

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



UNIVERSITE DJILLALI LIABES DE SIDI BEL ABBES
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE



LABORATOIRE DE MICROBIOLOGIE MOLECULAIRE PROTEOMICS ET SANTE

THESE Présentée par
M^{me} TOUMI Salima
EN VUE DE L'OBTENTION
DU DIPLOME DE DOCTORAT 3^{ème} CYCLE EN SCIENCES

Spécialité : Sciences Biologiques

Option : Microbiologie Moléculaire et Protéomique

Thème

**Isolement et caractérisation des souches levuriennes
productrices d'amylase à partir de sol saharien Algérien
et cultivée sur un milieu à base de lactosérum**

Soutenu le : Devant le Jury composé de :

Président :

Mr. BENALI Mohamed (Professeur, Université de Sidi Bel Abbès).

Examineurs :

Mr. BELABID Lakhdar (Professeur, Université de Mascara).

Mr. MEDDAH Boumediene (Professeur, Université de Mascara).

M^{lle} KANOUN Khedoudja (MCA, Université de Sidi Bel Abbès).

Directeur de thèse :

Mr. ABBOUNI Bouziane (Professeur, Université de Sidi Bel Abbès).

Année universitaire 2017/2018

Remerciement

« Il est bon qu'une personne aime son travail et le plus beau qu'elle le respecte».

Je tiens à remercier en premier lieu ALLAH, le tout Puissant de m'avoir donné courage, santé et patience pour achever ce travail.

Ce travail a été réalisé au Laboratoire de microbiologie moléculaire protéomique et santé de l'université Djillali Liabes Sidi Bel Abbès sous :

La direction scientifique de Monsieur ABBOUNI Bouziane à qui j'adresse mes vifs remerciements pour son encadrement, sa confiance, ses efforts et sa longue patience lors de la correction de cette thèse.

Mes remerciements sont adressés aux membres de Jury qui ont bien voulu accepter de juger ce modeste travail :

Monsieur le professeur Mr. BENALI Mohamed (Professeur, Université de Sidi Bel Abbès). Qui nous a fait l'honneur de présider ce Jury ;

Mr. BELABID Lakhdar (Professeur, Université de Mascara), Mr. MEDDAH Boumediene (Professeur, Université de Mascara) et M^{lle} KANOUN Khedoudja (MCA, Université de Sidi Bel Abbès). Qui nous ont honorés de bien vouloir examiner ce travail.

Ainsi qu'à toute personne ayant contribué de près ou de loin à l'élaboration de cette thèse.

Dédicaces

À

*Mes très chers parents que j'aime tant, sans lesquels je ne serai jamais
arrivée où j'en suis.*

*Mon tendre époux qui m'a encouragé et ma fillette ASSIL, source de
mon bonheur.*

*Mon unique frère ABDELHAKEM et ma charmante sœur
CHAHRAZED et toute ma famille dont le soutien et les
encouragements m'ont été salutaires.*

SALIMA

Résumé

Les enzymes produites par les microorganismes présentent une importance particulière dans l'industrie biotechnologique, les industries nécessitent des souches productrices des enzymes thermostables capables de résister au processus industriel. Les amylases, enzymes classées selon la nomenclature internationale EC 3.2.1.1, largement utilisées dans diverses industries (panification, biscuiterie, amidonnerie...etc).

L'objectif de ce travail est l'isolement et caractérisation de souches levuriennes productrices des amylases, l'étude de la cinétique enzymatique, l'optimisation des paramètres physicochimiques impliqués dans la production des amylases, les sources de carbones, les sources d'azotes, les sources d'ions, EDTA, SDS, pH, la température et la thermostabilité.

L'isolement des levures productrices de l'amylase est effectué à partir d'échantillons prélevés du sol saharien de Sud Ouest et Sud Est Algérien (Béchar et Ouargla) par l'utilisation d'un milieu de culture contenant de l'amidon comme seule source de carbone (Amylase Activity Medium).

Le criblage primaire des souches levuriennes productrices de l'amylase est mis en évidence par inondation de la surface de la gélose du milieu de culture utilisé, contenant des colonies pures, avec une solution de lugol. Les colonies isolées, sélectionnées productrices de l'amylase par la mesure de la zone d'hydrolyse formée sur la surface du milieu de culture contenant l'amidon comme seule source de carbone sont soumises à une éventuelle identification. Par ailleurs, l'étude du suivi de la cinétique enzymatique et l'optimisation des paramètres physicochimiques impliqués dans la production de l'amylase sont réalisées par l'utilisation de la méthode DNS.

Les résultats obtenus ont montré que parmi les 11 souches isolées, productrices d'amylase, une souche levurienne LB₃ se manifeste hautement productrice de l'amylase.

L'étude des caractères morphologiques, physiologiques et biochimiques semble indiquer que la souche levurienne LB₃, appartient au genre *Schwanniomyces*.

Par ailleurs, l'étude du suivi de la cinétique enzymatique et l'optimisation des différents paramètres impliqués dans la production de l'amylase chez la souche isolée, sélectionnée productrice de l'amylase, cultivée sur un milieu de culture à base de

lactosérum à 100% déprotéiné et supplémenté par l'amidon à 1% a révélé une importante source de production de cette enzyme, qui pourrait être exploitée dans le domaine industriel.

Mots clés : amylase, levures, sol saharien, *Schwanniomyces*, lactosérum.

Abstract

Amylases enzymes present an important biosources in biotechnological industry. Industries require thermostable enzyme producing strains capable of withstanding the industrial process. Amylases, enzymes classified according to the international nomenclature EC 3.2.1.1, widely used in various industries (bread making, biscuits, starch industry ...).

The aim of this study is the isolation and characterization of yeast strains producing amylases, the study of enzymatic kinetics, and the optimization of physicochemical parameters involved in the production of amylases, carbon sources, nitrogen sources, ion sources, EDTA, SDS, pH, temperature and thermostability.

The amylase producing yeasts are isolated from samples taken from the Saharan soil of South West and South East Algeria (Bechar and Ouargla) by the use of a culture medium containing starch as only carbon source (Amylase Activity Medium).

The primary screening of yeast strains producing amylase is evidenced by flooding the agar surface of the culture medium containing pure colonies, with a solution of lugol.

Isolated, selected colonies producing amylase by measuring the hydrolysis zone formed on the surface of the starch containing culture medium as the only source of carbon are subject to possible identification.

Moreover, the study of enzymatic kinetics and the optimization of the physicochemical parameters involved in the production of amylase are carried out by the use of the DNS method.

The results obtained showed that among the 11 isolated strains producing amylase, a yeast strain LB₃ is highly productive of amylase.

The study of morphological, physiological and biochemical characters suggests that the yeast strain LB₃ belongs to the genus *Schwanniomyces*.

Furthermore, the study of enzymatic kinetics and optimization of the various parameters involved in the production of amylase in the isolated and selected strain, producer of amylase, grown on a cheese whey based culture medium, 100% deproteinized and supplemented with 1% starch has revealed an important source of production of this enzyme, which could be exploited in the industrial field.

Key words: Amylase, Yeasts, *Schwanniomyces*, cheese whey.

ملخص

لدى الانزيمات المنتجة عبر الجزيئات الدقيقة اهمية كبيرة في الصناعات البيوتكنولوجية . الصناعات تتطلب سلالات منتجة لأنزيمات مقاومة للحرارة من بينها الاميلاز المدرجة في التسمية العالمية برمز EC 3.2.1.1 و المستعملة في عدة صناعات تحويلية.

الهدف من هذا العمل هو عزل و تحديد مجموعة من الخمائر المنتجة لانزيم الاميلاز , دراسة حركية الاميلاز و دراسة العوامل الفيزيائية المؤثرة على انتاج الاميلاز (مصادر الكربون , الازوت , الايونات) SDS , EDTA , الحموضة , الحرارة و مقاومة الحرارة).

تم عزل الخمائر المنتجة للاميلاز عبر مجموعة مختلفة من التربة الصحراوية بالجنوب الغربي والجنوب الشرقي الجزائري (بشار و ورقلة) باستعمال مستنبت يحتوي على النشاء كمصدر وحيد للكربون (Medium Amylase Activity).

اسفر الفحص الاول باستعمال طريقة غمر وسط الاستنبت بمحلول lugol على عزل 11 سلالة خميرة منتجة للاميلاز , من بينها السلالة المختارة LB₃ ذات الانتاجية العالية لانزيم الاميلاز

وضحت الدراسة المورفولوجية , الفيزيولوجية و البيوكيميائية الى ان سلالة الخميرة LB₃ تنتمي الى جنس *Schwanniomyces*

علاوة على ذلك , اظهرت الدراسات المتعلقة بالعوامل الفيزيائية و الحركية المؤثرة على انتاج الاميلاز في مصل الحليب و المكمل ب 1% من النشاء كمصدر وحيد لانتاج هذا الانزيم نتائج قيمة يمكن الاستناد بها في المجال التحويلي الصناعي.

الكلمات المفتاحية: نشاء , خمائر التربة الصحراوية , مصل الحليب.

Liste des abréviations

mg : Microgramme

μm : Micro-mole

MA : Malt Agar

ME : Malt Extract

Min : Minutes

rpm : Rotation par minute

SM : Solution mère

YG : Yeast Glucose

YMA : Yeast Malt agar

YPG : Yeast Peptone Glucose

Table des matières

Remerciements

Dédicace

Résumés

Abstract

ملخص

Liste des abréviations

Table des matières

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction générale..... 1

Revue bibliographique

Chapitre 1 : Les levures

1.1. Généralité 3

1.2. Reproduction 4

1.3. Habitat 5

1.4. Nutrition et besoins physicochimiques 5

1.5. Classification..... 6

1.6. Isolement des levures et identification 9

1.6.1. Etude des caractères culturels 9

1.6.2. Etude des caractères morphologiques et cellulaires. 10

1.6.3. Etude des caractères biochimiques et physiologiques..... 10

1.7. Application des levures en biotechnologie 12

Chapitre 2 : L'a -amylase

2.1. Définition..... 15

2.2. Nomenclature de l'a-amylase..... 15

2.3. Classification des amylase 16

2.4. Répartition 16

2.5. Structure et Mécanisme d'action 18

2.6. Caractéristiques générales 21

2.6.1. Spécificité de substrat 21

2.6.2. Effet de la température sur l'activité de l' α -amylase.....	21
2.6.3. Effet de pH sur l'activité de l' α -amylase	21
2.6.4. Effet des ions métalliques sur l'activité de l' α -amylase	21
2.7. Production de l'α-amylase	22
2.8. L'avantage de la production des enzymes par les microorganismes	22
2.9. Mesure de l'activité de l'amylase	23
2.9.1. Diminution de l'intensité du complexe amidon-iode	23
2.10. Application industrielles et biotechnologiques des amylases	23
2.10.1. En boulangerie.....	23
2.10.2. En sucrerie.....	24
2.10.3. En textile.....	24
2.10.4. Détergents.....	24
2.10.5. Domaine médicale et pharmaceutique.....	24

Chapitre 3 : Lactosérum

3.1. Généralité sur le lactosérum.....	25
3.2. Sources industrielles du lactosérum.....	26
3.3. Pouvoir polluant du lactosérum	27
3.4. Valorisation	27
3.4.1. Domaine médicale.....	28
3.4.2. Domaine alimentaire	28
3.4.3. Domaine biotechnologique	28

Matériels et méthodes

1. Objectifs.....	29
2. Isolement des souches levuriennes productrices de l'amylase	29
2.1. Echantillonnage	29
2.2. Détermination des valeurs du pH des échantillons.....	30
2.3. Isolement des levures	30
2.4. Conservation des souches levuriennes	31
2.5. Sélection des souches productrices de l'amylase	32
3. Identification des souches sélectionnées productrices de l'amylase	33
3.1. Etude des caractères cultureux	33

3.2. Etude des caractères morphologiques et cellulaires	33
3.3. Etude des caractères biochimiques et physiologiques.....	34
4. Détermination de la composition chimique du lactosérum	35
4.1. Détermination de la matière sèche	35
4.2. Détermination des taux de cendres	35
4.3. Détermination de l'acidité (Dornic).....	36
4.4. Détermination des valeurs du pH de lactosérum	36
4.5. Dosage de l'azote total	36
4.6. Dosage des sucres totaux	37
4.7. Dosage de la matière grasse	37
4.8. Dosage des sels minéraux	37
5. production de l'enzyme	38
5.1. Milieu de base	38
5.2. Préparation du milieu de base	38
5.3. Culture de la fermentation.....	38
6. Etude du suivi de la cinétique de l'amylase	38
7. Etude du suivi de la cinétique de croissance des souches sélectionnées productrices de l'amylase	39
8. Cinétique de production de l'amylase de la souche sélectionnée.....	39
8.1. Mesure des valeurs du pH	39
8.2. Détermination de la biomasse	40
8.3. Dosage de l'activité amylasique	40
8.4. Dosage des protéines.....	41
8.5. Dosage des sucres.....	41
9. Optimisation des paramètres physicochimiques impliqués dans l'activité de l'amylase	42
9.1. Effet de la valeur du pH sur l'activité de l'amylase	42
9.2. Effet de la température sur l'activité de l'amylase	42
9.3. Etude de la thermostabilité de l'amylase	42
9.4. Effet des effecteurs sur l'activité de l'amylase.....	42
9.4.1. Effet de différentes sources de carbone sur l'activité de l'amylase	42

9.4.2. Effet de différentes sources d'azote sur l'activité de l'amylase	43
9.4.3. Effet des ions métalliques, du SDS et de l'EDTA sur l'activité de l'amylase	43

Résultats et discussion

1. Isolement et purification des souches levuriennes productrices de l'amylase.	44
2. Screening des souches levuriennes productrices de l'amylase	51
3. Production de l'amylase	57
4. Composition chimique du lactosérum	57
4.1. Détermination de la concentration optimale en lactosérum	59
5. Identification de la souche levurienne isolée	60
5.1. Tests morphologiques	60
5.1.1. Caractères culturels	60
5.1.2. Caractéristiques de la reproduction végétative et sexuelle	60
5.2. Tests physiologiques et biochimiques	63
5.2.1. Fermentation des sucres	63
5.2.2. Assimilation des substrats azotés	63
6. Etude du suivi de la cinétique de croissance de la souche sélectionnée productrice de l'amylase	65
7. Cinétique de la production de l'amylase par la souche sélectionnée	66
7.1. Evolution de la concentration des glucides	67
7.2. Evolution du pH et des protéines au cours de la fermentation	69
8. Optimisation des paramètres physicochimiques impliqués dans la production de l'amylase	71
8.1. Effet de la variation du pH sur l'activité amylasique	71
8.2. Effet de la température sur l'activité amylasique	72
8.3. Etude de la thermostabilité de l'amylase	74
9. Effet des effecteurs la production de l'amylase	77
9.1. Effet de différentes sources de carbone sur la production de l'amylase	77
9.2. Effet de différentes sources d'azote sur la production de l'amylase	78

9.3. Effet des ions métalliques de SDS et de l'EDTA sur la production de l'amylase	79
--	----

Conclusion et perspectives.....	81
--	-----------

Références bibliographiques

Annexes

Résumé

Liste des figures

Figure 01 : Division de cellules levuriennes par bourgeonnement.

Figure 02 : Division d'une cellule de levure par bourgeonnement.

Figure 03 : Cycle de reproduction de la levure.

Figure 04 : Filamentisation des levures.

Figure 05 : Le mode d'action de l'amylase sur l'amidon.

Figure 06 : Présentation de la structure tridimensionnelle de l' α -amylase fongique.

Figure 07 : Structure tridimensionnelle de l' α -amylase.

Figure 08 : Mécanisme catalytique des hydrolases glycosyliques.

Figure 09 : Place du lactosérum dans les produits issus du lait.

Figure 10 : Présentation des sites de prélèvement des échantillons du sol, effectués à partir de deux régions, situées dans le Sud-Ouest et le Sud Est Algérien (**Bechar**: Guir et **Ouargla**: Hassi Messaoud).

Figure 11 : Présentation de la préparation des dilutions décimales et technique d'ensemencement des souches levuriennes sur milieux de cultures gélosées de Sabouraud et YMA, additionnée d'une concentration de 0,04 g/l de gentamicine.

Figure 12 : La conservation des souches levuriennes sélectionnées productrices de l'amylase, ensemencée dans des tubes à essai, contenant un milieu de culture gélosé de PDA ou MA, incubé à une température de 30°C pendant 3-5 jours

Figure 13 : Réduction de l'acide 3,5 dinitrosalicylique par un sucre réducteur lors du dosage de l'activité amylolytique par la méthode DNSA.

Figure 14 : Présentation de l'aspect macroscopique de la souche levurienne isolée LB₄ sur le milieu de culture Sabouraud, ajusté à une valeur de pH de 5, incubée à une température de 30°C pendant 72 heures.

Figure 15 : Présentation de l'aspect macroscopique de la souche levurienne isolée LB₃ sur le milieu de culture Sabouraud, ajusté à une valeur de pH de 5 incubée à une température de 30°C pendant 72 heures.

Figure 16 : Présentation de l'aspect macroscopique de la souche levurienne isolée LB₅ sur le milieu de culture Sabouraud, ajusté à une valeur de pH de 5, incubée à une température de 30°C pendant 72 heures.

Figure 17 : Présentation de l'aspect macroscopique de la souche levurienne isolée LB₂ sur le milieu de culture Sabouraud, ajusté à une valeur de pH de 5, incubée à une température de 30°C pendant 72 heures.

Figure 18 : Présentation de l'aspect macroscopique de la souche levurienne isolée LB₁ sur le milieu de culture Sabouraud, ajusté à une valeur de pH de 5, incubée à une température de 30°C pendant 72 heures.

Figure 19 : Présentation de l'aspect macroscopique de la souche levurienne isolée LH₆ sur le milieu de culture Sabouraud, ajusté à une valeur de pH de 5, incubée à une température de 30°C pendant 72 heures.

Figure 20 : Présentation de l'aspect macroscopique de la souche levurienne isolée LH₉ sur le milieu de culture Sabouraud, ajusté à une valeur de pH de 5, incubée à une température de 30°C pendant 72 heures.

Figure 21 : Présentation de l'aspect macroscopique de la souche levurienne isolée LH₁₁ sur le milieu de culture Sabouraud, ajusté à une valeur de pH de 5, incubée à une température de 30°C pendant 72 heures.

Figure 22 : Présentation de l'aspect macroscopique de la souche levurienne isolée LH₇ sur le milieu de culture Sabouraud, ajusté à une valeur de pH de 5, incubée à une température de 30°C pendant 72 heures.

Figure 23 : Présentation de l'aspect macroscopique de la souche levurienne isolée LB₈ sur le milieu de culture Sabouraud, ajusté à une valeur de pH de 5, incubée à une température de 30°C pendant 72 heures.

Figure 24 : Présentation de l'aspect macroscopique de la souche levurienne isolée LH₁₀ sur le milieu de culture Sabouraud, ajusté à une valeur de pH de 5, incubée à une température de 30°C pendant 72 heures.

Figure 25 : Illustration des diamètres de zones d'hydrolyses formées autour des colonies inoculées sur milieu de culture gélosé AAM, ajusté à une valeur de pH de 5, incubées à une température de 30°C pendant 72 heures.

Figure 26: Présentation de la zone d'hydrolyse formée, chez la souche LB₂, inoculée sur le milieu de culture AAM, ajusté à une valeur de pH de 5, incubée à une température de 30°C pendant 72 heures.

Figure 27 : Présentation de la zone d'hydrolyse formée, chez la souche LB₃, inoculée sur le milieu de culture AAM, ajusté à une valeur de pH de 5, incubée à une température de 30°C pendant 72 heures.

Figure 28 : Présentation de la zone d'hydrolyse formée, chez la souche LB₄, inoculée sur le milieu de culture AAM, ajusté à une valeur de pH de 5, incubée à une température de 30°C pendant 72 heures.

Figure 29 : Présentation de la zone d'hydrolyse formée, chez la souche LH₆, inoculée sur le milieu de culture AAM, ajusté à une valeur de pH de 5, incubée à une température de 30°C pendant 72 heures.

Figure 30 : Présentation de la zone d'hydrolyse formée, chez la souche LB₁, inoculée sur le milieu de culture AAM, ajusté à une valeur de pH de 5, incubée à une température de 30°C pendant 72 heures.

Figure 31 : Présentation de la zone d'hydrolyse formée, chez la souche LB₈, inoculée sur le milieu de culture AAM, ajusté à une valeur de pH de 5, incubée à une température de 30°C pendant 72 heures.

Figure 32 : Présentation des zones d'hydrolyse formées, chez les souches LH₇, LH₁₀ et LH₁₁ inoculées sur le milieu de culture AAM, ajusté à une valeur de pH de 5, incubée à une température de 30°C pendant 72 heures.

Figure 33 : Présentation des zones d'hydrolyse formées, chez les souches LB₅ et LH₉, inoculées sur le milieu de culture AAM, ajusté à une valeur de pH de 5, incubée à une température de 30°C pendant 72 heures.

Figure 34 : Présentation de l'aspect macroscopique de la souche levurienne isolée, sélectionnée productrice de l'amylase LB₃, inoculée sur milieu de culture Sabouraud, ajusté à une valeur de pH de 5, incubée à une température de 30°C pendant de 72 heures.

Figure 35 : Présentation de l'aspect microscopique de la souche levurienne isolée, sélectionnée productrice de l'amylase LB₃, inoculée sur milieu de culture Sabouraud, ajusté à une valeur de pH de 5, incubée à une température de 30°C pendant de 72 heures, après une coloration au bleu de méthylène (grossissement X40).

Figure 36 : Présentation de l'aspect microscopique de la souche levurienne isolée, sélectionnée productrice de l'amylase LB₃, inoculée sur milieu de culture Sabouraud, ajusté à une valeur de pH de 5, incubée à une température de 30°C pendant de 72 heures, à l'état frais (grossissement X100) (A: bourgeonnement des cellules).

Figure 37 : Présentation de l'aspect de filamentisation de la souche levurienne isolée, sélectionnée LB₃, inoculée sur le milieu de culture Sabouraud, ajusté à une valeur de pH de 5, incubée à une température de 25°C pendant 5 jours (grossissement X100).

Figure 38 : Présentation de la fermentation des sucres chez la souche levurienne isolée, sélectionnée productrice de l'amylase LB₃, inoculée sur le milieu de culture eau de levure, ajusté à une valeur de pH de 5, incubée à une température de 25°C pendant 7 jours.

Figure 39 : Présentation de test d'assimilation de l'azote chez la souche levurienne isolées, sélectionnée productrice d'amylase LB₃, inoculée sur le milieu de culture synthétique sans azote, ajusté à une valeur de pH de 5, incubée à une température de 25°C pendant 3 jours (**A:** Sulfate d'ammonium, **B:** Nitrate de potassium).

Figure 40 : Evolution cinétique de la croissance, la production de l'amylase et la consommation des glucides au cours de la fermentation de la souche levurienne isolées, sélectionnée productrice de l'amylase LB₃, inoculée sur milieu de culture à base de lactosérum à 100% déprotéiné et supplémenté par 1% d'amidon soluble, ajusté à une valeur de pH de 5, incubée avec agitation 180 rpm à une température de 30°C.

Figure 41 : Evolution cinétique des protéines et de pH au cours de la fermentation par la souche levurienne isolée, sélectionnée LB₃, inoculée sur milieu de culture à base de lactosérum à 100% déprotéiné et supplémenté par 1% d'amidon soluble, ajusté à une valeur de pH de 5, incubée avec agitation 180 rpm à une température de 30°C.

Figure 42 : Effet du pH sur l'activité de l'amylase de la souche levurienne isolée, sélectionnée, inoculée dans un milieu de culture à base de lactosérum à 100% déprotéiné et supplémenté par 1% d'amidon soluble, incubée à une température de 30°C pendant 48 heures.

Figure 43 : Effet de la température sur l'activité de l'amylase de la souche levurienne isolée, sélectionnée, inoculée dans un milieu de culture à base de lactosérum à 100% déprotéiné et supplémenté par 1% d'amidon, incubée avec agitation à 180 rpm, à différentes températures (20-60°C) pendant 30 minutes.

Figure 44 : Effet de la thermostabilité de l'amylase de la souche levurienne isolée, sélectionnée productrice de l'amylase LB₃, inoculée dans un milieu de culture à base de lactosérum à 100% déprotéiné et supplémenté par 1%

d'amidon, incubée à différentes températures pendant une période de temps de (0-190 min).

Figure 45 : Présentation de la courbe étalon du glucose.

Figure 46 : Présentation de la courbe étalon du lactose.

Figure 46 : Présentation de la courbe étalon des protéines.

Liste des tableaux

Tableau 1: Importance de certains oligoéléments et vitamines pour la croissance des levures.

Tableau 2: Classification des levures.

Tableau 3: Production et utilisation de certains enzymes de levures.

Tableau 4: Utilisation des levures et de leurs produits.

Tableau 5: Différents types de lactosérum.

Tableau 6: Composition chimique du lactosérum.

Tableau 7: Illustration des analyses chimiques des sols sahariens de deux régions de Sud Ouest et Sud Est Algérien prélevés de Béchar (Oued Guir) et Ouargla (Hassi Messaoud).

Tableau 8: Illustration de la Composition chimique de lactosérum de fromage « Camembert » de l'unité de production GIPLAIT de la région de Sidi Bel Abbès (Ouest Algérie).

Tableau 9: Illustration de l'effet de la dilution du lactosérum de fromage « Camembert » de l'unité de production GIPLAIT de la région de Sidi Bel Abbès (Ouest Algérie) sur la production de l'amylase chez la souche isolée, sélectionnée productrice de l'amylase LB₃.

Tableau 10: Illustration de l'Effet des différentes sources de carbone sur la production de l'amylase de la souche levurienne isolée, sélectionnée productrice de l'amylase LB₃, inoculée dans un milieu de culture à base de lactosérum à 100% déprotéiné, incubées à une température de 30°C pendant 72 heures.

Tableau 11: Illustration de l'effet des ions métalliques et de l'EDTA sur l'amylase de la souche levurienne isolée, sélectionnée productrice de l'amylase LB₃, inoculée dans un milieu de culture à base de lactosérum à 100%

déprotéiné et supplémenté par 1% d'amidon, incubées à une température de 30 °C pendant 72 heures.

INTRODUCTION

GENERALE

Introduction générale

Les enzymes appartenant à la famille des hydrolases telles que, les amylases sont parmi les plus importantes enzymes à l'échelle industrielle, ce qui les rendent l'un des outils-clés des biotechnologies (**Little, 2004**). En effet, le marché mondial des enzymes est représenté par 80% des hydrolases, particulièrement les amylases et les protéases (**Morvan, 2010**).

En Algérie, les amylases utilisées dans diverses industries (panification, biscuiterie, amidonnerie...etc) sont importées en totalité, ce qui nécessite la création des ateliers locaux pour la production de ces enzymes.

Toutefois, la production des amylases par des procédés biotechnologiques (fermentations), nécessite non seulement l'identification et la sélection des microorganismes amylolytiques, mais également le choix d'un substrat de fermentation à faible coût d'une part, et convenable en point de vue composition en élément nutritifs nécessaires au développement des microorganismes et la production des amylases, d'autre part (**De mot et Verachlert, 1985**).

Dans notre étude portant sur la production des amylases; nous avons choisi les levures comme agents de fermentation, vu leur place importante sur le marché des enzymes amylolytiques et leur remarquable capacité à coloniser et à exploiter une grande variété de substrats (**Ramashandran et al., 2004 et Ait-kaki, 2004**), et le lactosérum comme substrat de fermentation.

Le lactosérum, par leur richesse en sucres fermentescibles, sels minéraux et vitamines, il serait intéressant, voire indispensable, de l'utiliser comme milieu de fermentation pour la production de divers métabolites levuriennes utiles en industries ou en pharmacie. Ce substrat a fait l'objet de plusieurs études intéressant la biotechnologie alimentaire, par la production de la levure boulangère, d'acides organiques, d'enzymes amylolytiques, cellulolytiques et de bioalcool,...etc.

Les objectifs tracés pour la réalisation de ce présent travail sont :

- L'isolement d'une large gamme de souches levuriennes productrices de l'amylase à partir du sol saharien (Bechar et Ouargla).

- La sélection des souches levuriennes performantes capables de fermenter le lactosérum (sous produit de l'industrie laitière), dont nous avons l'intention de le revaloriser.
- Une étude cinétique de la production de l'amylase et de la croissance des souches levuriennes sélectionnées.
- L'optimisation de certains facteurs physicochimiques tels que le pH, la température, les sources de carbone, les sources d'azotes et les sources d'ions, impliqués dans la production de l'amylase.

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre I

1. Les levures

1.1. Généralité

Le terme levure provient du mot latin « **levare** » qui se traduit par la « **levée** » des pâtes panifiables (**Oteng-Gyang, 1984 ; Bouchet *et al.*, 2005**).

Les levures sont des eucaryotes hétérotrophes faisant partie du groupe de champignons unicellulaires (**Meyer *et al.*, 2004**); dont certaines forment des bourgeons non détachables sous forme de courte chaîne de cellules, immobiles, appelée pseudohyphe (**Guiraud, 1998 ; Tortora *et al.*, 2003**). Les cellules de levures ont des formes plus ou moins sphériques ou ovoïdes, parfois cylindriques ou de formes plus spécifiques (**Perscott *et al.*, 2007 ; Larpent, 1991**). Elles sont généralement plus grandes que celles des bactéries et présentent une structure plus complexe, notamment par la présence de noyau et d'organites divers. Elles se trouvent isolées, en paires, en chaînes ou en petits amas; leur taille est très variable suivant les espèces: 2,5-10,5µm de largeur contre 4,5-21µm de longueur. Ces dimensions et aspects dépendent fréquemment des conditions de culture et l'âge des cellules (**Scherr et Weaver, 1953**).

