

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

جامعة الاخوة منتوري
Université Mentouri Constantine
كلية علوم الطبيعة و الحياة
Faculté des sciences de la nature et de la vie



Département : Biochimie/ Biologie Cellulaire et Moléculaire

Mémoire présenté en vue de l'obtention du **Diplôme de Master**

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : *Biochimie / Analyse Protéomique et Santé*

Theme:

*Recherche de levures productrices d'enzymes glycolytiques
exocellulaires thermostables : Production (sur boîte de Pétri et
en batch) et Caractérisation des enzymes produites.*

Présenté et soutenu par : DALI Nadine Sofia

Le : 28/06/2016

HAMAME Afaf

Jury d'évaluation :

Président du jury : BENHAMDI A. M.C.B, Université Frères MENTOURI Constantine.

Encadreur : MERAIHI Z. Professeur, Université Frères MENTOURI Constantine.

Co-encadreur : DAKHMOUCHE S. M.A.A., ENS, Université Constantine 3.

Examineur : BENNAMOUN L. M.A.A., Université Frères MENTOURI Constantine.

Année universitaire : 2015 - 2016

Remerciements

Nous tenons à remercier en premier lieu Dieu, le tout Puissant de nous avoir donné volonté et patience pour achever ce travail réalisé à la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie de l'Université Frères Mentouri Constantine.

C'est avec grand plaisir que nous tenons à exprimer toute notre gratitude à Madame le Professeur Meraihi Z, notre encadreur, qui a dirigé ce travail, nous a soutenues et nous a poussées à nous surpasser et à donner le meilleur de nous même grâce à ses critiques constructives et avisées.

Un grand merci s'adresse aussi à notre co-encadreur Dr Djekriif-Dakhmouche S. et à M^{me} Bennamoun qui nous ont vraiment aidées avec leurs précieux conseils.

Nos vifs remerciements s'adressent également aux membres de jury qui ont accepté de juger ce travail :

À Dr Benhamdi A. pour le grand honneur de présider le jury.

À Mme Bennamoun L. Maître assistante à l'U. Frères Mentouri pour avoir bien voulu examiner ce travail.

Merci à tous les professeurs qui nous ont enseignées durant notre cursus universitaire en particulier Pr Mechakra et Pr Khelifi ainsi que toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Dédicaces

*Je dédie ce modeste travail, en premier lieu à mes chers
parents pour toutes ces années de sacrifices,*

*A toi papa, qui m'as toujours fait confiance et poussée à
donner le meilleur de moi-même,*

*A toi maman, qui m'as appris que la persévérance fini
toujours par payer et qui as toujours cru en moi et m'as
offert la meilleure des éducations,*

A mon frère Malik et ma sœur Serine pour leur amour,

*A mes grands-mères ainsi qu'à celle qui s'est occupée de moi
depuis toute petite "Mma"*

*A tous mes oncles, tantes, cousins, cousines et tous les
membres de la famille,*

Grand merci à Sandra et Celia qui m'ont beaucoup aidée.

*A tous mes amis qui m'ont soutenue et aidée ; Djihene, Ines,
Sami, Abdou, Youssef, et Rahim.*

*A celle que j'aurais aimé qu'elle soit parmi nous aujourd'hui
pour me partager cette joie « Lamia » que Dieu l'accueille
dans son vaste paradis.*

Nadine Sofia, DALI

Dédicaces

A la mémoire de mes parents, qui ont béni mon désir d'apprendre et m'ont toujours encouragé, avec tout mon amour et ma reconnaissance pour être devenue ce que je suis, que dieu leur procure santé et longue vie.

A ma mère " Ma source de tendresse et de courage, la lueur de ma réussite."

A mon père " L'épaule solide, l'œil attentif compréhensif et la personne la plus digne de mon estime et de mon respect. "

A mon frère Akram et à mes sœurs ma confidente Rayene, ma petite princesse Insaf, qu'ils trouvent ici le témoignage de ma profonde tendresse.

A mes très chers grands parents, mes oncles Nabil et Chauki, qu'ils trouvent ici l'expression de mes sentiments les plus sincères pour l'affection et le soutien, dont ils ont fait preuve à mon égard, lors des moments difficiles.

A mes très chères amies qui ont su arroser dans mon cœur joie et bonheur : Latifa, Sara, Leila, Badra, Inès, safa, Camille, Amina, Yamine, Ibtissem, Besma, Soussou. Mes dédicaces les plus distinguées à Doudou, Rimel, Samy, Chaher.

Je dédie ce modeste travail à une personnalité brillante, qui m'a été une source d'inspiration, aussi bien de ses qualités que de son parcours, il s'agit bien évidemment de Michel Depachetère, qui m'a toujours soutenu dans la vie.

Hamame Afaf.

Sommaire

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction

Chapitre 1: Synthèse bibliographique

| | |
|---|----|
| 1. Les levures..... | 3 |
| 1.1. Historique..... | 3 |
| 1.2. Généralités | 3 |
| 1.3. Habitat | 3 |
| 1.4. Caractéristiques des levures | 5 |
| 1.4.1. Caractéristiques Physiologiques et nutritionnels | 5 |
| 1.5. Classification des levures..... | 8 |
| 1.6. Biotechnologie et levures..... | 9 |
| 1.7. L'espèce <i>Clavispora lusitaniae</i> | 13 |
| 2. Enzymes et substrats | 16 |
| 2.1. L' α -amylase, enzyme hydrolysant l'amidon..... | 16 |
| 2.1.1. Généralités et nomenclature | 16 |
| 2.1.2. Origine des α -amylases | 17 |
| 2.1.3. Structure de l' α -amylase | 19 |
| 2.1.4. Mode d'action de l' α -amylase..... | 20 |
| 2.1.5. Température et pH optimum | 21 |
| 2.1.6. L'amidon, substrat de l' α -amylase..... | 23 |
| 2.1.7. Applications de l' α -amylase en industrie..... | 24 |
| 2.2. La maltase, enzyme hydrolysant le maltose..... | 26 |
| 2.2.1. Généralités et nomenclature | 26 |
| 2.2.2. Structure de la maltase | 27 |
| 2.2.3. Mode d'action..... | 27 |
| 2.2.4. Caractéristiques physico-chimiques..... | 29 |
| 2.2.5. Le substrat de production de la maltase, le maltose..... | 30 |
| 2.2.6. Applications de la maltase en industrie..... | 32 |
| 3. Autres enzymes glycolytiques : Cellulases et Pectinases | 33 |
| 3.1. Les pectinases, enzymes hydrolysant les pectines..... | 33 |
| 3.2. La cellulase, enzyme hydrolysant la cellulose | 35 |
| 4. Les protéases, enzymes hydrolysant les protéines | 37 |
| 5. Le milieu de base pour la production des enzymes : le lactosérum | 38 |

Chapitre 2: Matériel et méthodes

| | |
|--|----|
| 1. Matériel biologique et repiquage des souches sur boîtes de pétri | 40 |
| 2. Sélection de la souche la plus performante dans la production d'enzymes | 40 |
| 3. Mise en évidence sur boîtes des activités enzymatiques | 40 |
| 3.1. La mise en évidence de l'activité de l'alpha amylase..... | 40 |
| 3.2. La mise en évidence de l'activité de la maltase et de la cellulase | 40 |
| 3.3. La mise en évidence de l'activité de la pectinase | 41 |
| 3.4. La mise en évidence de l'activité des protéases | 41 |
| 4. Cinétique de production enzymatique de la souche d'intérêt | 41 |
| 4.1. Préparation de l'inoculum..... | 41 |
| 4.2. Dénombrement des cellules | 41 |
| 4.3. Milieu de base pour la production des enzymes..... | 41 |
| 4.3.1. Préparation du milieu | 42 |
| 4.4. Dosage des activités enzymatique | 42 |
| 4.4.1. Dosage de l'activité α -amylasique (méthode de Bernfeld 1955)..... | 42 |
| 4.4.2. Dosage de l'activité maltasique | 43 |
| 4.5. Dosage de protéines..... | 43 |
| 5. Etude des propriétés de l' α -amylase et de la maltase de l'extrait brut | 44 |
| 5.1. Effet du pH..... | 44 |
| 5.2. Effet de la température..... | 44 |
| 5.3. Stabilité thermique..... | 44 |
| 6. Traitement statistique | 44 |

Chapitre 3: Résultats et discussion

| | |
|--|----|
| 1. Repiquage des souches et sélection des levures ayant une meilleure croissance..... | 45 |
| 2. Mise en évidence des activités enzymatiques sur milieu de base solide (boîte de pétri) | 46 |
| 3. Cinétique de production de l' α -amylase et de la maltase par <i>Clavispora lusitaniae</i> | 50 |
| 4. Etude physico-chimique de l' α -amylase et de la maltase de <i>Clavispora lusitaniae</i> de l'extrait brut | 53 |
| 4.1. Effet de la variation du pH sur les activités α -amylasique et maltasique de <i>Clavispora lusitaniae</i> .. | 53 |
| 4.2. Effet de la température sur les activités α -amylasique et maltasique de <i>Clavispora lusitaniae</i> | 55 |
| 4.3. Effet de la thermostabilité sur les activités α -amylasique et maltasique de <i>Clavispora lusitaniae</i> .. | 57 |
| 4.3.1. Effet de la thermostabilité sur l'activité α -amylasique..... | 57 |
| 4.3.2. Effet de la thermostabilité sur l'activité maltasique..... | 59 |

Conclusion générale

Abstract

ملخص

Références

Annexes

Liste des abréviations

| | |
|---|---|
| Å : ångström | NADP⁺ : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate |
| AE : Activité enzymatique | PDA : Pomme de terre-Dextrose-Agar. |
| Asp : Aspartate | PE : pectinestérase |
| <i>A_w</i> : Activité de l'eau | PG : polygalacturonase. |
| BGL : β -glucosidases | PGL : polygalacturonate lyase |
| C : Celcius | PM : Poids Moléculaire |
| CaCl₂ : Chlorure de Calcium. | PMG : polyméthylgalacturonase |
| CBH : cellobiohydrolases | PMGL : polyméthylgalacturonate lyase |
| DNSA : 3,5 dinitrosalicylique acide | p-NPG : P-Nitrophenyl beta-D-glucopyranoside |
| EC : Enzym Commission number. | RG : rhamnogalacturonanes |
| EDTA : Ethylène diamine tétraacétique acide | Rpm : revolutions per minute (tours par minute). |
| EGL : endoglucanases | SDS : Sodium dodécylsulfate. |
| G6PD : Glucose-6-phosphate déshydrogénase | <i>Sp.</i> : Espèce |
| GANAB : Acide <i>Alpha-Glucosidase AB</i> | T : température |
| GANC : Neutral <i>Alpha-Glucosidase C</i> | TG : Triglycéride |
| GH : glycosides hydrolases | Trp : Tryptophane. |
| Glu : Glutamate. | UI : Unité Internationale |
| GRAS : Generaly Recognised As Safe | USD : United States Dollar. |
| HG : homogalacturonane | YPCA : Yeast extract-Peptone-Cellulose-Agar |
| Kda : kilo Dalton. | YPGA : Yeast extract-Peptone-Glucose-Agar |
| L : Levure | YPMA : Yeast extract-Peptone-Maltose-Agar |
| M : molaire | YPPA : Yeast extract-Peptone-Pectin-Agar |
| MS : Matière sèche | YPSA : Yeast extract-Peptone-Starch-Agar |
| NAD⁺ : Nicotinamide Adénine Dinucléotide. | |

Liste des figures

| | |
|---|----|
| Figure 01 : Filamentation des levures. | 04 |
| Figure 02 : Reproduction sexuée chez <i>Clavispora lusitaniae</i> . | 04 |
| Figure 03 : Arbre phylogénique des genres de levures. | 09 |
| Figure 04 : Structure monomérique de l'alpha-amylase. | 19 |
| Figure 05 : Mécanisme catalytique des hydrolases glycosyliques. | 20 |
| Figure 06 : Structure de l'amylose . | 23 |
| Figure 07 : Structure de l'amylopectine. | 23 |
| Figure 08 : Structure monomérique de la maltase. | 27 |
| Figure 09 : Mode d'action de la maltase. | 28 |
| Figure 10 : Mécanisme de configuration anomérique de la maltase. | 29 |
| Figure 11 : Structure de l'acide polygalacturonique (pectine) | 33 |
| Figure 12 : Mode d'action des pectinases. | 34 |
| Figure 13 : Courbe étalon maltose | 42 |
| Figure 14 : Courbe étalon glucose. | 43 |
| Figure 15 : Courbe étalon des protéines. | 44 |
| Figure 16 : Repiquage des quatre souches levuriennes, aspect macroscopique. | 45 |
| Figure 17 : Evolution cinétique de l'activité amyliasique au cours de la fermentation par <i>Clavispora lusitaniae</i> | 50 |
| Figure 18 : Effet du pH sur l'activité de l' α -amylase et la maltase de <i>Clavispora lusitaniae</i> . | 53 |
| Figure 19 : Effet de la température sur l'activité de l' α -amylase (pH6) et la maltase (pH6) de <i>Clavispora lusitaniae</i> . | 55 |
| Figure 20 : Effet de la thermostabilité sur l' α -amylase de <i>Clavispora lusitaniae</i> . | 57 |
| Figure 21 : Effet de la thermostabilité sur la maltase de <i>Clavispora lusitaniae</i> . | 59 |

Liste des tableaux

| | |
|---|----|
| Tableau 01 : Intérêt des vitamines et leurs coenzymes dans le métabolisme | 07 |
| Tableau 02 : Quelques enzymes industrielles produites par les levures | 11 |
| Tableau 03 : Quelques enzymes et protéines recombinantes synthétisées par des levures utilisées en thérapie. | 12 |
| Tableau 04 : Habitat de <i>Clavispora lusitaniae</i> . | 14 |
| Tableau 05 : Enzymes et protéines recombinantes dont le système d'expression est <i>Clavispora lusitaniae</i> ainsi leur usages thérapeutiques. | 15 |
| Tableau 06 : Quelques levures productrices d' α -amylase. | 18 |
| Tableau 07 : Les caractéristiques physico-chimiques de l' α -amylase chez quelques levures et moisissures. | 22 |
| Tableau 08 : Quelques propriétés de l' α -amylase acide et neutre. | 22 |
| Tableau 09 : Divers domaines d'application des α -amylases. | 25 |
| Tableau 10 : Les caractéristiques physico-chimiques de la maltase chez quelques levures et moisissures. | 31 |
| Tableau 11 : Propriétés physico-chimiques de quelques polygalacturonase (PG). | 34 |
| Tableau 12 : Quelques levures productrices de cellulase. | 35 |
| Tableau 13 : Composition chimique du lactosérum. | 39 |
| Tableau 14 : Mise en évidence des activités enzymatiques de la souche L10 sur milieux solides et spécifiques après 48 h d'incubation à différentes températures. | 47 |
| Tableau 15 : Mise en évidence des activités enzymatiques de la souche L5 sur milieux solides et spécifiques après 48 h d'incubation à différentes températures. | 48 |
| Tableau 16 : Diamètres de zones de lyse des souches L5 et L10. | 49 |

Introduction générale

Au cours des dernières décennies, des recherches importantes ont été entreprises sur les capacités des enzymes à être appliquées industriellement : forte thermostabilité et reproductibilité dans le temps par le biais de la biotechnologie, la biochimie et la microbiologie qui assurent une maîtrise hautement qualifiée, répondant aux besoins industriels, industrie agro-alimentaire ou pharmaceutique (Nassif *et al.*, 2015). Ceci offre de nombreuses possibilités de valorisation des coproduits qui constituent une matière première permettant de réduire les coûts de production, dont le lactosérum, le principal coproduit des industries laitières (Moletta, 2002). Longtemps considéré comme un sous-produit encombrant, sans intérêt, dont il fallait se débarrasser au moindres frais, le lactosérum est rejeté dans les eaux résiduaires de ces industries : rejet de plus de 145 millions de tonnes de lactosérum liquide chaque année (Audic *et al.*, 2003).

