.), Enzyme chemistry impact and application . Editions chapman and hall Lordon, 2<sup>nd</sup> édition. p: 306-351.



- Bhella R .S et Altossar I .** (1987).Translational control of  $\alpha$ -amylase gene expression in *Aspergillus awamori*. *Biotechnology and Applied Biochemistry*. 9, p:287-293.
- Boel E ., Brady L ., Brzozwski A ., Derewenda Z ., Dodson G ., Jensen V., Petersen S., Swift H., Thim L and Woldike., H.** (1990).Calcium binding in  $\alpha$ -amylases: an X-ray diffraction study at 2.1-Å resolution of two enzymes from *Aspergillus*. *Biochemistry*; 29, p :6244–6249.
- Boiron P.** (1996). Organisation et biologie des champignons . Edition Nathan. p :13- 35.
- Bolton D.J., Kelly C.T and Fogarty W.M .** (1997). Purification and characterization of the  $\alpha$ -amylase of *Bacillus flavothermus*. *Enzy. Microbiol. Technol.* 20, p: 340-343.
- Botton B., Breton A., Fevre M., Gauthier S., Guy P. H., Larpent J.P., Reymond P., Borel J.P ., Randoux A ., Maquart A F.X ., Lepeuc H.C et Valeyre J .** (1987). *Biochimie dynamique* .Ed. Marlorne Decarie. p: 267 – 289.
- Botton B., Breton A., Fevre M., Gauthier S., Guy P. H., Larpent J.P., Reymond P., Sanglier J.J., Vayssier Y and Veau P.** (1990).Moississures utiles et nuisibles d'importance industrielle. 2<sup>ème</sup> édition. Masson. Collection Biothechnologies. p :34 -381.
- Bouix M et Leveau J. Y .** (1991). Les levures *Ds* : Bourgeois C.M., Leveau J.Y. , *Techniques d'analyse et de contrôle dans les industries agroalimentaires*, édition 2 Lavoisier-Tec & Doc, Paris. 3, p : 206-229.
- Brock T.D., Madigan M.T., Martinko J.M et Parker J.** (1994).Macromolecules and Molecular Genetics. *In: Biology of Microorganisms*, Prentice-Hall, Inc.,New Jersey. p:170-173.
- Buelon A ., Colonna P et Leloup V.** (1990). Les amidons et leurs dérivés dans les industries des céréales. *Industries Alimentaires et Agricoles* . 6, p : 515-532.
- Buisson G., Duee E., Hasen R and Payan F.**(1987). Three dimensional structure of porcine pancreatic  $\alpha$ - amylase at 2.9Å resolution *In : Embo J. G . Role of calcium in structure and activity.* p : 3909-3916.
- Burhan A., Nisa U., Gokhan C., Ömer C., Ashabil A and OsmanG.** (2003).Enzymatic properties of a novel thermostable, thermophilic, alkalineand chelator resistant amylase from an alkaliphilic *Bacillus* Sp. Isolate ANT-6. *Process Biochem.* 38, p: 1397-1403.
- Clark H.E., Geldrich E.F., Kabler P.W and Huff C.B.** (1958). *Applied Microbiology*. International Book Company, New York, 53.
- Chung-An L ., Eng-Kiat L and Su-May Y.** (1998). Sugar Response Sequence in the Promoter of a Rice  $\alpha$ -Amylase Gene Serves as a Transcriptional Enhancer. *J Biol Chem*, 17, p: 10120-10131.

- Comi K., Akeno T., Minitoki T., Ozeki K., Kumagai C., Okazaki N and Linura Y.**(2000).Molecular cloning and caractérisation of a transcriptional activator gene amy involved in the amyolytic gene expression in *Aspergillus oryzae*. *Basic Biotechnal .Biochem.*64 (4), p :816-827.
- Cook J and Fur A .** (1953). Relation beeteene the nature and amount of the sugars and texture cultivated in USA. *Processing American Society Horticultated Sciences .* 61, p: 286-292.
- Cordeiro C. A., Leal M . L and Luciano A. B.** (2002) Production and proprieties of  $\alpha$ -amylase from thermophilic *Bacillus sp.* *Braz. J. Microbiol.* 33 (1), São Paulo .
- Coutinho P. M and Henrissat B.** (1999). Recent Advances in Carbohydrate Engineering, edited by H.J. Gilbert, G. J.
- Davies G. J., Brzozowski A ., Dauter Z ., Rasmussen M. D., Borchet T. V and Wilson K. S.** (2005). Structure of a *Bacillus halmopalus* family 13  $\alpha$ -amylase, BHA, in complex with an acarbose-derived nonasaccharide at 2.1 Å resolution. *Biological cristography.*61, p:190-193.
- Davies G.J and Henrissat H .** (1995). Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. *Structure*, 3, p: 853–859.
- Davies G.J., Wilson K.S and Henrissat B.** (1997). Nomenclature for sugar-binding subsites in glycosyl hydrolases. *Biochem. J.* 321, p : 557–559.
- De mot R and Verachttert H .** (1985).Purification and Characterization of Extracellular Amyolytic Enzymes from the Yeast *Filobasidium capsuligenum*. *Applied and Environmental Microbiology* .p : 1474-1482.
- De Souza C. E and Martins M . L .** (2000).. Culture conditions for the production of thermostable amylase by *Bacillus sp* . *Martins Brazilian Journal of Microbiology* C.E. de S. Teodoro and M.L.L. 31, p:298-302
- Dill K A .** (1990). Dominant forces in protein folding. *Biochemistry* 29, p:7133-7155.
- Djouilde D. R .** (2004). Mise au point d'un ferment mixte destiné à la bioconversion des tubercules de manioc cyanogènes. Thèse de doctorat . L'école nationale supérieure des sciences agro-industrielles (ENSAI) de l'université de Ngaoundéré , Cameroun.
- Dong G. C., Vieille A., Savchenko and Zeikus J. G.** (1997). Cloning, sequencing, and expression of the gene encoding extracellular  $\alpha$ -amylase from *Pyrococcus furiosus* and biochemical characterization of the recombinant enzyme. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, p:3569-3576.
- Dubois M ., Gills K . A., Hamilton J.K ., Rebers P. S and Smith F.** (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 28, p : 350-356.