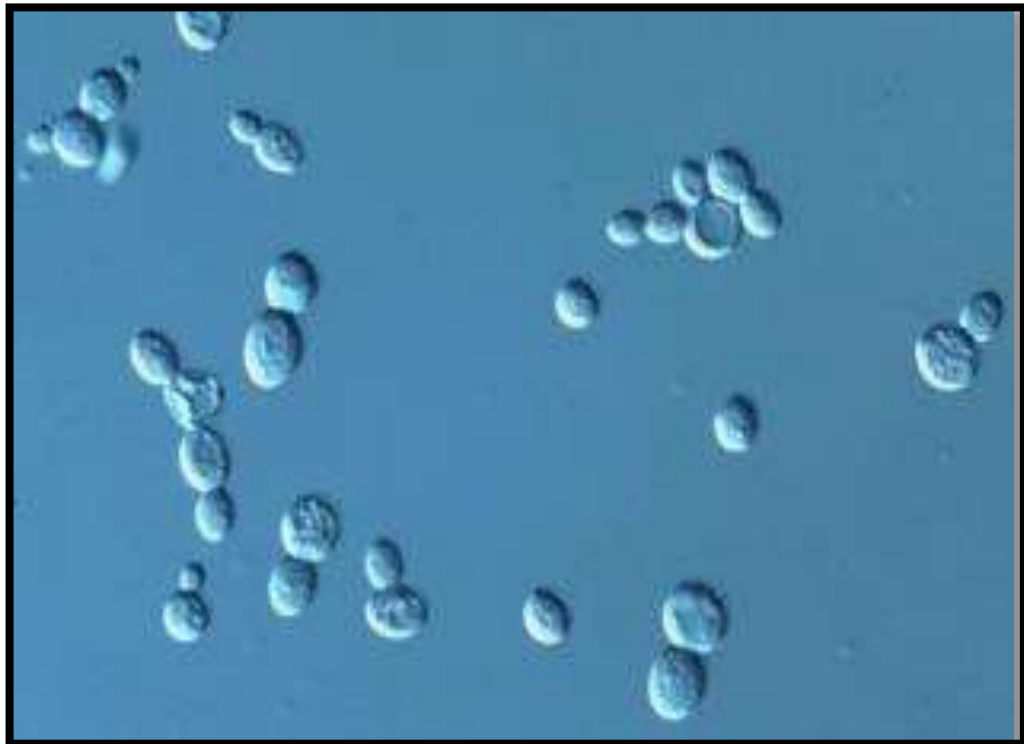


Figure 1 : Division de cellules levuriennes par bourgeonnement (**Kwon-Chung et Bennett, 1992**).

1.2. Reproduction

Les levures se reproduisent aussi bien par un cycle asexué (végétatif) que par un cycle sexué, selon les conditions nutritionnelles disponibles. La reproduction végétative se fait par bourgeonnement ou fission (**Larpent, 1992**) (**Figure 1, 2 et 3**), dans certaines conditions de cultures les levures sporogènes peuvent se reproduire par voie sexuée (**Bourgeois et Larpent, 1996**).

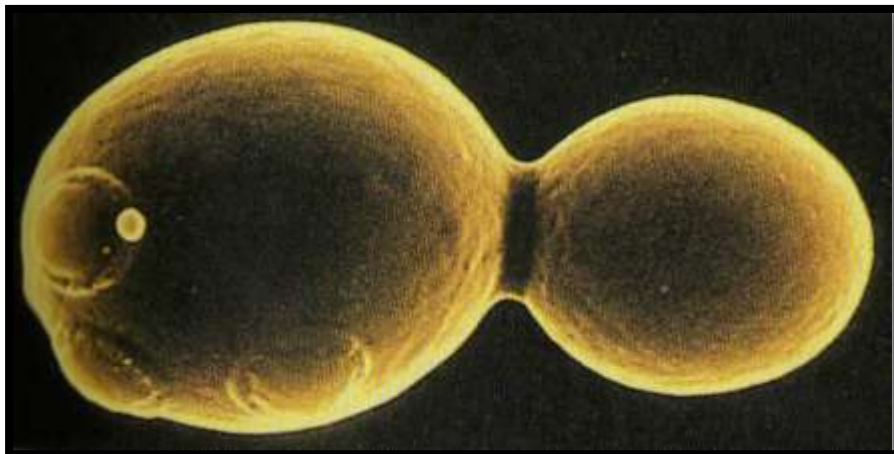


Figure 2 : Division d'une cellule de levure par bourgeonnement (**Madigan et Martinko, 2007**).

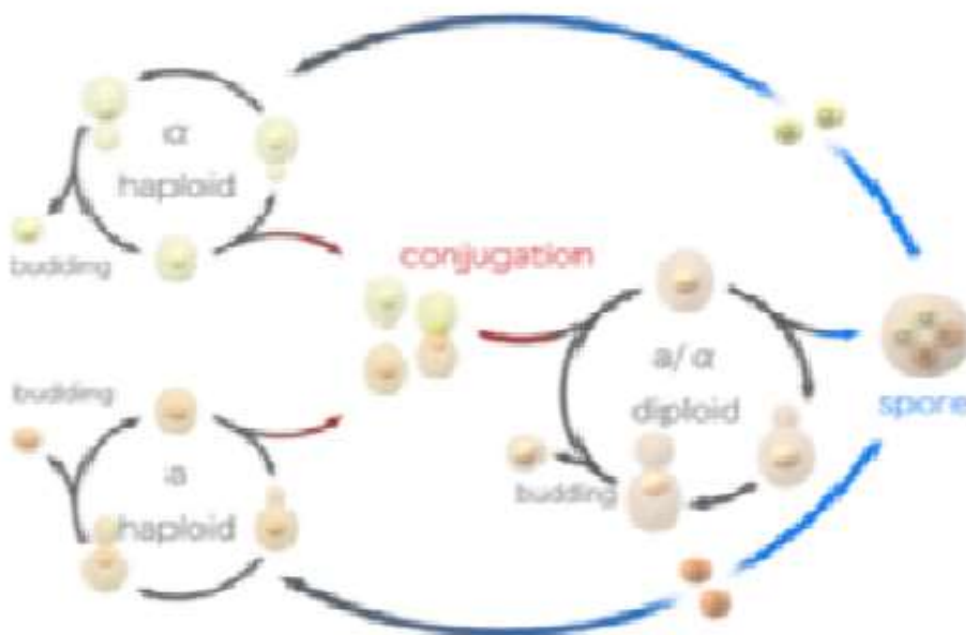


Figure 3 : Cycle de reproduction de la levure (**Leclerc et al., 1995**).

1.3. Habitat

Les levures sont très répandues dans les milieux riches en glucides, se présentent sous forme de poudre blanche sur les fruits et les feuilles et sont saprophytes du nectar de fleurs (**Larpen, 1992 ; Scriban, 2003**).

Certaines levures se développent abondamment dans des eaux douces et profondes associées au plancton, certaines espèces sont présentes dans le tube digestif des animaux et des insectes ; comme elles peuvent persister libres dans le sol (**Ahearn, 1973 ; Van Uden et Fell, 1986 ; Mangenot, 1966 ; Phaff et Starmer, 1987**).

1. 4. Nutrition et besoins physicochimiques

Les levures sont des organismes hétérotrophes et exigent des sources azotées et carbonées pour leur nourriture et leur développement (**Thuriaux, 2004**).

•Source de carbone et d'énergie

Le carbone constitue le composé majoritaire de la cellule levurienne et représente environ 50% du poids sec (**Rivière, 1970**). Les sources carbonées sont d'une grande importance dans la biosynthèse des constituants cellulaires variés tels que les glucides, les lipides, les protéines et les acides nucléiques, dont leur oxydation fournit l'énergie indispensable pour le métabolisme de la cellule (**Larpen, 1991**). Certaines levures utilisent une large gamme de substrats carbonés et d'autres levures assimilent seulement un petit nombre de composés (**Bourgeois et Leveau, 1991**). Des levures particulières utilisent des sources de carbone non conventionnelles telles que l'éthanol, le glycérol (**Tamaki et Hama, 1982**).

•Source d'azote

La synthèse des composés azotés structuraux et fonctionnels de la cellule est fortement liée à l'assimilation des formes oxydées ou réduites, vu que les levures sont incapables de fixer l'azote libre. Différentes sources d'azote organique telles que les sels d'ammonium ou de nitrate, les acides aminés, la farine de soja, le peptone, les extraits de levures sont assimilés chez la plupart des levures; permettant la synthèse

des protéines, des acides nucléiques et des vitamines (Walker *et al.*, 1995 ; Guiraud, 1998).

•Oligoéléments et facteurs de croissance

Les Oligoéléments sont des éléments constitutifs de coenzymes, présents en faible concentrations, indispensables, variés et interviennent lors des réactions enzymatiques, (Rivière, 1975 ; Larpent et Sanglier, 1992 ; Boiron, 1996). Ils jouent un rôle important dans l'activation et stabilisation des protéines et stimulent la croissance des levures (Tableau 1). Parmi les métaux alcalins indispensables souvent rencontrés les cations monovalents K^+ , Na^+ , Li^+ , Cs^+ , Rb^+ et les cations bivalents Mg^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} et Mn^{2+} (Pommier, 2003) .

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

Oligoéléments et facteurs de croissance	Rôle joué
Magnésium	- Stabilité et perméabilité des membranes. - Protection de la cellule contre les facteurs négatifs, tels que le choc thermique et la toxicité de l'éthanol.
Manganèse	- Il appuie la synthèse de la thiamine et des protéines, ce qui contribue à l'augmentation de la biomasse.
Zinc	- Coenzymes pour certains enzymes. - Contribution à la synthèse de la riboflavine et certaines protéines.
Biotine	- Essentielle dans les réaction de carboxylation et de décarboxylation. - Production des alcools et des esthers.
Thiamine	- Synthèse de l'isoleucine et de la valine.
Acide pantothénique	- Synthèse de l'Acétyl –COA . - Production des acides gras et des acides aminés.

•Besoins physicochimiques

Généralement, les levures sont adaptées à des environnements hostiles aux bactéries et se distinguent par certains besoins nutritifs (Perry *et al.*, 2004).

Les levures poussent aisément dans des environnements naturels à des températures de 25-30°C. Certaines levures sont thermophiles et d'autres psychrophiles.

Une large gamme des valeurs de pH comprises entre (2,4-8,6) sont tolérées par les levures. Cependant, la valeur optimale du pH est comprise entre (4,5-6,5)

La majorité des levures se développent en présence en présence d'oxygène à des activités de l'eau comprises entre (0,62 et 0,93) et résistent à la pression osmotique par accumulation des polyols comme osmoprotecteurs (**Delarras, 2007 ; Bouix et Leveau, 1991**).

Par ailleurs, certaines levures sont aérobies strictes d'autres sont aéro-anaérobies facultatives et utilisent la molécule du dioxygène (O₂) comme accepteur d'électrons final, fermentent les glucides et produisent de l'éthanol et du dioxyde de carbone (**Bourgeois et al., 1996 ; Davis, 1990**).

1. 5. Classification

Lodder et ses collaborateurs (1971) ont établi la classification des levures basée essentiellement sur l'étude des critères morphologiques, culturels, sexuels et physiologiques.

Kreger-Van Rij (1984) ont réactualisé la classification des levures par l'étude de certains organites tels que le noyau et le séquençage de l'ADN. Cette classification est devenue actuellement une référence et renferme une soixantaine de genres et environs 500 espèces.

Les levures se divisent en 3 grandes classes (**Tableau 2**):

- **Les ascomycètes:** appelées levures ascosporigènes, forment dans certaines conditions des ascospores à l'intérieure de la cellule.
- **Les basidiomycètes:** capables d'élaborer des spores externes apparentées aux basidiospores.
- **Les deutéromycètes ou levures imparfaites:** genres asexués et se multiplient par reproduction végétative.

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

Les levures ascomycètes	Les levures basidiomycètes	Les levures imparfaites
Saccharomycetaceae 1.Schizosaccharomycetoideae <i>Schizosaccharomyces</i> 2.Saccharomycetoideae <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>	Levures formant des teliospores <i>Leucosporidium</i> <i>Rhodospodium</i> <i>Sporidiobolus</i> Filobasidiaceae <i>Filobasidiella</i> <i>Filobasidium</i> Levures non classées <i>Sterigmatosporidium</i>	Sporobolomycetaceae <i>Bullera</i> <i>Sporobolomyces</i> Cryptococcaceae <i>Aciculoconidium</i> <i>Brettanomyces</i> <i>Candida</i> <i>Cryptococcus</i> <i>Eniella</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>Sympodiummyces</i> <i>Trichosporon</i> <i>Trigonopsis</i>

<i>Wingea</i>		
<i>Yarrowia</i>		
<i>Zygosaccharomyces</i>		
3.Lipomycetoideae		
<i>Lipomyces</i>		
4.Nadsonioideae		
<i>Hanseniaspora</i>		
<i>Nadsonia</i>		
<i>Saccharomycodes</i>		
<i>Wickerhamia</i>		
Spermophthoraceae		
<i>Coccodiascus</i>		
<i>Metchnikowia</i>		
<i>Nematospora</i>		

1.6. Isolement des levures et identification

Différents milieux de culture gélosés sont rendus sélectifs vis-à-vis de bactéries lors de leur acidification à des valeurs de pH comprises entre 4-3,5. Toutes fois, cette sélectivité est sans effet sur les bactéries acidophiles et sur les moisissures; dans ce cas, seuls des antibiotiques et des antifongiques peuvent inhiber leurs développements (**De Jong et Put, 1980**). Des milieux organiques complexes contenant des ingrédients comme l'extrait de malt, l'extrait de levure, la peptone en combinaison avec le glucose sont utilisés (**Hagler et Mendoca, 1981**).

L'identification des levures est basée essentiellement sur la détermination des caractères cultureux, morphologiques, sexuels et physiologiques (**Guiraud, 1998**).

1.6.1. Etude des caractères cultureux

La détermination des caractères cultureux est effectuée par ensemencement des milieux de culture liquide et solide et l'étude de la zone de la culture et l'aspect des colonies (milieu liquide, la forme, la couleur et la consistance des colonies (milieu solide) (**Guiraud, 1998**).

1.6.2 .Etude des caractères morphologiques et cellulaires

•Morphologie cellulaire normale et mode de multiplication végétative

Les caractères morphologiques et cellulaires sont étudiés par examen microscopique des préparations, ce qui a permis la détermination de la morphologie des cellules, leur arrangement et le mode de reproduction végétative (**Bouix et Leveau, 1991**).

•Aptitude à la Filamentisation

Dans certaines conditions de culture, les levures donnent des formes mycéliennes, mises en évidence par un examen microscopique. La recherche systématique de l'aptitude à la filamentisation d'une souche est effectuée sur milieu de culture spécifique telle que le milieu de culture PDA (**Guiraud, 1998**).

•Etude de la sexualité

La reproduction sexuée constitue la base de la distinction des genres, la formation d'ascospores présente un caractère très informatif dans l'identification des levures. Par ailleurs, l'observation de la forme de l'asque, de la forme et le nombre des ascospores, fournissent des éléments souvent caractéristiques d'espèces et du genre (**Kreger-Van-Rij, 1984 ; Larpent, 1991**).

•Morphologies particulières

Les chlamydospores et des ballistospores sont observées dans des milieux de culture pauvres en présence d'une tension d'oxygène réduite, (**Figure 4**) (**Guiraud, 1998**).

1.6.3. Etude des caractères biochimiques et physiologiques

L'indentification des levures est basée essentiellement sur la fermentation et l'assimilation de différents substrats carbonés et azotés (**Kreger-Van-Rij, 1984 ; Lodder 1971**).

• Fermentation des sucres

La mise en évidence de la fermentation des sucres est effectuée sur milieu de culture liquide lors du piégeage du dioxyde de carbone (CO_2), produit dans la cloche de Durham (**Larpent, 1991**).

• Utilisation des substrats carbonés

La mise en évidence de l'oxydation de différentes sources de carbone est effectuée sur des milieux de culture, contenant des hexoses, des pentoses, des di et tri saccharides, des polysaccharides, des alcools, des acides organiques et des hétérosides (**Bouix et Leveau, 1991**).

• Utilisation des substrats azotés

Les levures sont généralement dotées d'un système enzymatique très complexe permettant l'assimilation de l'ammonium, les peptones, les acides aminés et l'urée. Par ailleurs, certaines levures utilisent d'autres sources azotes telles que le nitrate, l'éthylamine, la cadaverine, etc (**Guiraud, 1998**).

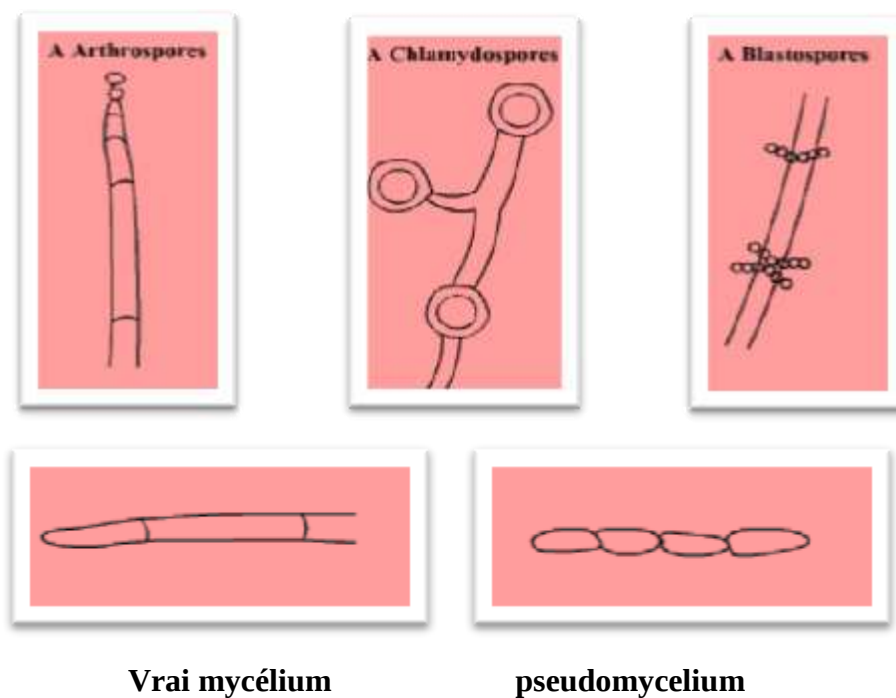


Figure 4 : Présentation de la Filamentisation des levures (**Guiraud, 1998**).

1.7. Applications des levures en biotechnologie

Les levures sont largement utilisées dans la production des pains et la fabrication des boissons alcoolisées (**Bouix et Leveau, 1991**) (**Tableau 3**).

Durant le processus de la préparation du pain, la levure se développe dans des conditions aérobioses et augmente la production de CO₂ et diminue considérablement l'accumulation d'alcool, ce qui favorise la formation d'une légère texture de nombreux pains et les traces de fermentation contribuent au goût final des pains (**Prescott et al., 2007**). Par ailleurs, dans des conditions anoxiques, les levures dirigent leur métabolisme vers une fermentation, accompagnée avec une production considérable de l'alcool (**Madigan et Martinko, 2007**).

Tableau 3 : production et utilisation de certains enzymes de levures (**Simon et meunier, 1970 ; Sicard, 1982**).

Types d'enzymes	Levures utilisées	Utilisations
Amylases	<i>Lipomyces Starkey</i> <i>Schwanniomyces Castelli</i>	Saccharification de l'amidon, boulangerie, textile, papeterie.
Invertases	<i>Saccharomyces carlbergensie</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	confiserie
Lipases	<i>Candida lipolytica</i>	Fromagerie, laiterie.
lactases	<i>Candida pseudotropicalis</i> <i>Kluyveromyces fragilis</i> <i>Kluyveromyces lactis</i>	Crèmes glacées

Outre, leur importance en panification et en brasserie, les levures trouvent de nombreuse application dans le domaine industrielle (**Tableau 4**).

La transformation du sucre en alcool dans la production de biocarburant s'effectue par un procédé de fermentation éthanolique à partir de plantes cultivées riches en sucre complexe telles que l'amidon le sucre de canne, la betterave sucrière, le maïs ou le blé. Lors du procédé de transformation, plusieurs dérivés sont obtenus tels que le bioéthanol, produit issu de la fermentation de sucres simples et de l'amidon hydrolysé

par la levure appartenant au genre *Saccharomyces*. L'éthanol obtenu, peut remplacer partiellement, totalement l'essence utilisé dans les moteurs à explosion et de complément au gasoil (**Anonyme, 2007**).

Dans le procédé de la fabrication des fromages, l'action des levures est amorcée dès les premières heures de l'égouttage et pendant l'affinage (**Jacobsen et Poulsen, 1995 ; Leclercq- Perlat et al., 2004**). Elles contribuent au développement des qualités organoleptiques du fromage par leurs intervention dans les différents processus tels que la protéolyse, la lipolyse, la consommation d'acide lactique et la fermentation du lactose (**Addis et al., 2001**).

La levure diététique largement utilisée comme complément alimentaire, caractérisée par leur richesse en vitamine B et en protéines et carencée en acides aminés soufrés, peut être supplémentée à la farine de blé et de maïs pour l'augmentation de leur valeur nutritionnelle (**Perry et al., 2004 , Madigan et Martinko, 2007**).

La disponibilité des connaissances de la biologie moléculaire des levures et la mise au point de techniques de génie génétique ont permis la programmation pour l'expression des protéines humaines et animales recombinantes, qui constituent une grande réussite de la biotechnologie dans le domaine médical notamment la production des enzymes, des hormones peptidiques, de facteurs de croissance, d'hémoglobine, de ferritine, l'érythropoïétine, etc) (**Bouix et Leveau, 1991 ; Edelstein, 2002**).

Tableau 4 : Utilisation des levures et de leurs produits (*Addis et al.*, 2001 ; *Jacobsen et Poulsen*, 1995 ; *Leclercq- Perlat et al.*, 2004).

Utilisations	Quelques exemples
Production de levures	Levure de boulanger (fabrication du pain) Levure sèche (supplément nutritionnel humain et animal)
Produits des levures	Extrait de levure (milieux de culture de microorganismes) Vitamines B et D Enzymes: invertase, galactosidase (Industrie agroalimentaire) -Produits chimiques pour la recherche : ATP, NAD ⁺ , ARN
Produits de fermentation de levure	Ethanol, Glycérol

Chapitre II

2. Généralité sur les enzymes

Les enzymes, des catalyseurs du monde biologique sont des macromolécules de haute masse moléculaire (10 à 100 kDa) présentes dans les cellules vivantes, jouent un rôle essentiel dans le contrôle des procédés métaboliques lors de la transformation des nutriments en énergie indispensable aux réactions de biosynthèse (**Bergmeyer *et al.*, 1979 ; Pelmont, 1995 ; Drouin, 2005**).

Patel et ses collaborateurs (2005) ont rapporté sur la caractérisation et l'étude de plus de 3000 activités enzymatiques. Les enzymes sont privilégiées dans l'industrie car elles permettent le contournement des inconvénients des produits chimiques et l'amélioration des relations coûts-efficacité des procédés (**Sandhya *et al.*, 2005**).

2.1. Définition de l' α -amylase

L' α -amylase est l'une des enzymes industrielles la plus importante et la plus ancienne (**Gupta *et al.*, 2008**). C'est une macromolécule appartenant à la classe des protéines globulaires, de type endoglycanases, de la classe des hydrolases qui agit sur les liaisons α (1-4) de l'amidon. Son action fournit dès le début un mélange de glucose, de maltose et de dextrines. En fin de réaction elle fournit du glucose et des résidus correspondant aux liaisons α (1-6) situées aux points de ramification des chaînes (**Raimbault, 1981 ; Alais *et al.*, 2008**). Elle est largement présente chez les animaux, les végétaux et les microorganismes. Bien que les α -amylases de différentes origines aient très peu de séquences d'acides aminés identiques, leur structure tridimensionnelle et l'organisation de leur site actif sont similaires (**Mercier, 1985**). Leur chaîne polypeptidique est organisée en trois domaines formé chacun d'un tonneau de huit segments bêta, entourés par huit hélices alpha. Leurs sites actifs sont constitués d'un ensemble de sous-sites (**Scriban, 1999**).

2.2. Nomenclature de L' α -amylase

L'action de L' α -amylase est de type endomoléculaire, qui conduit à la formation du D-glucose, de maltose et d'une petite quantité de maltodextrines. L' α -amylase hydrolyse les molécules d'amidon au niveau de la liaison α (1-4) glucanes (**Mercier, 1985**).

- **Nom systématique** : α -(1-4) D-glucane glucanohydrolase.
- **Nom codifié** : E.C .3.2.1.1
- **Nom recommandé**: Alpha-amylase.
- **Synonymes**: glycogenase, endoamylase, maxilase, taka-amylase A, thermolase, clarase, amylopsin (**Graber, 1989**).

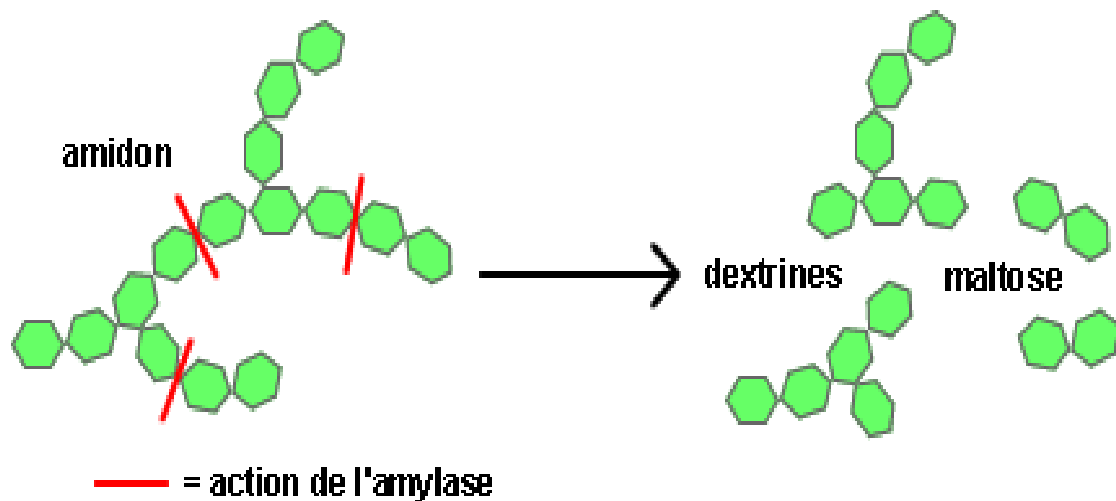


Figure 5: Le mode d'action de l'amylase sur l'amidon (**Graber, 1989**).

2.3. Classification des amylases

Les amylases sont divisées en deux catégories **endoamylases** et **exoamylases**. Les endoamylases catalysent la molécule d'amidon à l'intérieure d'une manière aléatoire. Cette action provoque la formation d'oligosaccharides linéaires et ramifiés à des diverses longueurs de chaines. Les exoamylases hydrolysent au niveau de l'extrémité non réductrice et donnent successivement des produits finaux plus courts (**Rani et al., 2003**).

2.4. Répartition des amylases dans le monde vivant

Les amylases sont universellement distribuées à travers les règnes végétaux, animaux et microbiens. Aux cours de la dernière décennie, des recherches considérables sont entreprises sur l' α -amylase extracellulaire, produites chez de nombreux micro-organismes.

L'avantage majeur de l'utilisation des micro-organismes dans la production des amylases est leur capacité productrice à grande échelle. **(Lonsane et al., 1990).**

Les amylases sont produites chez de nombreux microorganismes tels que les champignons, levures, bactéries et actinomycètes. **(Pandey et al., 2000).**

2.4.1. Origine animale

L' α -amylase animale est généralement extraite de la salive humaine, du pancréas des mammifères tels que les porcs et les veaux **(Bertheau et al., 1985 ; Chatterton et al., 1996).**

2.4.2. Origine végétale

L' α -amylase joue un rôle important dans le métabolisme glucidique chez les plantes, où elle participe à l'hydrolyse de l'amidon et la production des sucres réducteurs (glucose et maltose) directement assimilables **(Badot et Merlin, 1984).**

Cette enzyme végétale est généralement obtenue par extraction à partir des céréales, notamment le blé, l'orge, le son ou le riz et souvent formée au cours de la germination des graines, qui requiert une activité enzymatique très importante pour la mobilisation des réserves et le développement de l'embryon **((Srinivasa Rao et al., 2004 ; Brawn et Kelly, 1993 ; Charles et al., 2003).**

2.4.3. Origine microbienne

Deux types de l' α -amylase sont distingués : les α -amylases bactériennes et les α -amylases fongiques.

2.4.3.1. Les α -amylases fongiques

La production industrielle d'enzymes à partir des microorganismes fongiques appartenant surtout aux genres *Aspergillus* et *Penicillium* **(Takamine, 1894).** L' α -amylase fongique est d'une thermostabilité assez faible, avec une température optimale comprise entre 50-55°C **(Fogarty et Kelly, 1994 ; Duo-Chuan et al., 1997).**

Actuellement, certains genres de moisissures telles que *Rhizopus* et *Alternaria* sont utilisés dans la production d' α -amylase thermostable. Les levures interviennent

également dans la production d' α -amylase (Leveau et Bouix, 1993 ; Lateef *et al.*, 2004 ; Ait Kaki *et al.*, 2012).

2.4.3.2. Les α -amylases bactériennes

Les amylases sont principalement obtenues par procédé de fermentation lors de l'inoculation des bactéries appartenant à la famille de Bacillaceae telles que *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus licheniformis* et *Bacillus subtilis* (Milner *et al.*, 1997 ; Bousseboua, 2002 ; Mc Tighe *et al.*, 1995).