Le marché mondial des enzymes industrielles croît de 6,5% par an selon Reiss, 2007, en 2010 il devrait les 3,3 milliards USD. Pour certains pays, comme le Danemark ou la Finlande, la production d'enzymes représente plus de 30 % de leur industrie nationale en biochimie. En 2015, les lipases ont occupé 38,5 % du marché mondial, suivies par les amylases à 30,5 % (Morvan, 2010). Parmi les hydrolases figurent les α -glucosidases et les α -amylases extracellulaires en particulier. Elles sont commercialisées grâce à la diversité de leur application (amidonnerie, glucoserie, brasserie) (Monsan, 1982 et Pandey *et al.*, 2000 ; Arikian, 2007; Carvalho *et al.*, 2008 et Khady, 2013). La production de ces enzymes par une grande variété de microorganismes existe depuis longtemps (Gupta *et al.*, 2003), tel que le genre bactérien *Bacillus* (Sivaramakrishnana *et al.*, 2006) et les microorganismes fongiques appartenant surtout aux genres *Aspergillus* et *Penicillium*, du fait que la première production de l' α -amylase a été réussie par Takamine en 1894.

Actuellement, les levures, en tant qu'usine cellulaire, sont les sources les plus exploitées dans une large gamme d'applications industrielles biotechnologiques (Mardo, Karin *et al.*, 2016 ; Dammak *et al.*, 2016 et Singh *et al.*, 2015), en raison de leur thermorésistance avérée et leur caractère non pathogènes (GRAS) (Sindhu *et al.*, 2009). De nombreux travaux leur ont été consacrés dont la production de maltase thermostable à partir des espèces *Saccharomycopsis fibuligera* (Hostinova *et al.*, 2005) et *Saccharomyces cerevisiae* (Zhang *et al.*, 2015) et de l' α -amylase thermostable (Arikian, 2007;. Carvalho *et al.*, 2008) à partir de *Candida utilis*, *Aureobasidium pullulans* (Ouédraogo *et al.*, 2012), *Wickerhamia sp.* (Hernandez-Montanez *et al.*, 2012), *Talaromyces pinophilus* (Liang *et al.*, 2015) et *Clavispora lusitaniae* (Djekrif, 2016 et Ranjan *et al.*, 2016).

L'objectif principal de cette étude est la sélection de levures productrices de deux enzymes amylolytiques thermostables ; α -amylase et maltase de l'extrait brut et leur caractérisation (pH, température et thermostabilité). Les levures sont isolées d'une niche écologique d'un milieu extrême (Blé dur stocké à Biskra- Sahara- Sud Algérien). La production est faite sur un milieu optimisé à base de lactosérum.

Cette étude comporte une première partie consacrée à un état des lieux des connaissances sur les levures, les enzymes et le milieu de production : le lactosérum. La deuxième partie renferme les techniques et les méthodes et enfin la dernière partie récapitule les résultats et leur discussion.

Synthèse bibliographique

1. Les levures

1.1. Historique

Les levures sont les premiers microorganismes utilisées par l'homme depuis des millénaires, en particulier dans la fabrication des boissons alcoolisées et de pain fermenté (Bouix et Leveau, 1991 et Pol, 1996). Elles sont également les premiers microorganismes à être observés au microscope par A. Van Leeuwenhoek en 1680 qui les a dessinées. Ce n'est qu'avec les travaux de Pasteur (1866-1876) que le rôle des levures dans la fermentation alcoolique a été mis en évidence. A la même époque, la levure fut à l'origine du développement de la biochimie avec notamment les travaux de Büchner. A l'heure actuelle, les levures constituent un matériel expérimental de choix en raison de leur double état de microorganismes et d'eucaryotes (Pol, 1996) et leur caractère GRAS, elles continuent d'être utilisées pour le bénéfice de l'humanité dans la production de protéines recombinantes et d'autres substances (Lachance, 2011a)(Tableaux 2,3). Cependant, certaines espèces sont pathogènes comme *Candida albicans* (Kurtzman, 2011a).

1.2. Généralités

Selon Phaff *et al.* (1968), le mot levure provient du mot latin *levare* qui se traduit par lever, a été appliqué aux levures en raison de l'aptitude de ces microorganismes à produire du CO₂ pendant la fermentation et à lever la surface mousseuse d'un milieu liquide de fermentation (Oteng-Gyang, 1984). Les levures sont des eucaryotes hétérotrophes microscopiques avec un ADN double brin (Kurtzman *et al.*, 2011) faisant partie du groupe des champignons dont on les distingue par une taxonomie basée à la fois sur des caractères morphologiques et physiologiques (caractère unicellulaire et l'absence de vrai mycélium)(Guiraud, 1998) (Figure 1). Elles se reproduisent par bourgeonnement ou par fission binaire (Kreger-Van, 1984 ; François *et al.*, 2001)(Figure 2). Leurs cellules sont ovoïdes ou sphériques, parfois cylindriques ou allongées se détachant facilement les unes des autres et de ce fait bien adaptées à la propagation dans les liquides (Bouix et Leveau, 1991). Leur cytoplasme abrite l'ensemble des organites habituels des végétaux supérieurs non photosynthétiques (Guiraud, 1998).

1.3. Habitat

Les levures sont des espèces ubiquitaires. Elles se rencontrent sur les végétaux riches en sucre directement assimilables (Bouix et Leveau, 1991). En effet, les milieux fortement concentrés en sucre représentent un de leur environnements préférés (sirops, bière, miel, fleurs et de nombreux fruits) (Oteng-Gyang, 1984 et Jimoh *et al.*, 2012; Greppi *et al.*, 2013; Adewara *et al.*, 2013). D'autres écosystèmes où se développent des levures : à la surface ou à l'intérieur d'autres êtres vivants, dans les eaux, dans l'atmosphère et dans le sol (Leveau et Bouix, 1993 ; Thanh, 2006).

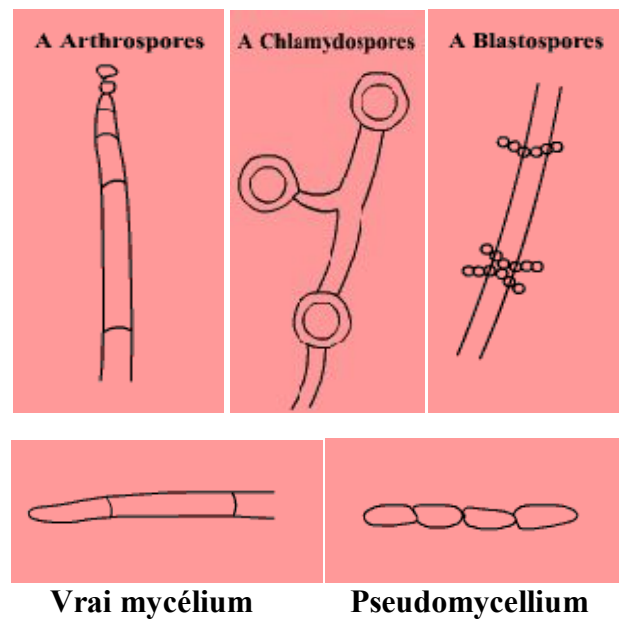


Figure 01 : Filamentation des levures (Guiraud, 1998)

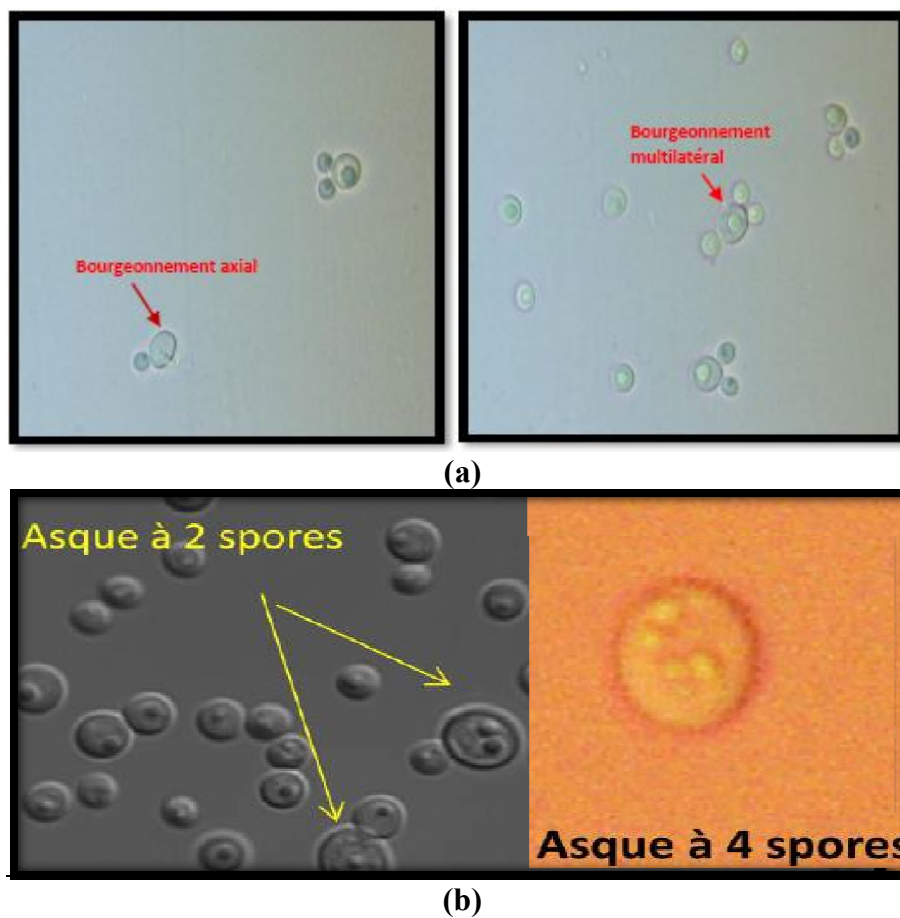


Figure 02 : Reproduction chez *Clavispora lusitaniae* ABS7 ; (a) asexuée par bourgeoisement (culture sur milieu YPGA) et sexuée avec formation d'asques à 2 et 4 spores. (Djekrif, 2016).

1.4. Caractéristiques des levures

1.4.1. Caractéristiques Physiologiques et nutritionnels

Selon Beudeker et ses collaborateurs (1996) ; la notion de stress en biotechnologie peut être définie comme l'ensemble des conditions qui provoquent des changements de processus physiologiques, inhibition de croissance ou du développement. Suite à cette définition, on pourrait considérer le stress comme des variations effectuées dans le milieu de culture de la levure (température, pH, apport d'oxygène, apports nutritionnels) qui peuvent, en fonction de leur concentration, provoquer différentes «réponses dynamiques» du microorganisme à différents niveaux (macroscopique, microscopique, moléculaire) (Sainz *et al.*, 2003), comme par exemple une modification du métabolisme cellulaire, des capacités de croissance et des fonctions physiologiques, des rendements et des productivités. Les substances inhibitrices sont parfois difficiles à éviter puisqu'elles sont souvent substrats ou produits de la réaction biochimique considérée (Gryta *et al.*, 2000). Une concentration élevée en éthanol inhibe l'activité enzymatique (Vincent T. *et al.*, 2016).

1.4.1.1. Les besoins nutritifs

Pour se maintenir, croître et se reproduire, la levure doit trouver dans son milieu externe les éléments nécessaires à la synthèse cellulaire et des conditions physicochimiques favorables.

✓ *Sources de carbone*

Les levures étant des chimiohétérotrophes ont besoin de sources carbonées (Walker, 2009) et de précurseurs pour la biosynthèse de constituants cellulaires variés comme les glucides, les lipides, les protéines, les acides nucléiques... (Botton, 1991). Plus de 400 espèces de ces microorganismes identifiées dans la littérature sont capables de métaboliser le glucose, le fructose et le mannose (Pol, 1996 ; Walker, 2009), le glucose peut avoir un effet répressif et inhibiteur sur l'assimilation d'autres sucres par les levures (Walker, 1998). Certaines d'entre elles utilisent des saccharides, des polyols, des alcools (éthanol, méthanol, glycérol), des polysaccharides (amidon soluble, pectine), l'acide lactique et l'acide citrique grâce aux enzymes de leur capital génétique (Kurtzman et Suzuki, 2010).