**Dunlap C.E.** (1975). Production of Single-Cell Protein from Insoluble Agricultural Wastes by Mesophiles, in Tannenbaum S.R and Wang D.I.C. eds., Single-Cell Protein II (MIT Press, Cambridge, Mass., USA, and London). p :244-262.

**Eksteen J.M., Steyn A.J., van Rensburg P., Cordero R. R and Pretorius I .S.** (2003). Cloning and characterization of a second alpha-amylase gene (LKA2) from *Lipomyces kononenkoae* IGC4052B and its expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *InterScience* .1, p:69-78.

**Fabiana G. M., Lenartovicz V., Cristina G.M., Edivan P and Rosane M . P.** (2001). The use of  $\alpha$ -methyl-D-glucoside , a synthetic analogue of maltose , as inducer of amylase by *Aspergillus sp* in Solid –state and submerged fermentations. *Brazilian Journal of Microbiology* .32, p :15-19

**Fischer E .H and Stein E .A .**(1960).  $\alpha$ -Amylases, in Boyer, P.D., Lardy, H. and Myrback, K. (Eds.), *The Enzymes*, 2nd edn., Academic Press, New York. 4,p:313-343.

**Flores M .E ., Ponce E ., Rubio M and Huitron C.** (1993). Glucose and glycerol repression of alpha -amylase in *Streptomyces kanamyceticus* and isolation of deregulated mutants. *Biotechnology Letters*.15, p:595-600.

**Gancedo C and Serrano R .** (1989). Energy- Yielding Metabolism. *In:* Rose A.H., Harrison J.S. (eds), *The yeasts, Metabolism and Physiology of Yeasts* . 2<sup>nd</sup> edition Academic Press. Londres. 3, p: 205 -251.

**Geneix C.**(1984). Recherche sur la stimulation et l'inhibition de la fermentation alcoolique du mout de raisin. Thèse Bordeaux II.

**Golubev W .I ., Manukyan A .R and Lazarev P.I .** (1984). *Zhurnal Obshchei Biologii* (Journal of General Biology, in Russian).45, p: 507.

**Graham T.** (1996). Acid  $\alpha$ -amylase biochemistry. 2 Ed., Rathews & Van Holde.132

**Guiraud J. P.**(1998). Microbiologie alimentaire. Dunod,Paris. p : 310-321

**Hagler A .N and Mendonca H . L.**(1981). *Applied and environmental Microbiology* .41, p:173.

**Hammer E ., Krowas D., Schafer A ., Specht M ., Franche W., and Schauer F.** (1998). Isolation and Characterization of a Dibenzofuran-Degrading Yeast: Identification of Oxidation and Ring Cleavage Products. *Appl Environ Microbiol*.64, p :2215-2219.

**Harrigan W.F and Mc Cance M.E.** (1976). Laboratory methods in food and dairy microbiology. *Sci. Food Agric* London. Academic Press. 32, p: 1145-1150.

**Hawang K.Y., Chang C., Lee J., Lee S.Y., Kim K.K ., Choe S., Sweet R .M and Such S.W.** (1997). Crystal structure of thermostable  $\alpha$ -amylase from *Bacillus licheniformis* refined at 1.7 Å resolution .*Mol. Cells*.7, p:251-258.

- Henrissat B.** (1991) . A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem J.*3, p: 280-309
- Heslot H .** (1996). L'ingenierie des proteines et ses applications . Lavoisier Tec et Doc.p: 424-432.
- Ibukun E .O., Akindumila F.** (1998). Extracellular amylase production by isolates of *Bacilli* micro-organism cultured on different starchy food broths. *Nig. J. Biochem. Mol. Biol.* 13, p: 91-95.
- Igarshi K ., Hatada Y., Hagihara H ., Saeki K ., TakaiwaM ., UlmuraT ., Ara K., Ozaki K., Kawai S., Kobayashi T and Ito S.** (1998). Enzymatic properties of novel liquefying  $\alpha$ -amylase from an alkalophilic *Bacillus* isolated and entire nucleotides and aminoacids sequences . *Appl. Environ. Microbiol.*, 64 (9), p : 3282 -3289.
- Imrie F.K and A.J. Vlitos.** (1975) .Production of Fungal Protein from Carob (*Ceratonia siliqua* L.),*In*: S.R. Tannenbaum and D.I.C. Wang, eds., Single-Cell Protein II .MIT Press. p: 223-243.
- Iwalokun B.A., Akinside K .I and Adeola S.A.** (2001). Extracellular protease and amylase secretion by four strains of *Bacillus cereus* isolated from fermented melon seeds (*Citrullus vulgaris*). *Nig. J. Biochem. Mol. Biol.* 16, p :113-118.
- Janecek S.** (1994). Sequence similarities and evolutionary relationships of microbial,plant and animal  $\alpha$ -amylases. *Eur. J. Biochem.* 224, p: 519–524.
- Janecek S. .** (1997).  $\alpha$ -Amylase family: Molecular biology and evolution. *Prog. Biophys.Mol. Biol.* 67,p: 67–97.
- Kacem-Chaouche N.** (2005). Production de catalase extacellulaire par un mutant d'*Aspergillus phoenicis* sur un milieu à base de farine de dattes déclassées. Thèse de Doctorat. Faculté des Sciences, Université Mentouri de Constantine.
- Kanazawa M.** (1975) . The Production of Yeast from n Paraffins *In/* S.R. Tannenbaum and D.I.C. Wang, eds., Single-Cell Protein II .M IT Press. p :438-453.
- Kandra L ., Gyemant G., Farakas E and Liptak A.** (1997). Action pattern of porcine pancreatic  $\alpha$ -amylase on three different series of beta –maltooligosaccharide glycoside. *Carbohydr.Res.*, 289 (3), p: 237-242.
- Kang H.K ., Lee J.H., Kim D., Day D.F., Robyt J.F., Park K .H and Moon T.W.** (2004). Cloning and expression of *Lipomyces starkeyi* alpha-amylase in *Escherichia coli* and determination of some of its properties. *FEMS Microbiol Lett.* 233 (1), p:53-64.
- Kekos D and Macris B .J.** (1983). *Appl. Environ. Microbiol.* 45, p: 935-941.