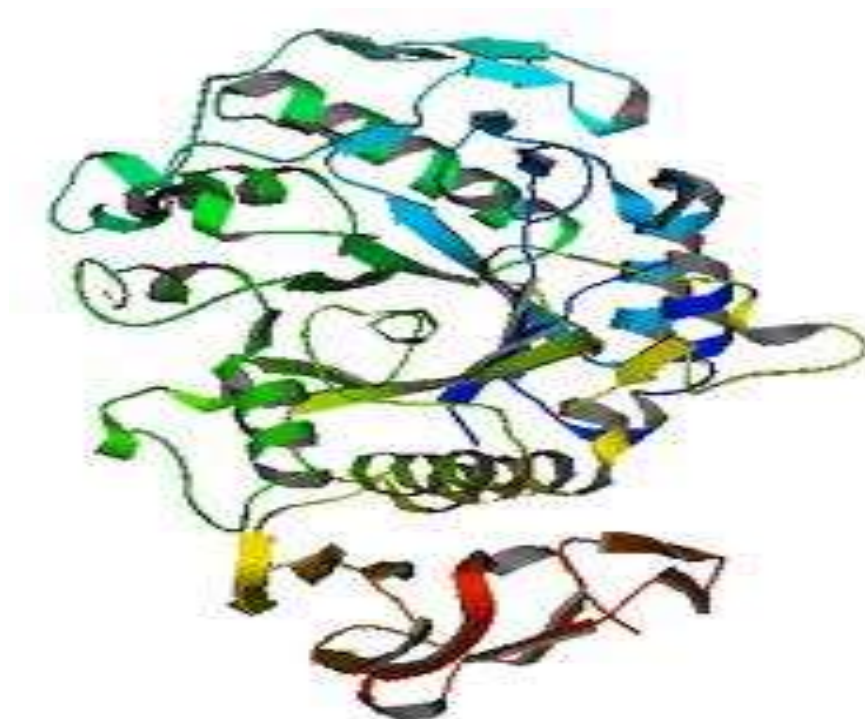


Figure 6: Présentation de la structure tridimensionnelle de l' α -amylase fongique (Priestle, 1988).

2.5. Structure et mécanisme d'action

Structurellement, les α -amylases sont considérées comme des glycoprotéines renfermant 478 acides aminés répartis en deux domaines globulaires appelés A (1-380 résidus) et B (381- 478 résidus) .Ces domaines sont associés par une chaîne polypeptidique constituée principalement de résidus hydrophobes. La partie glucidique est formée essentiellement de mannose. Les résidus constituant le site de fixation du substrat, ainsi que ceux constituant le site catalytique sont localisés dans le domaine A,

qui montre que l' α -amylase est formée de huit feuillets β plissés et de huit hélices α (Chiba, 1988).

Le mécanisme d'action de l' α -amylase nécessite la participation de trois fonctions du site actif impliquant un attaquant nucléophile, un stabilisateur de la charge positive de l'atome attaqué et un donneur de proton au groupe déplacé ; ceci signifie que la rupture de la liaison osidique fait intervenir une série d'échanges d'électrons et de protons entre certains résidus de l'enzyme et du substrat. Les groupes impliqués dans la réaction du site actif sont deux acides carboxyliques et un noyau imidazole (Parc *et al.*, 1997).



Figure 7 : Structure tridimensionnelle de l' α – 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).

Ce mécanisme est une caractéristique de l'enzyme et selon les conditions expérimentales (température, pH, taille et structure du substrat), l'enzyme peut utiliser l'un ou l'autre mécanisme et même une combinaison entre plusieurs mécanismes (Mazur et Nakatani, 1993; Nielson *et al.*, 2001):

- **Attaque aléatoire:** l' α -amylase hydrolyse aléatoirement les liaisons glucosidiques et libèrent deux fragments protéiques, séparément attaqués.
- **Attaque préférée:** l' α -amylase montre une préférence pour certaines liaisons dans le substrat.
- **Attaque répétitive ou multiple:** elle implique le déplacement de l'enzyme tout au long de la chaîne du substrat, pour l'hydrolyse des liaisons glucosidiques sans dissociation du substrat (Berry et Paterson, 1990 ; Scriban, 1999).

Fogarty et Kelly (1980), ont rapporté que les α -amylases sont des métallo-enzymes à calcium, qui intervient dans le maintien de la stabilité de la structure en acides aminés de cette enzymes (Figure 8).

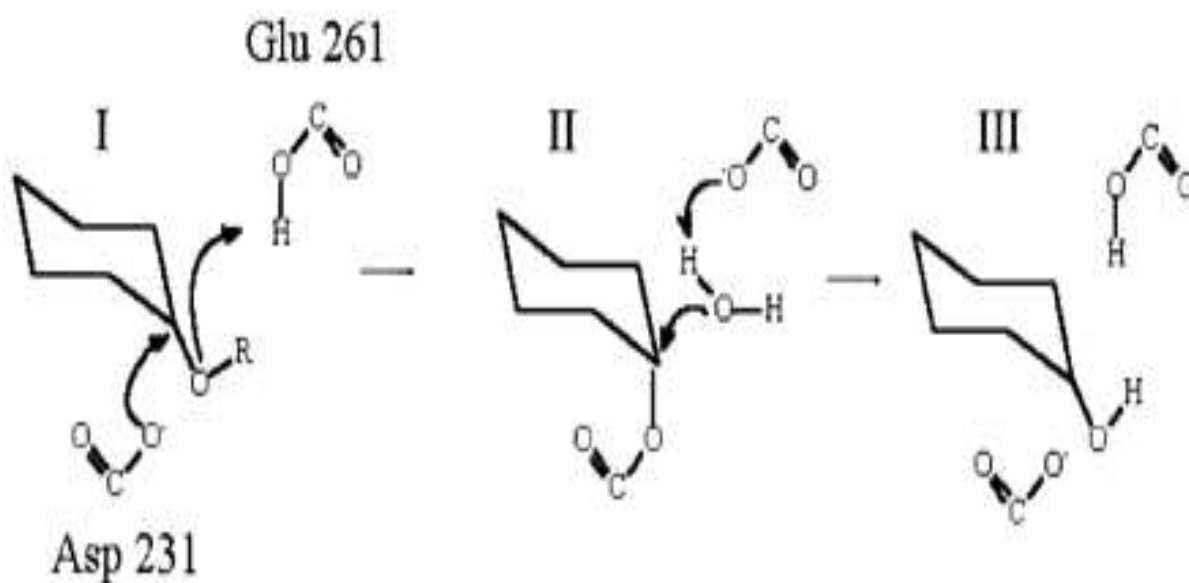


Figure 8 : Mécanisme catalytique des hydrolases glycosyliques (Nielsen *et al.*, 2001): (1) Protonation de l'oxygène glycosidique par le donneur d'hydrogène (Glu 261) et attaque sur le glucose (C1) par le nucléophile (Asp 231). Départ de la fin réductrice du substrat. (2) L'activation d'une molécule d'eau, clivage de la liaison covalente C1 Asp231. (3) Régénération des états initiaux de protonation.

2.6. Caractéristiques générales

2.6.1. Spécificité de substrat

Les unités de glucose dans la molécule d'amidon sont reliées par des liaisons osidiques α (1-4) par formation des chaînes hélicoïdales d'amylose, sur lesquelles de courtes chaînes de même constitution se branchent par des liaisons osidiques α (1-6) (**Pandey et al., 2000 ; Alais et al., 2008 ; Mercier, 1985**).

La production d' α -amylase chez certaines souches fongiques telles que *Aspergillus* sp, *Rhizopus* sp et *Penicilium* sp est contrôlée par l'amidon lors de l'induction de l'enzyme par son substrat naturel (**Leveau et Bouix, 1993 ; Nouadri 2011**).

2.6.2. Effet de la température sur l'activité de α -amylase

Les α -amylases ont une température optimale comprise entre 25-70°C, avec une grande stabilité thermique des α -amylases bactériennes (**Larpent-gourgaud et Sanglier, 1992**).

Vertiani et al. (1998) ont rapporté que la température optimale des α -amylases bactériennes varie entre 50-90°C, accompagnée avec une résistance thermique à des températures très élevées chez des souches thermophiles. Cependant, la température optimale des α -amylases fongiques varie entre (40-60°C) (**Lucio et al., 1996**).

2.6.3. Effet de pH sur l'activité de α -amylase

Les α -amylases sont généralement stables à des valeurs de pH comprises entre 4-9. Cependant, l'activité des α -amylases fongiques est optimale à des valeurs de pH comprises entre 4-5 (**Larpent-gourgaud et Sanglier, 1992**). Par ailleurs, **Lucio et al., (1996)** ont rapporté que l'activité de l' α -amylase chez la souche *Rhizopus oryzae* est optimale à une valeur de h comprise entre 4 et 6,5.

2.6.4. Effet des ions métalliques sur l'activité de α -amylase

Les α -amylases sont des métalloprotéines fortement liées à la présence des ions métalliques de Ca^{2+} , qui intervient vraisemblablement comme activateur allostérique (**Egas et al., 1998**).

Le calcium est responsable dans le maintien de la conformation optimale de l'enzyme et leur stabilité vis-à-vis de la dénaturation thermique et leur dénaturation par protéolyse (Savcheko *et al.*, 2002 ; Peixoto-Nogueira *et al.*, 2008 ; Nigam *et al.*, 1995 ; Mc tigue *et al.*, 1995).

L'activité enzymatique de l' α -amylase reste non modifiée en présence des ions K^+ , Na^+ , NH_4 , mais elle est fortement inhibée par l'éthylène diamine tétra acétate (EDTA) et les métaux lourds (Igarashi *et al.*, 1998 ; Talamond *et al.*, 2002).

2.7. Production d' α -amylase

Jensen *et al.*, 1987 ; Haasumet *et al.*, 1991 ; Nguyen *et al.* 2000 ont rapporté sur l'isolement, la caractérisation et la purification des amylases extracellulaires. Des α -amylases microbiennes sont actuellement industriellement produites, par de nombreuses espèces chez *Bacillus*, *Aspergillus* et *Rhizopus*, lors de la fermentation submergée et semi- solide (Niehaus *et al.*, 1999 ; Bel'en *et al.*, 2006).

Actuellement, la production d'amylase mis en œuvre utilise des procédés biotechnologiques à moindre coût, par l'utilisation de déchets organiques comme substrat de fermentation, tels que la pulpe de betterave, les déchets d'oranges, les produits céréaliers, les rebuts des dattes et le lactosérum (Baldwin *et al.*, 1986 ; Diomi *et al.*, 2008 ; Mahmoud *et al.*, 1998 ; Hart *et al.*, 1991 ; Pascal et Thomas, 1990; Açourène et Ammouche, 2011 ; Ait Kaki *et al.*, 2012).

Le milieu de fermentation utilisé contient d'une manière générale de l'amidon, considéré comme meilleur inducteur de la production de l'enzyme l'amylase bactérienne (*Lanuginosus thermomyces*) et fongique (*Aspergillus* et *Penicillium*) (Leveau et Bouix, 1993).

2.8. L'avantage de la production des enzymes par les microorganismes

Le développement de la microbiologie a permis de mieux comprendre les systèmes de la synthèse des enzymes chez les micro-organismes, dont la production industrielle est potentiellement orientée vers les procédés biotechnologiques.

Les principaux avantages de la production des enzymes par procédés de fermentation par rapport aux enzymes d'extraction sont les suivant :

- Une production indépendante des contraintes saisonnières et géographiques ;
- Une possibilité d'utilisation de matières premières bon marché ;
- Des rendements de production pouvant être augmentés de façon importante par l'amélioration des souches microbiennes par génie génétique et l'optimisation des conditions de fermentation (**Scriban, 1982**).

2.9. Mesure de l'activité de l'amylase

L' α -amylase est généralement explorée lors de l'utilisation de l'amidon soluble comme substrat. Cette enzyme catalyse l'hydrolyse des liaisons glycosidiques α -1,4 de l'amidon et produit du glucose, des dextrines et des dextrines limites. La réaction est accompagnée par une augmentation considérable du taux de sucres et la diminution de l'intensité de la couleur du complexe (amidon-lugol) du substrat traité et la diminution de la viscosité de la suspension d'amidon (**Gupta et al., 2003**).

2.9.1. Diminution de l'intensité du complexe amidon-iode

L'amidon forme un complexe bleu foncé avec l'iode. Lors de l'hydrolyse progressive, l'amidon se transforme en rouge brun. De nombreux protocoles sont décrits pour la détermination quantitative de l'amylase. A cet effet, cette méthode détermine l'activité dextrinisation de l'amylase en termes de diminution de la réaction de couleur d'iode.

2.10. Application industrielles et biotechnologiques des amylases

En raison de leur productivité et leur thermostabilité les amylases sont largement utilisées dans l'industrie alimentaire, pharmaceutique, textile, papeterie, et détergent (**Behal et al., 2006**). Lors de l'arrivée de nouvelles frontières en biotechnologie, le spectre d'application des amylases s'est élargi vers d'autres domaines tels que la chimie clinique, médicale et analytique (**Pandey et al., 2000**).

2.10.1. En boulangerie

L'addition d'une petite quantité d'amylase dans la farine, augmente considérablement la production du gaz carbonique lors de la fermentation qui conduit à la production d'un pain aéré (**Pandey et al., 2000**).

2.10.2. En sucrerie

La présence d'une contamination amylacée dans les sirops de canne augmente considérablement leur viscosité et par conséquent l'inhibition du processus de cristallisation. Cet inconvénient est éliminé par l'introduction d'une petite quantité d'amylase bactérienne immobilisée à une température supérieure à 80°C (**Roa et Satyanarayana, 2003**).

2.10.3. En textile

A raison de leur stabilité à la chaleur, les amylases bactériennes conviennent très bien à l'industrie de textile par la dégradation de l'apprêt amylacé lors du désencollage (**Ito et al., 1998**).

2.10.4. Détergents

Actuellement, environ 25% des détergents en poudre commercialisés, contiennent des enzymes industrielles telles que les protéases, les amylases et les pectinases, qui interviennent dans la décomposition des taches.

En effet, l'amylase dégrade les taches d'amidon en petites molécules telles que les oligosaccharides et les dextrines, libérés sous l'action des enzymes d'hydrolytiques (**Igarashi et al., 1998**).

2.10.5. Domaine médicale et pharmaceutique

Dans le domaine pharmaceutique, les amylases sont utilisées comme agent anti-inflammatoire et contre les dyspepsies et les fermentations intestinales (**Sanofi, 1996**). Dans le domaine médical, le taux de l' α -amylase est utilisé dans la détection de certaines maladies telles que l'insuffisance cardiaque, oreillons, cancer du pancréas (**Pandey et al., 2000**).

Chapitre III

3. Lactosérum

3.1. Généralités

Le lactosérum est le liquide jaune pâle qui reste après la coagulation du lait lors de la fabrication du fromage ou de la caséine (**Kosikowski, 1979**). Selon son degré d'acidité, 2 types sont distingués : le **lactosérum acide** et le **lactosérum doux** (**Tableau 5**). Leur composition chimique varie considérablement d'un lait à un autre selon la source du lait, les traitements chimiques et les procédés de fabrication (**Laplanche, 2004**). Sa principale caractéristique est qu'il contient beaucoup de lactose qui représente une principale source de carbone pour les microorganismes qui intéressent l'industrie agroalimentaire.

Le lactosérum contient également des protéines solubles ou protéines sériques qui restent en solution quand on précipite le lait, et des substances azotées non protéiques résultant de l'action des enzymes coagulantes ou du métabolisme des bactéries. Aussi il contient des sels minéraux tels que : Ca^{2+} , P, Na^+ , Cl^- , K^+ . Ces trois composants constituent un milieu favorable pour le développement des microorganismes (**Veissyere, 1975**).

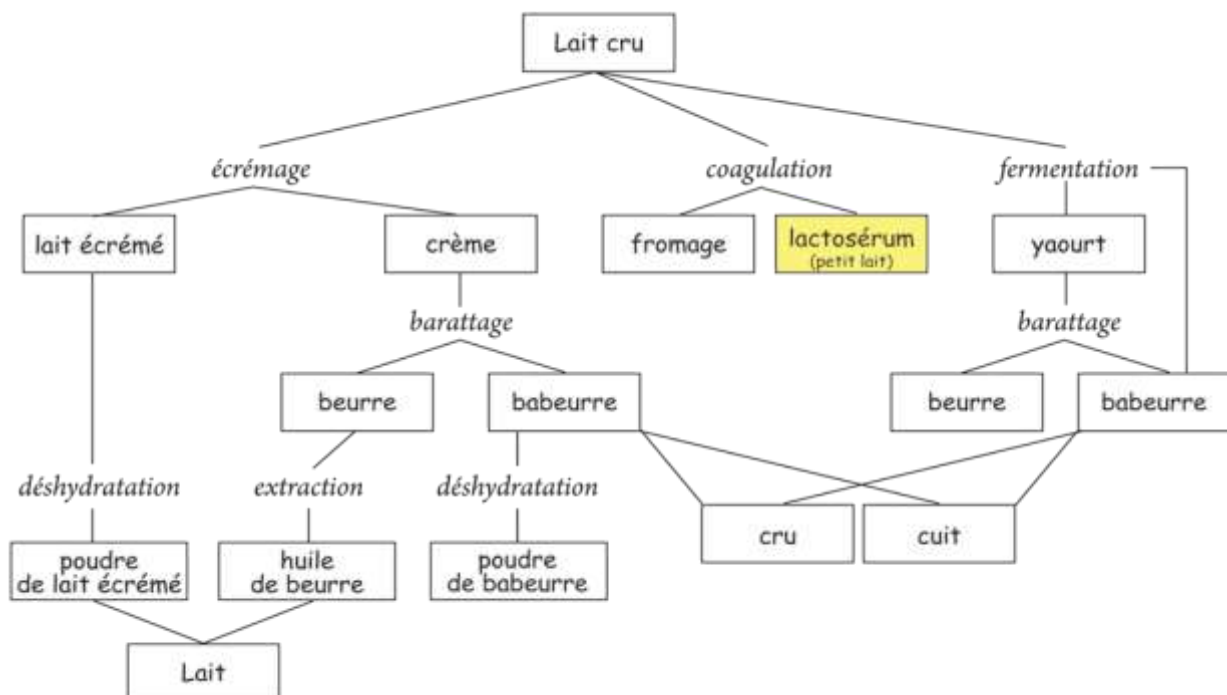


Figure 9 : Place du lactosérum dans les produits issus du lait (**Bourgeois et Larpent, 1996**).

3.2. Sources industrielles du lactosérum

Les deux voies industrielles de transformation du lait nature aboutissant au lactosérum sont la beurrerie et la fromagerie.

3.2.1. La beurrerie

C'est le procédé qui conduit à la fabrication du beurre à partir du lait nature. Après écrémage et extraction de la caséine par précipitation on obtient du « lactosérum écrémé ».

3.2.2. La fromagerie

C'est le procédé de la fabrication des fromages à partir du lait nature qui subit des processus de coagulation et de synérèse aboutissant d'une part à une phase solide le « fromage », d'une autre part à une phase liquide « le lactosérum ».

Tableau 5 : Différents types de lactosérum (Adrian *et al.*, 1991).

Degré d'acidité	Type	pH	Production
< 18° D	Lactosérum doux	6,5 - 6,7	Fromagerie à pâte pressée Fromagerie à pâte cuite Caséinerie présure.
> 18° D	Lactosérum acide	4,5 - 5	Fromagerie à pâte fraîche Fromagerie à pâte molle Caséinerie acide.

Le lactosérum doux est riche en lactose et en potassium. Dans le lactosérum acide une partie du lactose est transformée en acide lactique ; le lactosérum doux est pauvre en calcium (reste dans le caillé pour participer à la coagulation des protéines), alors que le lactosérum acide est riche en calcium (Morr *et al.*, 1993).

Tableau 6 : Composition chimique du lactosérum (Alais, 1981).

Paramètres	Lactosérum doux (g/l)	Lactosérum acide (g/l)
Acidité (° D)	13,83	67,16
Humidité (%)	93,5	93
Matières sèches	55 - 75	55 - 65
Cendres	4 - 6	6 - 8
Lactose	40 - 57	40 - 50
Matière azotée totale	7 - 11	4,8 - 10,5
Matière grasse	0 - 5	0 - 2
Acide lactique	0 - 0,3	7 - 8
Chlorure	2,3 - 2,9	2,0 - 2,2
Calcium	0,4 - 0,6	1,2 - 1,4
Phosphore	0,4 - 0,7	0,5 - 0,8
Potassium	1,4 - 1,6	1,2 - 1,5

3.3. Pouvoir polluant du lactosérum

Pendant longtemps, le lactosérum a constitué un effluent de l'industrie fromagère. Par sa composition riche en matière organique, son rejet dans l'environnement constitue une source de pollution à cause de sa demande biochimique en oxygène qui est très élevée entre **32000 à 60000 mg/L, (Cheryan, 1998)**. Le lactosérum engendre une pollution organique importante : **1L** correspond à environ **85%** de la pollution journalière générée par un habitant (**Laplanche et al., 2006**). Enfin si on se réfère à la composition du lactosérum, on y retrouve des composants d'intérêt d'où la possibilité de valorisation (**Bergel et al., 2004**).

3.4. Valorisation

Le lactosérum (80 % du lait) pose un problème majeur d'eau résiduaire dans les industries laitières mais avec les progrès des sciences on a réestimé la valeur nutritive

de ce sous-produit (**Alais, 1975**). Son utilisation s'étale sur différents domaines, en particulier le domaine médical, alimentaire et biotechnologique.

3.4.1. Domaine médical

L'utilisation des fractions protéiques du lactosérum est efficace contre les maladies du cœur, les ulcères, les cancers (**Berry, 2000**).

3.4.2. Domaine alimentaire

Le lactosérum est utilisé dans l'alimentation du bétail et l'alimentation humaine pour les diabétiques ou les sujets souffrant de malnutrition (**Dryer, 2001**).

3.4.3. Domaine biotechnologique

le lactosérum est un bon milieu de culture pour les microorganismes utilisant le lactose (**Alais, 1975**).

- **Les levures** : *Saccharomyces cerivisiae*, *Candida kefir* et *Kluveromyces fragilis* (**Gana et Touzi, 2001 ; Longhi et al., 2004**).
- **Les bactéries** : *Lactobacillus bulgaricus* et *Lactobacillus lactis* pour la production d'acide lactique (**Mehaia et Cheryan, 1986**).
- **Les moisissures** : *Penicillium camemberti* producteur de protéases, *Mucor miehei* et *Endothia parasitica* produisant des acidoprotéases (**Mechakra et al., 1999 ; Seker et al., 1999**).

MATERIELS

ET

METHODES

Matériel et méthodes

1. Objectifs

L'objectif de ce présent travail est l'isolement, le criblage d'une large gamme de levures productrices de l'amylase thermostable, isolées à partir de sol de deux régions, situées dans le Sud Ouest et le Sud Est Algérien (**Bechar** : Oued Guir et **Ouargla** : Hassi Messaoud), cultivées sur un milieu de culture à base de lactosérum

Les différentes démarches entreprises dans la partie pratique de la thèse sont récapitulées comme suit :

- ✓ Isolement des souches levuriennes productrices de l'amylase.
- ✓ Caractérisation de la souche la plus performante isolée, sélectionnée productrice de l'amylase par l'étude de leur morphologie, leur caractère physiologique et biochimique.
- ✓ Sélection de la souche productrice de l'amylase, dotée d'un important pouvoir de fermentation du lactosérum.
- ✓ Etude de la thermostabilité de la souche isolée, sélectionnée productrice de l'amylase.
- ✓ Optimisation des paramètres impliqués dans le processus de production des amylases.

2. Isolement des souches levuriennes productrices de l'amylase

2.1. Echantillonnage

Une pesée de 100 grammes des sols prélevées de différentes profondeurs (5, 10, 20 et 40 cm), est introduite dans des sachets en plastique stérile. Les échantillons sont ensuite transportés dans une glacière à une température de 4°C au sein du laboratoire de recherche de Microbiologie Moléculaire, Protéomics et santé au sein de la Faculté de Sciences de la nature et de la vie de l'université Djillali Liabes Sidi Bel Abbès afin de procéder les analyses physicochimiques et microbiologiques (**Rodríguez *et al.*, 2005**).

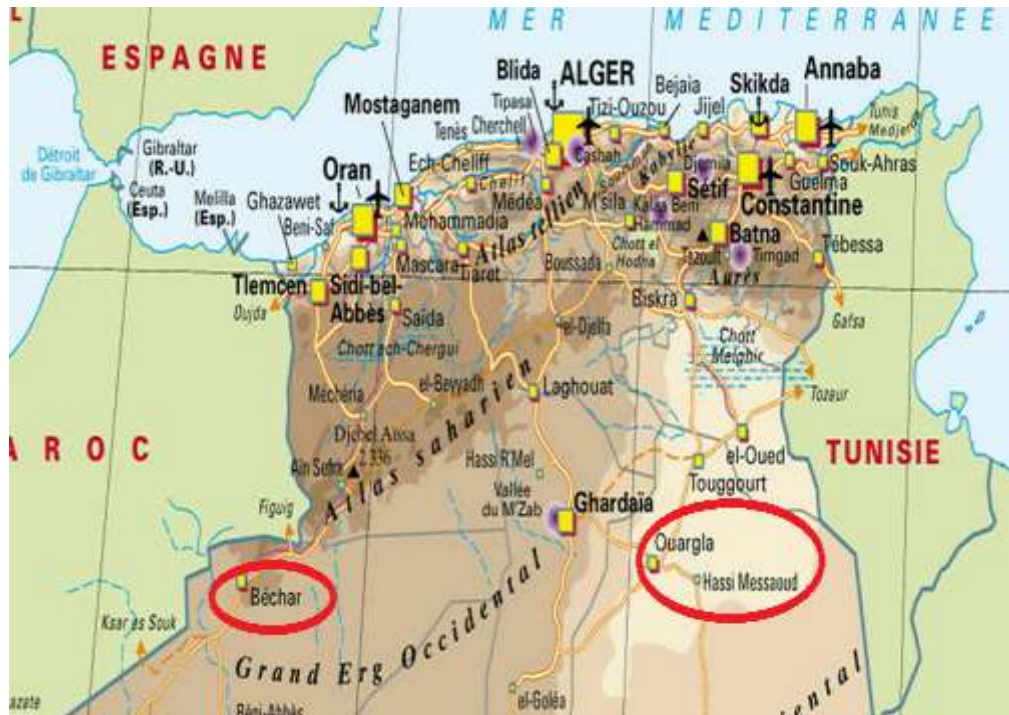


Figure 10 : Présentation des sites de prélèvement des échantillons du sol, effectués à partir de deux régions, situées dans le Sud Ouest et le Sud Est Algérien (**Béchar** : Guir et **Ouargla** : Hassi Messaoud).

2.2. Détermination des valeurs du pH des échantillons

La détermination des valeurs du pH des échantillons prélevées de différentes sites (**Béchar** : Oued Ghir et **Ouargla** : Hassi Messaoud), est effectuée dès l'arrivée au laboratoire de recherche de Microbiologie Moléculaire, Protéomique et santé. Cette technique consiste la préparation d'une suspension par l'introduction d'une pesée de 10 g de sol dans un volume de 90 ml d'eau distillée stérile et la mesure de la valeur du pH de la solution à l'aide d'un pH mètre étalonné avec les deux solutions de 2 N NaOH et de 2 N HCl (**Davet et Rouxel, 1997**).

2.3. Isolement des levures

Une pesée d'un gramme de sol prélevé est introduite dans un volume de 9 ml d'eau physiologique stérile, homogénéisé à l'aide d'un vortex pendant une période de 10 minutes. Des dilutions décimales (10^{-1} - 10^{-6}) sont préparées à partir de la solution mère, étalées sur milieux de cultures gélosées de **Sabouraud** et **YMA**, additionnée d'une

concentration de 0,04 g/l de gentamicine, permettant l'inhibition de la prolifération des bactéries à Gram positifs et négatifs. La morphologie et l'homogénéité des cellules sont étudiées lors de la coloration des colonies obtenus au bleu de méthylène, et leur observation à l'aide d'un microscope optique avec un grossissement de 40X (Ulacio *et al.*, 1997 ; Tsuyoshi *et al.*, 2004 ; Hammer *et al.*, 1998 ; Tsuyoshi *et al.*, 2004 ; Harrigon et Mc lace, 1976).

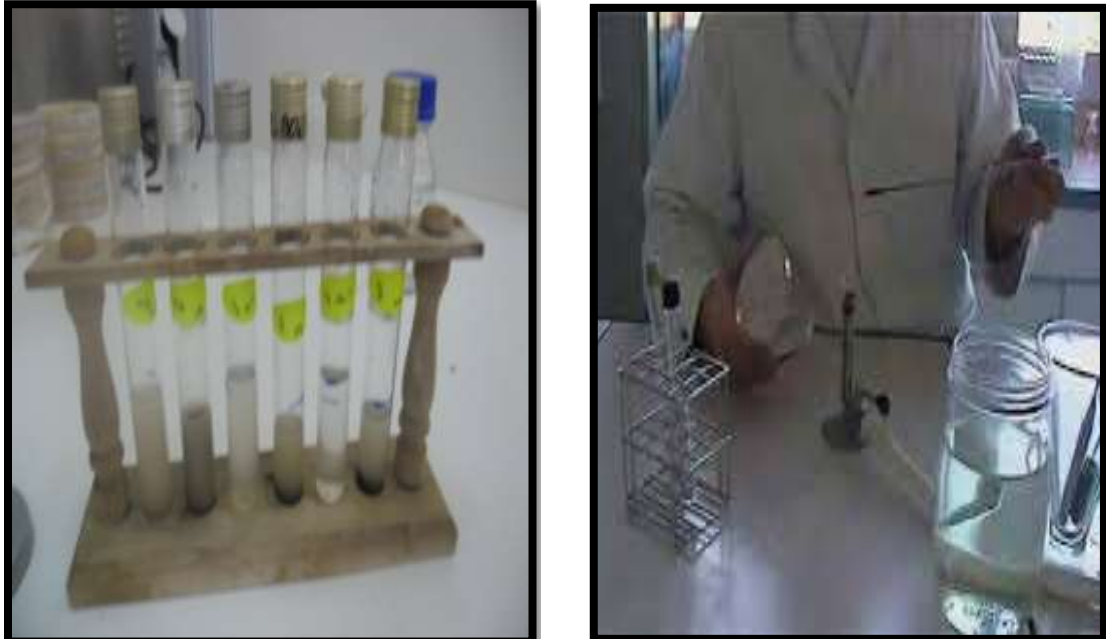


Figure 11 : Présentation de la préparation des dilutions décimales et technique d'ensemencement des souches levuriennes sur milieux de cultures gélosées de Sabouraud et YMA, additionnée d'une concentration de 0,04 g/l de gentamicine.