Les souches de *Schwanniomyces castellii*, *S. fibuligera* produisent la biomasse à partir de l'amidon non hydrolysé (à partir des pommes de terre ou leurs pelures, l'amidon soluble) (Ouédragao *et al.*, 2012), les hydrolysats de plantes, le moût de pomme,... (Halász et Lásztity, 1991 ; Klein et Fauveau, 1995 et Bekatorou *et al.*, 2006). Ces données suggèrent une capacité à disposer d'un niveau élevé d'enzymes glycolytiques et lipasiques.

✓ *Sources d'azote*

La plupart des levures sont capables d'assimiler différentes sources d'azote organiques (peptone, extrait de levure, glutamine, base purines et pyrimidines...), l'extrait de levure constitue le principal stimulateur de la croissance microbienne en particulier pour les levures (Walker *et al.*, 1998 et Deak, 2006) et des sources inorganiques pour la biosynthèse des acides aminés, des protéines, des acides nucléiques et des vitamines (Larpen et Larpen-Gourgaud, 1997 ; Guiraud, 1998 et Deak, 2006). Toutes les levures sont pratiquement capables d'utiliser l'azote minéral comme les sels d'ammonium utilisés dans les milieux de culture (Bourgeois, 1996). Contrairement à *Hansenula* et *Citeromyces*, certains genres de levures sont incapables d'utiliser les nitrates : *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Pichia* et *Debaryomyces*. Par contre, les nitrites sont métabolisables par *Debaromyces hansenii* et *Pichia pinus* (Bourgeois, 1996).

✓ *Minéraux, oligoéléments et vitamines*

Les minéraux sont importants pour les levures et constituent des facteurs de croissance ou des cofacteurs pour les enzymes (Leblon , 1988). Pour un développement adéquat, elles ont besoin d'oligo-éléments variés (Al, Cr, Br, Cu, Pb, Mn, Zn, Sn...) et en très faible concentration servant de stabilisateurs des biomolécules ou constituants essentiels des systèmes enzymatiques (Larpen-Gourgaud et Sanglier, 1992) (tableau 1). D'autres facteurs comme les vitamines (la biotine et la thiamine...) peuvent être des éléments constitutifs de coenzymes variés essentiels à la croissance des levures (Riviere, 1975 ; Botton *et al.*, 1990 et Guiraud, 1998) comme pour *Sacharomyces cerevisiae* qui a besoin de biotine pour croître. Par contre, certaines levures peuvent se multiplier en l'absence de vitamines comme la souche *Candida lusitaniae* qui n'a pas besoin de vitamines pour sa croissance. Les besoins en vitamines varient selon l'espèce. Les ions Ca²⁺ ont un effet significatif sur le métabolisme et la physiologie des microorganismes (Sarıkaya et Gurgun, 2000).

1.4.1.2. **Caractéristiques physico-chimiques**

✓ *Effets de la température et du pH*

Conformément aux lois thermodynamiques, la température influence les réactions biologiques. La température de culture des levures se situe entre 35 et 45°C pour leur assurer une croissance adéquate. Toutefois, ces températures ne sont pas rigoureusement les températures optimales de croissance que les levures trouvent dans leurs habitats naturels (Leveau et Bouix, 1993). En effet, la température minimale de croissance peut se situer entre 20°C et 50°C pour les microorganismes thermophiles qui poussent à des températures comprises entre 45 et 80°C (Rudiger *et al.*, 1995 et Madigan et Martino, 2006) comme pour des espèces des genres levuriens de *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Debaryomyces*, *Pichia*, *Candida*, 98% des levures ont une

température de croissance comprise entre 24 et 48 °C (Deak, 2006). La levure *Candida thermophila*, isolée du sol en Corée, croît à 51°C (Shin et al., 2001), certaines se développent à plus de 50°C : *Candida Slooffii*, *Saccharomyces telluris* et *Torulopsis bovina* (Bourgois et al., 1988 et Leveau et Bouix, 1993).

Les microorganismes capables de se développer à des températures comprises entre 50 et 60°C sont désignés comme thermophiles modérés (Bertoldo et Antranikian, 2002). D'autres levures peuvent se développer à des températures allant de 0 à 50°C, ce sont les levures mésophiles (Oteng-Gyang, 1984), tandis que les levures psychrophiles ont une température maximale de croissance se situant entre 5°C et 20°C. Les levures thermophiles ont besoin d'une température élevée pour vivre qui peut aller jusqu'à 100°C (Leveau et Bouix, 1993 et Prescott *et al.*, 1995).

Le pH a également une influence sur le développement des levures qui ont tendance à coloniser des environnements acides et par leurs activités métaboliques (la respiration et la sécrétion d'acide organique) acidifiant encore plus le milieu. Les levures tolèrent une large gamme de pH allant de 2,4 à 8,6. Leur croissance optimale se fait à des pH allant de 4 à 6,5 et beaucoup d'espèces tolèrent de grandes variations de pH comme les levures du genre *Candida* qui se multiplient activement en milieu acide, de pH2 à pH6 mais peuvent survivre à pH9. Les levures sont fortement inhibées par les acides acétique, lactique citrique, l'acide ascorbique et propionique (Nancy, 1983).

Tableau 1: Intérêt des vitamines et leurs coenzymes dans le métabolisme (Riviere, 1975)

| Vitamines | Coenzymes | Réaction enzymatique produites |
|---------------------|--|---|
| Acide nicotinique | Pyridine nucléotides (NAD ⁺ et NADP ⁺) | Déshydrogénation. |
| Riboflavine (B2) | Flavine nucléotides | Déshydrogénation et transport d'électrons. |
| Thiamine (B1) | Co-carboxylase | Décarboxylation. |
| Pyridoxine (B6) | Pyridoxalphosphate | Metabolismes des acides aminés (transamination, désamination, décarboxylation). |
| Acide pantothénique | Coenzyme A | Oxydation des acides cétoniques, métabolisme des acides gras. |
| Acide folique | Acide tétrahydrofolique | Transfert des groupements à un carbone. |
| Biotine | Enzymes utilisant la biotine comme cofacteur | Fixation du CO ₂ et transfert de groupements carbonyles. |
| Cobamide (vit B12) | Coenzyme à cobamides | Réaction de réarrangement moléculaire. |

✓ *L'aération*

Les levures peuvent être classées selon leur mode de production énergétique, utilisant la respiration ou la fermentation. Il est important de noter que ces processus sont principalement réglés par des facteurs environnementaux (Walker *et al.*, 1997). En effet, toutes les levures sont capables de se développer en présence d'oxygène ; il n'y a pas de levures anaérobies strictes, certaines sont aérobies strictes : *Rhodotorula*, *Rhodospiridium*, *Lipomyces*, *Saccharomyces*, *Cryptococcus*, *Sporobolomyces*, *Hansenula*, *Pichia*, *Torulopsis* et *Debaryomyces* (Bouix et Leveau, 1991). D'autres sont aéro-anaérobies facultatives préférant un métabolisme soit fermentaire même en présence d'oxygène comme les *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces* et *Brettanomyces* ; soit respiratoire en présence d'oxygène comme les *Candida*, les *Kluyveromyces* la plupart des *Pichia* et des *Hansenula* et quelques *Torulopsis* (Bouix et Leveau, 1991).

✓ *La pression osmotique et l'activité d'eau (Aw)*

La pression osmotique varie d'une souche à une autre. La plupart des souches ne peuvent se développer à des activités de l'eau inférieure à 0,90. Certaines tolèrent des pressions osmotiques plus élevées correspondant à une activité de l'eau de l'ordre de 0,60 mais avec un métabolisme lent. Ces levures sont dites xérotolérantes (Leveau et Bouix, 1979 et Larpent et Larpent Gaurgaud, 1997), car elles sont capables de synthétiser des osmoprotecteurs (bétaine et glycérol).

1.5. Classification des levures

La classification de référence est actuellement celle de Kreger-Van 1984, qui présente des changements sensibles par rapport à la précédente classification de Lodder (1971). En particulier, de nouveaux critères taxonomiques comme la composition en bases de l'ADN, la structure de la paroi, le type de coenzyme Q sont pris en compte pour permettre des études plus rigoureuses. (Figure 3). La classification actuelle répertorie 60 genres et 500 espèces (Bouix et Leveau, 1991).

Selon leur mode de reproduction, les levures se divisent en trois grandes classes :

- **Les ascomycètes** : se reproduisent par un processus sexué dans un asque résultant de la transformation d'une cellule après méiose.
- **Les basidiomycètes** : réalisent une reproduction sexuée avec formation de basidiospores sur une baside.
- **Les deutéromycètes** : regroupent l'ensemble des levures ne présentant pas de mode connu de reproduction sexuée, ne se multipliant que par reproduction végétative.

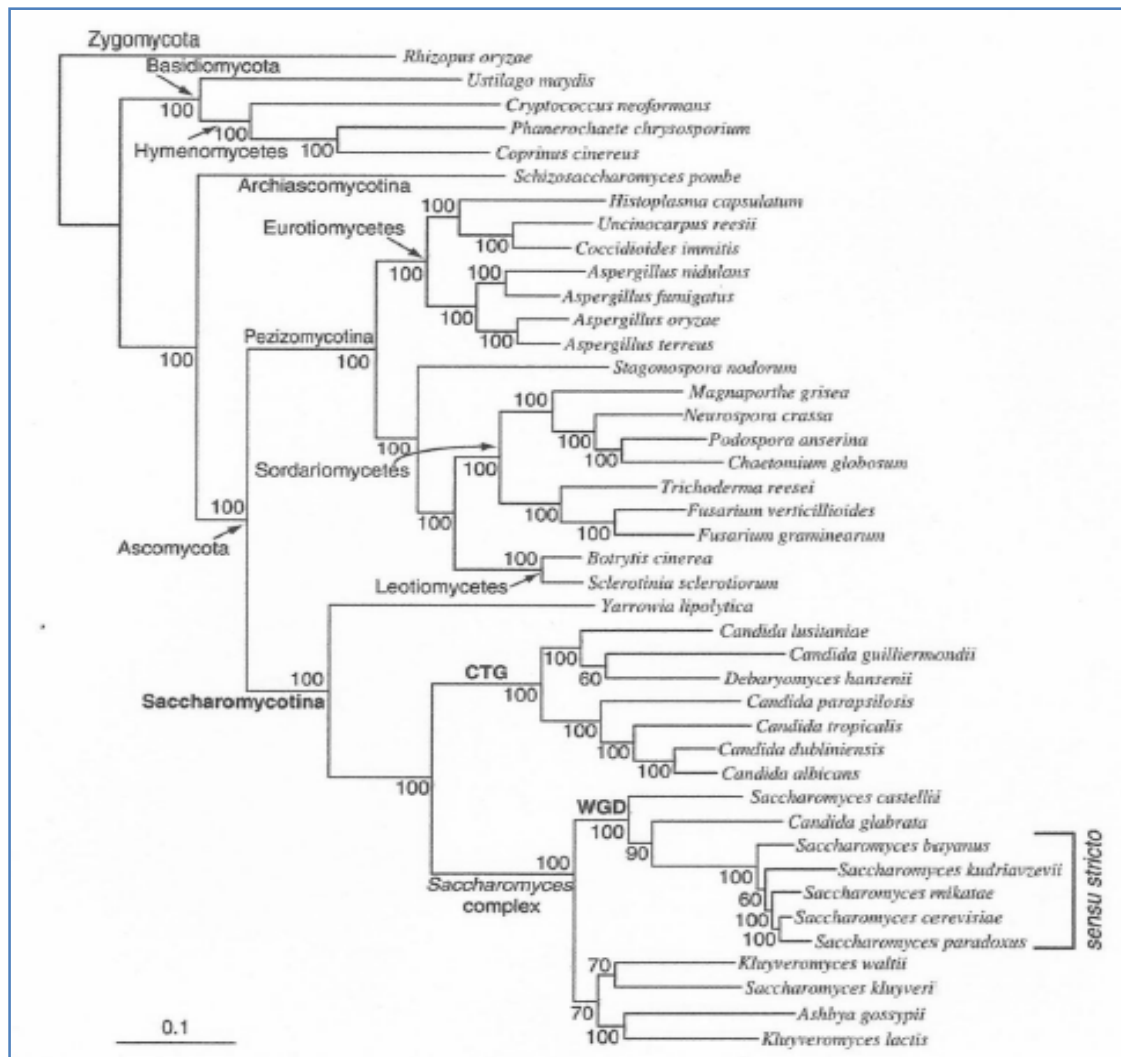


Figure 3: Arbre phylogénétique des genres des levures (Scannell *et al.*, 2007).

1.6. Biotechnologie et levures

La plupart des levures sont de type GRAS (Generally Recognised As Safe) pour leur innocuité comme *Saccharomyces cerevisiae* (Leveau et Bouix, 1993). En plus de leur métabolisme diversifié, ces microorganismes occupent une place essentielle dans l'industrie alimentaire, elles participent à l'élaboration de nombreux produits alimentaires, la production des enzymes industrielles (tableau 2), d'éthanol-carburant et de protéines unicellulaires pour l'alimentation animale (Simon et Meunier, 1970) du glycérol ainsi que certains solvants, vitamines, vaccins et caroténoïdes (Jacob, 1997 et Buzzini, 2000); mais aussi à la revalorisation de déchets agricoles (Scriban, 1984 et Lecterc *et al.*, 1995). Les biotechnologies et la recherche biomédicale exploitent également ces microorganismes (Mattanovich *et al.*, 2012), pour la production de molécules d'intérêt médical (Johnson et Echavarri-Erasum, 2011) (tableau 3).

✓ **Boissons alcoolisées**

Le rôle traditionnel des levures est la fabrication de boissons alcoolisées, dont la fabrication repose sur la fermentation alcoolique, qui consiste à fermenter les sucres simples en éthanol. Cette propriété, les fait intervenir dans la vinification et de l'élaboration de la bière (Coulibaly *et al.*, 2014). La levure *Saccharomyces cerevisiae*, est la plus utilisée (Leveau et Bouix, 1993).

✓ **Panification**

Une autre utilisation, connue depuis l'antiquité, est la fabrication du pain: le dégagement de gaz carbonique, qui accompagne la fermentation, permet de faire lever la pâte en lui conférant une texture légère (Urien, 2015). On utilise également *Saccharomyces cerevisiae* (levure de boulangerie) (Simon et Meunier, 1970 et Cofalec, 2006).