- Kelly C. T., Moriarty M .E and Fogarty W.M.** (1985). Thermostable extracellular  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase of *Lipomyces starkeyi*. Applied Microbiology and Biotechnology Publisher: Springer-Verlag GmbH. 22 (5), p : 352 – 358.
- Khoo S.L ., Amirul A .A., Kamaruzaman M., Nazalan N and Azizan M .N.** (1994). Purification and characterization of alpha-amylase from *Aspergillus flavus*. Folia Microbiol(Praha) .39(5), p :392-8.
- Kichakova N. A.**(1991).The effect of the carbon sources and calcium ions on the activity of thermostable alpha-amylase in *Bacillus* sp. Mikrobiol.Zh. 53 (1), p :44-8.
- Kindle K . L .** (1983). Appl .Biochem . Biotechnol . 8, p : 153 -170.
- Kocher G.S, Katyal P** (2003). Use of potato starch for extracellular amylase production by a yeast isolate. Department of microbiology, Punjab agricultural university, Ludhana 141004, India.
- Kraulis P. J.** (1991). *J. Appl. Cryst.* 24, p : 946-950.
- Kreger-Van Rij N. J.**(1984).The Yeast, a Taxonomic Study, Elsevier Biomedical. Press, Amsterdam.
- Kwon-Chung K . J and Bennett J.E.** (1992). *Medical Mycology*. Lea & Febiger, Philadelphia.Press, Amsterdam.
- Larpent G .M and Sanglier J. J.** (1992). Biotechnologies. Principes et méthodes. P : 574-581.
- Lecoq R .** (1965). Manuel d'analyses alimentaires et d' expertises usuelles. Tome I. Editions Doin. Deren et Cie. p : 569.
- Lefuji H., Chino M., Kato M and Imura Y.** (1996). Raw-starch-digesting and thermostable  $\alpha$ -amylase from the yeast *Cryptococcus* sp. S-2 : purification, characterization, cloning and sequencing . Biochem. J. 318, p: 989-996 .
- Leveau J.Y and Bouix M .** (1979). Etude des conditions extrêmes de croissance des levures osmophiles. *Ind. Alim. Agric.*,11, p : 1147-1151.
- Leveau J.Y and Bouix M .** (1999). Les moisissures. *In*:Florent J . (Ed.). Microbiologie industrielle. Les microorganismes d'intérêt industriel. Ed .Lavoisier. p: 112-168.
- Levitzki A and Steer M .L .** (1974) . The allosteric activation of mammalian a-amylase by chloride. *Eur J Biochem* 41, p:171-180.
- Lin L . L ., Hsu W. H and Chu W. S .** (1997). A gene encoding for an  $\alpha$ -amylase from thermophilic *Bacillus* sp. strain TS-23 and its expression in *Escherichia coli*. J Appl Microbiol.82, p:325–334.

- Lodder J.**( 1971). The yeasts, a taxonomic study, 2ème edition. North Holland, Amsterdam, Londres. p :1385 .
- Long C. M., Virolle M . J., Chang S and Bibb M. J.** (1987).  $\alpha$ -Amylase gene of *Streptomyces limosus*: nucleotide sequence, expression motifs, and amino acid sequence homology to mammalian and invertebrate  $\alpha$ -amylases. *J Bacteriol.*169, p :5745–5754.
- Lourens K and Reid G.** (2002). Yeast nutrient management in winemaking. The Australian & New Zealand Grapegrower & Winemaker. Annual Technical Issue. p: 50 - 54.
- Lowry O. H., Rosebroughi N. J., Farr A.L and Randall R. J.** (1951) . Protein measurement with the folin phenol reagent . *J. Biol. Chem.* 193 (1), p: 265-275.
- Lund, A .** (1954).Studies on the Ecology of Yeasts .Munksgaard , Copenhagen.
- Manners D.J.** (1962) . Enzymic synthesis and degradation of starch and glycogen. *Adv. Carbohydr. Chem.* 17, p: 371-430.
- Mantsala P and Zalkin H .** (1979). *J . Biol . Chem.* 254, p: 8540 -8547.
- Marco J L ., Bataus L . A ., Valancia F. F., Ulhoa C. J., Astolfi F.S and Felix C .R.** (1996). Purification and characterization of a truncated *Bacillus subtilis*  $\alpha$ -amylase produced by *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol.*44, p:746–752.
- Mastuura Y.M., HaradaW and Kakudo .M .** (1984). Structure and possible catalytic residues of Taka-amylase A. *J Biochem .Tokyo.*95, p :697–702.
- Matsumura M .G., and Matthews B. W.** (1989). Substantial increase of protein stability by multiple disulphide bonds. *Nature.* 342, p:291-293.
- McCarter J.D and Withers S.G.** (1996). Unequivocal identification of Asp-214 as the catalytic nucleophile of *Saccharomyces cerevisiae*  $\alpha$ -glucosidase using 5-fluoro glycosyl fluorides. *J. Biol. Chem.* 271, p: 6889–6894.
- McCarter J.D and Withers S.G.** (1994) .Mechanisms of enzymatic glycoside hydrolysis. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 4, p: 885–892.
- Mcmahon E .M., Kelly C.T. and Fogarty W.M.** (1999). High maltose producing amylolytic system of a *Streptomyces* species. *Biotechnology Letters.* 21, p: 23-26.
- Moranelli F., Yaguchi M ., Calleja G. B and Nasim A.** (1987). Purification and characterization of the extracellular alpha-amylase activity of the yeast *Schwanniomyces alluvius*. *Biochem Cell Biol.* 65(10),p: 899-908.
- Moreira F .G ., Veridiana L and Peralta R .M .** (2004). A thermostable maltose-tolerant  $\alpha$ -amylase from *Aspergillus tamarii*. *Journal of Basic Microbiology .* 44 ( 1 ) , P: 29 – 35.