2.4. Conservation des souches levuriennes

La conservation des souches levuriennes isolées, sélectionnées productrices de l'amylase consiste à procéder des repiquages successifs sur gélose incliné de PDA ou MA, l'incubation à une température de 30°C pendant un intervalle de temps de 3-5 jours et la conservation à une température de 4°C (UI-Haq *et al.*, 2002).



Figure 12: La conservation des souches levuriennes isolées, sélectionnées productrices de l'amylase, ensemencée dans des tubes à essai, contenant un milieu de culture gélosé de PDA ou MA, incubé à une température de 30°C pendant 3-5 jours

2.5. Sélection des souches productrices de l'amylase

La sélection des souches productrices de l'amylase est effectuée sur un milieu de culture **AAM** (Amylase Activity Medium), ajusté à une valeur de pH de 5. Les boîtes de Pétri sont ensuite incubées à une température de 30°C pendant un intervalle de temps de 2-3 jours. La mise en évidence de l'activité de l'amylase est effectuée par l'inondation de la surface de la gélosé avec une solution de lugol. Une lecture positive de la production de l'amylase se manifeste par l'apparition d'un halo clair autour de la colonie ensemencée. Les diamètres des zones d'hydrolyses de l'amidon formés sont mesurés pour la sélection des souches productrices de l'amylase (**Fossi *et al.*, 2009 ; Tatsinkou *et al.*, 2005**).

3. Identification des souches sélectionnées productrices de l'amylase

L'identification des souches isolées, sélectionnées productrices de l'amylase est effectuée selon les techniques décrites par **Lodder (1971)** et **Kreger-Van (1984)**.

3.1. Etude des caractères cultureux

L'étude des caractéristiques culturelles des souches isolées, sélectionnées productrices de l'amylase est procédée par l'observation des cultures, inoculées sur des milieux de cultures liquides (**YM**, **YPG** et **YG**) et sur milieux solides inclinés (les mêmes gélosés à 2%), incubées à des températures comprises entre 25-28°C, pendant un intervalle de temps de 3-5 jours, puis examinées quotidiennement pendant 4 semaines. L'observation consiste l'étude de l'aspect des cultures, la couleur, la texture et la forme des colonies.

3.2. Etude des caractères morphologiques et cellulaires

L'étude des caractères morphologiques des souches isolées, sélectionnées productrices de l'amylase est effectuée par l'observation au microscope optique avec un grossissement de 40X et 100X lors de la coloration des cellules avec le bleu de méthylène.

•Morphologie cellulaire normale et mode de multiplication végétative

L'étude microscopique de cellules permet de visualiser la forme, la taille (oculaire micrométrique), l'arrangement et le mode de division des cellules.

•Formation de mycélium

La mise en évidence de la formation de mycélium est effectuée sur milieu de culture gélosé de PDA, déposé à l'aide d'une pipette stérile sur une lame propre, préalablement stérilisée dans une boîte de Pétri. Les souches levuriennes isolées, sélectionnées productrices de l'amylase sont ensuite ensemencées en strie longitudinale, incubées à une température de 25-28°C pendant un intervalle de temps de 3-5 jours et l'observation microscopique est effectuée avec un grossissement 40X et 100X.

•Caractéristiques sexuelles

Lorsque les souches levuriennes isolées, sélectionnées productrices de l'amylase est ascoporogène, la mise en évidence de la sporulation est effectuée sur trois milieux de culture le milieu de Mac Clary, Fowells et Gordkowa (**Annexe A**).

Les tubes à essai inclinés, contenant les milieux de culture conditionnés sont ensemencés en surface à partir d'une pré-culture de la phase exponentielle de croissance dans un milieu de culture liquide (ME) (**Annexe A**), incubés à une température de 20°C pendant 8-30 jours. Des observations microscopiques régulières sont effectuées pour la visualisation de la présence d'asques et leur forme, le nombre et la forme des ascospores.

3.3. Etude des caractères biochimiques et physiologiques

Les caractéristiques biochimiques et physiologiques des souches isolées, sélectionnées productrices de l'amylase sont explorées par l'étude de la fermentation des substrats carbonés et l'assimilation des substrats azotés.

•Fermentation des sucres

La mise en évidence de la fermentation des sucres est effectuée lors de l'inoculation des souches isolées, sélectionnées productrices de l'amylase dans des tubes à essai stériles, contenant le milieu de culture eau de levure (extrait de levure à une concentration de 0,5% dans l'eau), additionné de différentes sources de carbone telles que le glucose, le maltose, le fructose, le saccharose, le lactose, le xylose, le galactose et l'amidon à une concentration de 2%. Les tubes à essai stériles menus d'une cloche de Durham sont ensemencés avec une suspension de levure, incubés à une température de 25-28°C pendant 2-21 jours. Une lecture positive de la fermentation se manifeste par l'apparition du gaz dans la cloche de Durham (**Wickerham et Burton, 1948 ; Wickerham, 1951**).

•Assimilation des composés azotés

La mise en évidence de l'assimilation des composés azotés est effectuée lors de l'inoculation des souches isolées, sélectionnées productrices de l'amylase dans des

boîtes de Pétri stériles, contenant le milieu de culture synthétique, dépourvu de source d'azote. La source d'azote (le nitrate de potassium) est déposée à la surface du milieu de culture sous forme de cristaux, incubés à une température de 25°C pendant 3 jours. Le sulfate d'ammonium est utilisé comme témoin. Une lecture positive de la dégradation de la source d'azote se manifeste par le virage de la couleur du milieu de culture.

4. Détermination de la composition chimique du lactosérum

Le lactosérum provient de la fabrication de fromage « Camembert », au niveau de l'unité de production GIPLAIT de la région de Sidi Bel Abbès. Les échantillons sont prélevés dans des bouteilles en plastique, conservés dans un congélateur à une température de -20°C.

4.1. Détermination de la matière sèche

La méthode consiste l'introduction et le séchage d'un volume de 10 ml du lactosérum dans une capsule préalablement séchée et tarée dans une étuve à 105°C jusqu'à l'obtention d'un poids constant (plus de 5 heures). La différence de masse avant et après séchage sert de mesurer la teneur en matière sèche. Ces teneurs sont exprimées en pourcentage de masse, calculées par la formule suivante (**Afnor, 1986**) :

$$MS = (M_2 - M_1) \times (100/V) \text{ mg/l}$$

M_1 : masse en gramme de la capsule vide.

M_2 : masse en gramme de la capsule et du résidu.

V : volume de l'échantillon en ml.

$MS (\%) = 100\% - H (\%)$. / H : humidité.

4.2. Détermination des Taux de cendres

Les cendres totales permettent de juger la richesse en éléments minéraux (**Audigie et al., 1984**). Une pesée de 5-10 ml est introduite dans un creuset de porcelaine calciné, chauffée prudemment jusqu'à ce que l'échantillon devienne noir et sec et qu'il n'y ait plus de risque de perte. Ensuite, l'échantillon est calciné le dans un four à moufle à une température de 600°C pendant 1h30 jusqu'à l'obtention de cendre grisâtre ou

blanchâtre. L'échantillon est refroidi dans un dessiccateur et le creuset est pesé. Le procédé est réalisé plusieurs fois jusqu'à obtention d'un poids constant (**AOAC., 2000**). Les résultats sont exprimés en pourcent de la substance sèche, calculés par la formule suivante :

$$M_m(\%) = [(M_2 - M_1) / M_0] \times 100$$

D'où :

M_m : Teneur en cendre (%) ;

M₀ : Masse initiale du MC (g) ;

M₁ : Masse du creuset vide (g) ;

M₂ : Masse du creuset + cendre (g).

4.3. Détermination de l'acidité (Dornic)

La méthode de dosage a lieu par titrimétrie de l'acide lactique à l'aide de NaOH N / 9 en présence de phénol phtaléine comme indicateur coloré de pH (**Lecoq, 1965**).

4.4. Détermination des valeurs du pH de lactosérum

La détermination du pH du lactosérum s'effectue par une lecture directe à l'aide d'un pH mètre préalablement étalonné avec les deux solutions de 2 N NaOH et de 2 N HCl.

4.5. Dosage de l'azote total

La détermination de l'azote totale des échantillons de sol prélevés a été effectuée par la méthode de **Kjeldhal, (1883)**. Cette méthode se déroule en deux étapes : La minéralisation consiste la transformation de l'azote organique en une forme minérale (des sulfates d'ammonium). La réaction est réalisée dans un milieu à forte concentration en acide sulfurique et en présence d'un catalyseur, le K₂SO₄, qui permet l'augmentation et la stabilisation de la température de la réaction. Lors de la deuxième étape, la titration, le milieu réactionnel est alcalinisé par l'addition de l'hydroxyde de sodium, la solution obtenue est distillée et l'ammonium entraîné par la vapeur est condensé puis collecté dans une solution d'acide borique additionné de quelques goutte d'un indicateur coloré. La solution résultante est, enfin, titrée par une solution d'acide sulfurique (**Hamon et al., 1990**)

4.6. Dosage des sucres totaux

Les sucres totaux sont déterminés selon la méthode de **Dubois (1956)** dont le principe repose sur la réaction suivante: l'acide sulfurique concentré provoque à chaud le départ de plusieurs molécules d'eau à partir des oses. Cette déshydratation s'accompagne par la formation d'un hydroxy-méthyl furfural (HMF) dans le cas d'hexose et d'un furfural dans le cas d'un pentose. Ces composés se condensent avec le phénol pour donner des complexes colorés (jaune-orangé). L'intensité de la coloration est proportionnelle à la concentration des oses. La densité optique est mesurée à 488 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (**Dubois et al., 1956**).

4.7. Dosage de la matière grasse

La méthode utilisée dans ce travail est celle de Wiseman. L'acide chlorhydrique libère à chaud la matière grasse des protéines et d'autres substances qui est séparée ensuite par filtration. Après séchage, elle est extraite à l'éther de pétrole dans un appareil de Soxhlet, les extraits lipidiques étherés sont séchés puis pesés (**Lecoq, 1965**).

4.8. Dosage des sels minéraux

• Calcium

Après minéralisation de l'échantillon, le calcium est précipité sous forme d'oxalate de calcium. Après séparation et lavage du précipité, l'acide oxalique formé est dosé, en milieu sulfurique au moyen d'une liqueur titrée de permanganate de potassium N/2 (**Lecoq, 1965**).

• Chlore ou chlorures

Les chlorures présents dans un aliment sont exprimés soit en chlore soit en chlorures titrés par la méthode de Charpentier et Volhard (**Lecoq, 1965**).

5. Production de l'enzyme

5.1. Milieu de base

Le milieu de culture utilisé pour la culture des levures isolées, sélectionnées productrices de l'amylase est essentiellement composé de lactosérum déprotéiné par la technique de précipitation des protéines lors de l'ajustement de la valeur du pH à 4,6 et le chauffage dans un bain-marie à une température de 100°C pendant un intervalle de 2 heures. Le filtrat est ensuite récupéré par centrifugation à une vitesse de 4180 g pendant 10 min. Le surnageant récupéré est stocké dans des flacons fermés hermétiquement à une température de 4 °C.

5.2. Préparation du milieu de base

Le milieu de culture de base est préparé à différentes concentrations en lactosérum déprotéiné, afin de déterminer la concentration optimale pour la production de l'amylase. Par ailleurs, le milieu de culture est additionné de l'amidon à une concentration de 1%, puis ajusté à une valeur de pH de 5 (UI-haq *et al.*, 2002).

5.3. Culture de la fermentation

Les souches isolées, sélectionnées productrice de l'amylase, sont inoculées dans des Fioles Erlenmeyer d'un volume de 250 ml, contenant 50 ml de milieu de culture, ajusté à une valeur de pH de 5, avec une biomasse de $2,6 \times 10^6$ cellules/ ml, incubées avec agitation 180 rpm à une température de 30°C pendant 72 heures (UI-haq *et al.*, 2002).

6. Etude du suivi de la cinétique de l'amylase

L'étude du suivi de la cinétique de l'amylase chez les souches isolées, sélectionnées productrices de l'amylase est effectuée par l'inoculation d'un volume de 0,5 ml de l'amylase brute produite par mode de fermentation submergée, avec une concentration de 1% de l'amidon, additionnée à un volume de 0,5 ml d'une solution de 0,1 M de tampon phosphate, ajustée à une valeur de pH de 5.

La réaction enzymatique est amorcée par l'incubation du mélange réactionnel dans un bain marie à une température de 40°C pendant un intervalle de temps de 30 min, stoppée par l'ajout d'un volume de 1 ml du réactif de DNS et incubé ensuite à une température de 100°C pendant 5 minutes et l'activité de l'amylase est mesurée par la méthode de la DNS (Ifraan *et al* , 2012).

La lecture est effectuée par mesure de l'absorbance à une longueur d'onde de 488 nm et la concentration en sucres réducteurs est déterminée à partir de la courbe d'étalonnage du glucose, dont les concentrations varient de (0-100 µg/ml) (Annexe B).

7. Etude du suivi de la cinétique de croissance des souches sélectionnées productrices de l'amylase

L'étude du suivi de la cinétique de croissance des souches isolées, sélectionnées productrices de l'amylase est réalisée dans des Fioles Erlenmeyer de 250 ml, contenant un volume de 50 ml du milieu de culture liquide de production, et l'incubation avec une agitation de 180 rpm, à une température de 30°C pendant un intervalle de temps de 96 heures. Les milieux sontensemencés par une suspension de cellules à raison de $2,6 \times 10^6$ cellules/ ml, mesurée à une longueur d'onde de 488 nm et des prélèvements d'un volume de 1 ml, à des intervalles de temps réguliers de 4 heures sont effectués (UI-haq *et al.*, 2002).

8. Cinétique de production de l'amylase de la souche sélectionnée

L'étude de la cinétique de production de l'amylase est réalisée en Erlensmyers de 250 ml à raison de 50 ml de milieu de base par erlen. Après stérilisation et ensemencement ($2,6 \times 10^6$ cellules/ml), les erlens sont incubés à 30°C pendant 96 heures sous agitation de 180 tours/min. Des prélèvements sont effectués régulièrement chaque 4 heures à partir des 3 essais expérimentaux réalisés. Après récupération de la biomasse par centrifugation, les paramètres suivants sont mesurés :

8.1. Mesure des valeurs du pH

La valeur du pH de l'extrait enzymatique est mesurée à l'aide d'un pH mètre étalonné avec deux solutions de 2 N NaOH, 2N Hcl.

8.2. Détermination de la biomasse

La biomasse des souches isolées, sélectionnées productrices de l'amylase est déterminée lors de leur inoculation dans un milieu de culture, incubés à une température de 30°C pendant 96 heures. La biomasse est récoltée par centrifugation à une vitesse de 4180 rpm pendant 10 minutes, rincée avec de l'eau distillée stérile, séchée dans une étuve, ajustée à une température 105°C pendant 30 minutes (Pedersen et Nielsen, 2000).

8.3. Dosage de l'activité amylasique

L'activité des amylases est mesurée selon la méthode de **Bernfeld (1955)**, basée essentiellement sur l'augmentation de l'intensité de la couleur du complexe (maltose libéré lors de l'hydrolyse de l'amidon-réactif DNSA), mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 540 nm.

L'activité enzymatique est exprimée par unité internationale (**U/ml**), correspondant à une μ mole du maltose libéré par minute et par millilitre du milieu alcalin et à chaud, l'acide 3,5-dinitrosalicylique (3,5-DNSA) jaune est réduit par les oses réducteurs en acide 3-amino 5-nitrosalicylique rouge orangé.

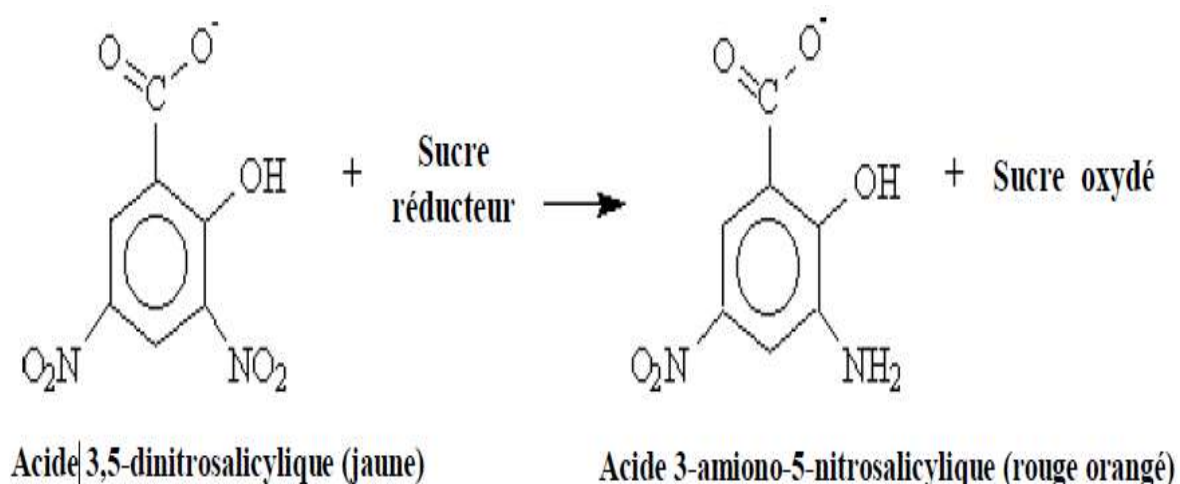


Figure 13 : Réduction de l'acide 3,5 dinitrosalicylique par un sucre réducteur lors du dosage de l'activité amylolytique par la méthode DNSA (**Maktouf et al., 2013**).

8.4. Dosage des protéines

Les protéines sont dosées selon la méthode décrites par **Lowry et ses collaborateurs (1951)**. Le sulfate de cuivre dans un milieu alcalin et le réactif de Folin-ciocalteu (acide phosphomolybdo-tungstique) en présence d'une protéine manifeste une coloration bleue.

Dans la réaction de Biuret : la présence de sulfate de cuivre dans un milieu alcalin permet le dosage des liaisons peptidiques des protéines.

Cependant, le réactif de Folin en présence la tyrosine et le tryptophane donne un complexe réduit de coloration bleu (**Lowry et al., 1965**) (**Annexe C**).

8.5. Dosage des sucres

Le phénol en présence d'acide sulfurique est employé pour la micro-détermination colorimétrique quantitative des sucres et de leurs dérivés méthylés, des oligosaccharides et des polysaccharides, selon la méthode originalement développée par **Dubois et al., (1956)**. La réaction entre le phénol et les sucres implique la déshydratation des sucres (hexoses) en 5-(hydroxyméthyl)-2-furaldéhyde (HMF), en présence d'acides forts. La réaction subséquente du phénol avec HMF mène à la formation d'un chromogène inconnu. En présence de ces deux réactifs, les sucres donnent une couleur jaune crème, dont l'intensité est proportionnelle à la concentration des sucres totaux. La densité optique est déterminée à 488 nm (**Imbeaul., 1997**).

Dans un tube à essai, un volume de 1 ml de la surnageant est ajouté à un volume de 1 ml de phénol (5%) et de 5 ml d'acide sulfurique concentré (95%). Le mélange est rapidement homogénéisé à l'aide d'un vortex, laissé à une température ambiante pendant 10 minutes, placé dans un bain marie pendant 20 minutes à une température 30°C, refroidi à la température ambiante (**Dubois., 1956**).

La lecture de l'absorbance s'effectue à une longueur de 488 nm et la concentration en sucres totaux est mesurée à partir de la courbe d'étalonnage de solution standard de saccharose (**Annexe B**). La couleur est stable à un intervalle de temps très long.

9. Optimisation des paramètres physicochimiques impliqués dans l'activité de l'amylase

9.1. Effet de la valeur du pH sur l'activité de l'amylase

La valeur du pH optimale de l'activité de l'amylase chez les souches isolées, sélectionnées est déterminée par l'inoculation d'un volume de 1 ml du surnageant avec de deux solutions tampon du phosphate monopotassique, dipotassique à une concentration de 0,1 M, contenant l'amidon, ajustée à différentes valeurs de pH (2,5-8,5). La réaction est amorcée par l'incubation du mélange réactionnel à une température de 30°C pendant 48 heures et l'activité de l'amylase est mesurée par la méthode de la DNS (**Ifraan et al., 2012**).

9.2. Effet de la température sur l'activité de l'amylase

La température optimale de l'activité de l'amylase chez les souches isolées, sélectionnées est déterminée par l'inoculation d'un volume de 1 ml du surnageant avec une solution tampon de phosphate de 0,1 M, contenant l'amidon, ajustée à une valeur de pH de 5. La réaction est amorcée par l'incubation du mélange réactionnel à des températures de (20-85°C) pendant 30 minutes et l'activité de l'amylase est mesurée par la méthode de la DNS (**Ifraan et al , 2012**).

9.3. Etude de la thermostabilité de l'amylase

L'étude de la stabilité thermique est explorée par mesure de l'activité amylasique lors de l'incubation de l'extrait enzymatique à différentes températures (60, 70, 80, 90, 100, 110 et 120°C) à des intervalles de temps de 0-190 min, avec des prélèvements toutes les 15 minutes (**Somogyi et Nelson, 1952**).

9.4. Effet des effecteurs sur l'activité de l'amylase

9.4.1. Effet de différentes sources de carbone sur l'activité de l'amylase

L'effet des sources de carbone sur la production de l'amylase est mise en évidence lors de l'inoculation des souches isolées, sélectionnées productrices de l'amylase dans un milieu de culture de production, additionné de différents source de carbone (glucose, glycogène, maltose, xylose, isomaltose, pullulane, amylopectine et l'amidon

soluble, de maïs, de pommes de terre et de blé) à une concentration de 1%, conditionné avec une cloche de Durham, incubés à une température de 25°C pendant 3 jours. Une lecture positive de la fermentation de la source de carbone se manifeste par le dégagement de CO₂ dans la cloche de Durham, perçu par la bulle d'air. L'activité amylasique est mesurée par la méthode DNS.

9.4.2. Effet de différentes sources d'azote sur l'activité de l'amylase

L'effet des sources d'azote sur la production de l'amylase est mise en évidence lors de l'inoculation des souches isolées, sélectionnées productrices de l'amylase dans un milieu de culture de production, additionné de différents composés organiques telles que (extrait de levure, la caséine, l'extrait de bœuf et la peptone et inorganiques (nitrate et sulfate d'ammonium) à une concentration de 0,2%, incubés à une température de 25°C pendant 3 jours. Une lecture positive de la dégradation de la source d'azote se manifeste par le virage de la couleur du milieu de culture.

9.4.3. Effet des ions métalliques, du SDS et de l'EDTA sur l'activité de l'amylase

L'étude de l'influence de divers ions métalliques sur la production de l'amylase chez les souches isolées, sélectionnées productrices est effectuée lors de l'inoculation des souches isolées, sélectionnées productrices de l'amylase dans un milieu de culture de production, additionné de différents ions métalliques tels que (Ca²⁺, Zn²⁺, Fe²⁺, Fe³⁺, Hg²⁺, Mn²⁺, Mg²⁺, Cu²⁺, Cd²⁺, Na⁺ et K⁺) à une concentration de (1 et 5 mM), ajustée à une valeur de pH 5, incubés à une température de 30°C pendant 3 jours.

Par ailleurs, l'effet de détergent (SDS) et de l'acide acétique tétra éthylène-diamine (EDTA) sont également testés et l'activité amylasique est mesurée par la méthode DNS.

RESULTATS

ET

DISCUSSION

1. Isolement et purification des souches levuriennes productrices d'amylase

L'isolement de souches levuriennes productrices d'amylase est effectué à partir des échantillons prélevés au niveau de différents sites Sud Ouest et Sud Est Algérien tels que l'Oued Guir (Béchar) et la région de Hassi Messaoud (Ouargla).

L'échantillonnage des différents prélèvements effectués sur les milieux de culture gélosés Sabouraud et YMA, ajusté préalablement à une valeur de pH de 5 ont permis l'isolement de 11 souches levuriennes (**LB₁, LB₂, LB₃, LB₄, LB₅, LH₆, LH₇, LH₈, LH₉, LH₁₀ et LH₁₁**).

L'estimation du nombre total des levures, isolées à partir du sol est de l'ordre de (**10^5 - 10^6 cellule/g**), ce que explique la présence d'un faible taux de levure lors de la comparaison avec la population de bactéries et des moisissures de (**4×10^6 - 7×10^7 cellule/g**) respectivement (**Phaff et Starmer, 1987**).

L'analyse des résultats ont montré que les prélèvements effectués à partir de profondeurs 5 et 10 cm se manifestent plus peuplées. Par ailleurs, les profondeurs (20 et 40 cm) sont dépourvues de population levurienne, ce qui suggère que les souches levuriennes sont autochtones au site (**Phaff et Starmer, 1987**).

La présence d'un faible nombre des souches levuriennes est expliquée par la valeur du pH du sol analysé, relativement basique 7,1, qui favorise prépondérante la prolifération des populations bactériennes. Des travaux antérieurs réalisés par (**Allen et Ahearn, 1987 ; Larpent et larpent-Gaurgaud, 1997**) ont rapporté que les levures préfèrent des milieux de cultures de valeurs de pH acides.

Outre, les conditions extrêmes de croissance, certaines souches levuriennes ont manifesté une importante résistance, due principalement à la présence de leur forme sporulante ou capsulée (*Lipomyces*, *Cryptococcus*, *Rhodotorula*). Par ailleurs, la présence de certaines espèces est fortement liée au dépôt des résidus animale ou végétale et à la structure du sol (**Golubev et al., 1984 ; Phaff et Starmer, 1987**).

L'analyse chimique des sols sahariens de Bechar et Ouargla effectuée ont révélé la présence d'un faible taux de **matières organiques** (inférieur à 3%) et par conséquent en **carbone** et en **azote**. Cependant, le sol de Bechar se manifeste très riche en matières organiques (2,54%) que celui d'Ouargla (1,62%). Par ailleurs, les deux sols

se manifestent riche en carbone avec un taux respectif de (14‰ et 9‰) et pauvre en azote avec un taux respectif de (0.69‰ et 0.5‰).

Les sols de Bechar et Ouargla ont présenté un rapport respectif de C/N= 20,2 et 18, ce qui favorise le développement microbien (Botton, 1991).

La mesure de la conductivité électrique (CE), a montré un degré de salinité du sol inférieure à 11, ce qui explique le faible taux de salinité des sols analysés.

Le taux de Mg^{2+} est relativement semblable chez les deux échantillons de sol (2,9 et 3,2%). A l'opposé, la concentration de sodium est relativement très élevée chez le sol d'Ouargla 8,5% par rapport au sol de Bechar 3,3% (Tableau 7).

Le faible peuplement de la population levurienne est fortement liée à la présence d'un faible taux en matière organique dans sites étudiés, la structure du sol qui exerce un effet négative sur leur distribution et à la température élevée d'Ouargla 50°C par rapport à Bechar 45°C (Phaff et Starmer, 1987).

Tableau 7 : Illustration des analyses chimiques des sols sahariens de deux régions de Sud Ouest et Sud Est Algérien prélevés de Béchar (Oued Guir) et Ouargla (Hassi Messaoud).

Site	Bechar	Ouargla
Profondeur (cm)	10 cm	10 cm
Matière organique (%)	2.54	1.62
Carbone (‰)	14	9
Azote (‰)	0.69	0.5
Saturation (%)	6.4	5.8
C.E (Salinité)	2.1	1.5
CO ₃ H (meq/l)	0.8	0.7
SO ₄ (meq/l)	10.3	12.1
Ca ²⁺ (meq/l)	6.9	10.8
Mg ²⁺ (meq/l)	2.9	3.2
Na ⁺ (meq/l)	2.5	8.4
K ⁺ (meq/l)	0.5	0.2

N.B : Les **meq/l** expriment le nombre de milliéquivalents d'un ion déterminé contenus dans 1000 millilitres de produit fini.



Figure 14 : Présentation de l'aspect macroscopique de la souche levurienne isolée LB₄ sur le milieu de culture Sabouraud, ajusté à une valeur de pH de 5, incubée à une température de 30°C pendant 72 heures.



Figure 15 : Présentation de l'aspect macroscopique de la souche levurienne isolée LB₃ sur le milieu de culture Sabouraud, ajusté à une valeur de pH de 5 incubée à une température de 30°C pendant 72 heures.



Figure 16 : Présentation de l'aspect macroscopique de la souche levurienne isolée LB₅ sur le milieu de culture Sabouraud, ajusté à une valeur de pH de 5, incubée à une température de 30°C pendant 72 heures.

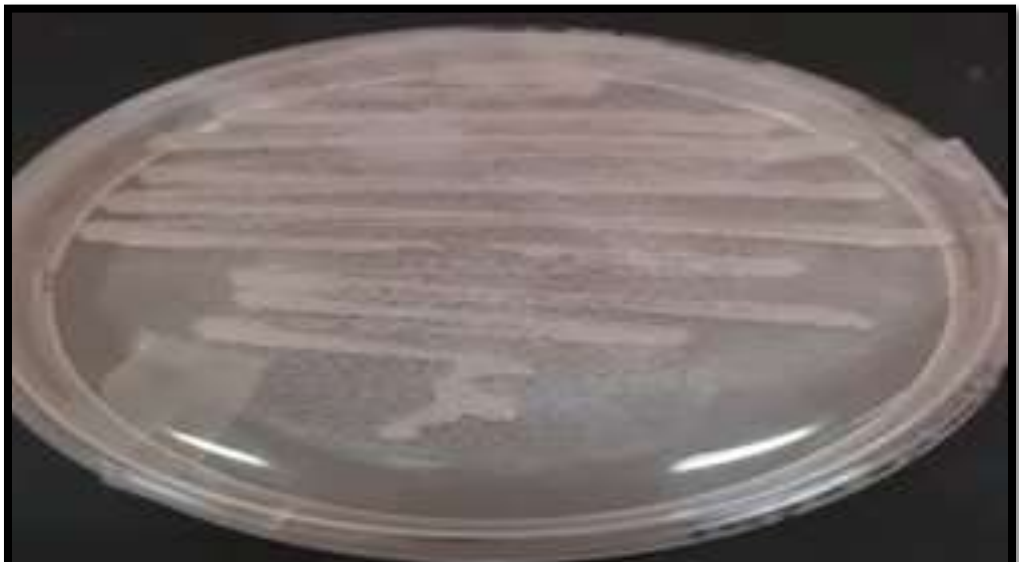


Figure 17 : Présentation de l'aspect macroscopique de la souche levurienne isolée LB₂ sur le milieu de culture Sabouraud, ajusté à une valeur de pH de 5, incubée à une température de 30°C pendant 72 heures.