✓ **Affinage des fromages**

Incapables d'utiliser les acides organiques comme source d'énergie et de carbone (Larpen, 1991), les levures participent à l'affinage des fromages ; en consommant l'acide lactique produit par les bactéries lactiques à partir des composants du lait et contribuent ainsi à réduire l'acidité du caillé (Leveau et Bouix, 1993). En plus de la levure *S.cerevisiae*, de nombreuses espèces ont été introduites comme les genres *Kluyveromyces*, *Debaryomyces*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Torulopsis*, *Candida* et *Rhodotorula* (Larpen, 1991).

✓ **Production d'enzymes et de protéines recombinantes**

La production de protéines recombinantes utilisées en thérapie est un marché en nette progression, peut atteindre plus de 20 milliards de dollars à l'horizon 2020 (Gaëlle Fleitour, 2012). Les enzymes digestives et leur utilisation en bio-industries sont très développées. A l'horizon 2015, les lipases occupent 38,5 % du marché suivi par les amylases, 30,5 % marché européen des enzymes dans les applications alimentaires (Morvan, 2010). Les levures constituent une des importantes sources d'enzymes commerciales en raison de leurs capacités polyvalentes et de la frugalité de leurs exigences permettant, d'obtenir une biomasse importante à bas prix (Pol., 1996). Comme exemples nous citons, l'invertase ou la saccharase ou β -fructosidase ou invertase sécrétée par diverses levures est utilisée industriellement pour produire du glucose et du fructose à partir de mélasses de betterave ou de cannes à sucre (Simon et Meunier, 1970) (tableaux 3,5).

✓ **Production d'alcools industriels**

Depuis quelques temps, une nouvelle utilisation des levures est apparue. Les levures, essentiellement des souches du genre *Saccharomyces*, grâce à leur haute capacité fermentaire, peuvent assurer la bioconversion de nombreux substrats saccharosés (jus de betteraves, sirop, mélasse de sucrerie) en bioéthanol (Leveau et Bouix, 1993).

Tableau 2: Quelques enzymes industrielles produites par les levures (Simon et Meunier, 1970 ; Sicard, 1982 ; Liese et *al.*, 2000 ; Wong et *al.*, 2002 ; Pandey, 2006 ; Sikander *et al.*, 2010 et Johnson et Echavarii, 2011).

| Enzyme | Code | Type de liaison hydrolysée | Levures | Industrie |
|------------------------------|--------------|--|--|---|
| Amylase | EC 3.2.1.1 | α 1-4 endogène | <i>Lipomyces starkey</i> <i>Schwanniomyces castellii</i> | Préparation des aliments, textile, papeterie, pharmacie |
| Chymosine | EC 3.4.23.4 | Protéase | <i>Klyveromyces sp.</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | Préparation des aliments |
| β -galactosidase | EC 3.3.1.23 | β -1-4 du lactose | <i>Saccharomyces sp.</i> | Applications alimentaires |
| Glutaminase | EC 3.5.1.2 | Peptidase désamine le groupement γ -NH ₂ de la glutamine | <i>Zygosaccharomyces rouxii</i> | Thérapeutique analyse |
| Inulinases | EC 3.2.1.7 | Hydrolyse la liaison 2,1- β -D-fructose | <i>Candida sp.</i> <i>Klyveromyces marxianus</i> | Applications alimentaires |
| Invertase | EC 3.2.1.26 | Hydrolyse la liaison O-C(fructose) | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>S.arlbergensie</i> , <i>Candida utilis</i> | |
| Lactase | EC 3.2.1.108 | Hydrolyse la liaison β (1-4) du lactose en galactose et glucose. | <i>Candida pseudotropicalis</i> <i>Klyveromyces fragilis</i> , <i>Candida</i> | Préparation des aliments laitiers |
| Lipase | EC 3.1.1.3 | Hydrolyse les liaisons <i>sn1</i> et <i>sn3</i> des triacylglycérols ou TG | <i>Candida lipolytica</i> | Thérapeutique |
| | | | <i>Candida rigosa</i> | Préparation des aliments |
| | | | <i>Saccharomycopsis lipolytica</i> <i>Pseudozyma Antarctica</i> | Aromes |
| | | | <i>Trichosporon fermentum</i> | Dégraissage, biorestauration |
| | | | <i>Yarrowia lipolytica</i> | Thérapeutique, détergents |
| Phénylalanine Ammonia-lyase | EC 4.3.1.24 | catalyse la conversion de l'acide aminé phénylalanine en acide cinnamique, avec libération d'ammoniac(NH ₃) | <i>Rhodotorula sp.</i> <i>Rhodospordium sp.</i> | Pharmaceutique |
| Phénylalanine déshydrogénase | EC 1.4.1.20 | L-phénylalanine , H ₂ O et du NAD ⁺ , alors que les 4 produits sont phénylpyruvate , NH ₃ ,NADH et H ⁺ | <i>Candida boidinii</i> | |

Tableau 3: Quelques enzymes et protéines recombinantes synthétisées par des levures utilisées en thérapie.

| Types d'enzymes | Code | Levures utilisées | Pathologie à traiter | Références |
|---|-------------|---|----------------------------|--|
| α -amylase | EC 3.2.1.1 | <i>Saccharomyces carlbergensis</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | Aide digestive | Wong <i>et al.</i> , 2002 |
| Beta-glucosidase | EC 3.2.1.21 | <i>Clavispora lusitaniae</i> | Maladie de Gaucher | Lamers <i>et al.</i> , 2016 ; Regenboog <i>et al.</i> , 2016 |
| Glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PD) | EC 1.1.1.49 | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | Le favisme | (Loiudice <i>et al.</i> , 2001) |
| Hémoglobine | – | <i>Pichia pastoris</i> | Anémie Thalassémie | Huaxin <i>et al.</i> , 2007 |
| Lipases | EC 3.1.1.3 | <i>Candida lipolytica</i> <i>Kluyveromyces marxianus</i> | Aide digestive | Sikandar <i>et al.</i> , 2010 et Deive <i>et al.</i> , 2003 |
| Protéines vaccins | – | <i>Sporidiobolus</i> | Prévention des infections. | Bitter <i>et al.</i> , 1984 Blin., 2002 |

1.7. L'espèce *Clavispora lusitaniae*

Comme toutes les levures amylolytiques qui ont suscité l'intérêt des chercheurs et envahi les marchés de la bio-industrie par leur facilité de culture (Fossi *et al.*, 2005), *Clavispora lusitaniae*, s'est révélée capable de produire différentes protéines recombinantes et enzymes utilisées en thérapie, en plus de l' α amylase (Djekrif, 2014 et 2016 ; Ranjan et Sahay 2015 et Ranjan *et al.*, 2016) (tableau 6). A ce jour, peu d'études ont été menées sur la levure *Clavispora lusitaniae*.

✓ Taxonomie

Les *Clavispora sp.* sont des organismes eucaryotes appartenant au règne des champignons. Kurtzman (2011) décrit la classification de *Clavispora lusitaniae* suivante :

Règne : Champignon

Sous-règne : Dikarya

Phylum : Ascomycota

Subphylum : Saccharomycotina

Classe : Saccharomycetes

Ordre: Saccharomycétales

Famille: Metschnikowiaceae

Genre: *Clavispora*

Espèce : *lusitaniae*

Synonyme : *Candida lusitaniae* (forme anamorphe)

Autres noms : *Clavispora imtechensis*, *Saccharomyces carmosousae*, *Candida parapsilosis* et *Candida obtusa*. (Rodrigues de Miranda, 1979)

La levure *Candida lusitaniae* est une espèce cosmopolite ubiquiste dont la niche écologique est mal connue (Lachance, 2011). C'est un organisme saprophyte (non pathogène) du tube digestif de l'homme et de nombreux animaux (mammifères, oiseaux) (Aoufi *et al.*, 2001). Cette espèce est isolée dans plusieurs sites dans le monde : l'Europe, la Nouvelle Zélande, l'Inde, le Mexique, les États-Unis, le Venezuela, les Îles de Caïmans, le Canada, les Bahamas (Lachance, 2011) et l'Algérie (Rezki *et al.*, 2013 et Djekrif *et al.*, 2014). Dans l'environnement, *Clavispora lusitaniae* est isolée à partir d'une large gamme de substrats: végétaux, animaux, déchets industriels et spécimens cliniques (tableau 4).

Elle pousse rapidement sur le milieu Sabouraud sous forme de colonies blanches d'aspect crémeux, lisse et brillant (Figure 16). Chez les levures, la reproduction se fait selon deux modes : la reproduction sexuée et la reproduction asexuée. *Clavispora lusitaniae*, adopte une reproduction asexuée par bourgeonnement multilatéral et division transversale, qui aboutit à la forme anamorphe ou forme imparfaite (hétérothallique téléomorphe), le pseudomycélium peut être absent, rudimentaire ou abondant, parfois la présence de vrai mycélium est notée (levures non pigmentées) (Barnett *et al.*, 2000) et une reproduction sexuée avec formation des ascospores (forme parfaite) sur des milieux appropriés. Les asques sont ellipsoïdaux à paroi évanescence et contiennent 1 à 4 ascospores, piriformes, à paroi lisse (Figure 2). Les cellules sont de formes variables rondes ou allongées). Les souches de *C. lusitaniae* produisent les pseudohyphes avec des chaînes de blastoconidies développées (Lachance, 2011).

Toutes les levures, dont *Clavispora lusitaniae*, sont des chimiohétérotrophes et ont besoin de composés organiques carbonés, servant à la fois comme de source de carbone et de source d'énergie pour leur développement. En plus d'avoir la capacité de métaboliser le glucose, le fructose et le mannose (Walker, 2009), les levures *Candida sp.* et *Clavispora lusitaniae* ont le potentiel de fermenter le D xylose alors que pour les souches industrielles, il reste inutilisable (Nigam *et al.*, 1985). Les nitrates et l'urée ne sont pas assimilés par *C. lusitaniae* (François *et al.*, 2001).

Tableau 4 : Habitat de *Clavispora lusitaniae*

| Habitat | Références |
|--|---|
| Agave | Pérez-Brito <i>et al.</i> , 2015 |
| Blé | Djekrif <i>et al.</i> , 2014 |
| Cornichons | Rezki <i>et al.</i> , 2013 |
| Dattes | Rezki <i>et al.</i> , 2013 |
| Déchets de pomme de terre | Ouédraogo <i>et al.</i> , 2012 |
| Déchets industriels | Lachance, 2011 et Ouédragao <i>et al.</i> , 2012 |
| Ecorces d'arbres | Rao R. S <i>et al.</i> , 2008 |
| Fromage | Jacques et Caseregola, 2008 et Binetti <i>et al.</i> , 2013 |
| Jus d'orange et jus de fruits | Covadonga <i>et al.</i> , 2002 et Jairath <i>et al.</i> , 2012 |
| Lactosérum | Jairath <i>et al.</i> , 2012 |
| Mezcal | Verdugo Valdez <i>et al.</i> , 2011 |
| Pulque | Ian Hornsey, 2012 |
| Spécimens cliniques | Zhang <i>et al.</i> , 2010 ; Lachance, 2011 et Ouédragao <i>et al.</i> , 2012 |
| Tube digestif de l'homme et de nombreux animaux (mammifères) | Aoufi S. <i>et al.</i> , 2001 |
| Végétaux (légumes, fruits, feuilles, graines) | Ranjan K. <i>et al.</i> , 2015 |
| Yaourt | Lopandic <i>et al.</i> , 2006 |

Tableau 5 : Enzymes et protéines recombinantes dont le système d'expression est *Clavispora lusitaniae* ainsi leur usages thérapeutiques.

| Protéines ou enzymes | Code | Intérêt thérapeutique | Références |
|--|--------------|--|---|
| 1,2- α -L-fucosidase | EC 3.2.1.63 | Fucosidose | Wawron <i>et al.</i> , 2011 ; B Jihene <i>et al.</i> , 2014. |
| Aminopeptidase B | EC 3.4.11.6 | Œdème angioneurotique | Pfaller <i>et al.</i> , 2015; Hofman <i>et al.</i> , 2016. |
| Beta glucuronidase | EC 3.2.1.31 | Syndrome mucopolysaccharidose de type VII | Prajapati <i>et al.</i> , 2014 ; Montañaño <i>et al.</i> , 2016. |
| Beta-glucosidase | EC 3.2.1.21 | Maladie de Gaucher | Lamers <i>et al.</i> , 2016 ; Regenboog <i>et al.</i> , 2016. |
| Candidapepsine | EC 3.4.23.24 | Traitement des troubles liés à une déficience en testostérone. | Parra <i>et al.</i> , 2009 ; Sandler <i>et al.</i> , 2016. |
| Chymotrypsine | EC 3.4.21.1 | Activateurs protéasome, PA28 γ et PA200. Indispensable dans la fertilité masculine. | Vinterová <i>et al.</i> , 2011 ; Huang <i>et al.</i> , 2016. |
| Cytosine deaminase | EC 3.5.4.1 | Le <i>lymphome</i> diffus à grandes <i>cellules B</i> . | Sanglard et Dominique, 2016 ; Yamamoto <i>et al.</i> , 2016. |
| Glucose 1-dehydrogenase | _ | Syndrome néphrotique idiopathique chez les enfants. | Koivistoinen <i>et al.</i> , 2012 ; Guglani <i>et al.</i> , 2016. |
| Peptidyl- dipeptidase A | EC 3.4.15.1 | Inflammation néphrotique | De Melo <i>et al.</i> , 2007 ; Maleki <i>et al.</i> , 2016. |
| Phosphopyruvate hydratase | EC 4.2.1.11 | Traitement du déséquilibre métabolique causé par la toxicité des ions et le stress osmotique. | Funk <i>et al.</i> , 2016 ; Long R. <i>et al.</i> 2016. |
| Recepteur d'histidine kinase RTK | _ | Choléra (activation de la voie de signalisation anti <i>Vibrio cholerae</i>). | Chapeland <i>et al.</i> , 2007 ; Dörr <i>et al.</i> , 2016 |
| Ribonuclease H | EC 3.2.1.4 | Régulation de la pression intraoculaire et inhibition de l'apoptose neuronale par la Ribonuclease 5. | Simitsopoulou <i>et al.</i> , 2016 ; Kim <i>et al.</i> , 2016 |
| Thrombine Facteur II | _ | Thrombose veineuse cérébrale en début de grossesse. | Manzoni <i>et al.</i> , 2015 et Fall <i>et al.</i> , 2016.. |
| UDP-3-O-acyl-N-acetylglucosamine deacetylase | EC 3.5.1.108 | Traitement des maladies neurologiques et des troubles immunitaires. | Dias <i>et al.</i> , 2014 ; Falkenberg <i>et al.</i> , 2016. |
| Urée carboxylase | EC 6.3.4.6 | Insuffisance hépatique aiguë. | Cortis <i>et al.</i> , 2015 ; Santra <i>et al.</i> , 2016. |
| α -galactosidase | EC 3.2.1.22 | Maladie de Fabry | Orenga <i>et al.</i> , 2015 ; Üçeyler <i>et al.</i> , 2016. |
| α -mannosidase | EC 3.2.1.24 | Cardiomyopathie | Prajapati <i>et al.</i> , 2014 ; NÁ Bergin <i>et al.</i> , 2016. |

2. Enzymes et substrats

2.1. L' α -amylase, enzyme hydrolysant l'amidon

2.1.1. Généralités et nomenclature

L' α -amylase (EC 3.2.1.1) est une macromolécule appartenant à la classe des protéines globulaires, famille des glycosides hydrolases nommée GH13, regroupant près de 28 000 séquences de protéine avec différentes spécificités (Janeček *et al.*, 2014 et 2015). Elle clive les liaisons α -1,4-glycosidiques de glucides et oligosaccharides (Zhang *et al.*, 2013) fournissant ainsi à la fin de la réaction du glucose et des résidus correspondant aux liaisons α (1-6) situées aux points de ramification des chaînes (Raimbault, 1981; Alais *et al.*, 2008).