- Morkeberg R .M., and Nielsen J .** (1995). Induction and repression of alpha-amylase production in batch and continuous cultures of *Aspergillus oryzae*. *Microbiology*. 141: 2449-2454.
- Moulin G and Glazy P.** (1978). *Z. Allg. Mikrobiol.* 18, p : 269- 274.
- Nakad A .T., SAKAI S and Tsujisaka Y.** (1990). Purification and characterization of two forms of maltotetraose-forming amylase from *Pseudomonas stutzeri*. *Agric Biol Chem.*54, p:737-743.
- Nakatani H.,** (1996). Ronte carlo stimulation of multiple attack mechanism of  $\alpha$ -amylase. *Biopolymers.*39 (5), p:665-669.
- Nielsen J.E ., Borchert T. V and Vriend .G.** (2001). The determinants of  $\alpha$ -amylase pH-activity profiles . *Protein Engineering*, Oxford University Press. 14 (7), p:505-512.
- Nielsen J. E and Borchet T. V.** (2000). *Biochim. Biophys. Acta.* 1543, p: 253-274.
- Nishio N and Nagai S .** (1981). Single cell protein production from man darin orange peel. *European J. Appl. Microbiol. Biothechnol.* 11, p:156.160
- Ostergaard S., Olsson L and Nielsen J.** (2000)..Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. *MicrobiolMolBiolRev.* 64(1), : 34-50.
- Palmer T. A.** (1975). Glucose syrups in food and drink. *Process Biochemistry*
- Panchal C. J.** (1990). Yeast strain selection . Marcel Dekker (ed.) USA. p :189.
- Pasari A.B., Korus R.A., Williams R.A and Heimsch R. C.** (1987).Catabolic repression of amylase synthesis in yeast. *Biotechnol. Bioeng.* 30, p:363-367.
- Pazur J . H and Marchetti N.T.** (1992). Action patterns of amylolytic enzymes as determined by the [1-14 C]malto-oli\_gosaccharides mapping method. *Carbohydr. Res.* 227, p :215-225.
- Pedersen H and Nielsen J.** (2000). The influence of the nitrogen source on the  $\alpha$ -amylase productivity of *Aspergillus oryzae* in contiuous cultures . *Appl Microbiol. Biothechnol.* 53, p: 278-281.
- Phaff H .J and Starmer W.T.** (1987). *Yeasts Associated with Plants, Insects and Soil In:* Rose A.H., Harrison J.S. (eds), *The yeasts, V1, Biology of yeast.* 2<sup>nd</sup> edition Academic Press. Londres. p :123-174.
- Phaff H.J., Miller M.W. and Mrak E .M .**(1978). *The Life of Yeasts.* Harvard University Press, Cambridge, Massachsetts.
- Prieto J. A., Bort B.R ., Martinez J., Randez G .F., Buesa C and Sanz P.**(1995). Purification and characterization of a new alpha-amylase of intermediate thermal stability from

the yeast *Lipomyces kononenkoae*. *Biochem Cell Biol.*73 (1-2), p :41-9.

**Ramachandran S., Patel A. K., Nampoothiri K. M., Chandran S., Szakacs G., Soccol C. R and Pandey A.** (2004) . Alpha amylase from a fungal culture grown on oil cakes and its properties. *Braz. arch. biol. technol.* 47 (2) .

**Ray R.R., Jana S.C and Nanda G.** (1996) Induction and catabolite repression in the biosynthesis of  $\alpha$ -amylase by *Bacillus megaterium* B6. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 38, p : 223-230.

**Riviere J.** (1975). Les applications industrielles de la microbiologie. Collection Sciences agronomiques. Masson et Cie (ed.),p : 31-195.

**Sa-Correia et Van Uden N .** (1981). Production of biomass and amylase by the yeast *lipomyces kononenkoae* in starch limited continuous culture. *European J. Microbio. Biothechnol.*13, p: 24-28.

**Sadhukhan R.K., Roy S.K., Rah S.K., Manna S and Chakrabarty S.L .** (1992). Induction and regulation of  $\alpha$ -amylase synthesis in a cellulolytic thermophilic fungus *Myceliophthora thermophila* D14 (ATCC 48104). *Ind. J. Exp. Biol.* 30, p: 482-486.