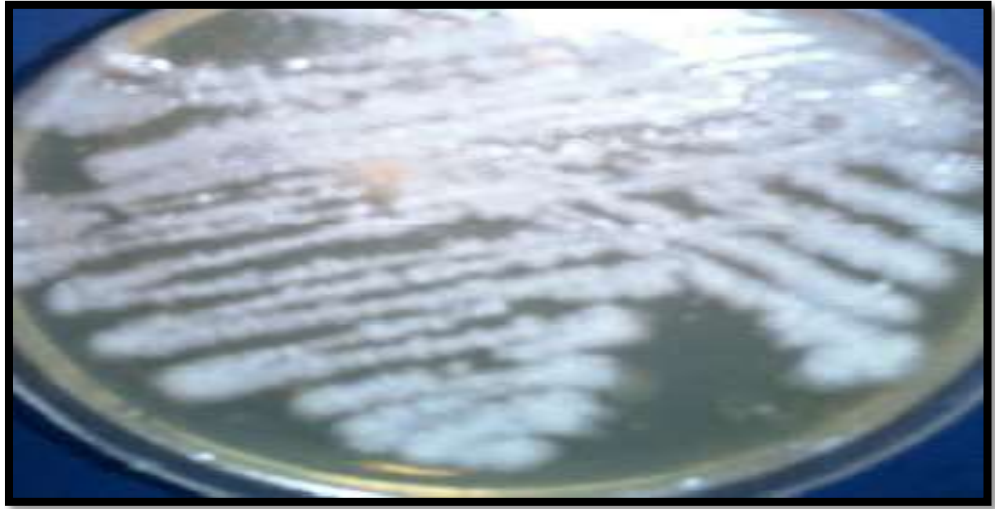


Figure 18 : Présentation de l'aspect macroscopique de la souche levurienne isolée LB₁ sur le milieu de culture Sabouraud, ajusté à une valeur de pH de 5, incubée à une température de 30°C pendant 72 heures.



Figure 19 : Présentation de l'aspect macroscopique de la souche levurienne isolée LH₆ sur le milieu de culture Sabouraud, ajusté à une valeur de pH de 5, incubée à une température de 30°C pendant 72 heures.



Figure 20 : Présentation de l'aspect macroscopique de la souche levurienne isolée LH₉ sur le milieu de culture Sabouraud, ajusté à une valeur de pH de 5, incubée à une température de 30°C pendant 72 heures.

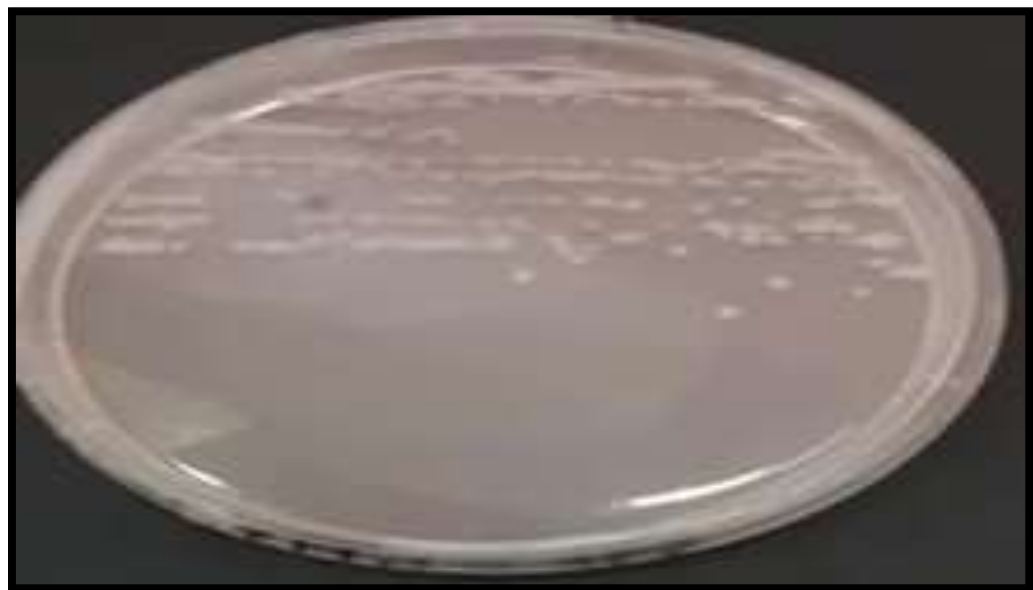


Figure 21 : Présentation de l'aspect macroscopique de la souche levurienne isolée LH₁₁ sur le milieu de culture Sabouraud, ajusté à une valeur de pH de 5, incubée à une température de 30°C pendant 72 heures.



Figure 22 : Présentation de l'aspect macroscopique de la souche levurienne isolée LH₇ sur le milieu de culture Sabouraud, ajusté à une valeur de pH de 5, incubée à une température de 30°C pendant 72 heures.



Figure 23 : Présentation de l'aspect macroscopique de la souche levurienne isolée LB₈ sur le milieu de culture Sabouraud, ajusté à une valeur de pH de 5, incubée à une température de 30°C pendant 72 heures.



Figure 24 : Présentation de l'aspect macroscopique de la souche levurienne isolée LH₁₀ sur le milieu de culture Sabouraud, ajusté à une valeur de pH de 5, incubée à une température de 30°C pendant 72 heures.

2. Screening des souches levuriennes productrices d'amylase

Le screening primaire des souches levuriennes productrices d'amylase, isolées à partir des échantillons prélevés au niveau de différents sites, est effectué sur le milieu de culture gélosé AAM (Amylase Activity Medium), contenant de l'amidon comme seule source de carbone et d'énergie, incubé à une température de 30°C, pendant un intervalle de temps de 72 heures.

Les résultats obtenus ont montré des diamètres de zones d'hydrolyse variables. Les 11 souches levuriennes isolées à partir des échantillons prélevés au niveau de différents sites ont manifesté une importante activité productrice de l'amylase, avec des diamètres de la zone d'hydrolyse de l'amidon entre 5 et 29 mm. Par ailleurs, d'autres souches isolées ont présenté une moyenne activité productrice de l'amylase, avec des diamètres des zones d'hydrolyses de l'amidon respectif de (22 et 25 mm).

Six souches (**LB₁**, **LB₂**, **LH₆**, **LH₈**, **LH₁₀** et **LH₁₁**) ont révélé une faible activité productrice de l'amylase avec des diamètres de la zone d'hydrolyse de l'amidon inférieure à 18 mm.

Le criblage primaire effectué par mesure du diamètre de la zone d'hydrolyse formée a permis la sélection de la souche la plus performante LB₃ productrices d'amylase (Figure 25).

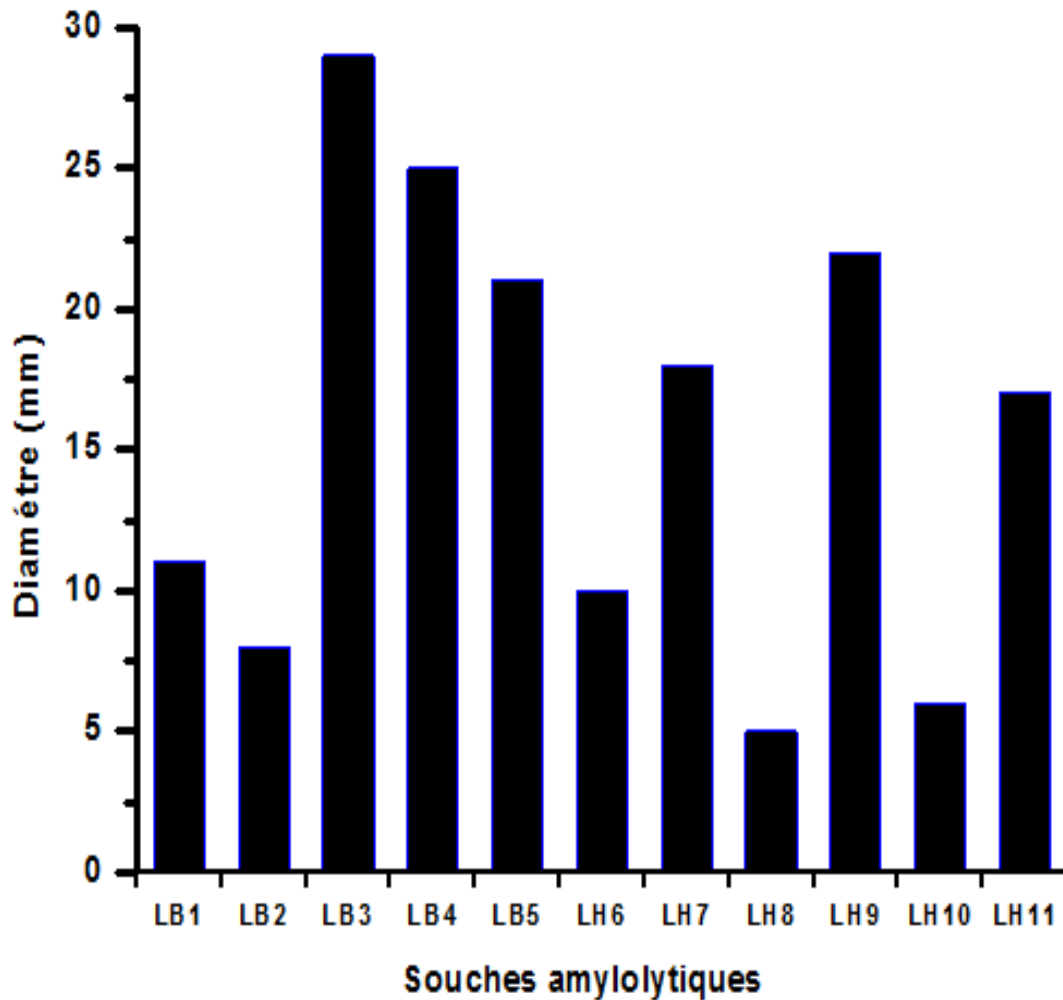


Figure 25 : Illustration des diamètres de zones d'hydrolyses formées autour des colonies inoculées sur milieu de culture gélosé AAM, ajusté à une valeur de pH de 5, incubées à une température de 30°C pendant 72 heures.



Figure 26 : Présentation de la zone d'hydrolyse formée, chez la souche LB₂, inoculée sur le milieu de culture AAM, ajusté à une valeur de pH de 5, incubée à une température de 30°C pendant 72 heures.



Figure 27 : Présentation de la zone d'hydrolyse formée, chez la souche LB₃, inoculée sur le milieu de culture AAM, ajusté à une valeur de pH de 5, incubée à une température de 30°C pendant 72 heures.

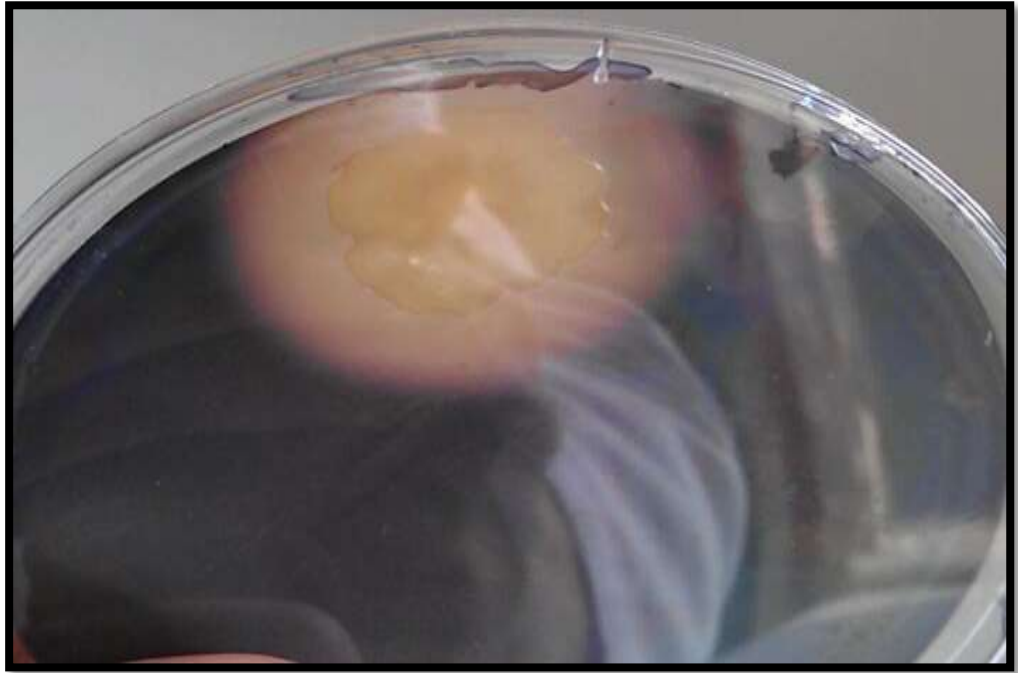


Figure 28 : Présentation de la zone d'hydrolyse formée, chez la souche LB₄, inoculée sur le milieu de culture AAM, ajusté à une valeur de pH de 5, incubée à une température de 30°C pendant 72 heures.



Figure 29 : Présentation de la zone d'hydrolyse formée, chez la souche LH₆, inoculée sur le milieu de culture AAM, ajusté à une valeur de pH de 5, incubée à une température de 30°C pendant 72 heures.



Figure 30 : Présentation de la zone d'hydrolyse formée, chez la souche LB₁, inoculée sur le milieu de culture AAM, ajusté à une valeur de pH de 5, incubée à une température de 30°C pendant 72 heures.



Figure 31 : Présentation de la zone d'hydrolyse formée, chez la souche LB₈, inoculée sur le milieu de culture AAM, ajusté à une valeur de pH de 5, incubée à une température de 30°C pendant 72 heures.

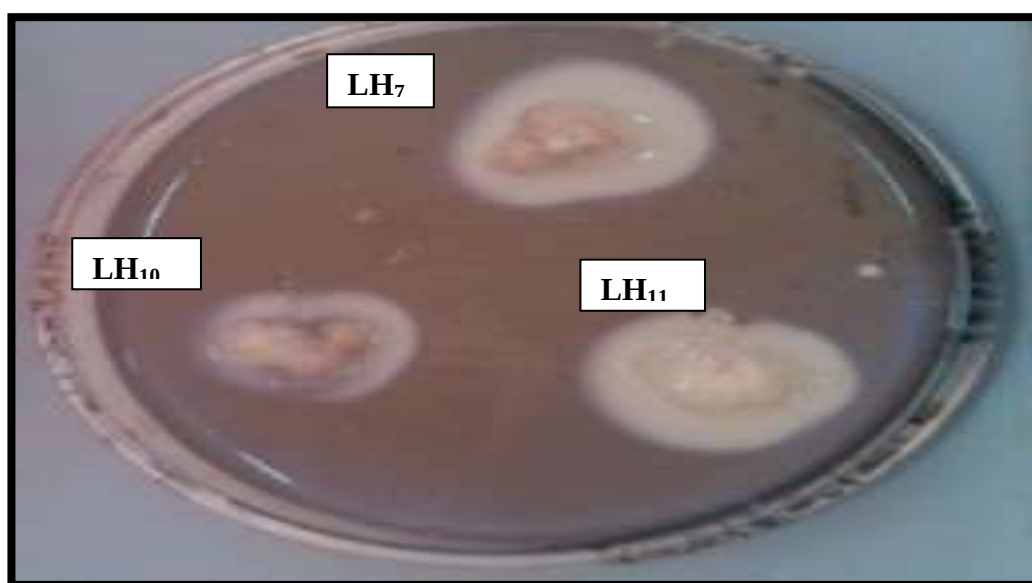


Figure 32 : Présentation des zones d'hydrolyse formées, chez les souches LH₇, LH₁₀ et LH₁₁ inoculées sur le milieu de culture AAM, ajusté à une valeur de pH de 5 incubée à une température de 30°C pendant 72 heures.

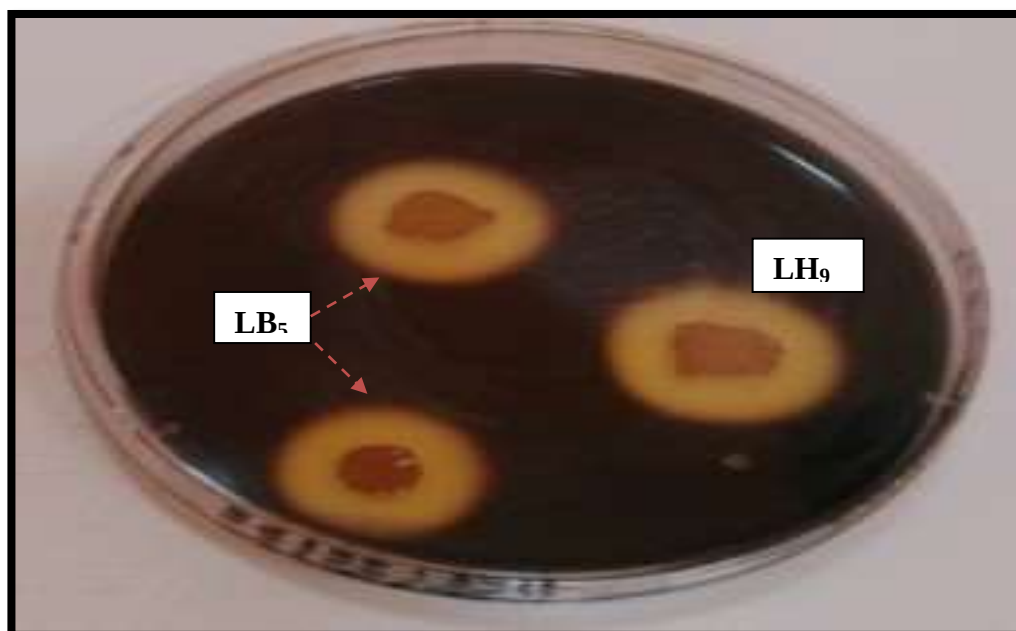


Figure 33 : Présentation des zones d'hydrolyse formées, chez les souches LB₅ et LH₉, inoculée sur le milieu de culture AAM, ajusté à une valeur de pH de 5, incubée à une température de 30°C pendant 72 heures.

3. Production de l'amylase

L'utilisation de la méthode décrite par **Ando et ses collaborateurs (1984)**, basée sur la mesure du diamètre de la zone d'hydrolyse de l'amidon pour l'évaluation de la production de l'amylase chez les souches isolées, incubées à une température de 30°C pendant 72 heures, a permis la sélection d'une souche levurienne isolées, sélectionnées productrices de l'amylase est utilisée pour l'évaluation de l'activité de l'amylase et l'optimisation des différents paramètres impliqués dans la production de l'amylase.

La production de l'amylase est mise en évidence par la méthode de la fermentation submergée, lors de l'inoculation de la souche sélectionnée productrice de l'amylase dans un milieu de culture à base de lactosérum déprotéiné, contenant l'amidon à une concentration de 1%, incubées à une température de 30°C pendant un intervalle de temps de 24 heures. Le surnageant contenant l'amylase est récupéré par centrifugation à une vitesse de 4180g pendant 10 minutes.

4. Composition chimique du lactosérum

L'analyse de la composition chimique du milieu de fermentation fait apparaître que le lactosérum doux est riche en sucres totaux 67 g/L, en particulier en lactose (47,87 g/L) (**Tableau 9**). Le lactose constitue une source importante de carbone et d'énergie pour la croissance de nombreux microorganismes possédant le système beta galactosidase (**Trystram et al., 1991 ; Lejeune et Baron, 1995**). Ce constat est en accord avec les résultats de (**Alais, 1981**), qui justifie que le lactosérum doux contient une teneur plus élevée en lactose (40-57 g/L) par rapport au lactosérum acide (38-55 g/L).

Les résultats obtenus ont largement excédé les valeurs rapportées par (**Alais, 1981 ; Adrian, 1973**), où la teneur protéique de 6,02 g/L. Cette différence en teneur protéique est due au processus de fabrication du fromage. La matière azotée totale (1,2 g/L) est inférieure à celle trouvée par (**Luquet et Boudier, 1984 ; Alais, 1981**) (1,2-1,8 g/L). Cette teneur azotée donne un rapport de C/N=28 (le rapport C/N indispensable à un développement adéquat des levures doit être supérieure ou égal à 18) (**Botton, 1991**).

Tableau 8 : Illustration de la Composition chimique de lactosérum de fromage « Camembert» de l'unité de production GIPLAIT de la région de Sidi Bel Abbes (Ouest Algérie).

Paramètres mesurés	Valeur obtenue (g/L)
pH	5,9
Matière sèche	61
Matière azotée totale	0,92
Sucres totaux	67
Lactose	47,87
Matière minérale(Cendres)	9,5
Calcium	0,35
Chlore	3,4
Acidité (Acide lactique)	2,8

La teneur en acide lactique (2,8 g/L) se rapproche de celle suggérée **Luquet et ses collaborateurs (1984)** (0–3 g/L). Une teneur élevée en acide lactique traduit une infection microbienne qui a décomposé le lactose en acide lactique (**Luquet et Boudier, 1984 ; Casalis, 1975**). Par ailleurs, la matière sèche (61 g/L) est une teneur comprise dans l'intervalle rapporté par (**Alais, 1981**) de 55-75 g/L.

Cependant, la valeur du pH 5,9 est légèrement inférieure aux résultats rapportés par **Egas et ses collaborateurs (1990)** (6,5-6,7). Cette différence est due aux conditions de transport et de stockage du lactosérum.

La concentration en matières minérales du lactosérum (12,2 g/L) est plus élevée que celle rapportée par (**Alais, 1981**) (4-6 g/L). La matière minérale s'avère riche en chlore (3,4 g/L) et en calcium (0,35 g/L), facteurs activateurs des amylases (**Hwang et al., 1997 ; Egas et al., 1998**).

La composition chimique de lactosérum révèle un milieu de culture d'une grande valeur alimentaire (sucres totaux, lactose, protéines, sels minéraux). Ce sous produit laitier peut être employé comme un milieu de fermentation pour la production des

amylases. Ce recyclage évite la pollution de la nature par la prolifération microbienne (Gana et Touzi, 2001).

4.1. Détermination de la concentration optimale en lactosérum

Dans le but de déterminer la concentration optimale de production de l'enzyme par la levure isolée, sélectionnée productrice de l'amylase LB₃, cultivée sur un milieu à base de lactosérum, une gamme de dilution est réalisée (10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 et 100%) (**Tableau 10**). La production de l'amylase est proportionnelle à la concentration du lactosérum, à une concentration de **100%** l'activité amylasique de la souche levurienne isolées, sélectionnée LB₃ est maximale (**4591 UI /ml**).

La souche levurienne isolées, sélectionnée, productrice de l'amylase **LB₃** nécessite un milieu de fermentation constitué de 100% en lactosérum déprotéiné et supplémenté par 1% d'amidon soluble.

Tableau 9 : Illustration de l'effet de la dilution du lactosérum de fromage « Camembert » de l'unité de production GIPLAIT de la région de Sidi Bel Abbes (Ouest Algérie) sur la production de l'amylase chez la souche isolée, sélectionnée productrice de l'amylase LB₃.

Concentration du lactosérum	Activité amylasique x 10 ² (UI/ml)
10	9,50
20	10,10
30	16,07
40	19,24
50	20,10
60	25,40
70	29,86
80	36,76
90	41,50
100	45,91

5. Identification de la souche levurienne isolée

L'identification de la souche levurienne isolée, sélectionnée **LB₃** est de faite selon les clefs de détermination de **Lodder (1971)** et **Kreger Van (1984)**.

5.1. Tests morphologiques

L'observation macroscopique réalisée à l'œil nu de la souche isolée, sélectionnée productrice de l'amylase sur les milieux de culture liquide et solide utilisés, a permis d'établir certains critères tels que l'aspect, la couleur, le diamètre et le relief des colonies de la souches isolée.

5.1.1. Caractères cultureux

L'observation macroscopique des cultures en milieux de culture liquides et sur milieux de cultures solides (YG, YPG et YM), a révéler les caractères suivants:

- ✓ Colonies arrondies, crémeuse, de couleur blanche (**Figure 34**)
- ✓ Culture abondante sur gélose inclinée.
- ✓ La culture en milieu de culture liquide présente un culot au fond du tube, absence de voile et d'anneau.
- ✓ Surface lisse et brillante.
- ✓ La taille des colonies est moyenne.

5.1.2. Caractéristiques de la reproduction végétative et sexuelle

L'observation microscopique de la souche isolée, sélectionnée productrice d'amylase **LB₃** a permis de constater la présence de formes cellulaires suivantes:

- ✓ Une morphologie cellulaire : la forme des cellules est ovale à ronde (**Figure 35**).
- ✓ Un mode de reproduction : bourgeonnement unipolaire à multipolaire
- ✓ Une filamentisation : de type pseudomycélienne.
- ✓ Une sporulation : présence d'ascospores (1 à 2 spores) avec une ascospore de forme ronde et rebord équatorial. Les spores sont emprisonnées dans l'ascospore.



Figure 34: Présentation de l'aspect macroscopique de la souche levurienne isolées, sélectionnée productrice de l'amylase LB₃, inoculée sur milieu de culture Sabouraud, ajusté à une valeur de pH de 5, incubée à une température de 30°C pendant de 72 heures.

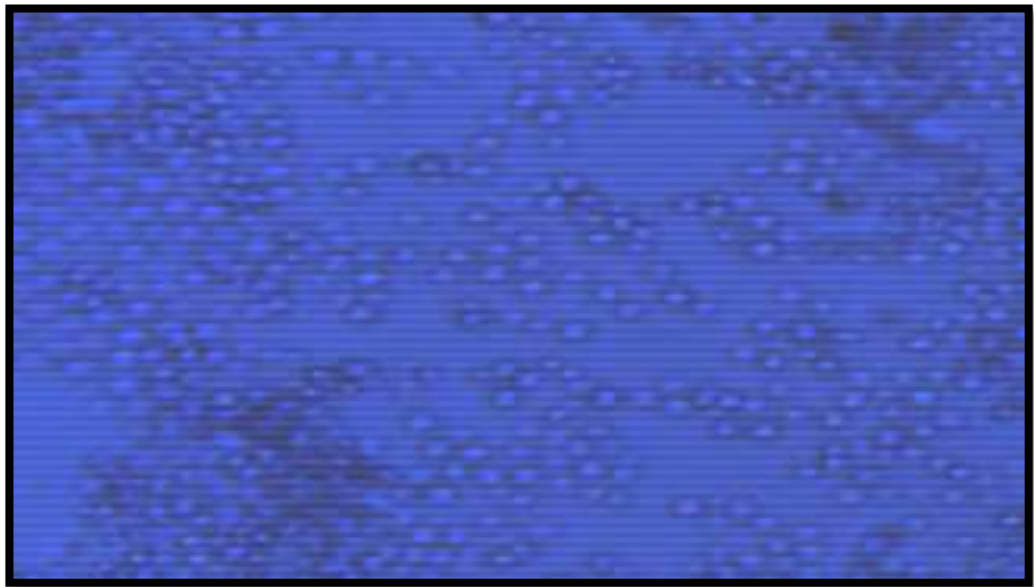


Figure 35 : Présentation de l'aspect microscopique de la souche levurienne isolées, sélectionnée productrice de l'amylase LB₃, inoculée sur milieu de culture Sabouraud, ajusté à une valeur de pH de 5, incubée à une température de 30°C pendant de 72 heures, après une coloration au bleu de méthylène (grossissement X40).

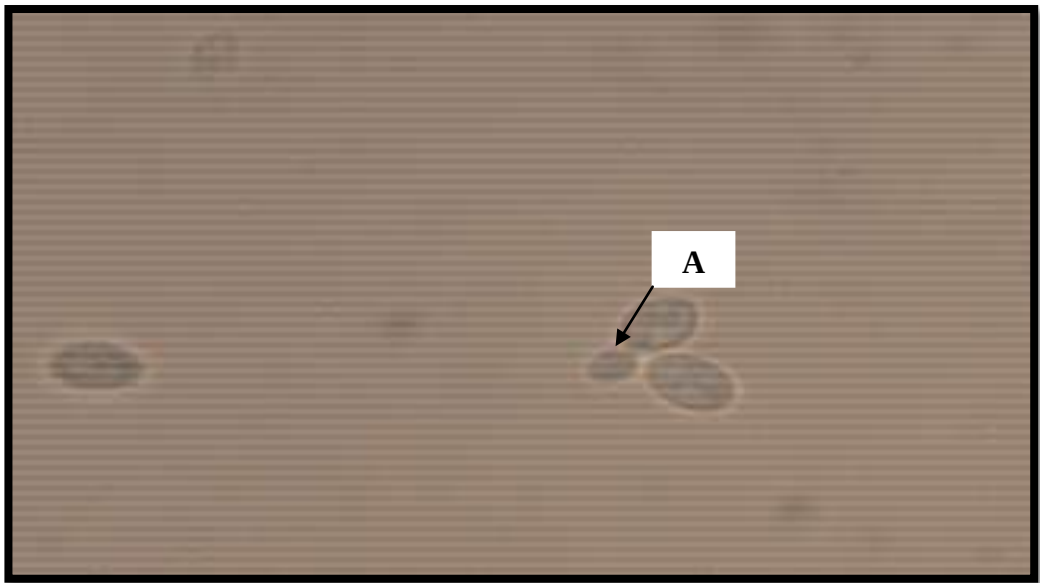


Figure 36 : Présentation de l'aspect microscopique de la souche levurienne isolées, sélectionnée productrice de l'amylase LB₃, inoculée sur milieu de culture Sabouraud, ajusté à une valeur de pH de 5, incubée à une température de 30°C pendant de 72 heures, à l'état frais (grossissement X100) (A : bourgeonnement des cellules).