Sa répartition est ubiquitaire (Xie *et al.*, 2014). Chez les mammifères, l' α -amylase est présente principalement dans les sécrétions salivaires et pancréatiques. Celle d'origine microbienne (bactéries, moisissures et levures) est exocellulaire, exceptées certaines espèces comme *Bacillus subtilis* et *Pishia burtonii* (Moulin *et al.*, 1978 et Mantsala *et al.*, 1979 ; Saleem *et al.*, 2013, Foresti *et al.*, 2014 et Tran *et al.*, 2014). La production d' α -amylase microbienne s'est révélée étant la plus efficace (Niehaus *et al.*, 1999 et Bel'en *et al.*, 2006).

En plus d'être l'enzyme la plus ancienne, l' α -amylase est considérée comme l'une des plus importantes enzymes industrielles (Gupta *et al.*, 2008). Aujourd'hui, les α -amylases détiennent la principale part du marché mondial d'enzymes en raison de leur productivité et thermostabilité (Behal *et al.*, 2006), déclenchant ainsi leur industrialisation, dont différentes préparations sont disponibles avec de divers fabricants d'enzymes pour l'utilisation spécifique dans plusieurs industries : alimentaire, pharmaceutique, textile, papeterie, détergent, brasserie et la bioconversion des déchets solides (Pandey *et al.*, 2000, Gupta *et al.*, 2003).

✓ *Nomenclature*

Il existe plusieurs nomenclatures pour l' α -amylase :

- Nom systématique : α (1 - 4) D-glucane glucanohydrolase
- Nom codifié : E.C .3.2.1.1
- Nom recommandé : α -amylase
- Synonymes : glycogenase, endoamylase, maxilase, taka-amylase A, takatherm, thermolase, amylotherm, clarase, amylopsin, spitase CP1, G995, kleistase L1, THC 250, maxamy, ptyalin (Graber et Combes, 1989 , Schamburg et Slzmann, 1991 et Dauter et al., 1999 ,Foresti *et al.*, 2014 , Tran *et al.*, 2014).

2.1.2. Origine des α -amylases

Les α -amylases sont des enzymes abondantes dans tous les règnes. Cependant, les sources microbiennes sont les plus préférées pour la production à grande échelle (Haq *et al.*, 2002).

- ✓ **Origine animale** : Généralement extraite de la salive humaine et du pancréas des mammifères, tels que les porcs et les veaux (Bertheau *et al.*, 1985; Chatterton *et al.*, 1996).
- ✓ **Origine végétale** : L' α -amylase joue chez les plantes un rôle important dans le métabolisme glucidique, où elle participe à l'hydrolyse de l'amidon en produisant des sucres réducteurs (glucose et maltose) directement assimilables (Badot et Merlin, 1984). Elle est obtenue par extraction à partir des céréales, notamment le blé, l'orge, le son ou le riz (Srinivasa Rao *et al.*, 2004). Elle est 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 (Brawn et Kelly, 1993 ; Charles *et al.*, 2003).
- ✓ **Origine microbienne** : Deux types sont distingués : les α -amylases bactériennes et les α -amylases fongiques.

➤ *Les α -amylases bactériennes*

Ce type d'enzymes est obtenu principalement par fermentation de Bacillacées (Milner *et al.*, 1997). Il s'agit de *Bacillus subtilis* et *Bacillus damyloliquefaciens* (Tanyildizi *et al.*, 2005 ; Haq *et al.*, 2002 et Umamaheswari *et al.*, 2010). De nombreuses amylases aux propriétés industrielles ont été découvertes chez des bactéries acidophiles ; *Penicillium grisofulvum* (Ertan *et al.*, 2006), alcalinophiles ; *Thermobifida fusca* (Yang *et al.*, 2010) et thermophiles ; *Bacillus cohnii* (Fogarty et Kelly, 1980 et Panchal, 1990) et *Bacillus licheniformis* (Cordeiro *et al.*, 2002 ; Sanchez et Cardona, 2008 ; Umamaheswari *et al.*, 2010 et Yihan, 2010) . Ces enzymes interviennent dans la transformation de l'amidon par fragmentation rapide en clivant les liaisons α (1→4) (Nadirman *et al.*, 2006).

➤ *Les α -amylases fongiques*

La production industrielle d'enzymes à partir des microorganismes fongiques appartenant surtout aux genres *Aspergillus* et *Penicillium*, existe depuis longtemps, du fait que la première production d' α -amylase a été réussie par Takamine en 1894. Les levures sont les organismes les plus employées dans la production de biomasse, à valeur nutritive élevée (Yanez *et al.*, 1972 ; Imrie *et al.*, 1975 et Leveau et Bouix, 1993), des levures productrices d' α -amylase sont rapportés dans le tableau 6.

Tableau 6 : Quelques levures productrices d'α-amylase

| Genre de Levure | Références |
|--|--|
| <i>Lipomyces kononenkoae</i> | Spencer- Martins et Van Uden, 1979 |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Saccharomycopsis fibuligera</i> <i>Lipomyces kononenkoa</i> | Fogarty et Kelly, 1980 et Panchal, 1990 |
| <i>Filobasidium capsuligenum</i> | De Mot et Varachtert, 1985 |
| <i>Saccharomyces castelli</i> | Kelly <i>et al.</i> , 1985 |
| <i>Schwanniomyces castelli</i> | Sills <i>et al.</i> , 1984 ; Clementi et Rossi, 1986 ; Fogarty et Kelly, 1980 et Panchal, 1990 |
| <i>Trichosporon pullulans</i> | De Mot et Varachtert, 1986 |
| <i>Candida antartica</i> CBS 6678 | De Mot et Varachtert 1987 |
| <i>Candida spp</i> | Moranelli <i>et al.</i> , 1987 |
| <i>Schwanniomyces alluvius</i> | |
| <i>Candida edax</i> | Ettalibi et Beratti, 1988 |
| <i>Schwanniomyces occidentalis</i> | Dohmen <i>et al.</i> , 1989 et Wang <i>et al.</i> , 1989 |
| <i>Lipomyces sp</i> | Prieto <i>et al.</i> , 1995 |
| <i>Cryptococcus sp. S-2</i> | Iefuji <i>et al.</i> , 1996 |
| <i>Saccharomycopsis capsularis</i> | Soni <i>et al.</i> , 1996 |
| <i>Pichia burtonii</i> 15-1 | Acourene et Ammouche, 2001 ; Kato <i>et al.</i> , 2007 |
| <i>Schwanniomyces alluvius</i> | Kelly <i>et al.</i> , 1985 ; Panchal, 1990 et Kang <i>et al.</i> , 2004 |
| <i>Cryptococcus flavus</i> | Wanderly <i>et al.</i> , 2004 |
| <i>Saccharomyces kluyveri</i> YKMS | Moller <i>et al.</i> , 2004 |
| <i>Pichia burtonii</i> | Takeuchi <i>et al.</i> , 2006 |
| <i>Saccharomyces alluvirus</i> | Merabti, 2006 |
| <i>Schwanniomyces sp</i> | Haifeng <i>et al.</i> , 2006 |
| <i>Pichia polymorpha</i> | Gonzalez <i>et al.</i> , 2008 |
| <i>Lipomyces starkey</i> | Benaouida, 2008 |
| <i>Saccharomycopsis fibuligera</i> | Chi <i>et al.</i> , 2009 |
| <i>Candida utilis</i> <i>Aureobasidium pullulans</i> | Ouédraogo <i>et al.</i> , 2012 |
| <i>Candida guilliermondi</i> <i>Candida famata</i> <i>Trichosporon mucoides</i> | Acourene et Ammouche, 2012 |
| <i>Wickerhamia sp.</i> | Hernandez-Montanez <i>et al.</i> , 2012 |
| <i>Lipomyces kononenkoa</i> | Boukhennane et Boudebza, 2014 |
| <i>Talaromyces pinophilus</i> | Liang <i>et al.</i> , 2015 |
| <i>Clavispora lusitaniae</i> | Djekrif <i>et al.</i> , 2014 et 2016 ; Ranjan et Sahay, 2015 ; Ranjan <i>et al.</i> , 2016 |
| <i>Debaryomyces occidentalis</i> | Kregiel, 2016 |

2.1.3. Structure de l' α -amylase

L' α -amylase fongique est une glycoprotéine monomérique (De Souza *et al.*, 2010 et Ernest *et al.*, 2014) comportant trois domaines globulaires (A, B et C) (Li *et al.*, 2014). Elle renferme une partie glucidique formée principalement, de D-mannose, D-glucose, D-galactose, D-xylose et D-glucosamine (Stefanova et Emanuilova, 1992) associés chimiquement à la chaîne polypeptidique constituée de 471 à 483 résidus d'acides aminés, avec 4 ou 5 ponts disulfures (Heslot, 1996). Le domaine central A, forme un tonneau (β / α) 8 contenant 8 feuillets β plissés et qui se disposent de façon parallèle et de 8 hélices, il porte le site actif à la partie C-terminale des feuillets (Burhan, 2003). Le domaine B est formé d'une boucle de 64 résidus d'acides aminés reliant A- α 3 avec A- β 3 et constitue une sorte de « couvercle » au-dessus du site actif et le domaine C (Figure 8), jugé par Doyon et ses collaborateurs (2002) essentiel pour le repliement post-traductionnel de l' α -amylase pancréatique de rat, il est constitué d'un tonneau de 8 feuillets antiparallèles (Kadziola *et al.*, 1994, Horváthová *et al.*, 2001) (Figure 4a).

En dehors de ces trois domaines, certaines enzymes de la famille GH13 possèdent aussi des modules supplémentaires dont « E » à leur extrémité C-terminale, jouant un rôle dans l'adsorption d'amidon (Bodri *et al.*, 1997, Jemli *et al.*, 2008).

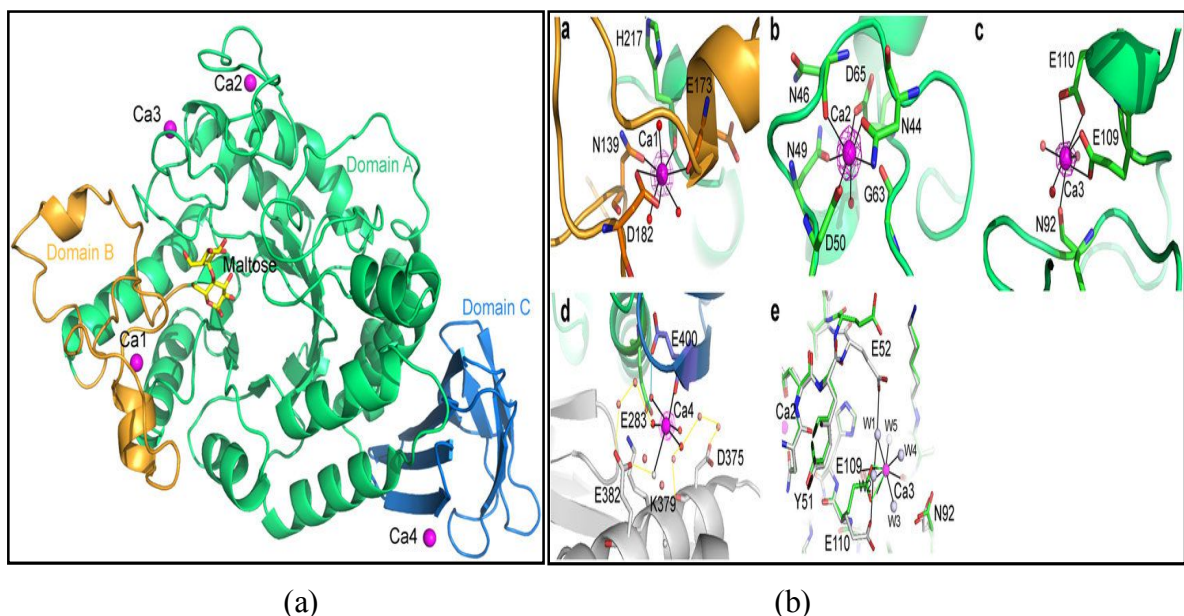


Figure 4 : (a) Structure monomérique de l' α -amylase (Li *et al.*, 2014) Les domaines A, B et C sont indiquées en vert, orang, et bleu, respectivement. Les ions calcium sont présentés dans le magenta. (b) les sites de fixation des ions Calcium dans α -amylase de *Anoxybacillus* (GH13).