**Schwimmer S and Balls A.K.** (1949) .Isolation and properties of crystalline  $\alpha$ -amylase from germinated barley. *J. Biol. Chem.* 179, p :1063-1074.

**Schomburg D and Salzmann M .** (1991). Enzyme Hand book 4. Classe3:Hydrolases. Springer –Verlag (ed.). Berlin Heidelberg .Germany. p : 1- 12.

**Scriban R.** (1999). Biotechnologie. 5ème édition. Techniques et Documentation – Lavoisier (éd.),p : 401-409

**Sicard P.** (1982). Applications industrielles des enzymes . *In* : Les enzymes production et utilisations industrielles . Durand G., Monson P. Editions Gauthier – Villars, Paris.p:121-164.

**Sinnot M.L .** (1990). Catalytic mechanisms of enzymic glycosyl transfer. *Chem. Rev.*, 90,p :1171–1202.

**Sloof W. C.** (1970). *In*: The Yeasts, a Taxonomic Study. (J .Lodder, ed.), North- Holland Publishing Company, Amsterdam.p: 379-402.

**Sogaard M., Olsen F. L and Svensson B.** (1991). C-terminal processing of barley  $\alpha$ -amylase in malt, aleurone protoplasts, and yeast. *Proc Natl Acad Sci USA* .88, p:8140–8144.

**Steer M and Levitzki A.** (1973). The metal specificity of mammalian  $\alpha$ -amylases as revealed by enzyme activity and structural probes. *FEES Leu* 31, p:89-92.

**Stefanova M and Emanulilova E .** (1992). Caraceterization of a thermostable  $\alpha$ -amylase from *Bacillus brevis* .*Eu.J. Biochem.* 207(1), p : 345-349.



- Tamaki N and Hama T .** (1982). In “Methods in enzymology” (W. A. Wood, ed.), Academic Press, London. 89, p: 285-306.
- Tatsinkou F. B., Taveai F and Ndjouenkeui R. .**(2005). Production and partial characterization of a thermostable amylase from ascomycetes yeast strain isolated from starchy soils. *African Journal of Biotechnology* .4 (1), p:14-18.
- Toralballa G and Eitingon M .** (1967). Action of Urea and Certain Other Amide Reagents on Crystalline Porcine Pancreatic Amylase, *Arch Biochem Biophys*. p :119- 519.
- Uitdehaag J.C., Mosi R., Kalk K.H., van der Veen B.A., Dijkhuizen L ., Withers S.G and Dijkstra B.W. .** (1999) X-ray structures along the reaction pathway of cyclodextrin glycosyltransferase elucidate catalysis in the  $\alpha$ -amylase family. *Nature Struct. Biol.* 6, p: 432–436.
- Ul-haq I ., Roheena A., Ashraf H and Shah A .H .** (2002). Isolation and Screening of Fungi for the Biosynthesis of Alpha Amylase. *Biotechnology*. 1 (2-4), p: 61-66.
- Vallee B . L ., Stein E . A ., Summer W.N and Fisher E .H. .** (1959). Metal content of  $\alpha$ -amylases of various origins. *J Biol Chem*. 234, p:2901-2929.
- Vallier P., Bata J and Colabert L .** (1977). Optimal conditions of alpha- amylase production by *Aspergillus oryzae* in liquid media . *Ann. Microbial. (Paris)*.128 (3), p: 359-371.
- Van Uden N and Fell J.W.** (1968). *Advances in Microbiology of the Sea*. Academic Press, New York. 1, p: 167-201.
- Van der walt J.P.**(1970). In *The yeasts, a Taxonomic Study .* (J. Lodder, ed.). North-Holland Publishing Co., Amsterdam and London. p : 555-718.
- Van der walt J.P and Yarrow D.**(1984). In *The yeasts, a Taxonomic Study* (N.J.W. Kreger-Van Rij, ed.), Elsevier Biochemical Press, Amsterdam. p :45-104.
- Vieille C and Zeikus J.G.** (2001). Hyperthermophilic Enzymes: Sources, Uses, and Molecular Mechanisms for Thermostability .*Microbiology and Molecular Biology Reviews* . 65(1), p:1-43.
- Vihinen M., Peltonen T., Iitia A., Suominen I and Mantsala P.** (1994) C-terminal truncations of a thermostable *Bacillus stearothermophilus*  $\alpha$ -amylase. *Protein Eng.*7, p:1255–1259.
- Vishniac H.S and Hempfling W.P.**(1979). *Journal of General Microbiology* .p: 112:301.
- Walker G.M ., Wiley J and Chihhster S.**(1997). *Yeast Physiology and Biotechnology*.
- Walker G.** (2000). The role of metal ions in optimising yeast fermentation performance. In: *Nutritional aspects II. Synergy between yeasts and bacteria*. Lallemand Technical Meeting . p: 27-30 .

- Wanderley K.J., Torres F.A and Moraes L . M.** (2004). Characterization of alpha-amylase from the yeast *Cryptococcus flavus*. FEMS Microbiol Lett. 231(2), p :165-9.
- Wickerham L .J.**(1951).Taxonomy of yeasts. Technical Bulletin No. 1029,United States. Department of Agriculture, Washington, D.C.
- Wickerham L .J., Burton K .A .**(1948).Journal of Bacteriology . 56, p:363.
- Yamane K., Hirata Y., Furusato T., Yamazaki H and Nakayama A .** (1984). Changes in the properties and molecular weights of *Bacillus subtilis* M-type and N-type  $\alpha$ -amylases resulting from a spontaneous deletion. J Biochem (Tokyo). 96, p:1849–1858.
- Yañez E ., Ballester N., Fernandez V and Mönckeberg F.** (1972).Chemical Composition of *C utilis* and the Biological Quality of the Yeast Protein, J. Sci. Food Agric. 23, p: 581-586.
- Yu S. M., Kuo Y. H., Shen G., ShenY .J and Liu L .F.,** (1991).Metabolic repression of  $\alpha$ -amylase gene expression in suspension cultured cells of rice.*J.Biol.Chem* .266 (31), p:21131-21137.