Figure 37 : Présentation de l'aspect de filamentation de la souche levurienne isolée, sélectionnée LB₃, inoculée sur le milieu de culture Sabouraud, ajusté à une valeur de pH de 5, incubée à une température de 25°C pendant 5 jours (grossissement X100).

5.2. Tests physiologiques et biochimiques

5.2.1. Fermentation des sucres

La souche isolée, sélectionnée productrice d'amylase LB₃ présente une aptitude à fermenter certains sucres comme le glucose, le fructose, le saccharose, le maltose et l'amidon, mais ne fermente pas le lactose, le xylose et le galactose. Ces fermentations positives des sucres sont caractérisées par production des gaz (CO₂) dans la cloche de Durham (**Figure 38**).

5.2.2. Assimilation des substrats azotés

La souche isolée, sélectionnée productrice d'amylase LB₃ présente une assimilation positive pour le sulfate d'ammonium mais elle n'assimile pas le nitrate de potassium, du fait de l'absence de croissance cellulaire, donc les nitrates ne sont pas utilisés comme sources d'azote (**Figure 39**).

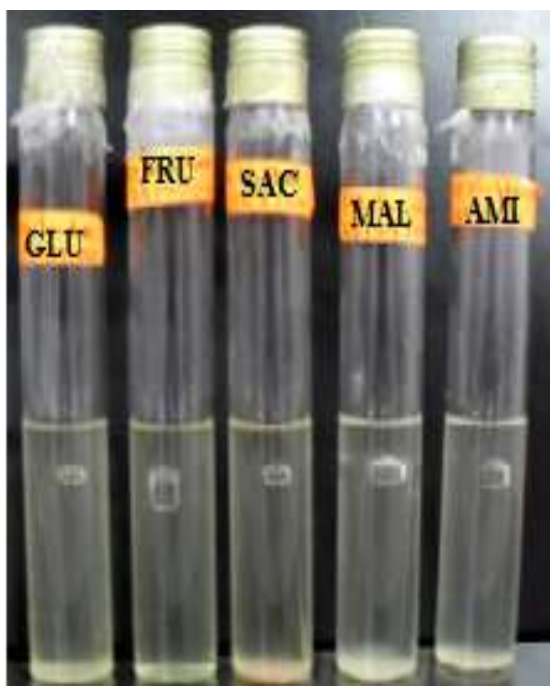
Le métabolisme fermentaire observé de l'hydrolyse de l'amidon, la non assimilation des nitrates et le processus caractéristique de formation des asques montrent que la souche levurienne isolée, sélectionnée productrice d'amylase LB₃ correspond au genre : *Schwanniomyces* (Lodder, 1971 ; Kreger Van, 1984 ; Oteng-Gyang, 1984 ; Rose et Harrison, 1987 ; Larpent et Larpent-Gourgaud, 1997).

Le sol est l'habitat typique pour ce genre. Par ailleurs, trois espèces supplémentaires sont décrites : *Schwanniomyces castellii* de sol de champ de vigne en Espagne, *Schwanniomyces alluvius* de plusieurs sols dans le milieu Ouest des U.S.A et *Schwanniomyces persoonii* des sols de l'Afrique du sud (Kloecker, 1909 ; Rose et Harrison, 1987 ; Phaff et Starmer, 1987).

Tubes témoins



Fermentation (+)



Fermentation (-)

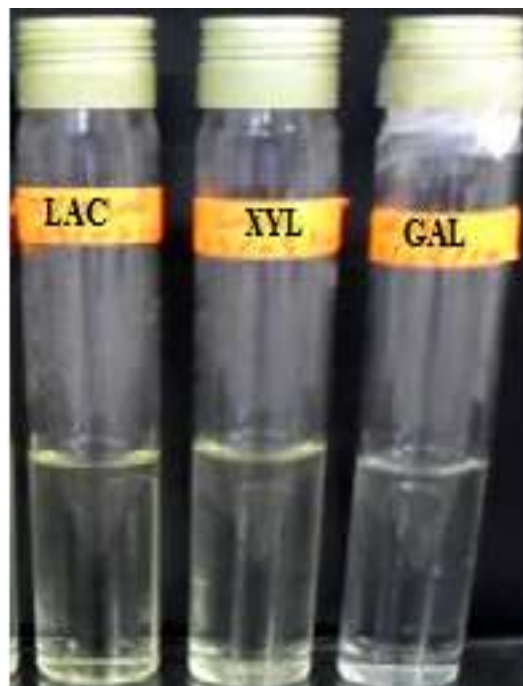


Figure 38 : Présentation de la fermentation des sucres chez la souche levurienne isolée, sélectionnée productrice de l'amylase LB₃, inoculée sur le milieu de culture eau de levure, ajusté à une valeur de pH de 5, incubée à une température de 25°C pendant 7 jours.

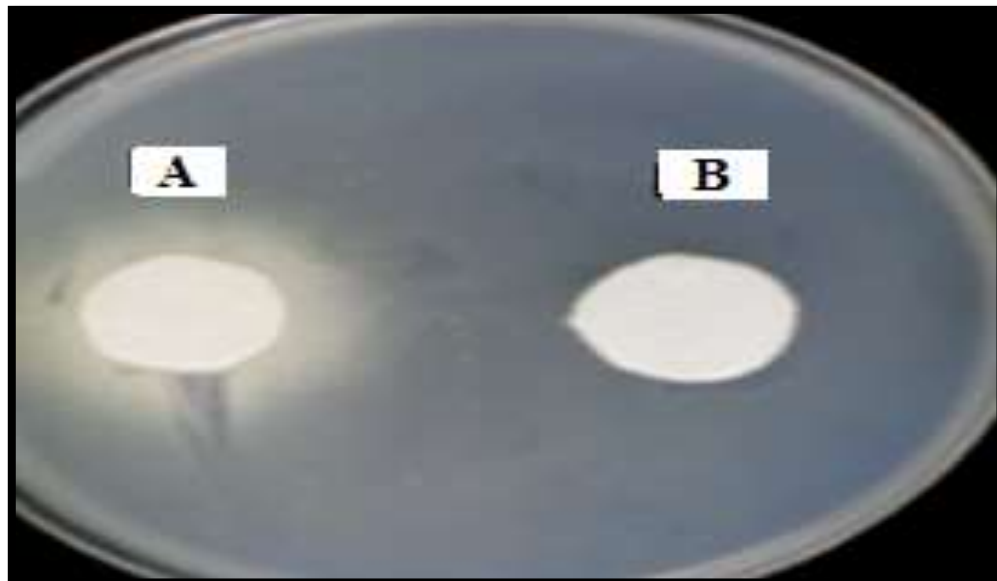


Figure 39 : Présentation de test d'assimilation de l'azote chez la souche levurienne isolées, sélectionnée productrice de l'amylase LB_3 , inoculée sur le milieu de culture synthétique sans azote, ajusté à une valeur de pH de 5, incubée à une température de 25°C pendant 3 jours (**A:** Sulfate d'ammonium, **B:** Nitrate de potassium).

6. Etude du suivi de la cinétique de croissance de la souche sélectionnée productrice d'amylase

L'inoculation de la souche levurienne isolée, sélectionnée productrice de l'amylase LB_3 dans un milieu de culture à base de lactosérum à 100% déprotéiné avec une densité optique initiale 0,18, incubées à une température de 30°C pendant 96 heures.

Le suivi de la cinétique de croissance de la souche isolée, sélectionnée productrice de l'amylase LB_3 limité sur un intervalle de temps de 96 heures est réalisé par mesure de la densité optique à une longueur d'onde de 488 nm à l'aide d'un spectrophotomètre.

Les résultats obtenus (**Figure 40**) ont montré que la souche isolées, sélectionnées productrice de l'amylase LB_3 a manifesté une excellente croissance, traduite la production d'une importante quantité de la biomasse (8,01 g/L) après 56 heures de

fermentation. Par ailleurs, la croissance de la souche sélectionnée LB₃ s'arrête et on assiste à une légère baisse de la biomasse (6,96-6,55 g/L). En effet, les cellules conservent une activité métabolique mais leur structure biochimique subit des modifications (**Leclerc *et al.*, 1995 et Bouix et Leveau, 1999**).

La souche isolée, sélectionnée productrice de l'amylase LB₃ a montré une faible production de la biomasse dès les 74 heures (6,55-2,11 g/L), ceci est probablement expliquée par la mauvaise adaptation de cette souche aux conditions défavorables de milieu de culture (épuisement en source d'énergie, accumulation de produits d'excrétions métaboliques et autolyse par des protéases intracellulaires).

7. Cinétique de la production de l'amylase par la souche sélectionnée

L'évaluation du potentiel enzymatique de l'amylase chez la souche levurienne sélectionnée LB₃ est mise en évidence. La souche isolée, sélectionnée productrice de l'amylase est inoculée dans un milieu de culture à base de lactosérum à 100% déprotéiné, contenant l'amidon soluble à une concentration de 1%, incubées à une température de 30°C pendant 96 heures. Le surnageant est récupéré par centrifugation à une vitesse de 4180 g pendant 10 minutes et l'activité de l'amylase est évaluée par la méthode de DNS.

La synthèse de l'enzyme commence dès le début de la fermentation mais en faible quantité (1688 UI/ml). La production de l'amylase augmente avec la croissance cellulaire (**Figure 40**). Cette constatation se concorde avec les travaux réalisés par **Kocher et Katyal (2003) ; Tatsinkou et ses collaborateurs (2005)** chez les levures ascomycètes cultivées sur des milieux de culture à base de pomme de terre et de blé.

La juxtaposition des profils de biomasse et d'activité amylasique traduit une synthèse associée à la croissance. En effet, l'activité amylasique augmente de façon importante après 56 heures de fermentation (2035-4796 UI/ml).

Ce mécanisme d'activité s'explique par les changements morphologiques et physiologiques de la souche levurienne influençant la production de l'amylase. Cependant, le temps de fermentation nécessaire pour arriver à l'activité amylasique optimale varie d'une souche à une autre et d'un milieu de fermentation à un autre.

Une activité maximale de 6582 UI/ml est observée au cours de la phase d'accélération de la croissance après 78 heures chez la souche *Lipomyces sp* cultivée sur un milieu de culture à base de déchets de dattes.

La diminution de l'activité amylasique commence dès la 60^{ème} heure de fermentation et elle se poursuit pour atteindre la valeur de 2009 UI/ml au bout de 94 heures, cette diminution est due à l'épuisement du milieu de culture en nutriments nécessaires à la croissance et à l'autolyse des cellules (Merabti, 2006 ; Leclerc *et al*, 1995).

7.1. Evolution de la concentration des glucides

Au cours de la fermentation, la teneur du milieu de culture en sucres diminue pendant les premières heures (12 heures). Les résultats obtenus (**Figure 40**) ont montré que la consommation des glucides devient importante après 56 heures de fermentation. Une variation brusque (45,2 g/L-16,98 g/L) due à l'assimilation des glucides présents dans le lactosérum par la souche isolée, sélectionnée productrice d'amylase LB₃ pour ses activités métaboliques.

L'hydrolyse enzymatique dépend de la concentration du substrat et de l'enzyme, un changement est observé en fonction du temps et de la quantité du sucre formé pendant ce processus de transformation, ce qui est expliquée par l'inversion proportionnelle entre l'augmentation du taux du produit formé et la diminution de la quantité du substrat utilisé et la concentration de l'enzyme en fonction du temps.

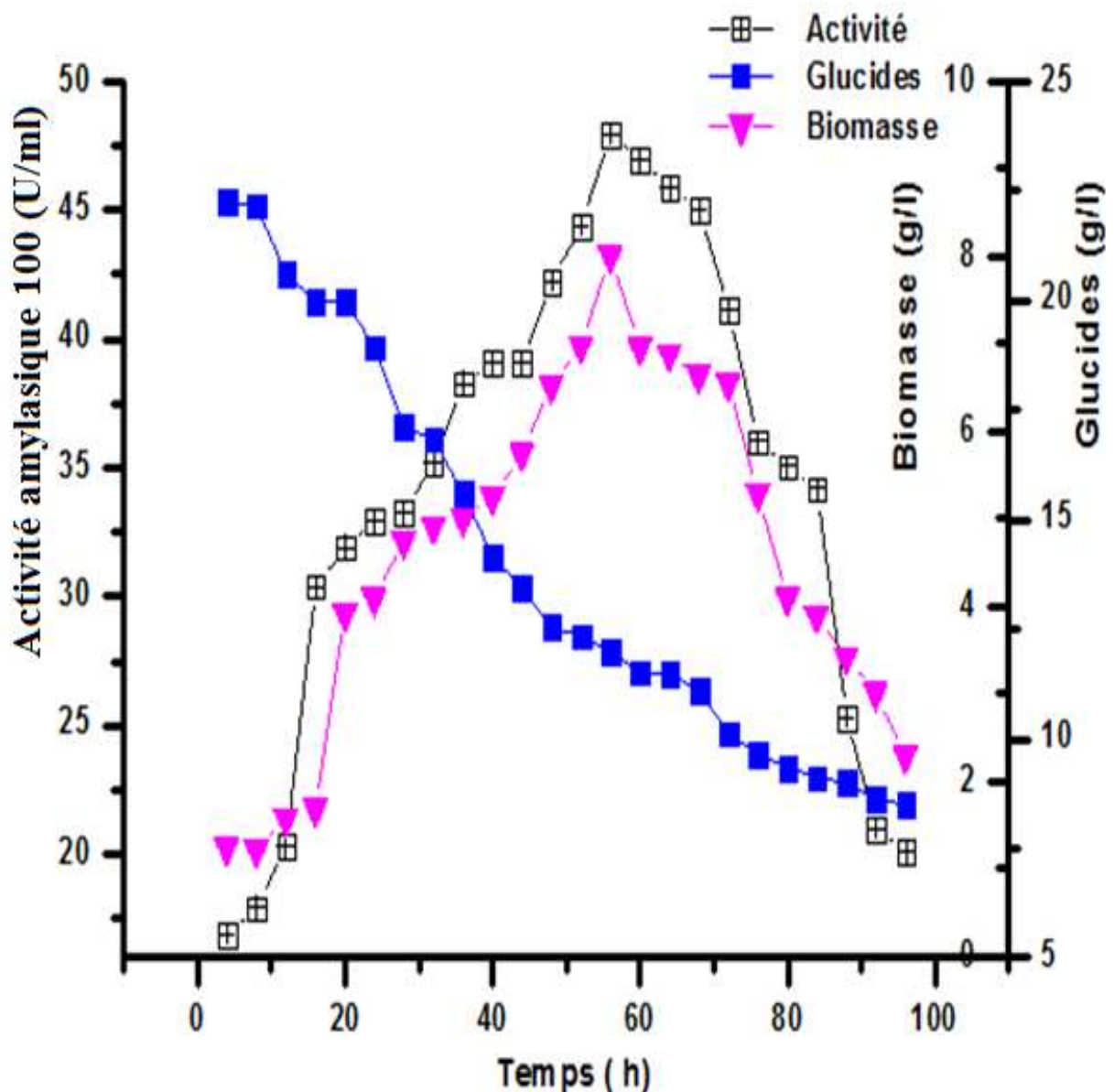


Figure 40 : Evolution cinétique de la croissance, la production de l'amylase et la consommation des glucides au cours de la fermentation de la souche levurienne isolées, sélectionnée productrice de l'amylase LB₃, inoculée sur milieu de culture à base de lactosérum à 100% déprotéiné et supplémenté par 1% d'amidon soluble, ajusté à une valeur de pH de 5, incubée avec agitation 180 rpm à une température de 30°C.

7.2. Evolution du pH et des protéines au cours de la fermentation

Le pH demeure constant pendant les premières heures de la fermentation (4-24 heures), puis il augmente progressivement jusqu'à atteindre une valeur maximale (pH 6,62) après 28 heures. Cette augmentation est due à la dégradation des protéines qui libèrent des acides aminés hydrolysés ensuite en ammoniacque par désamination ou à la métabolisation des glucides qui libère du CO₂ (**Leclerc *et al.*, 1995**).

Le pH reprend sa diminution à partir de 60 heures suite à la formation d'acides organiques (acides succinique, acétique, formique) à partir des glucides (**Gancedo et Senano, 1989**). Enfin le pH maintient une valeur stable de 4 jusqu'à la fin de fermentation (**Figure 41**).

Quant à l'évolution des protéines au cours de la fermentation (**figure 41**), une légère hausse est observée pendant les premières heures de la fermentation (4-24 heures), expliquée par la synthèse d'enzyme 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'amylase.

Les protéines diminuent d'une manière plus importante après les 74 heures (2,62 g/L). Cette baisse des protéines s'explique par l'attaque des protéases libérées lors de la lyse cellulaire (**Leclerc *et al.*, 1995 et Bouix et Leveau, 1999**).

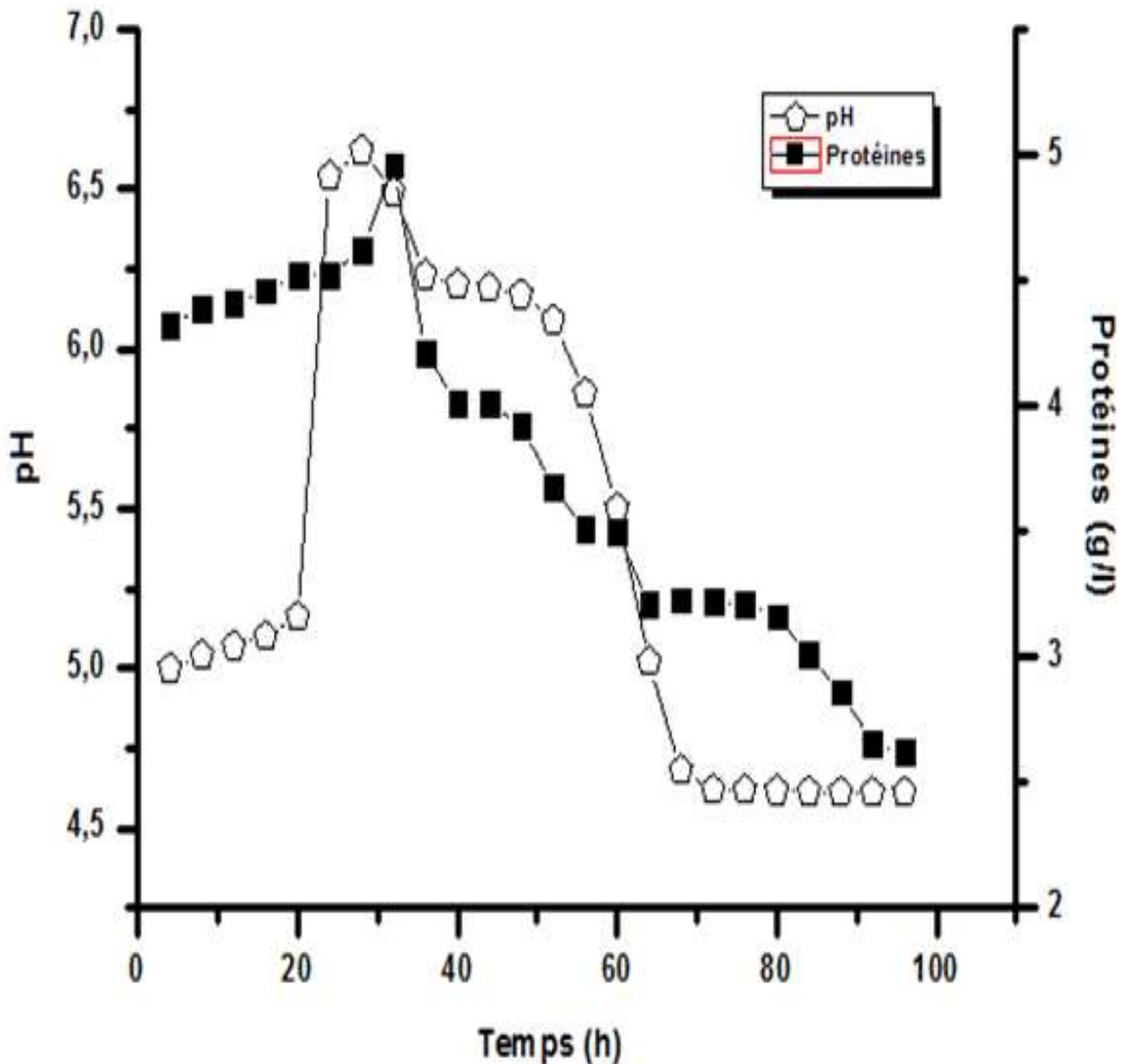


Figure 41 : Evolution cinétique des protéines et de pH au cours de la fermentation par la souche levurienne isolée, sélectionnée LB₃, inoculée sur milieu de culture à base de lactosérum à 100% déprotéiné et supplémenté par 1% d'amidon soluble, ajusté à une valeur de pH de 5, incubée avec agitation 180 rpm à une température de 30°C.

8. Optimisation des paramètres physicochimiques impliqués dans la production de l'amylase

8.1. Effet de la variation du pH sur l'activité amylasique

L'effet de la valeur de pH sur la production de l'amylase chez la souche isolée, sélectionnée productrice de l'amylase LB₃ est mis en évidence. La souche sélectionnée productrice de l'amylase LB₃ est inoculée dans un milieu de culture à base de lactosérum à 100% déprotéiné et supplémenté par 1% d'amidon soluble, ajusté à différentes valeurs de pH, par fermentation submergée, incubées à une température de 30°C pendant 48 heures. Le surnageant est récupéré par centrifugation à une vitesse de 4180 g et l'activité de l'amylase est évaluée par la méthode de DNS.

Les résultats obtenus (**Figure 40**) ont montré que la souche isolées, sélectionnée productrice de l'amylase LB₃ a manifesté une excellente production de l'amylase (4409 UI/ml) à une valeur de pH de 6.

L'activité progresse proportionnellement dans l'intervalle de pH 2,5-6, au delà de cette valeur, elle commence sa diminution et à pH 8,5, elle perd 78% de son activité. Cette perte est due à l'effet du pH sur L'ionisation des groupements des chaînes latérales qui maintiennent la structure de l'enzyme et interviennent dans l'activité du site actif.

Le pH optimum de 6 pour l'amylase de la souche isolées, sélectionnée productrice de l'amylase LB₃ est proche de 6,3 chez la levure *Schwanniomyces alluvius* et de 5,6 chez la levure *Filobasidium capsuligenum* et identique chez la levure *Lipomyces sp.* Cependant, il est différent chez d'autres genres levuriens : 5,5 chez la levure *Schwanniomyces occidentalis* et 4,5-5 chez *Lipomyces kononenkoae*.

Ces différences sont dues à la variation de la composition en acides aminés, où chaque amylase développe un état de protonation spécifique et à la composition du milieu de culture (**Wilson et Ingledew, 1982 ; Prieto et al., 1995 ; De Mot et Verachlert, 1985 ; Merabti, 2006 ; Wang et al., 1989**).

L'amylase de la souche levurienne isolées, sélectionnée productrice de l'amylase LB₃ a un pH optimum de 6 semblable a des amylases fongiques, mais différent des

amylases bactériennes qui ont parfois des pH optimum plus alcalins (pH 8) (figure 25) (De Souza et Martins, 2000 ; Cordeiro *et al.*, 2002).

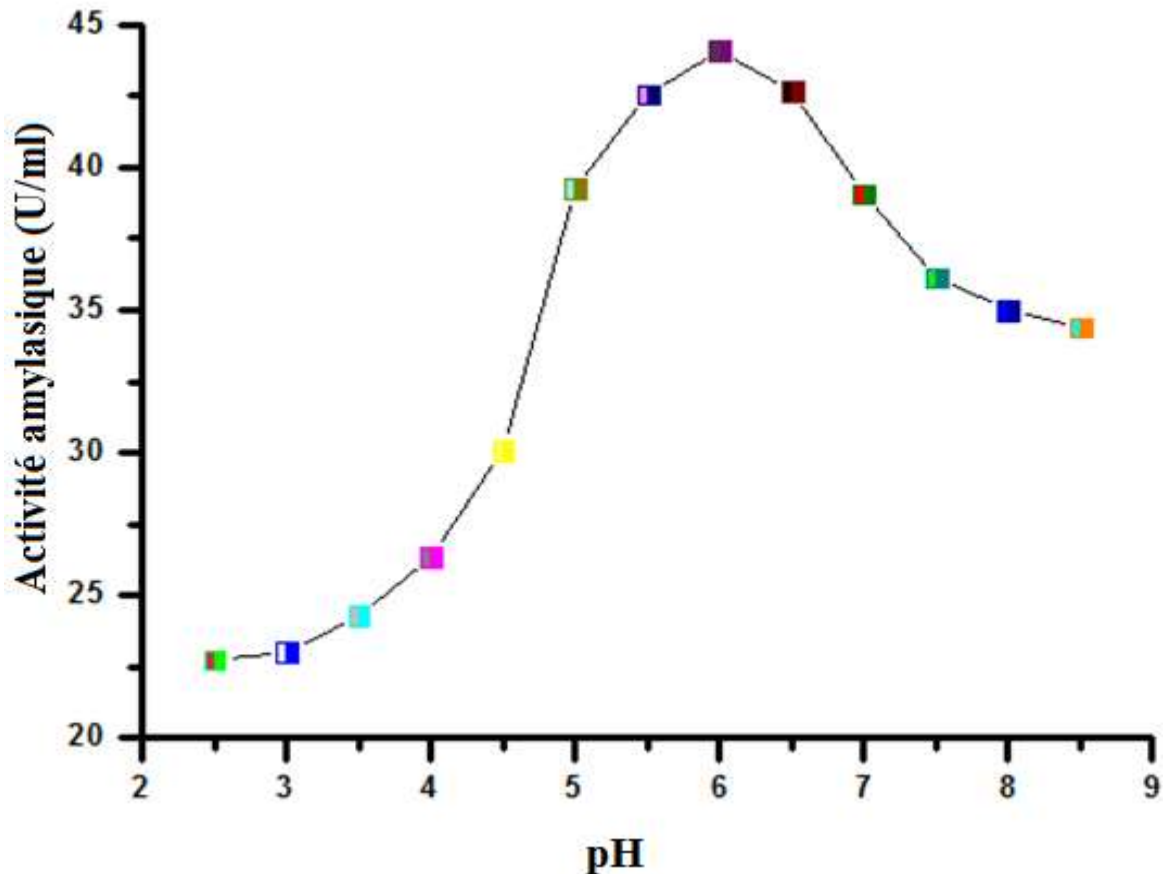


Figure 42 : Effet du pH sur l'activité de l'amylase de la souche levurienne isolée, sélectionnée, inoculée dans un milieu de culture à base de lactosérum à 100% déprotéiné et supplémenté par 1% d'amidon soluble, incubée à une température de 30°C pendant 48 heures.

8.2. Effet de la température sur l'activité amylasique

L'évaluation de l'effet de la température sur la production de l'amylase chez la souche sélectionnée LB₃ est mise en évidence. La souche isolée, sélectionnée productrice de l'amylase LB₃ est inoculée dans un milieu de culture à base de lactosérum à 100% déprotéiné par fermentation submergée, incubées à différentes températures pendant 30 minutes.

Le surnageant est récupéré par centrifugation à une vitesse de 4180 g pendant 10 minutes et l'activité de l'amylase est évaluée par la méthode de DNS.

Les résultats obtenus (**Figure 42**) ont montré que la souche isolées, sélectionnée productrice de l'amylase LB₃ est manifesté une excellente production de l'amylase à une température de 60°C et l'activité de l'amylase croit régulièrement dans la zone de température de 20-60 °C et diminue considérablement lorsque la température passe de 65-85°C

En effet, la température optimale des amylases levuriennes varie entre 40-60 °C et peut atteindre les 70°C chez certaines espèces comme *Lipomyces starkeyi*. Comparée aux souches bactériennes, cette température est proche des bactéries thermophiles avec des températures optimales de 70-90°C (**Panchal, 1990**).

Les souches *Lipomyces starkeyi* et *Aureobasidium pulluans* signalent une température optimale de 60°C. Cependant, les études menées sur les espèces levuriennes de même genres (*Schwanniomyces alluvius* et *Schwanniomyces occidentalis*) possèdent des amylases avec des températures optimales moindres de 40 et 50°C (**Kelly et al., 1985 ; Haifeng et al., 2006 ; Moranelli et al., 1987 ; Wang et al., 1989**).

De plus, l'optimum de l'activité de l'amylase de *Schwanniomyces sp* est supérieure à celle de *Cryptococcus flavus* et *Filobasidium capsuligenum*, où leur température optimale avoisine les 50°C (**Wanderley et al., 2004 ; De mot et Verachtert, 1985**).

Schwanniomyces sp a un potentiel pour la production d'une amylase thermostable, qualifié de thermophile puisque son activité est maintenue dans un intervalle de température de 60-65°C, une caractéristique des enzymes thermophiles (**Vieille et Zeikus, 2001**).