En outre, l' α -amylase est une métallo-enzyme à calcium (Comi *et al.*, 2000 et Savcheko *et al.*, 2002). Buisson et ses collaborateurs (1987), ont décrit un site de fixation de l'ion Ca^{2+} dans l'enzyme du pancréas du porc. L'ion se lie entre les domaines A et B et joue un rôle stabilisateur du site actif. Selon Boel et ses collaborateurs (1990), ce site à forte affinité, existe aussi dans l' α -amylase d'*Aspergillus oryzae*, mais il en existe un deuxième, d'affinité plus faible, localisé au fond de la poche de fixation du substrat. L'existence de ce deuxième site explique que le calcium exerce un effet inhibiteur de l'activité enzymatique à haute concentration (Boel *et al.*, 1990). Pour certaines α -amylases, la présence d'un site de fixation du Cl^- est également signalée (Graham, 1996 et Hwang *et al.*, 1997) et pour d'autres, l'ion Zn^{2+} (Comi *et al.*, 2000) (Figure 4b).

2.1.4. Mode d'action de l' α -amylase

Le mécanisme d'action de l' α -amylase nécessite la participation de trois fonctions du site actif impliquant un attaquant nucléophile (Asp 231), un stabilisateur de la charge positive de l'atome attaqué (Asp328) et un donneur de proton au groupe déplacé (Glu 261) (Mc carter et Withers, 1996 et Uitdehaag *et al.*, 1999); 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 (Park *et al.*, 1997)(Figure 05).

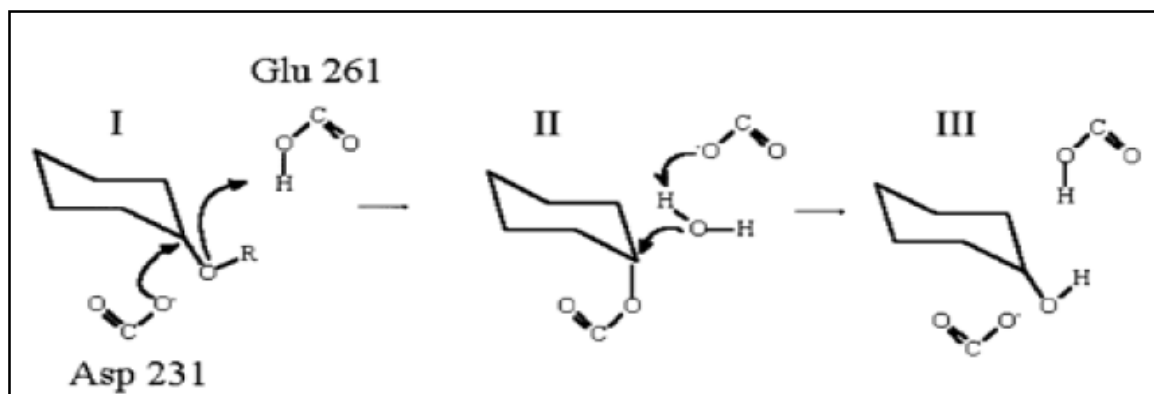


Figure 05 : Mécanisme catalytique des hydrolases glycosyliques (Nielsen *et al.*, 2001):
 (1) Protonation de l'oxygène glycosidique par le donneur d'hydrogène (Glu 261) et attaque sur le glucose (C1) par le nucléophile (Asp 231). Départ de la fin réductrice du substrat. (2) L'activation d'une molécule d'eau, clivage de la liaison covalente C1 Asp 231. (3) Régénération des états initiaux de protonation.

Ce mécanisme est une caractéristique de l'enzyme et selon les conditions expérimentales (température, pH, taille et structure du substrat), l'enzyme utilise l'un des mécanismes ou peut combiner entre plusieurs mécanismes dont les plus importants sont : (Mazur et Nakatani, 1993 et Nielson *et al.*, 2001) :

- ✓ **Attaque aléatoire ou au hasard:** n'importe quelle liaison α -(1-4) peut être hydrolysée à partir de l'extrémité réductrice. Elle provoque la formation de glucose, maltose et surtout de dextrans (Scriban, 1999).
- ✓ **Attaque préférée:** l' α -amylase montre une préférence pour certaines liaisons glucosidiques dans le substrat (Berry et Paterson, 1990).
- ✓ **Attaque multiple ou répétitive :** elle implique le déplacement de l'enzyme tout au long de la chaîne du substrat et l'enzyme hydrolyse les liaisons glucosidiques sans se dissocier du substrat (Kandra *et al.*, 1997).

2.1.5. Température et pH optimum

En général, les α -amylases ont une température optimale comprise entre 25 °C et 70 °C, avec une grande stabilité thermique pour les α -amylases bactériennes. Vertiani *et al.* (1998), signalent que la température optimale des α -amylases bactériennes varie de 50 °C à 90 °C avec possibilité de résistance à des températures dépassant 100 °C, pour celles isolées des souches hyperthermophiles. Cependant la température optimale des α -amylases fongiques varie selon leur origine de 40°C à 60°C avec un optimum plus élevé (70°C) pour l' α -amylase de la souche *Lipomyces starkey* (Kang *et al.*, 2004) et un optimum d'action se situant entre 50 et 60°C pour d'autres souches (Fogarty et Kelly, 1994 ; Duo-Chuan *et al.*, 1997 ; Wanderly *et al.*, 2004 ; Haifeng *et al.*, 2006 et Benaouida, 2008) (Tableau 07).

Actuellement d'autres genres de moisissures dont *Rhizopus Alternaria*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae* et *Aspergillus tamaris* ont été utilisées pour la production d' α -amylase relativement thermostable (Lateef *et al.*, 2004 ; Ait-Kaki *et al.*, 2012 ; Khan et Yadav, 2011 ; Adekunle *et al.*, 2013 ; Benamoun, 2001 ; Swetha *et al.*, 2006 et Moreira *et al.*, 2004).

L' α -amylase est très sensible au pH. Par conséquent, le choix du pH optimum est très essentiel pour la production de cette enzyme (McMahon *et al.*, 1999). Selon Kindle (1983), l'optimum d'activité peut être obtenu à des pH compris entre 4 et 8. Les α -amylases bactériennes, ont un optimum supérieur à la neutralité (Tanyildizi *et al.*, 2005, Haq *et al.*, 2002 et Umamaheswari *et al.*, 2010), alors que les fongiques, ont des pH optimum compris entre 4 et 6 (Moreira *et al.*, 2004 et Khan, 2016). Pour les levures, l'enzymes requiert selon les espèces des pH entre 4 et 6 (Fogarty et Kelly, 1980 et Panchal, 1990 ; Kang *et al.*, 2004 ; Benaouida, 2008 et Merabti, 2006). Le tableau 08 rapporte quelques propriétés de l' α -amylase acide et neutre (Archana et Satyanarayana, 2013).

Tableau 07 : Caractéristiques physico-chimiques de quelques espèces productrices d' α -amylase.

| Origine | T (°C) | pH | thermostabilité (°C) | Références |
|------------------------------------|--------|---------|----------------------|--|
| Levures | | | | |
| <i>Clavispora lusitaniae</i> | 37 | 6.8 | 4- 45 | Ranjan <i>et al.</i> , 2015 |
| <i>Saccharomyces alluvirus</i> | 40 | 6.3 | 40 | Fogarty et Kelly, 1980 et Panchal, 1990 |
| <i>Filobasidium capsuligenum</i> | 50 | 5.6 | 50 | De Mot et Verachlert, 1985 |
| <i>Cryptococcus flavus</i> | 50 | 5.5 | 50 | Wanderly <i>et al.</i> , 2004 |
| <i>Schwanniomyces alluvius</i> | 50 | 9 | 50 | Moranelli <i>et al.</i> , 1987 |
| | 40 | 6.3 | 40 | Fogarty et Kelly, 1980 et Panchal, 1990 |
| <i>Schwanniomyces occidentalis</i> | 50 | 5.5 | 50 | Wang <i>et al.</i> , 1989 et Kim <i>et al.</i> , 2010 |
| <i>Lypomyces sp</i> | 55 | 6 | 80-90 | Merabti, 2006 |
| <i>Schwanniomyces sp</i> | 60 | 6 | 60-70 | Benaouida, 2008 |
| <i>Lipomyces kononenkoa</i> | 60 | 4.5-5 | - | Kelly <i>et al.</i> , 1985 ; Prieto <i>et al.</i> , 1995 |
| <i>Saccharomyces castelli</i> | 60 | 6 | – | Fogarty et Kelly, 1980 et Panchal, 1990 |
| <i>Pichia polymorpha</i> | 70 | 4 | – | Fogarty et Kelly, 1980 et Panchal, 1990 |
| <i>Lipomyces starkeyi</i> | 70 | 6 | – | Kelly et al. ,1985 ; Panchal, 1990 et Kang <i>et al.</i> , 2004 |
| <i>Clavispora lusitaniae</i> | 54 | 8 | 85 | Djekrif <i>et al.</i> , 2014 et 2016 |
| Moisissures | | | | |
| <i>Aspergillus tamarii</i> | 50 -55 | 4.5-6.5 | 50-65 | Moreira <i>et al.</i> , 2004 |
| <i>Aspergillus oryzae</i> | 30 -55 | 5.0-6.9 | – | Bennamoun, 2001 ; Swetha <i>et al.</i> , 2007 ; Ait Kaki, 2012 ; Yoon <i>et al.</i> , 2005 et Patel <i>et al.</i> , 2005 |
| <i>Aspergillus niger</i> | 28- 35 | 5.5-6.5 | – | Murado <i>et al.</i> , 1997 ; Van der kaaij <i>et al.</i> , 2007 ; Khan et Yadav, 2011, Adekunle <i>et al.</i> , 2012 ; Djekrif <i>et al.</i> , 2016 |

Tableau 08: Quelques propriétés de l' α -amylase acide et neutre (Archana et Satyanarayana, 2013).

| Propriétés | α -amylase acide | α -amylase neutre |
|----------------------|-------------------------|--------------------------|
| Gamme de pH | 3- 6 | 6.5- 8 |
| Température (°C) | 40 – 115 | 37 – 90 |
| Masse moléculaire | 41 – 160 | 12.5 – 70 |
| Pi | 3.4 – 4.8 | 5 – 7.1 |
| Thermostabilité (°C) | 60 – 80 | Instable |

2.1.6. L'amidon, substrat de l' α -amylase

L'amidon est un polysaccharide d'origine végétale composé de l'assemblage de deux homopolymères de glucose : l'amylose et l'amylopectine.

✓ L'amylose

Représente 15-à 25% de l'amidon. Il est constitué de longues chaînes linéaires d'unités D-glucopyranosyle liées par des liaisons α -(1,4) pouvant aller de $5 \cdot 10^5$ à 10^6 Da en masse moléculaire (Figure06). L'amylose présente une structure hélicoïdale renfermant de 6 à 8 résidus glucopyranosyle par tour de spire (pas de l'hélice 10,6 Å) et est localisé dans la zone amorphe du granule d'amidon (Malumba *et al.*, 2011).

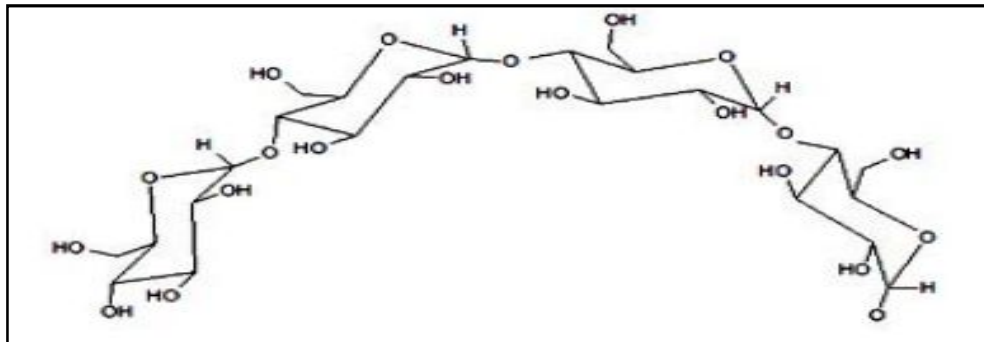


Figure 06 : Structure de l'amylose (Malumba *et al.*, 2011)

✓ L'amylopectine

Grand polymère d'unités glucosyle ayant un poids moléculaire compris entre 10^7 et 10^8 Da. Il est principalement constitué d'une chaîne linéaire de résidus D-glucopyranosyle liés en α -(1,4), et 5 à 6% de ramifications en α (1,6). L'ensemble confère à l'amylopectine une structure arborescente constituée par 3 chaînes différentes : les chaînes B les plus internes, les chaînes A plus courtes et qui viennent se greffer sur les chaînes B, et les chaînes C. Les chaînes A ont la possibilité de s'associer entre elles pour se mettre sous la forme de double hélice. L'étude de l'amylopectine par diffraction des rayons X montre que la zone de ramification est une région amorphe alors que la région renfermant les enchaînements en α -(1,4) présente une structure semi-cristalline (Parada, 2012).

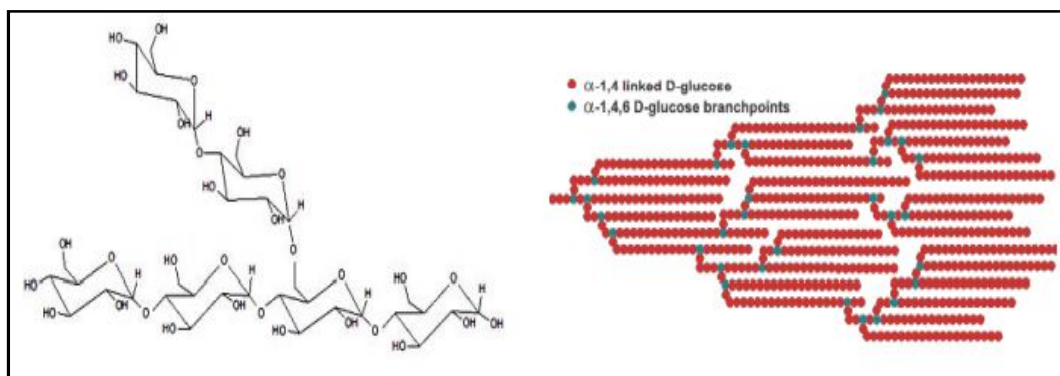


Figure 07: Structure de l'amylopectine (Parada, 2012)

2.1.7. Applications de l' α -amylase en industrie

Commercialisées pour la première fois en 1984 (Gupta *et al.*, 2003), les amylases sont d'une grande importance en biotechnologie, leur marché représentant environ 25% du marché mondial des enzymes (Rajagopalan and Krishnan, 2008 et Reddy *et al.*, 2003). Par leur capacité à modifier un certain nombre des propriétés de l'amidon (Palmer, 1975), elles trouvent des applications très diverses dans les secteurs de la détergence, de l'alimentaire, des bioénergies, de l'industrie du papier, des colles, ou encore de l'industrie pharmaceutique (Tableau09).