## Annexe 1

### ▼ Milieux de culture

#### § Fowell

Agar.....	20 g
Acétate de sodium trihydraté.....	5 g
Eau distillée.....	1000 ml

#### § Gordkowa

Glucose.....	1 g
Peptone.....	10 g
Nacl.....	5 g
Agar.....	25 g
Eau distillée.....	1000ml

#### § Malt Agar (MA)

Extrait de malt .....	30 g
Peptone.....	5 g
Glucose.....	15 g
Agar.....	15g
Eau distillée.....	1000 ml

#### § Mac Clary

Glucose.....	1 g
Kcl.....	1.8 g
Extrait de levure.....	2.5 g
Acétate de sodium .....	8.2 g
Agar.....	15 g
Eau distillée.....	1000 ml

#### § Malt Extract (ME)

Extrait de malt .....	30 g
Peptone.....	5 g
Glucose.....	15 g
Eau distillée.....	1000 ml

#### § Potao Dexros Agar (PDA)

Extrait de pomme de terre	
Glucose.....	20 g
Agar.....	20 g
Eau distillée.....	1000 ml

§ Sabourraud

Glucose.....	20 g
Peptone.....	10 g
Agar.....	15 g
Eau distillée.....	1000 ml

§ Solution peptonée

Peptone.....	5 g
Eau distillée.....	1000 ml

§ Yeast Glucose (YG)

Glucose.....	20 g
Extrait de levure.....	3 g
Eau distillée.....	1000 ml

§ Yeast Malt (YM)

Glucose.....	10 g
Peptone.....	5 g
Extrait de malt.....	3 g
Extrait de levure.....	3g
Eau distillée.....	1000 ml

Remarque : Ces milieux sont ajustés à un pH de 5.

## Annexe 2

### ▼ Détermination de la matière sèche

Le tau de matière sèche exprimé en %, est donné par la formule suivante :

$$\% = \frac{p3-p1}{p2-p1} \times 100$$

p1 : poids du creuset vide.

p2 : poids du creuset + la prise d'essai.

P3 : poids du creuset vide+ matière sèche.

## Annexe 3

### ▼ Dosage des sucres totaux

#### Protocole expérimental

A 1 ml d'échantillon, est ajouté 1 ml de phénol à 5% et 5 ml d'acide sulfurique concentré.

Laisser reposer pendant 10 min à température ambiante, puis incuber à 30°C pendant 20 min.

L'apparition du complexe jaune orange est suivie en mesurant la densité optique à 488 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV / Visible (Lambda EZ 150), par rapport à une gamme d'étalonnage établie avec une solution mère de 100µg/ml de glucose.

#### Réactifs

Phénol à 5% dans l'eau distillée.

Acide sulfurique concentré, d= 1.84

#### Protocole

1ml d'échantillon est ajouté à 1 ml de phénol et à 5 ml d'acide sulfurique . Laisser reposer 10 minutes à température ambiante , puis chauffer à 30°C pendant 20 minutes . La coloration jaune orangé est mesurée à 488 nm par rapport à une gamme d'étalon de 100µg/ml maximum en glucose (Annexe 6).

## Annexe 4

### ▼ Dosage de la matière azotée totale

- Réactifs :
- Acide sulfurique concentré (d =1.84)
  - Acide sulfurique 0.1 N
  - Soude 0.1N
  - Lessive de soude, à 33%
  - Sélénium en poudre pur (catalyseur)
  - Indicateur rouge de méthyle
  - Papier pH ou papier tournesol
  - Billes en verre ou pierre ponce

- Matériels :
- Balance de précision
  - Matras kjeldahl de 500ml
  - Appareil à distiller
  - Réchaud à gaz ou électrique
  - Burette de 250 ml
  - Erlen- meyer de 300 ml

### Protocole :

#### ***Première étape : minéralisation sulfurique***

Introduire dans un matras Kjeldahl de 500 ml :

- 1 g d'échantillon
- 2 g de catalyseur (bien mettre en suspension l'échantillon au sein du catalyseur)
- 20 ml d'acide sulfurique concentré

Porter ensuite le matras sur une rampe chauffante, permettant l'aspiration des vapeurs sulfuriques. Prolonger le chauffage une demi- heure après décoloration complète, c'est à dire après que la solution soit devenue limpide. Laisser refroidir.

**Seconde étape : déplacement et distillation de l'ammoniaque :**

Verser dans le matras de Kjeldahl contenant le sulfate d'ammonium :

- 160 ml d'eau distillée
- 80 ml de lessive de soude à 33%

Ajouter quelques graines de pierre ponce pour régulariser l'ébullition. Pour le déplacement de l'ammoniaque, il faut ajouter la lessive de soude délicatement, une fois que l'appareil à distiller est prêt à fonctionner : Réfrigération assurée et extrémité de l'appareil plongeant dans un erlen-meyer contenant 20 ml d'acide sulfurique 0.1N( l'extrémité de l'appareil doit être en contact avec le liquide). Vérifier la fin de la distillation en recevant quelques gouttes de distillat, soit sur un papier tournesol rouge, soit sur du papier.