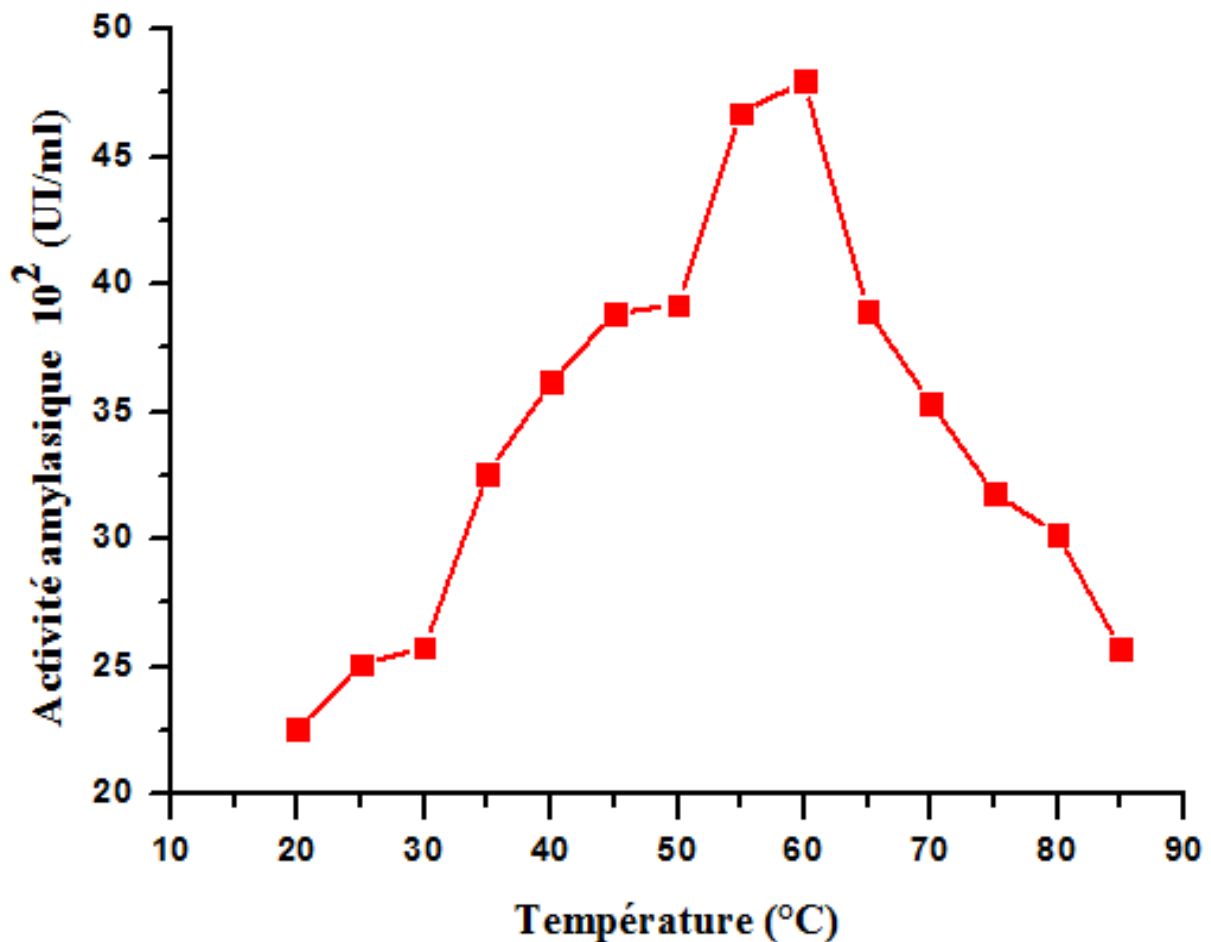


Figure 43 : Effet de la température sur l'activité de l'amylase de la souche levurienne isolée, sélectionnée, inoculée dans un milieu de culture à base de lactosérum à 100% déprotéiné et supplémenté par 1% d'amidon, incub e avec agitation à 180 rpm, à différentes températures (20-60 C) pendant 30 minutes.

8.3. Etude de la thermostabilité de l'amylase

L'évaluation de l'effet de la température sur la production de l'amylase chez la souche isolées, sélectionnée LB₃ est mise en évidence. La souche isolées, sélectionnée productrice de l'amylase LB₃ est inoculée dans un milieu de culture à base de lactosérum à 100% déprotéiné par fermentation submergée, incub es   différentes températures (60, 70, 80, 90, 100, 110 et 120 C) sur une période de temps de 0-190 minutes avec des prélèvements toutes les 15 minutes.

Le surnageant est récupéré par centrifugation à une vitesse de 4180 g pendant 10 minutes et l'activité de l'amylase est évaluée par la méthode de DNS.

L'enzyme résiste à une température de 60°C pendant un intervalle de temps de 160 minutes d'incubation. Elle est également stable à une température de 70°C puisqu'elle conserve 85 % de son activité initiale pour un traitement thermique de 120 minutes. Leur demi-vie à une température de 80°C et 90°C est respectivement de 190 et 140 minutes. Pour la durée d'une heure de traitement, l'enzyme conserve 70% de son activité à 90°C et 67% à 100°C (**Figure 44**).

Ces pourcentages élevés de conservation de l'activité sont des indices qualifiant de l'amylase de *Schwanniomyces sp* qui dépasse largement les valeurs rapportées par la levure *Cryptomyces sp* qui conserve uniquement 20% et 10% de son activité après des traitements thermiques de 30 minutes à 80 et à 90°C et celle de *Aureobasidium pullulans* qui se dénature complètement à 70°C pendant 30 minutes. Cependant, *Schwanniomyces alluvius* rapportent une amylase très thermostable (**Moranelli et al., 1987 ; Lefuji et al., 1996 ; Haifeng et al., 2006**).

Ces différences de comportement vis-à-vis du traitement thermique sont dues au patrimoine génétique particulier à chaque espèce et à l'adaptation physiologique du microorganisme à la niche écologique dans laquelle il vit (**Hasper et al., 2002**).

Cette thermostabilité est due à d'autres facteurs comme la présence de certaines liaisons dans la structure secondaire et tertiaire des protéines enzymatiques (liaisons hydrogènes, liaisons secondaires, liaisons avec métaux et ponts disulfures) permettent de consolider la structure de l'enzyme et donc sa résistance au traitement thermique.

En effet, des études ont prouvé que la richesse en résidus cystéines et en glucides (glucosylation excessive) confère à la molécule enzymatique une grande intégrité structurale résistant à des températures élevées (**Scriban, 1999 ; Vieille et Zeikus, 2001 et Xu et al. 2002**).

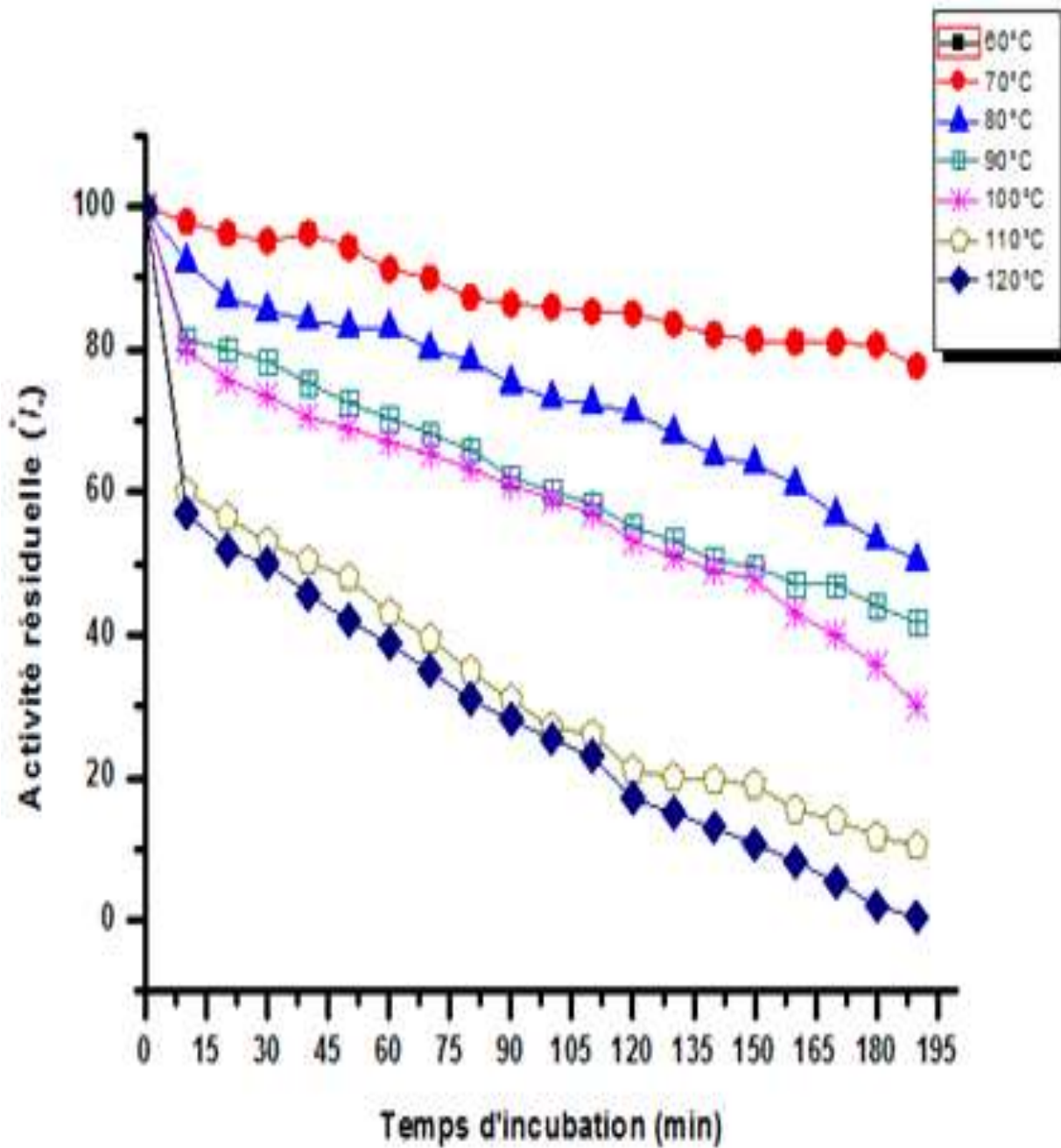


Figure 44 : Effet de la thermostabilité de l'amyase de la souche levurienne isolée, sélectionnée productrice de l'amyase LB₃, inoculée dans un milieu de culture à base de lactosérum à 100% déprotéiné et supplémenté par 1% d'amidon, incub e à différentes températures pendant une période de temps de (0-190 min).

9. Effet des effecteurs la production de l'amylase

9.1. Effet de différentes sources de carbone sur la production de l'amylase

L'effet de différentes sources de carbone sur la production de l'amylase chez la souche isolées, sélectionnée productrice de l'amylase LB₃ est mis en évidence. La souche isolées, sélectionnée productrice de l'amylase LB₃ est inoculée dans un milieu de culture à base de lactosérum à 100% déprotéiné, additionnée de glucose, glycogène, maltose, xylose, isomaltose, pullulane, amylopectine, l'amidon soluble, l'amidon de maïs, l'amidon de pommes de terre et l'amidon de blé à une concentration de 1%, incubées à une température de 30°C pendant 72 heures.

Les résultats obtenus (**Tableau 10**) ont montré que la souche isolées, sélectionnée LB₃ a manifesté une excellente production de l'amylase lors de l'ajout de tous les types d'amidon utilisés comme sources de carbone dans le milieu de culture de base avec une activité maximale sur l'amidon de blé, suivie de la pomme de terre, avec un taux de production respectif de (42,8 UI /ml et 39,9 UI/ml).

Par ailleurs, la souche isolées, sélectionnée LB₃ a révélé lors de l'ajout de xylose, de l'amylopectine et de glycogène avec un taux de production respectif de (28,6, 19 et 13,6 UI/ml). Le glucose est un très mauvais substrat avec un taux de production de 6,04 UI/ml. L'isomaltose et la pullulane ne sont pas hydrolysées du tout.

Des études antérieures réalisées par **Saxuna et ses collaborateurs (2007)** ont rapporté que les substrats complexes induisent une plus grande production d'amylase.

Les sources de carbone sont des facteurs importants qui affectent la croissance cellulaire et la formation de produits de microorganismes. Il a été suggéré que l'induction de l'amylase est affectée par de l'amidon ou des produits de dégradation de l'amidon tels que le maltose (**Moulin et Galzy, 1979 ; Virolle et Bibb, 1988**).

Tableau 10 : Illustration de l'Effet des différentes sources de carbone sur la production de l'amylase de la souche levurienne isolée, sélectionnée productrice de l'amylase LB₃, inoculée dans un milieu de culture de production, incubées à une température de 30°C pendant 72 heures.

Les sources de carbone	L'activité enzymatique (UI / ml)
Glucose	06,04
glycogène	13,6
amidon de maïs	36,8
amidon de pomme de terre	39,9
Amidon de blé	42,8
amidon soluble	34
Xylose	28,6
isomaltose	00
pullulane	00
amylopectine	19

9.2. Effet de différentes sources d'azote sur la production de l'amylase

L'effet de différentes sources d'azote sur la production de l'amylase chez la souche sélectionnée productrice de l'amylase LB₃ est mis en évidence. La souche sélectionnée productrice de l'amylase LB₃ est inoculée dans un milieu de culture à base de lactosérum à 100% déprotéiné, additionnée d'extrait de levure, de caséine, d'extrait de bœuf, de peptone, de nitrate d'ammonium et de sulfate d'ammonium à une concentration de 0,2%, incubées à une température de 25°C pendant 3 jours.

Les résultats obtenus ont montré que la souche LB₃ a manifesté une excellente production d'amylase lors de l'ajout de nitrate d'ammonium et de sulfate d'ammonium, avec un taux de production respectif de (58 et 52,67 UI/ml).

Par ailleurs, la souche LB₃ a révélé une faible production d'amylase, lors de l'ajout de l'extrait de levure, de caséine, de l'extrait de bœuf et de peptone, avec un taux de production respectif de (22, 8, 20,6, 18,2 et 14,9 UI/ml).

Sharma et al., 2012 ; Magee et Kosaric, 1987 ; Anto et al., 2006 ; Krishna et Chandrasekaran, 1996 ; Bozic et al., 2011 ; Coleman et Elliott, 1962 ont rapporté que les activités des amylases d'*Aspergillus sp*, *Bacillus subtilis* IP 5832 et *Bacillus sp* sont similaires à nos résultats.

9.3. Effet des ions métalliques de SDS et de l'EDTA sur la production de l'amylase

L'évaluation de l'effet des ions (Ca^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , Hg^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+} , Cu^{2+} , Cd^{2+} , Na^{+} et K^{+}), de SDS et de l'EDTA sur la production de l'amylase chez la souche sélectionnée LB₃ est mise en évidence. La souche isolée, sélectionnée productrice de l'amylase LB₃ est inoculée dans un milieu de culture de production contenant des ions (Ca^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , Hg^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+} , Cu^{2+} , Cd^{2+} , Na^{+} et K^{+}), de SDS et de l'EDTA par fermentation submergée, incubée à une température de 30°C pendant 3 jours. Le surnageant est récupéré par centrifugation à une vitesse de 4180 g pendant 10 minutes et l'activité de l'amylase est évaluée par la méthode de DNS.

Les résultats obtenus (**Tableau 11**) ont montré que la souche sélectionnée productrice de l'amylase LB₃ a manifesté une forte activité d'amylase en présence de Ca^{2+} et Mn^{2+} avec un taux de production respectif de (181% et 172%).

A l'opposé, la souche LB₃ a montré une diminution de l'activité de l'amylase en présence du K^{+} , Na^{+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} et Hg^{2+} .

Igarashi et al., (1998) ; Takeuchi et al., 2006 ; Murakami et al., 2007 ; Kadrekar et Ramasarma, (1990) ; Lin et al., (1998) ; Burhan et al., (2003) ont rapporté que les activités des amylases de *Schwanniomyces alluvius*, *Pichia burtonii*, *Bacillus sp*, *Bacillus halodurans* 38C-21 et *Bacillus cereus* NY14 sont similaires à nos résultats.

Par ailleurs, Efuji et al., 1996 ; Prieto et al., 1995 ; Gupta et al., 2003 ; Bush et al., 1989 ont rapporté que la culture de *Lipomyces kononenkoae* CBS 5608 en présence de Ag^{+} , Cu^{2+} et Hg^{+2} intervient dans l'inhibition de l'activité de l'amylase.

L'activité amylasique est inhibée par 5mM de l'EDTA après 1 heure d'incubation. Des études antérieures réalisées par (Steyn et Pretorius, 1995) ont rapporté que l'activité amylasique de *Lipomyces kononenkoae* n'a pas été affectée par l'EDTA.

L'augmentation de la teneur en SDS de 1% à 2% diminue l'activité de 29% à 13% après 1 heure d'incubation. Ce détergent anionique permet la perturbation des protéines ayant une structure ordonnée plus élevée.

Tableau 11 : Illustration de l'effet des ions métalliques et de l'EDTA sur l'amylase de la souche levurienne isolée, sélectionnée productrice de l'amylase LB₃, inoculée dans un milieu de culture de production, incubées à une température de 30 °C pendant 72 heures.

Réactifs	Activité relative (%)	
	1mM	5mM
HgCl ₂	61	26
ZnSO ₄	62	29
CuSO ₄	57,9	23
MnSO ₄	126	172
MgSO ₄	96	84
CaCl ₂	129	181
CdCl ₂	87	64
FeSO ₄	58	28
Fe ³⁺	74	57,6
NaCl	90	82,7
KCl	91	72
Ag ⁺	60	25
EDTA	42	35

Conclusion

Les amylases suscitent un intérêt majeur grâce à leur utilisation potentielle dans de nombreux secteurs industriels. Ces enzymes sont d'une grande importance en biotechnologie et trouvent des applications dans de nombreux domaines tels que l'agroalimentaire, médicale, détergeant, textile...etc. Grâce à leur diversité d'exploitation, cette classe d'enzyme contribue avec un apport de 30% du marché mondial de la commercialisation des enzymes industrielles.

L'objectif de ce présent travail est l'isolement, caractérisation et la sélection des souches levuriennes productrices de l'amylase à partir du sol saharien de Sud Ouest et Sud Est Algérien (Béchar et Ouargla), l'optimisation de certains facteurs physicochimiques tels que le pH, la température, les sources de carbone, les sources d'azote, les sources d'ions, EDTA et SDS impliqués dans la production et l'activité de l'amylase ainsi que leur identification phénotypique selon les clefs de **Lodder (1971)**, **Kreger Van, (1984)** et **Guiraud, (1998)**.

Les résultats obtenus ont permis l'isolement de 11 souches levuriennes à partir des sols sahariens de Béchar et Ouargla, dont le screening primaire a permis la sélection d'une souche plus performante LB₃ productrice de l'amylase, avec une excellente activité amylolytique dont le diamètre de zone d'hydrolyse de l'amidon est 29 mm.

L'optimisation des paramètres impliqués dans la production et l'activité de l'amylase de la souche sélectionnée a montré que cette dernière a une excellente production de l'amylase lors de l'ajout de tous les types d'amidon utilisés comme sources de carbone dans le milieu de culture à base de lactosérum avec une activité maximale sur l'amidon de blé, suivie de la pomme de terre, avec un taux de production respectif de (42,8 UI /ml et 39,9 UI/ml).

Cependant, la souche LB₃ a manifesté une excellente production de l'amylase lors de l'ajout de nitrate d'ammonium et de sulfate d'ammonium, avec un taux de production respectif de (58 UI/ml et 52,67 UI/ml).

Par ailleurs, la souche isolée, sélectionnée productrice de l'amylase LB₃ a montré une importante activité de l'amylase à une valeur de pH de 6, une température de 60°C et une thermorésistance à 70°C pendant un traitement thermique de 120 minutes. Cependant, la souche sélectionnée LB₃ a manifesté une forte activité de l'amylase en

présence de Ca^{2+} et Mn^{2+} avec un taux de production respectif de (181% et 172%). A l'opposé, la souche LB₃ a montré une inhibition de l'activité de l'amylase en présence de SDS et de l'EDTA (5 mM)

L'étude du suivi de la cinétique de la croissance de la souche sélectionnée LB₃ a révélé une excellente croissance, traduite par la production d'une importante quantité de la biomasse (8,01 g/L) après 56 heures de fermentation.

L'identification de la souche sélectionnée productrice de l'amylase selon les clefs de **Lodder (1971)**, **Kreger Van, (1984)** et **Guiraud, (1998)** a montré que cette levure amylolytique appartient au genre *Schwanniomyces*.

En perspective, des études approfondies doivent compléter ce modeste travail telles que :

- ✓ Purification de l'amylase par méthode chromatographiques telles que HPLC, FPLC.
- ✓ Caractérisation des gènes impliqués dans la production de l'amylase.
- ✓ Clonage des fragments, codant la production de l'amylase dans des vecteurs puissants.
- ✓ Caractérisation de sites de fixation du substrat et le site de la spécificité par des mutations dirigées.
- ✓ La production industrielle des amylases et leur utilisation dans le domaine des produits agroalimentaires et pharmaceutiques.

- AHEARN D.G. (1973).** Estuarine Microbial Ecology: The Belle W. In. Marine Science .University of South Carolina Press, Columbia, South Carolina. 1: 433-440.
- ALLEN N. H., AHEARN D. G. (1987).** Ecology of Aquatic Yeasts in: Rose A.H., Harisson J.S. (Eds), the yeasts, V1, Biology of yeast. 2nd Edition. Academic Press. London., 123-174.
- ANTO H., TRIVEDI U., PATEL K. (2006):** Glucoamylase production by solid-state fermentation using rice flake manufacturing waste products as substrate. Bioresource Technology. (10):1161-1166.
- ARCHER D.B., PEBERDY J.F. (1997).** The molecular biology of secreted enzyme production by fungi. Critical reviews in biotechnology. 17(4):273-306.
- BADOT R.M., MERLIN D. (1984).** Métabolisme énergétique et mouvement révolutif chez le haricot (*Phaseolus vulgaris*). Ann. Sci. Uni. Franche-Comté, Biol.Veg. 4 : 7-12.
- BEHAL A., SINGH J., SHARAMA M.K., PUR P., BATRA N. (2006).** Characterisation of Alkaline α -Amylase from *Bacillus sp* AB 04. International Journal of Agriculture & Biology. 08(1): 80-83.
- BERNFELD P. (1955).** Amylases In: Clowck S. P., Kaplan N. O. (ed.), Methods in enzymology. Academic press, New York. 1: 149-157.
- BERRY D., PATERSON A. (1990).** Enzymes in food industry In: Sucking C.J.(ed.),Enzyme chemistry impact and application. Edition champman and hall London, 2nd édition. 306-351.
- BERTHEAU Y., KOTOUJANSKY A ., COLENOA A. (1985).** Sources actuelles et potentielles d'enzymes d' hymolyses et de dépolymérisation. In : Mouranche A. et Coste C. (Ed) : Hydrolyses et dépolymérase enzymes, d intérêt industriel. Ed. Gautier-Villard. 47-108.
- BOIRON P. (1996).** Organisation et biologie des champignons. Edition Nathan. 13-35.
- 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).** Moisissures utiles et nuisibles d'importance industrielle.2ème édition. Masson. Collection Biotechnologies. 34 -381.

- BOUIX M., LEVEAU J. Y. (1991).** Techniques d'analyse et de contrôle dans les industries agroalimentaires, édition 2 Lavoisier-Tec & Doc, Paris. 3 :206-229.
- BOUIX M., LEVEAU J. Y. (1999).** Production des enzymes. In : Scriban R. (Ed) : Biotechnologies .Ed. Lavoisier :344-400.
- BOZIC N., RUIZ J., LOPEZ. S . J., VUJCIC Z. (2011).** Optimization of the growth of and α -amylase production by *Bacillus subtilis* IP 5832 in shake flask and laboratory fermenter batch cultures. Journal of the Serbian Chemical Society. 76(7):965-972.
- BURHAN A., NISA U., GOKHAN C., ÖMER C., ASHABIL A., OSMAN G. (2003).** Enzymatic properties of a novel thermostable, thermophilic, alkaline and chelator resistant amylase from an alkaliphilic *Bacillus sp.* isolate ANT-6. Process Biochemistry. 38(10):1397-1403.
- Bush D. S., Sticher L., Van Huystee R., Wagner D., Jones R. L. (1989).** The calcium requirement for stability and enzymatic activity of two isoforms of barley aleurone alpha-amylase. Journal of Biological Chemistry. 264(32):19392-19398.
- CHARLES A., GUY L., LAURENT M. (2003).** Biochimie alimentaire, 5ème édition de l'abrégé. Dunod, Paris.
- CHATTERTON J. R., VOGELSONGK. M., LUYELLMAN A.B., HUDGENS G. A. (1996).** Salivary α - amylase as a measure of endogenous adrenergic activity. Clin. Phisiol. J. 16(4): 344-348.
- COLEMAN G., ELLIOT W. (1962).** Studies on α -amylase formation by *Bacillus subtilis*. Biochemical Journal. 83(2):256.
- COSTES C. (1985).** Les enzymes ; Production et utilisations industrielles. Bordas, Paris. 37-195.
- DAVET P., ROUXEL F. (1997).** Détection et isolement des champignons du sol. (Ed), INRA. Paris. 13-18.
- EGAS M. C., DACOTA M. S., COWMAN D. A., PIRES E.M. (1998).** Extracellular amylase from *Thermus filiformis*: purification and biochemical characterisation. Extremophiles. 2(1): 23-32.
- FOGARTY W. M., KELLY A. (1980).** Amylases amyloglycosidases and related glucanases in Ecanon. Microbiology. Acad press, New York and London. 17-24.

- GANCEDO .C., SENANO R. (1989).** Energy-Yielding Metabolism. In : Rose A.H., Harrison J.S. (eds), The yeast, Metabolism and Physiology of Yeast. 2 nd edition Academic Press. London. 3: 205- 251.
- GUIIBOT A., C MERCIER C., GERALD O. (1985).** Aspinall editeur Academic Press inc.Orlando.
- GUIRAUD J. P. (1998).** Microbiologie alimentaire. Dunod, Paris. 310-321.
- GUPTA R., GIGRAS P., MOHAPATR H., GOSWAMI V. K., CHAUHAN B. (2003).** Microbial α -amylases: a biotechnological perspective. Process Biochemistry. 38(11):1599-1616.
- HAGLER A .N., MENDONCA H .L. (1981).** Applied and environmental Microbiology.
- HAMMER E., KROWAS D., SCHAFER A., SPECHT M., FRANCKE W., SCHAUER F. (1998).** Isolation and characterisation of a Dibenzofuran-Degrading Yeast: Identification of Oxidation and Ring Cleavage Products. Appl. Environ. Microbiol. 64: 2215-2219.
- HARRIGON W. F., MCLACE M. E. (1976).** Laboratory methods in food and dairy.
- HWANG K. Y., SONG H. K., CHANG C., LEE J., LEE S. Y., KIM K. K., CHOE S., SWEET R. M., SUCH S. W. (1997).** Crystal structure of thermostable α -amylase from *Bacillus licheniformis* refined at 1, 7 Å resolution. Mol. Cells. 7(2): 251-258.
- IGARSHI K., HATADA Y., HAGIHARA H., SAEKI K., TAKAIWA M., ULMURA T., ARA K., OZAKI K., KAWAI S., KOBAYASHI T., ITO S. (1998).** Enzymatic properties of novel liquefying α -amylase from an alkalophilic *Bacillus* isolated and entire nucleotides and aminoacids sequences .Appl. Environ. Microbiol. 64(9): 3282-3289.
- ITO S.T., KOBAYASHI K., ARA K., OZAKI S., KAWAI S and HALADA Y. (1998).** Alkaline detergent enzymes from alkaliphiles: enzymatic properties, genetics and structures. In: Behal A., Singh J., Sharama M.K., Pur P and Batra N. Characterisation of Alkaline α -amylase from *Bacillus* sp. International Journal of Agriculture & Biology. 08(1): 80-83.

- KADREKAR S., RAMASARMA G. (1990).** Amylase and protease production by *Bacillus subtilis*: Studies on improvement of strain and medium. Journal of food science and technology. 27(1):4-6.
- KELLY C. T., BOLTON D. J., FOGARTY W. M. (1994).** Biphasic production of α -amylase of *Bacillus flavothermus* in batch fermentation. Biotechnology. 19(7): 675-677.
- KREGERVAN N. J. (1984).** The Yeast, a Taxonomic Study, Elsevier Biomedical. Press, Amsterdam.
- KRISHNA C., CHANDRASEKARAN M. (1996).** Banana waste as substrate for α -amylase production by *Bacillus subtilis* (CBTK 106) under solid-state fermentation. Applied Microbiology and Biotechnology. 46(2):106-111.
- KWONCHUNG K. J., BENNETT J.E. (1992).** Medical Mycology. Lea & Febiger, Philadelphia. Press, Amsterdam.
- LARPENT G. M., SANGLIER J. J. (1992).** Biotechnologies. Principes et méthodes. 574-581.
- LARPENT J. P. (1991).** Biotechnologie des levures, Masson, Milan Barcelone Bonn. Paris. 97-127.
- LARPENT J. P. (1991).** Biotechnologie des levures. (Ed), Masson, paris.
- LARPENT J. P., LARPENT G. M. (1997).** Mémento technique de microbiologie. 3e édition, Lavoisier-Tec & Doc, Paris. 8: 217-240.
- LECLERC H., MEYER A., DEIANA J. (1995).** Cours de microbiologie générale, nouveau programme, biosciences et techniques, doin éditeur, paris. 73-92.
- LEFUJI H., CHINO M., IMURA Y. (1996).** Raw-starch-digesting and thermostable α -amylase from the yeast *Cryptococcus sp.* S-2: purification, characterization, cloning and sequencing. Biochem. J. 318: 989-996.
- LEVEAU J. K., BOUIX M. (1993).** Microbiologie industrielle, les microorganismes d'intérêt industriel; Lavoisier TEC & DOC, paris. 08: 2-92.
- LODDER J. (1971).** The yeasts, a taxonomic study, 2ème edition. North Holland, Amsterdam, Londres.