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

✓ α -amylase recombinante utilisée en thérapie

Elle est utilisée dans le diagnostic médical pour détecter certaines pathologies. Elle est élevée dans le sérum de patients atteints d'une pancréatite aiguë, de certains cancers digestifs et d'oreillons (Lo *et al.*, 2001). L' α -amylase recombinante sert d'aide digestif pour éviter les dyspepsies et les fermentations intestinales (Lo *et al.*, 2001 et Yihan *et al.*, 2010)(Tableau05).

Tableau 09 : Divers domaines d'application des α -amylases.

| Industries | Applications | Références |
|---------------------------------------|--|---|
| Biocarburants | Développement des biocarburants de première génération à production de bioéthanol | Oner, 2006 |
| Biscuiterie et planification | -Régulation des activités diastasiques des farines. -Formation de la mie souple en boulangerie. -Amélioration de la texture des gâteaux pâtisseries et des biscuits. | Pandey <i>et al.</i> , 2000 ; Malhotra <i>et al.</i> , 2002 et Azizi <i>et al.</i> , 2003 |
| Boissons | -Fabrication d'alcool éthylique, de boissons sucrées non alcoolisées et de jus de fruits. -Obtention des bières sans dextrines, dites bières à basses calories. | Mamo <i>et al.</i> , 1999 |
| Détergents | -Augmentation du pouvoir blanchissant. -Dégradation des résidus de féculents tels que les pommes de terre, les sauces, crème, chocolat. | Gupta <i>et al.</i> , 2003 |
| Environnement | Traitement des eaux résiduaires pour l'élimination de l'amidon. | Malhotra <i>et al.</i> , 2002 |
| Industrie pharmaceutique | Aide digestive. Anti-inflammatoire et anti-œdémateuse. | Yolande Gauthier <i>et al.</i> , 2014 |
| Textile, la tannerie, de la papeterie | Désencollage des tissus ainsi que dans les domaines de papeterie et tannerie | Teodoro <i>et al.</i> , 2000 |
| Sucrierie | -Facilité des opérations d'extraction et de raffinage du saccharose à partir de la betterave ou de la canne à sucre pour éliminer des traces d'amidon gênant la purification. -Préparation des sirops sucrés à base d'amidon de maïs et de sirops de chocolats. | Van der maarel <i>et al.</i> , 2002 et Martin <i>et al.</i> , 2003 |

2.2. La maltase, enzyme hydrolysant le maltose

2.2.1. Généralités et nomenclature

Les Maltases sont des α -glucosidases spécialisées (hydrolases qui libèrent l' α -D-glucose de l'extrémité non réductrice de leurs substrats) (Andriotis *et al.*, 2016), leur substrat préféré est le maltose (Choi *et al.*, 2013).

Les α -glucosidases microbiennes sont habituellement classées en deux types (I et II) sur la base de leurs spécificités de substrat: le Groupe I est capable de libérer l' α -D-glucose de l'extrémité non réductrice du substrat spécifique tel que le 4-nitrophény et l' α -D-glucopyranoside(p-NPG), mais à des taux inférieurs à celui de l'hydrolyse du maltose (Frandsen et Svensson *et al.*, 1998; Andriotis, 2016). Par ailleurs le groupe II, agit sur l'extrémité terminale en position réductrice du substrat(Yoshikawa *et al.*, 1994; Andriotis *et al.*, 2016). Ce type d'enzyme est largement réparti entre les microorganismes aérobies et anaérobies, où il peut être soit extracellulaire lié à la cellule ou intracellulaire (Eichler *et al.*, 2001; Ilavenil *et al.*, 2016).

La maltase est codé par le gène MALx2 (Musa et Marina *et al.*, 2016) et le gène MAL'A chez *S. acidocaldarius* (Choi *et al.*, 2013). C'est une enzyme ubiquitaire présente dans tous les tissus (Scheen *et al.*, 2008): les vertébrés, les plantes, les bactéries, les champignons, les moisissures et les levures comme *Isaria fumosorosea* (Linxia Liuet *et al.*, 2015) ; *Cordyceps brongniartii* (Sasaki *et al.*, 2015), *Moesziomyces antarcticus*(M. Wanget *et al.*, 2015) *Grosmannia clavigera* (Riken Yokohama *et al.*, 2016) et *Candida sp.* (Boukail et Maazi *et al.*, 2015).

✓ *Nomenclature*

- Nom systématique : α -(1,4) D-glucosidase (Salafsky; Ira S. *et al.*, 1971)
- Nom codifié : EC 3.2.1.20
- Nom recommandé : maltase (A. Dahlqvist, 1961).
- Synonymes :
 - glucoinvertase (Acourene Said *et al.*, 2014; Olivia *et al.*, 2005).
 - glucosidosucrase (Satoshi Kitao *et al.*, 1993).
 - maltase-glucoamylase (R. Quezada Calvillo *et al.*, 2015).
 - α -glucopyranosidase (M. D. Ogunbadejo *et al.*, 2015).
 - glucosidoinvertase (M. D. Ogunbadejo *et al.*, 2015).
 - α -D-glucosidase (A. Siczko *et al.*, 2013).
 - α -glucoside hydrolase (V. J. Akshatha *et al.*, 2014).
 - α -D-glucoside glucohydrolase (H. Husebye *et al.*, 2002).
 - glycosidases (Peumans *et al.*, 2006).
 - α -Glucosidase (P. B. Agrawal *et al.*, 2003).

2.2.2. Structure de la maltase

Les maltases ont une structure qui diffère selon leurs origines :

- ✓ **Homodimérique** : comme celle extraite de la bactérie *Geobacillus sp.* (Vo Si Hung *et al.*, 2005); des moisissures comme *Xanthophyllomyces dendrorhous* (Gutiérrez-Alonso *et al.*, 2015), et de la levure *Pichia pastoris*. La masse moléculaire de l'enzyme est variable selon la souche : 97Kda pour *Pichia pastoris* (Henrik Naested *et al.*, 2006) et *Ophiostoma piceae* (Haridas *et al.*, 2013), 430Kda chez la levure *Candida guilliermondii* (H. Nadeem *et al.*, 2016) et 130Kda pour la moisissure *Xanthophyllomyces dendrorhous* (Gutiérrez-Alonso *et al.*, 2015).
- ✓ **Monomérique** : chez les bactéries thermophiles comme *Thermus caldophilus* (Oyekanmi Nashiru, Sukhoon Koh *et al.*, 2001); chez les levures comme *Saccharomyces cerevisiae* (PM 13Kda) (Katrin Viigand *et al.*, 2016), *Lipomyces starkeyi*, (PM 35Kda) (Z. Gong *et al.*, 2012), *Candida albicans* (PM 50Kda) (Zheng-xin *et al.*, 2015) (Figure 08).

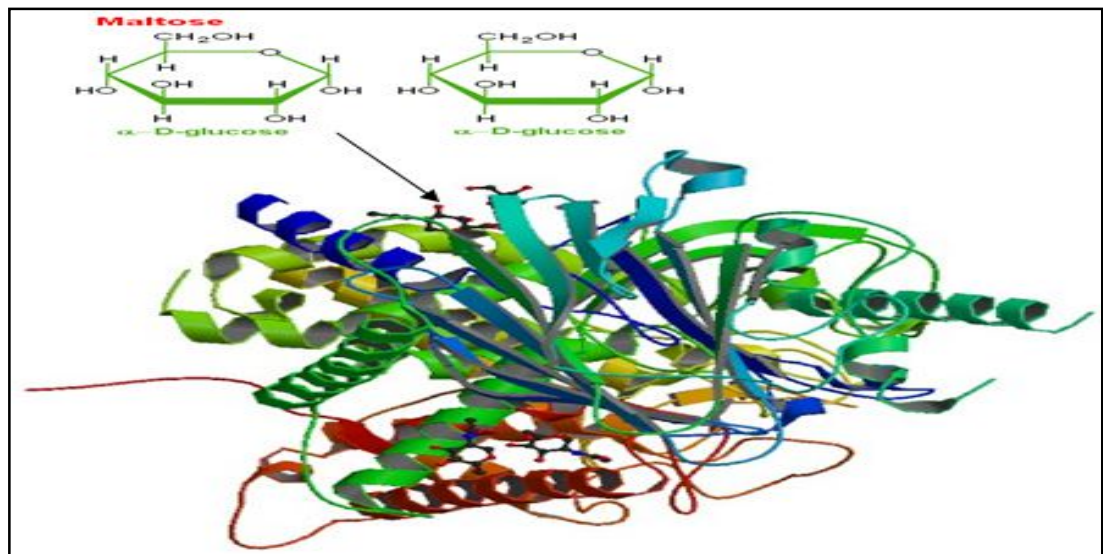


Figure 08 : Structure monomérique de la maltase liée à 4-O- α -D-Glucopyranosyl-D-glucose ($C_{12}H_{22}O_{11}$), chez *Saccharomyces cerevisiae* (diffraction par les rayons X, la structure est représentée à une résolution de 2 Å) (Barker *et al.* 2013).

2.2.3. Mode d'action

La maltase est une hydrolase amylolytique glycolytique qui permet l'obtention du Glucose à partir de l'extrémité terminale non réductrice du substrat des oligosaccharides ou des polysaccharides (Muhammad Asif Nawaz *et al.*, 2016) (Figure 09). L'enzyme exerce deux types de réactions catalytiques :

- ✓ **Réaction d'hydrolyse** : transfert d'un résidu de glycosyle à partir d'un oligosaccharide ou polysaccharide à une molécule d' H_2O , ce résidu glycosyle est obtenu par élimination du groupe hydroxyle hémiacétal de la forme cyclique (Marija Pavlović *et al.*, 2014).
- ✓ **Réaction de transglucosylation** : transfert d'un résidu glycosyle à partir d'un oligosaccharide à une autre molécule réceptrice (G. Styevkó *et al.*, 2013).

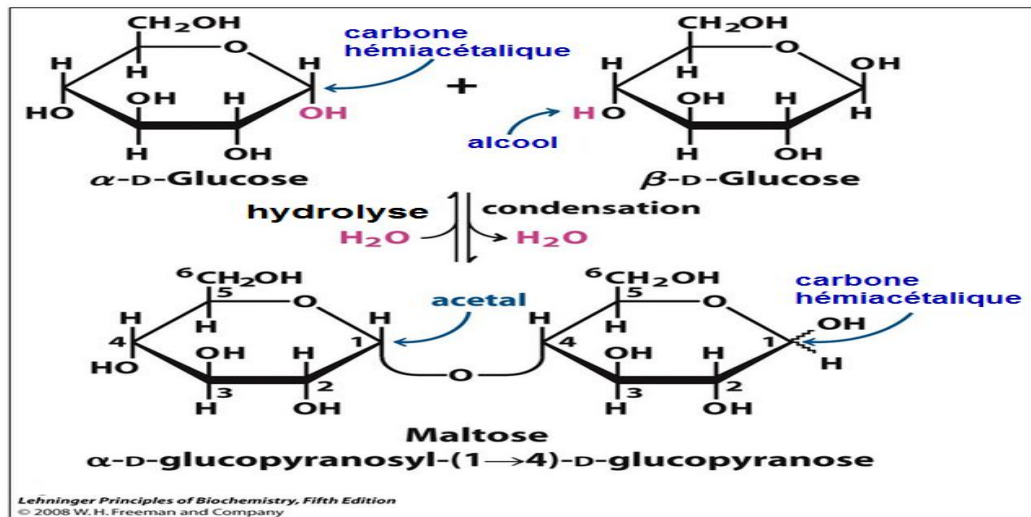


Figure 09 : Mode d'action de la maltase (Amit Kessel *et al.*, 2012).

Elle a deux mécanismes de configuration anomérique : un mécanisme d'inversion et un mécanisme de rétention (Figure 10).

- ✓ **Inversion de configuration anomérique** : Les enzymes qui libèrent un sucre de configuration opposée, agissent avec inversion de configuration anomérique (par simple substitution). Elles utilisent un mécanisme catalytique non-covalent pour exploiter la catalyse acido-basique générale. Une molécule d'eau est activée par un acide carboxylique déprotonné (Asp ou Glu) de l'enzyme afin de générer un hydroxyle qui attaque le carbone anomérique (Figure 10a) (Sinnott, 1990; Mccarter *et al.*, 1994; Davies *et al.*, 1995; S. Maicas *et al.*, 2016).
- ✓ **Rétention de configuration anomérique** : Les enzymes agissant avec rétention de configuration anomérique, libèrent un produit dont la stéréochimie du carbone anomérique est la même que celle du substrat (après deux inversions successives). Dans ce cas, le nucléophile effectuant la première attaque sur le carbone anomérique est l'acide carboxylique déprotoné de l'enzyme (Asp ou Glu), formant un intermédiaire covalent. Par conséquent, le substituant du glucoside est relâché à cette première étape. Par la suite, un deuxième résidu acide active une molécule d'eau qui, en attaquant le carbone anomérique, libère le glucide de l'enzyme (Henrissat *et al.*, 1995). (Figure 10b).