**Troisième étape :**

L'ammoniaque distillée, est reçu dans l'erlen-meyer contenant l'acide sulfurique en excès (20 ml). On ajoute dans l'erlen- meyer quelques gouttes de rouge de méthyle et on titre par la soude 0.1N l'acide sulfurique restant (proportion qui n'a pas réagi avec l'ammoniaque). Doser goutte à goutte avec la soude contenue dans la burette, jusqu'au virage jaune pale persistant.

Calculs : Le pourcentage d'azote est déterminé selon la formule suivante :

$$N = \frac{0.0014 \times V \times 100}{p}$$

V : volume initial de l'acide sulfurique – volume de l'acide sulfurique restant qui n'a pas réagit avec l'ammoniaque

P : poids de l'échantillon

Le pourcentage d'azote par rapport à l'échantillon sec sera donc :

$$N = \frac{0.0014 \times V \times 100}{p} \times \frac{100}{(100 - H)}$$

H : l'humidité de l'échantillon.

Et pour obtenir une valeur appropriée du taux de protéines, il faut multiplier le taux d'azote par un coefficient déterminé expérimentalement, qui est égal à 6.25 dans notre échantillon.

## Annexe 5

### ▼ Dosage de la matière grasse totale

#### Réactifs :

- Acide chlorhydrique 1N
- Solution aqueuse de ferrocyanure de potassium à 10%
- Solution aqueuse d'acétate de zinc à 20%
- Sable purifié pour analyse
- Ether de pétrole
- Papier filtre

#### Matériels :

- Balance de précision
- Appareil de soxhlet
- Rotavapeur
- Réfrigérant
- Dessiccateur
- Ballon rode de 250ml

#### Protocole :

Peser 5 g de l'échantillon, ajouter 50 ml d'acide chlorhydrique et faire bouillir pendant 5 minutes. Laisser reposer. Si le liquide n'est pas clair, ajouter 1 ml de solution d'acétate de zinc à 20% et 1 ml de solution de ferrocyanure de potassium à 10%. Filtrer sur un filtre mouillé, contenant 5 g de sable purifié, puis sécher à l'étuve à 105°C. Extraire le papier filtre séché et résidu avec de l'éther de pétrole pendant 2 heures dans un soxhlet, dont le ballon aura été taré. Broyer le résidu et extraire de nouveau pendant 1 heure. Chasser par distillation sous vide sur un rotavapeur la totalité du solvant contenu dans le ballon, en condensant les vapeurs de solvant à l'aide d'un réfrigérant descendant . Sécher ensuite à l'étuve à 105°C jusqu'à poids constant.



### Calculs :

Le poids des matières grasses totales est déterminé selon la formule suivante :

$$P = P_1 - P_2$$

P : poids de la matière grasse contenue dans l'échantillon.

P<sub>1</sub> : poids du ballon avant extraction

P<sub>2</sub> : poids du ballon après extraction

Le taux de la matière grasse par rapport au produit sec sera donc :

$$\frac{P \times 100}{(100 - H)}$$

(100 - H)

H : humidité du produit

## Annexe 6

### ✓ Dosage des protéines

#### Réactifs

Solution A : Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 2% dans NaOH 0.1N.

Solution B : CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O 1% .

Solution C : Tartrate double de Na et de K à 2% .

Solution M : Préparée avec :

20 ml de Solution A

1 ml de Solution B

1 ml de Solution C

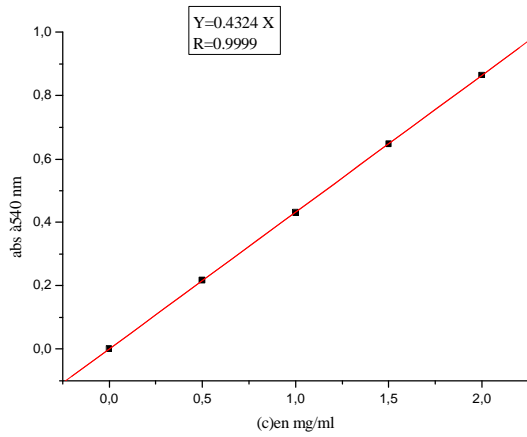
Solution E : Réactif de Folin -ciocalteu dilué au 1/10ème

#### Protocole

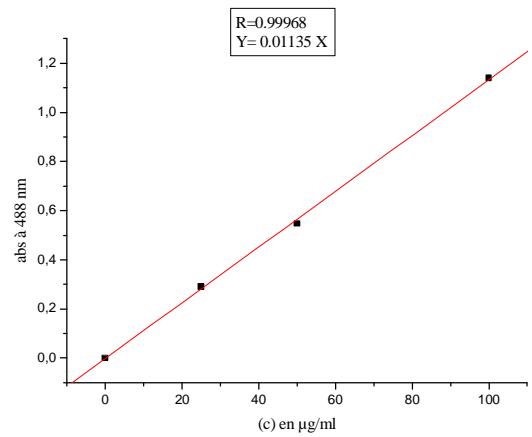
Ajouter à 1 ml d'échantillon, 1ml de solution M. Homogénéiser et laisser reposer 15 minutes à température ambiante . Verser alors 3 ml de solution E et agiter immédiatement . Laisser la réaction colorée se développer 45 minutes à température ambiante et à l'obscurité et mesurer la densité optique à 750nm . La gamme est établie à partir d'une solution standard de sérum albumine bovine dont les concentrations varient de 0-500µg /ml ( annexe 7).