- LOURENS K., REID G. (2002).** Yeast nutrient management in winemaking. The Australian & New Zealand Grape grower & Winemaker. Annual Technical Issue. 50 - 54.
- MAGEE R. J., KOSARIC N. (1987).** The microbial production of 2, 3-butanediol. Adv Appl Microbiol. 32(1): 89-161.
- MAMO G., GESSESSE A. (1999).** Purification and characterization of two raw-starch-digesting thermostable α -amylases from a thermophilic *Bacillus sp.* Enzyme and Microbial Technology. 25(3):433-438.
- MAZUR A. K., NAKATANI H. (1993).** Multiple attack mechanism in the porcine pancreatic α -amylase hydrolysis of amylose and amylopectine. Arch. Bioch. Biophysics. 306(1): 29-38.
- MERCIER C. (1985).** Les enzymes amylolytiques. In Mauranch A & Costes C. (Ed): Hydrolases et polymerases. Ed. Gauthier Villars. 109-142.
- MOULIN G. J., GALZY P. (1979).** Study of an amylase and its regulation in *Lipomyces starkeyi*. Agricultural and Biological Chemistry. 43(6):1165-1171.
- MOURANCHE A., COSTES C. (1985).** Hydrolases et dépolymérase. Enzymes d'intérêt industriel. Collection dirigée par Costes C. France.
- MURAKAMI S., NISHIMOTO H., TOYAMA Y., SHIMAMOTO E., TAKENAKA S., KAULPIBOON J., PROUSOONTORN M., LIMPASENI T., PONGSAWASDI P., AOKI K. (2007).** Purification and characterization of two alkaline, thermotolerant α -amylases from *Bacillus halodurans* 38C-2-1 and expression of the cloned gene in *Escherichia coli*. Bioscience, biotechnology, and biochemistry. 71(10): 2393-2401.
- NGUYEN Q. D., REZESSY J. M., HOSCHKE Á. (2000).** Optimisation of composition of media for the production of amylolytic enzymes by *Thermomyces lanuginosus* ATCC 34626. - Food Technol. Biotechnol. 38(3): 229-234.
- NIELSON J. E., BORCHERT T. V., VRIEND G. (2001).** The determinant of α -amylase pH activity profiles. Protein Engineering. Oxford University Press. 14(7): 505-512.
- PANCHAL C. J. (1990).** Yeasts strain selection. Marcel Dekker (ed) USA.

- PANDEY A., NIGAM P., SOCCOL V.T., SINGH D., MOHAN R. (2000).** Advances in microbial amylases. In: Alva S., Anupama J., Savla J., Chiu Y.Y., Vyshali P., Shruti M., Yogeetha B.S., Bhavya D., Purvi J., Ruchi K., Kumudini B.S and Varalakshmi K.N. Production and characterisation of fungal amylase enzyme isolated from *Aspergillus sp.* JGI12 in solid state culture. African Journal of Biotechnology. 6(5): 576-581.
- PEDERSEN H., NIELMSEN J. (2000).** The influence of the nitrogen source on the α -amylase productivity of *Aspergillus oryzae* in continuous cultures . Appl Microbiol. Biothechnol. 53: 278-281.
- PHAFF H. J., 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. 2nd edition Academic Press.Londres. 123-174.
- PRIESTLE Y. P. (1988).** A sterea cartoon-drawing program for proteins. J.Appl. Crystall., 21: 472-576.
- Prieto J. A., Bort B. R., Martínez J., Randez G. F., Sanz P., Buesa C. (1995).** Purification and characterization of a new α -amylase of intermediate thermal stability from the yeast *Lipomyces kononenkoae*. Biochemistry and Cell Biology. 73(1-2):41-49.
- ROA U. M., SATYANARAYANA T. (2003).** Statistical optimisation of a high maltose-forming, hyperthermostable and Ca^{2+} independent alpha-amylase production by an extreme thermophile *Geobacillus thermoleovorans* using response surface methodology. In: Behal A., Singh J., Sharama M.K., Pur P and Batra N. Characterisation of Alkaline α -amylase from *Bacillus sp* AB 04. International Journal of Agriculture & Biology. 08(1): 80-83.
- SANOFI W. (1996).** Notices du médicament (maxilase) 94258 genilly cedex france fabricant Sanofi Winthrop industrie ambares 33. France.
- SAVCHEKO A., VIEILLE C., KANG S., ZEIKUS J. C. (2002).** *Pyrococcus* α -amylase is stabilised by calcium and zinc .Department of biochemistry and molecular biology. University east Lausing. 111-123.

- SAXUNA R. K ., DUTT K .,AGARWAL L ., Nayyar P. (2007).** A highly thermostable and alkaline amylase from a *Bacillus* sp PN5. *Bioresource Technology*. 98(2): 260–265.
- SCRIBAN R. (1999).** *Biotechnologies*. 5^{ème} édition. Techniques et Documentation-Lavoisier. 149-157.
- SCRIBAN R. (1982).** *Biotechnologie, technique et documentation-Lavoisier*, paris. 591(267): 2-85206-140-6.
- SHARMA N., VAMIL R., AHMAD S., AGARWAL R. (2012).** Effect of different carbon and nitrogen sources on α -amylase production from *Bacillus amyloliquefaciens*. *Int J Pharm Sci Res*. 3(4):1161-1163.
- SHATTA A., EL-HAMAHMY A., AHMED F., IBRAHIM M., ARAFA M. (1990).** The influence of certain nutritional and environmental factors on the production of amylase enzyme by *Streptomyces aureofaciens* 77. *J Islamic Acad Sci*. 3(2):134-138.
- SICARD P. (1982).** Applications industrielles des enzymes. In : Durand G. & Monson P. (Ed): *Les enzymes production et utilisation industrielles*. Ed. Gauthier-Villars. 121-164.
- SIMON P., MEUNIER R. (1970).** *Microbiologie industrielle et génie biochimique*. Masson ETCIE, éditeurs, paris. 31-47: 385-411.
- SRINIVASA R. M., REDDY G., VENKATESWARA R . G., SAMBASIVA R. K. (2004).** Studies on the extraction and characterisation of thermostable α -amylase from pericarp of *Borassus indica*. *African Journal of Biotechnology*. 4: 289-291.
- Steyn A. J., Pretorius I. S. (1995).** Characterization of a novel α -amylase from *Lipomyces kononenkoae* and expression of its gene (LKA1) in *Saccharomyces cerevisiae*. *Current genetics*. 28(6): 526-533.
- TAKEUCHI A., SHIMIZU I. A., NISHIYAMA Y., MURA K., OKADA S., TOKUE C., ARAI S. (2006).** Purification and characterization of an α -amylase of *Pichia burtonii* isolated from the traditional starter “Murcha” in Nepal. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*. 70(12):3019-3024.
- TAMAKI N., HAMA T. (1982).** In “*Methods in enzymology*” (W. A. Wood, ed.), Academic Press, London. 89: 285-306.

- TSUYOSHI N., FUDOU R., YAMANAKA S., KOZAKI M., TAMANG N., THAPA S., TAMANG J. P. (2004).** Identification of yeast strains isolated from marcha in Sikkim, a microbial starter for amylolytic fermentation. *International Journal of Food Microbiology*. 99: 135-146.
- ULACIO D., PEREZ C., PINEDA Y. J. (1997).** Mycoflora in tobacco plant roots (*Nicotiana tabacum*) in portuguesa state, Venezuela. *Bioagro*. 9(1): 3-11.
- ULHAQ I., ROHEENA A., ASHRAF H., SHAH A. H . (2002).** Isolation and Screening of Fungi for the Biosynthesis of Alpha Amylase. *Biotechnology*. 1 (2-4): 61-66.
- VAN U. N., FELL J. W. (1968).** *Advances in Microbiology of the Sea*. Academic Press, New York. 1: 167-201.
- VIROLLE M. J., BIBB M. (1988).** Cloning, characterization and regulation of an α -amylase gene from *Streptomyces limosus*. *Molecular microbiology*. 2(2):197-208.
- WALKER G. (2000).** The role of metal ions in optimizing yeast fermentation performance. In: *Nutritional aspects II. Synergy between yeasts and bacteria*. Allemande Technical Meeting . 27-30.
- WANG T. T., LIN L. L., HSU W. H. (1989).** Cloning and expression of *Schwanniomyces occidentalis* α -amylase gene in *Saccharomyces cerivisiae*. *Applid and Environmental Microbiology*. 55(12): 3167-3172.
- WICKERHAM L. J., BURTON K . A. (1948).** *Journal of Bacteriology*. 56: 363.
- WICKERHAM L. J. (1951).** *Taxonomy of yeasts*. Technical Bulletin No. 1029, United States. Department of Agriculture, Washington, D.C.

Annexe A: Milieux de culture

1. Milieux d'isolement

*** Sabouraud**

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

***Yeast Malt Agar (YMA)**

Extrait de levure.....	3 g
Extrait de malt.....	3 g
Peptone.....	5 g
Glucose.....	10 g
Agar	20 g
Eau distillée.....	1000 ml

2. Milieux de repiquage et de conservation

*** Potato Dextrose Agar (PDA)**

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

Préparation de l'extrait de pomme de terre :

Une pesée de 200 g de pomme de terre lavée, coupée en petits dés est introduite dans un volume d'un litre d'eau distillée, portée à ébullition pendant 1 heure, écrasés à l'aide d'un mixeur , filtrée dans un récipient

Préparation du milieu

L'agar et le glucose sont dissous à chaud dans un volume d'un litre d'eau distillée, ajustés à une valeur de pH de 5, stérilisés dans un autoclave à une température de 110°C pendant 30 minutes.

*** Malt Agar (MA)**

Extrait de Mal	30 g
Peptone.....	05 g
Glucose	15 g
Agar	15 g
Eau distillée	1000 ml

3. Milieux de sélection

*** AAM**

Eau distillée stérile	1000 ml
Amidon	10 g
Agar	20 g
Ajustement de la valeur de pH à 5 et stérilisation à une température de 110°C pendant 30 minutes.	

4. Milieux d'identification

*** Yeast Glucose (YG)**

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

*** Yeast Malt (YM)**

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

*** Yeast Peptone Glucose (YPG)**

Extrait de levure	5 g
Peptone.....	10 g
Glucose.....	20 g
Eau distillée	1000 ml

*** Malt Extract (ME)**

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

*** Fowells**

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

*** Gordkowa**

Glucose	1 g
Peptone.....	10 g
NaCl	5 g
Agar	20 g
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	20 g
Eau distillée.....	1000 ml

***Fermentation des sucres**

Extrait de levure.....	4,5 g
Peptone	7,5 g
Sucre.....	20 g
Eau distillée	1000 ml

***Assimilation nitrates**

Glucose	20 g
KH ₂ PO ₄	1 g
MgSO ₄	0,5 g

Agar 20 g
Eau distillée 1000 ml

5. Milieux d'optimisation

Amidon 4 g
(NH₄)₂SO₄ 15 g
KH₂PO₄ 3 g
MgSO₄, 5H₂O 0,5 g
Extrait de levure 4 g
Micro-éléments en solution..... 1 ml
Eau distillée 1000 ml

Les milieux de culture préparés sont autoclavés à 120°C pendant 20 minutes.

Annexe B : Les courbes d'étalonnages

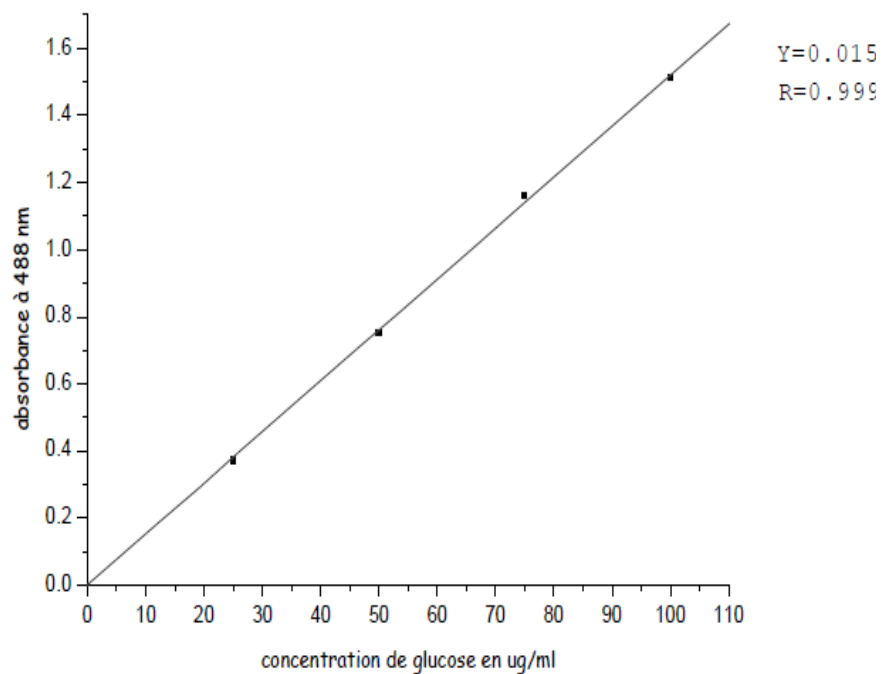


Figure 45: Présentation de la courbe étalon du glucose.

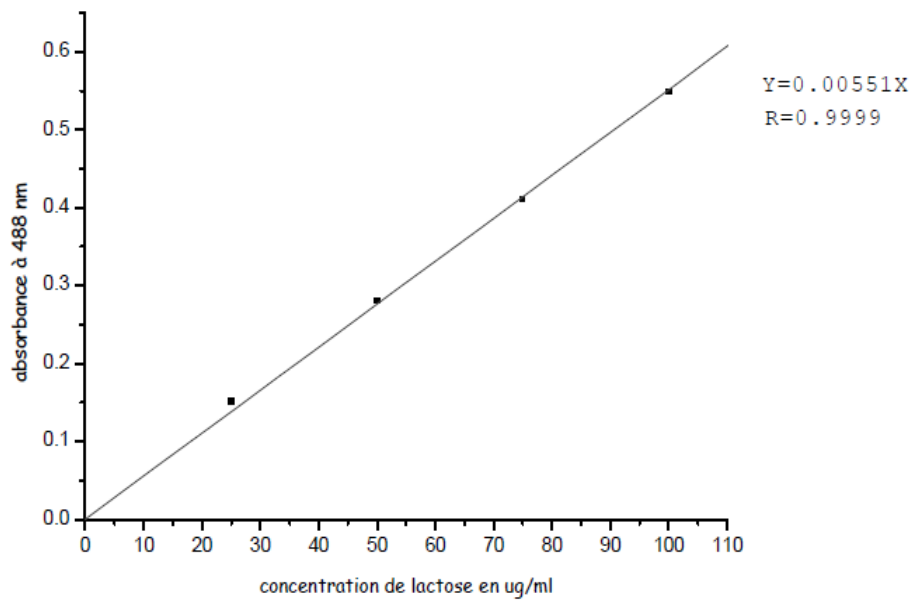


Figure 46: Présentation de la courbe étalon du lactose.

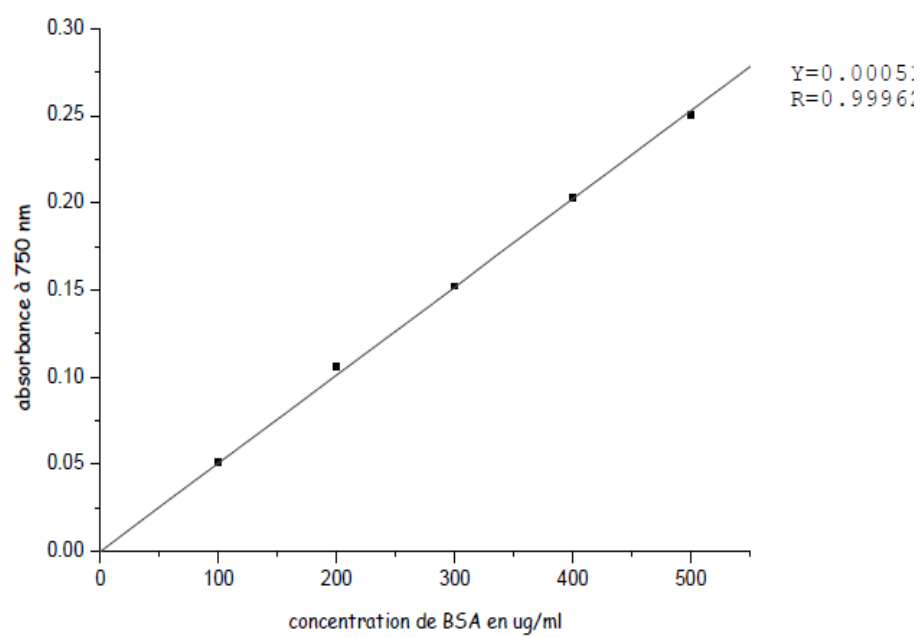


Figure 47: Présentation de la courbe étalon des protéines.

Annexe C : les dosages

1. Détermination de l'acidité

- versement d'un volume de 10 ml de lactosérum dans un bécher de 50 ml.
- ajout de deux gouttes de la solution de phénophtaléine.
- Titrage avec une solution de N/9 NaOH, placée dans une burette.

La coloration rose apparue (comparée à un témoin) doit persister au moins une dizaine de secondes. L'acidité en gramme pour 100 g de lactosérum est donnée par la formule suivante :

$$0,01 \times V \times 100/E$$

Une pesée de 0,01 g est introduite d'acide lactique dans un volume de 1 ml de solution de NaOH.

V = volume en ml de la solution de NaOH.

E = masse en gramme de la prise d'essai.

2. Dosage de l'azote total

Réactifs

Acide sulfurique concentré (d = 1,84)

Acide sulfurique 0,1 N

Soude 0,1 N

Lessive de soude 33%

Sélénium en poudre pur (catalyseur)

Indicateur rouge de méthyle

Papier pH ou papier tournesol

Billes de verre ou pierre ponce

Protocole

1- Minéralisation sulfurique

- Introduction dans un Matras Kjeldhal 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.

Le liquide est chauffé jusqu'à des colorations complète (la solution devenu limpide) en maintenant une ébullition tranquille sans laisser échapper les vapeurs sulfuriques qui doivent le surmonter et laissé refroidir.

2- Alcalinisation et distillation

- Ajout dans le Matras Kjeldhal contenant le sulfate d'ammonium:

160 ml d'eau distillée

80 ml de lessive de soude à 33%

Quelques graines de pierres ponce pour régulariser l'ébullition.

- Ajout de lessive de soude (sans agitation par risque de perte de l'ammoniaque) pour le déplacement de l'ammoniaque, une fois que l'appareil à distiller est prêt à fonctionner :

- Réfrigération assurée et extrémité de l'appareil plongeant dans un erlen-meyer de 30 ml contenant 20 ml d'acide sulfurique 0,1 N (extrémité de l'appareil doit être en contact avec le liquide).

- Vérification de la fin de la distillation en recevant quelques gouttes de distillat, soit sur papier tournesol rouge (qui devient bleu en présence d'ammoniaque, car le milieu est basique), soit sur du papier pH.

3- Titrage

- L'ammoniaque distillée est reçue dans erlen-meyer contenant l'acide sulfurique en excès (20 ml).

- Ajout dans des erlen-meyer quelques gouttes de rouge de méthyle et titrage par la soude 0.1N l'acide sulfurique restant (qui n'a pas réagit avec l'ammoniaque).

- Dosage goutte à goutte avec la soude contenue dans la burette, jusqu'au virage jaune pâle persistant.

Calculs

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

$$N = \frac{0,0014 \times V \times 100}{p}$$

V : volume de l'acide sulfurique qui a réagit avec l'ammoniaque.

P : la prise d'essai (1 g).

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 : humidité de l'échantillon.

Pour obtenir une valeur appropriée du taux de protéines, il faut multiplier le taux d'azote par un coefficient déterminé expérimentalement.

3. Dosage des sucres totaux

Réactifs

Solution mère de lactose à 100 µg/ml pour la courbe étalon du lactose.

Solution mère de glucose à 100 µg/ml pour la courbe étalon de glucose.

Phénol 5 % dans l'eau distillée.

Acide sulfurique concentré à 95% de pureté et de densité $d = 1,84$

Protocole

Ce dosage permet la détermination des concentrations de glucose et du lactose dans le lactosérum. À 1 ml de l'échantillon dilué, on ajoute un volume de 1 ml du phénol à 5% puis 5 ml d'acide sulfurique. Après agitation, on laisse le mélange réactionnel reposer 10 minutes à température ambiante, puis on l'incube au bain Marie à 30°C pendant 30 minutes. Après la lecture des absorbances au spectrophotomètre à 488 nm, les valeurs obtenues sont traduites en concentrations de glucose et lactose par référence à des courbes d'étalonnage préalablement établies.

4. Dosage de la matière grasse

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

Protocole

- Ajout d'un volume de 50 ml d'acide chlorhydrique à une pesée de 5 g de l'échantillon et faire bouillir pendant 5 minutes.
- Ajout d'un volume de 1 ml de solution d'acétate de zinc à 20% et 1 ml de solution de ferrocyanure de potassium à 10%, si le liquide n'est pas clair
- Filtration sur un filtre mouillé, contenant 5 g de sable purifié
- Séchage à l'étuve à 105°C.
- Extraction du papier filtre séché et résidu avec de l'éther de pétrole pendant 2 heures dans un soxhlet, dont le ballon aura été taré.
- Broyage du résidu et extraction de nouveau pendant 1 heure.
- Distillation sous vide sur un rotavapeur la totalité du solvant contenu dans le ballon, en considérant les vapeurs de solvant à l'aide d'un réfrigérant descendant.
- Séchage ensuite à l'étuve à 105°C jusqu' à poids constant.

Calculs

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

$$P = P1 - P2$$

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

P1 : poids du ballon avant extraction

P2 : poids du ballon après extraction

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

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

H : humidité du produit

5. Dosage des sels minéraux

5.1. Dosage du Calcium

Réactifs

Solution saturée à froid d'oxalate d'ammonium

Solution d'acide formique à 2%

Solution d'acide acétique à 20%

Solution d'acide sulfurique à 20%

Solution d'acide d'ammoniaque à 20%

Solution de rouge de méthyle

Eau ammoniacale oxalatée (Ammoniaque 10 ml + Solution saturée d'oxalate de calcium).

Permanganate de potassium N/2

Protocole

- Incinération d'une pesée de 5 g et alcalinisation légère par l'ammoniaque en présence de rouge de méthyle.
- Dissolution du précipité par un excès de solution à 20% d'acide formique ou d'acide acétique et porté à l'ébullition, en additionnant quelques gouttes du même acide si un trouble se manifeste à nouveau.
- Ajout d'un excès (10 ml) de solution à froid d'oxalate d'ammonium. Après 1 heure, recueille le précipité sur un filtre sans cendres.
- Lavage à l'eau ammoniacale à 10% saturée d'oxalate de calcium pour éliminer complètement l'oxalate d'ammonium (le filtrat ne doit plus réagir avec un sel de calcium).
- Passage du précipité dans un bécher à l'aide d'une pissette à eau bouillante, on utilise environ 50 ml d'eaux chaude. On peut également faire passer dans le bécher le précipité et le filtre que l'on dilacère. Dans ce cas, un dosage témoin avec filtre seul est nécessaire.
- Ajout d'un volume de 25 à 30 ml d'acide sulfurique à 20% pour dissoudre le précipité et porter la solution à plus 60-70°C.
- Versement goutte à goutte de la solution titrée de permanganate de potassium jusqu'à coloration rose persistante, 1 ml de la solution N/10 de permanganate de potassium correspond à 2 mg de calcium.

5.2. Dosage du Chlore

Réactifs

Acide azotique ou nitrique à 5%

Acide azotique à 2%

Acide azotique 6 N

Solution de ferrocyanure de potassium :

Ferrocyanure de potassium 15 g

Eau distillée 100 ml

Solution d'acétate de zinc :

Acétate de zinc 30 g

Eau distillée 100 ml

Solution environ 1N de potasse

Solution eau oxygénée à 10 volumes

Solution saturée de permanganate de potassium

Solution d'azote (ou de nitrate d'argent N/10)

Solution de sulfocyanure (thiocyanate) d'ammonium (ou de potassium) N/10

Solution saturée d'alun de fer ammoniacale (à 40 %)

Protocole

- Incinération d'un volume de 5 g de produit pendant 1 heure à 220°C
- Epuisement des cendres à plusieurs reprises par une solution d'acide azotique à 2%
filtration sur filtre sans cendres
- Incinération du filtre à plus 550°C et reprend les cendres obtenues par la solution d'acide nitrique à 2%.
- Jonction de cette liqueur à la précédente et amené les solutions à un volume connu
- Prélèvement d'un volume de la solution déféquée renfermant les chlorures dans un ballon jaugé de 200 ml.
- Ajout d'un volume de 5 ml d'acide azotique et 20 ml d'azote d'argent N/10
- Après agitation, laisser le mélange reposer à l'obscurité pour rassembler le précipité de chlorure d'argent
- Filtration d'un volume de 100 ml de la solution claire et l'ajout de 5 ml d'une solution d'alun de fer ammoniacal pure à 40 % dont on fait disparaître la coloration brune par de l'acide nitrique en quantité suffisante pour amener la solution à une teinte vert claire
- titrage du l'excès d'argent à l'aide d'une solution N/10 de sulfocyanure d'ammonium ou de potassium jusqu'au virage rose
- Faire d'autre part, un titrage avec 100 ml d'eau distillée renfermant 5 ml d'acide nitrique, 10 ml d'azotate d'argent N/10 et 5 ml d'une solution saturée d'alun de fer ammoniacal.

La différence des deux lectures, exprimée en millilitres d'azotate d'argent N/10, correspond aux chlorures contenus dans la moitié du volume prélevé de la solution déféquée. 1 ml de nitrate d'argent N/10 correspond à 0.00585 g de chlorures de sodium.

6. Dosage de l'activité amylolytique

Réactifs

- **DNSA**

Une pesée de 1 g d'acide 3,5 dinitrosalicylique est introduite dans un volume de 20 ml de 2N NaOH et 50 ml d'eau distillée et ajout d'un volume de 30 g de tartrate double de sodium et de potassium. Le mélange est Complété à 100 ml avec l'eau distillée puis Filtrer et conserver à l'abri de la lumière.

- **Substrat**

Une pesée de 1 g d'amidon soluble est introduite dans 100 ml de tampon phosphate 0,1 M, pH 5.

Protocole

- Ajout à 0,5 ml de l'extrait enzymatique un volume de 0,5 ml du substrat puis agiter et incubé à 40°C pendant 30 minutes. Le blanc est constitué d'extrait enzymatique dénaturé à 100°C pendant 15 minutes. La réaction est arrêtée par l'addition de 1 ml de DNSA, suivie d'un chauffage à 100°C pendant 5 minutes. Après refroidissement dans un bain de glace, 10 ml d'eau distillée sont ajoutés. L'absorbance est déterminé à 488 nm. La concentration des sucres réducteurs correspondants est déterminée à partir d'une courbe étalon établie avec des concentrations du glucose variant de 10 à 100 mg/100 ml

7. Dosage des protéines

Réactifs

Solution A : Na_2CO_3 2 %, 0,1 N NaOH

Solution B : Tartrate double de Na, K 2 % dans l'eau distillée.

Solution C : $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1 % dans l'eau distillée.

Solution D : 0,5 ml de la solution C

0,5 ml de la solution B

0,5 ml de la solution A

Réactif de Folin-ciocalteu dilué au 1/3^{ème}

Protocole

- Ajout à un volume de 1 ml d'échantillon, un volume de 5 ml de la solution D
- Après agitation, laisser le mélange reposer 10 minutes à température ambiante
- Ajout d'un volume de 0,5 ml de réactif de Folin, agité le mélange pendant 10 minutes et laissé la réaction colorée se développer 30 minutes à l'obscurité. L'absorbance est déterminée à 750 nm.

N.B : La courbe étalon est établie avec une solution de sérum albumine bovine (BSA) dont les concentrations varient de 0-500 µg/ml.

Résumé :

Les enzymes produites par les microorganismes présentent une importance particulière dans l'industrie biotechnologique, les industries nécessitent des souches productrices des enzymes thermostables capables de résister au processus industriel. Les amylases, enzymes classées selon la nomenclature internationale EC 3.2.1.1, largement utilisées dans diverses industries (panification, biscuiterie, amidonnerie...etc).

L'objectif de ce travail est l'isolement et caractérisation de souches levuriennes productrices des amylases, l'étude de la cinétique enzymatique, l'optimisation des paramètres physicochimiques impliqués dans la production des amylases, les sources de carbones, les sources d'azotes, les sources d'ions, EDTA, SDS, pH, la température et la thermostabilité.

L'isolement des levures productrices de l'amylase est effectué à partir d'échantillons prélevés du sol saharien de Sud Ouest et Sud Est Algérien (Béchar et Ouargla) par l'utilisation d'un milieu de culture contenant de l'amidon comme seule source de carbone (Amylase Activity Medium).

Le criblage primaire des souches levuriennes productrices de l'amylase est mis en évidence par inondation de la surface de la gélose du milieu de culture utilisé, contenant des colonies pures, avec une solution de lugol. Les colonies isolées, sélectionnées productrices de l'amylase par la mesure de la zone d'hydrolyse formée sur la surface du milieu de culture contenant l'amidon comme seule source de carbone sont soumises à une éventuelle identification. Par ailleurs, l'étude du suivi de la cinétique enzymatique et l'optimisation des paramètres physicochimiques impliqués dans la production de l'amylase sont réalisées par l'utilisation de la méthode DNS.

Les résultats obtenus ont montré que parmi les 11 souches isolées, productrices d'amylase, une souche levurienne LB₃ se manifeste hautement productrice de l'amylase.

L'étude des caractères morphologiques, physiologiques et biochimiques semble indiquer que la souche levurienne LB₃, appartient au genre *Schwanniomyces*.

Par ailleurs, l'étude du suivi de la cinétique enzymatique et l'optimisation des différents paramètres impliqués dans la production de l'amylase chez la souche isolée, sélectionnée productrice de l'amylase, cultivée sur un milieu de culture à base de lactosérum à 100% déprotéiné et supplémenté par l'amidon à 1% a révélé une importante source de production de cette enzyme, qui pourrait être exploitée dans le domaine industriel.

Mots clés : amylase, levures, sol saharien, *Schwanniomyces*, lactosérum.