## Annexe 7

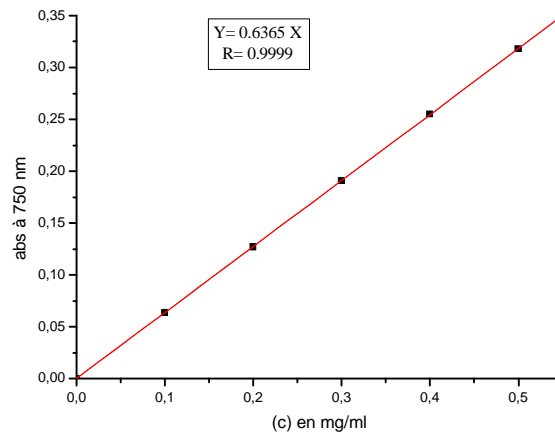
### ▼ Les courbes d'étalonnage



Courbe étalon du maltose



Courbe étalon du glucose



Courbe étalon des protéines

### Annexe 8

- ▼ Analyse de la variance pour l'effet du pH sur l'activité de l' $\alpha$ -amylase partiellement purifiée (P<0.05)

Source de variation	d.d.l	S. C	S.C.M	F
pH	12	43146683.41	3595556.95	290.68
Variation résiduelle	13	160802	12369.38	
Variation totale	25	43307485.41	1732299.41	

### Annexe 9

- ▼ Analyse de la variance pour l'effet de la température sur l'activité de l' $\alpha$ -amylase partiellement purifiée (P<0.05)

Source de variation	d.d.l	S. C	S.C.M	F
Température	13	3900119.456	300009.188	15.00
Variation résiduelle	14	280000	20000	
Variation totale	27	4180119.456	154819.24	

### **Abstract**

The isolation of yeasts realized on saharian soil from Biskra , allowed to index **5 strains** . They were tested on PDA medium with 1% of starch . On 5 strains , one (**S5**), presented a high amyolytic activity compared to the others . The microscopic, physiological and biochemical studies of this strain , allowed to identify its kind : *Lipomyces*.

In addition, culture medium , based on flour date rejects, was used at **1.5%** for the production of  $\alpha$ -amylase with fermentation of selected yeast *Lipomyces sp*. The ammonium sulphate (**at 0.2%**) and yeast extract (**at 0.5%**) were added respectively as source of nitrogen and growth factors, with starch at **1%** as inductive substrate, in order to constitute a favourable medium to yeast development and production of  $\alpha$ -amylase. The kinetic study for production of  $\alpha$ -amylase realized on this medium, revealed that the production reached its maximum (**6582 U** ) at **78 hour** of fermentation. Partial purification of enzyme by ammonium sulphate, gave a maximum yield in enzyme (**77.3%**) for the fraction **50%** . The  $\alpha$ -amylase partially purified, has an optimal **pH** of **6** and an optimal **temperature** of **55°C**. The study of the thermostability of  $\alpha$ -amylase of *Lipomyces sp*, revealed that enzyme is thermostable. The half-life of the enzyme at 80°C, is of **150 min** and at 90°C, it is of **130 min** .

**Key words** : Isolation – Saharian soil – Amyolytic yeast – Characterization -  $\alpha$ -amylase - Date rejects -Thermostability.

*Nom: Merabti*  
*Prénom : Ryma*

***Thème: Isolement et caractérisation de souches levuriennes amylolytiques à partir de sol saharien algérien***

**Résumé:**

L'isolement des levures à partir d'échantillon de sol saharien de Biskra, a permis de répertorier **5 souches**. Ces dernières, sont sélectionnées sur un milieu PDA à 1% d'amidon . La souche **S5** possède une activité amylolytique élevée par rapport aux autres . L'étude des caractéristiques microscopique, physiologique et biochimique, révèle que cette souche appartient au genre : *Lipomyces sp.* Par ailleurs, la concentration de **1.5%** de farine de déchets de dattes , semble être adéquate, pour une production optimale de l' $\alpha$ -amylase par *Lipomyces sp.* Le milieu est supplémenté par le sulfate d'ammonium ( **0.2%** ), par l'extrait de levure (**0.5%**) et par l'amidon à **1%** (substrat inducteur). L'étude cinétique de la production de l'  $\alpha$ -amylase sur ce milieu, montre une production maximale de **6582 U**, après **78 heures** de fermentation. La purification partielle de l'  $\alpha$ -amylase par le sulfate d'ammonium (**50%**), a donné un rendement optimal en enzyme de **77.3 %**. L' $\alpha$ -amylase partiellement purifiée, a un **pH** optimum de **6** et une température optimale de **55°C**. L' étude de la thermostabilité de l'  $\alpha$ -amylase de *Lipomyces sp.*, révèle qu'elle est thermostable, où nous avons enregistré des demi-vies de **150 min** et **130 min** à 80°C et à 90°C respectivement.

**Mots clés :**

Isolement – Sol saharien - Levures amylolytiques – Caractérisation -  $\alpha$ -amylase – Déchets de dattes - Thermostabilité.

***Laboratoire de Génie Microbiologique et Applications***  
***Département des Sciences de la Nature et de la Vie***

**Membres du jury**

<b>Mr BOULAHROUF A.</b>	Prof., Université Mentouri – Constantine	<b>Président</b>
<b>Mme MERAIHI Z .</b>	Prof., Université Mentouri – Constantine	<b>Rapporteur</b>
<b>Mme MECHAKRA A.</b>	M.C., Université Mentouri – Constantine	<b>Examineur</b>
<b>Mr BENHIZIA Y.</b>	M.C., Université Mentouri – Constantine	<b>Examineur</b>