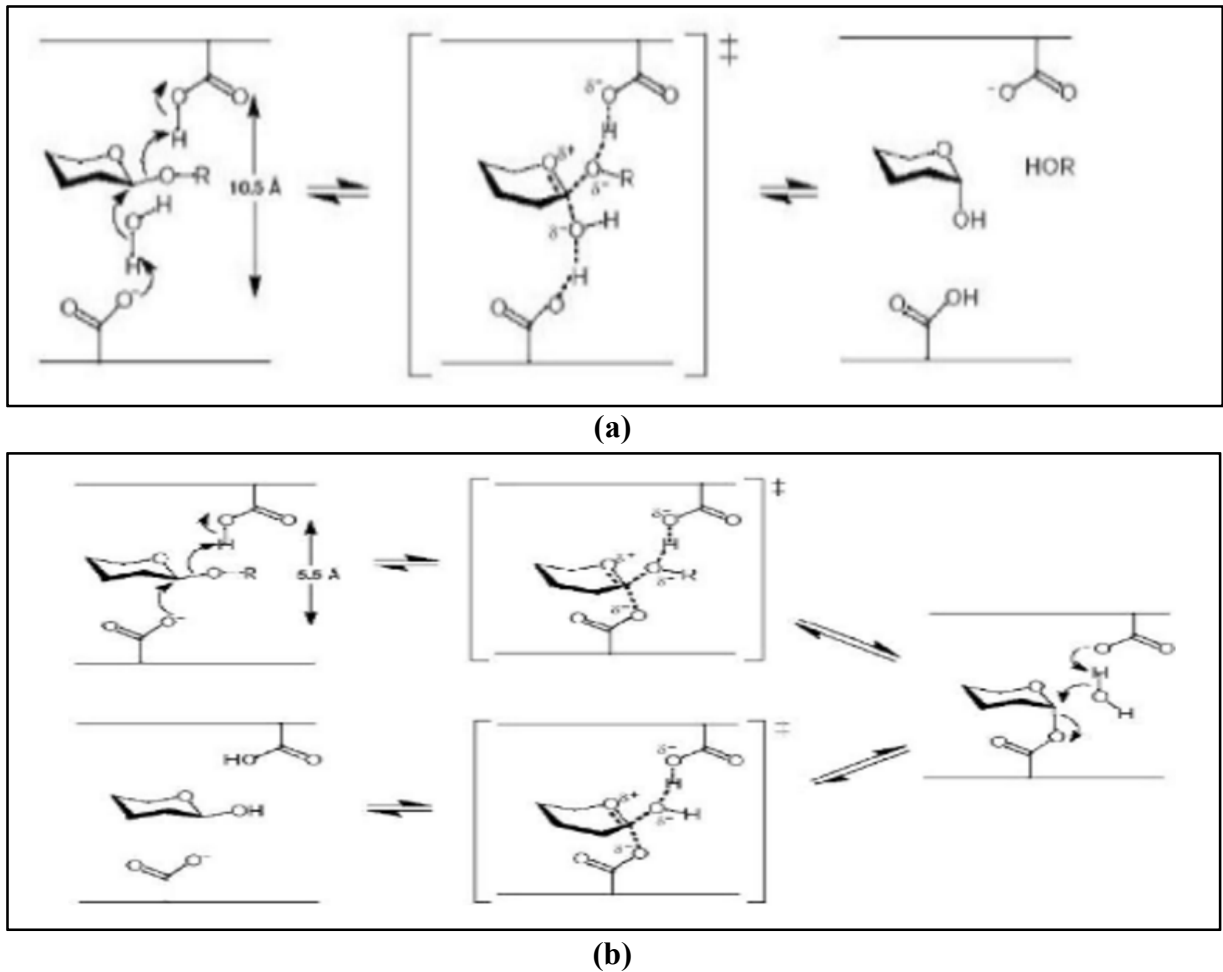


Figure 10 : Mécanisme de configuration anomérique de la maltase : (a) mécanisme d'inversion ; (b) mécanisme de rétention. (Henrissat *et al.*, 1995 ; Davies *et al.*, 1995 ; S. Maicas *et al.*, 2016 ; D. H. Kwan *et al.*, 2016).

2.2.4. Caractéristiques physico-chimiques

Les maltases se distinguent par le type de leurs substrats, exemple chez les micro-organismes comme *Thermus caldophilus* l'enzyme hydrolyse la fonction non réductrice de la liaison α -1,6-glycosidique de l'isomaltosaccharose et le panose, la liaison α -1,3-glycosidique des oses suivant : nigerose et turanose respectivement (Oyekanmi Nashiru *et al.*, 2011) et la liaison α -1,2-glycosidique du sucrose (Majzlová *et al.*, 2013). L' α -glucosidase qui possède une large gamme de spécificités de substrat est rapporté de *Bacillus sp* qui agit sur la liaison α -1-glycosidique de l' α -trehalose, ainsi que les liens α -1,3 et α -1,4 et α -1,6 et α -1,2 de nigerose, maltose, isomaltose, 1-O-aryle- α -glucosides respectivement, (Oyekanmi Nashiru *et al.*, 2001). Le mécanisme moléculaire qui aboutit à la multispécificité de reconnaissance des substrats résulte de la séquence d'acides aminés du site actif de l'enzyme (Oyekanmi Nashiru *et al.*, 2001).

✓ **Température optimale et la stabilité thermique**

La température optimale de la maltase est un paramètre variable selon l'origine de l'enzyme c'est-à-dire le type d'espèce et les conditions de son écosystème (Tableau10) :

- **Chez les moisissures** : 50°C *Trichoderma harzianum* (Grün C. H. *et al.*, 2006); 45°C et stable à 50°C, *Mortierella alliacea* (Tanaka *et al.*, 2002), 45°C, *Orpinomyces sp.* (Yo-Chia Chen *et al.*, 2014) et 60°C *Aspergillus niveus* (Da Silva *et al.*, 2009)
- **Chez les levures** : 60°C, *Neurospora crassa* dans *Pichia pastoris* (Xue Pei *et al.*, 2016), 45°C, *Culex quinquefasciatus* dans *Pichia pastoris* (Akinloye *et al.*, 2012).

✓ **pH optimum**

Le pH est l'un des critères variables de la maltase, elle a un pH optimum d'action acide et neutre : GANAB et GANC (K. Ghédira *et al.*, 2016). L'intervalle de variation est entre pH 4 et pH 9 selon le type des microorganismes (Tableau 10):

- **Chez les champignons** : le pH optimum de la maltase d'origine fongique est variable : pH 5 *Mortierella alliacea* (Tanaka *et al.*, 2002), pH 5.5 *Paecilomyces thermophila* (Huiyong Jia *et al.*, 2012) et pH 7 pour *Chaetomium thermophilum* (Giannesi *et al.*, 2006).
- **Chez les levures** : la littérature rapporte différents pH ; pH 4.5 pour *Schizosaccharomyces pombe* (Okuyama *et al.*, 2001); pH 6 pour *Pichia pastoris* (Qiaojuan Yan *et al.*, 2006) et pH7 pour *Saccharomyces cerevesiae* (Liu Z. L. *et al.*, 2012 et Zhang *et al.*, 2015).

2.2.5. Le substrat de production de la maltase, le maltose

Le maltose ou α -D-glucopyranosyl (1→4)-D-glucopyranose, de masse molaire 342,297 g.mol⁻¹ (IUPAC. 2015; Brongijk *et al.*, 2001) possède un pouvoir glycémique très élevé, supérieur à celui du glucose. Il est considéré comme une très bonne source d'énergie rapide (A. Cracco, R. Caiazza *et al.*, 2011). On le trouve dans les céréales, les graines germées, il entre dans la composition des confiseries, des confitures, du ketchup, de la bière et la fermentation des pâtes levées (M. Abdulkhair, M. A. Alghuthaymi, 2016). Le maltose est une substance métabolique primordiale chez divers micro-organismes : les bactéries *Bacillus stearotherophilus* (Yecheng Sun et Xuguo Duan *et al.*, 2016), *Bacillus Subtilis* (Tingting Tan *et al.*, 2015); les mycètes *Aspergillus Oryzae* (Tetsuya Hiramoto *et al.*, 2014) et chez les levures *Saccharomyces cerevisiae* (Xue Lin *et al.*, 2015), *Saccharomyces sp.* (Vassilios Ganatsios *et al.*, 2014), *Clavispora lusitaniae* (Ranjan *et al.*, 2016). Ce disaccharide provient de l'hydrolyse de l'amidon sous l'action des amylases, possède un pouvoir réducteur avec un carbone hémiacétalique libre dans un glucose et hydrolysable par une enzyme spécifique de la classe des hydrolases appelée maltase (D-glucoside glucohydrolase) (Bharathiraja *et al.*, 2016).

Tableau 10 : Les caractéristiques physico-chimiques de la maltase chez les levures et les moisissures. (T : température)

| Espèces | pH | T (°C) | Thermostabilité (°C) | Références |
|--|---------|--------|----------------------|--|
| Levure | | | | |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 4.2 | 30 | 30-50 | Tdera <i>et al.</i> , 2006 |
| <i>Clavispora lusitaniae</i> | 6 | 45 | 50-60 | Z. Lewis <i>et al.</i> , 2013 |
| <i>Clavispora lusitaniae</i> | 6 | 35 | 35-37 | Pedro Garcia-Martos <i>et al.</i> , 2005 |
| <i>Clavispora lusitaniae</i> | 5.5 | 60 | 60 | Z. Lewis Liu <i>et al.</i> , 2015 |
| <i>Clavispora lusitaniae</i> | 5 | 50 | 50-60 | Xu Wang <i>et al.</i> , 2016 |
| <i>Candida guilliermondii</i> | 5 | 38 | 40-80 | Iwona Gientka <i>et al.</i> , 2016 |
| <i>Candida sp.</i> | 5 | 40 | 70 | Boukail, 2015 |
| <i>Candida albicans</i> | 7 | 48 | 50 | Frade Perez <i>et al.</i> , 2016 |
| <i>Pichia kudriavzevii</i> | 6.9 | 50 | 50-80 | Silvana M. <i>et al.</i> , 2016 |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 7.5 | 42 | 42 | Pascal R. <i>et al.</i> , 2010 |
| <i>Saccharomycopsis fibuligera</i> | 5.5 | 42.5 | ≥30 | Reiser V. <i>et al.</i> , 1995 |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 6.3-7 | 52.5 | ≥40 | Matusaka <i>et al.</i> , 1999 |
| <i>Saccharomyces logos</i> | 6.9 | 40 | 40-60 | Chiba, S. <i>et al.</i> , 2003 |
| <i>schizosaccharomyces pombe</i> | 4.5 | 35 | 35-50 | Okuyama <i>et al.</i> , 2005 |
| <i>Saccharomyces carlsbergensis</i> | 6.7-6.8 | 48 | 43 | Needleman <i>et al.</i> , 2014 |
| <i>Wickerhamomyces anomalus (Pichia anomala)</i> | 8.5 | 35 | 37 | Restuccia <i>et al.</i> , 2011 |
| <i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i> | 6.5 | 60 | 60-80 | Gutiérrez <i>et al.</i> , 2015 |
| <i>Lipomyces staekeyi</i> | 4-4.5 | 60 | 60-70 | Kelly <i>et al.</i> , 1995 |
| Moisissure | | | | |
| <i>Aspergillus niger</i> | 4.3 | 40 | 40-50 | Kita A. <i>et al.</i> , 2009 |
| <i>Trichoderma viride</i> | 5.3 | 43 | 40-47 | Cui J. <i>et al.</i> , 2016 |
| <i>Aspergillus nidulans</i> | 5.5 | 45 | 40-50 | Kato N. <i>et al.</i> , 2002 |
| <i>Aspergillus fumigatus</i> | 4.5 | 50 | 50 | Pinghua Cao <i>et al.</i> , 2015 |
| <i>Lentinula edodes</i> | 5 | 50 | 40 | Yamasaki <i>et al.</i> , 2008 |
| <i>Cryptococcus curvatus</i> | 6 | 50 | 40-60 | Zhiwei Gong <i>et al.</i> , 2015 |
| <i>Ganoderma lucidum</i> | 5.5 | 80 | 80 | Guizhi <i>et al.</i> , 2016 |
| <i>Ganoderma lucidum</i> | 5.5 | 60 | 55-70 | Zhao X. <i>et al.</i> , 2015 |
| <i>Aspergillus awamori</i> | 5.9 | 55 | 45-55 | Singh B <i>et al.</i> , 2016 |
| <i>Thermoascus aurantiacus</i> | 4.5 | 80 | 80-100 | Carvalho A. <i>et al.</i> , 2010 |
| <i>Fusarium oxysporum</i> | 5 | 70 | 80 | Folasade M. <i>et al.</i> , 2016 |
| <i>Sporotrichum thermophila</i> | 5 | 60 | 60-85 | Bala A. <i>et al.</i> , 2016 |
| <i>Alaromyces thermophilus</i> | 5 | 60 | 60 | Malek F. <i>et al.</i> , 2016 |
| <i>Thermotoga naphthophila</i> | 6-9 | 97 | 60-90 | Kaleem Iqbal <i>et al.</i> 2016 |

2.2.6. Applications de la maltase en industrie

✓ Biotechnologie et biothérapie

Les maltases sont des biocatalyseurs de réactions biochimiques au sein des organismes vivants, elles sont utilisées en biotechnologie pour catalyser les réactions de dépolymérisation des macromolécules et de synthèse en raison de leur spécificité et de leur efficacité (Assoi Yapi *et al.*, 2008). Chez l'homme, la maltase joue un rôle important dans :

- La production de glucose dans la lumière intestinale. L'inhibition de l'enzyme constitue une cible de médicament efficace pour le diabète de type 2 et pour l'obésité.
- La maladie de Pompe est une maladie autosomique récessive qui se manifeste par un trouble métabolique attribué à un déficit en α -glucosidase. Le glycogène s'accumule dans les lysosomes, ce qui entraîne une faiblesse musculaire progressive, une insuffisance cardiaque et d'autres symptômes neurologiques. L' α -glucosidase recombinante dont le système d'expression est *Pichia pastoris* constitue un traitement envisageable (Meng P. *et al.*, 2010).
- Le diagnostic biochimiques de certaines pathologies (Biomarqueur) : des études suggèrent que la maltase peut être utile pour l'évaluation des fonctions de l'épididyme, et en particulier l'exclusion de l'obstruction épидидymaire, cela se manifeste chez les patients ayant une : leucocytospermie, oligozoospermie et azoospermie (Sorokin Konstantin *et al.*, 2016).

✓ Industries alimentaires

Les oligosaccharides et les monosaccharides à usage nutritionnel connaissent un développement important en raison de leur aptitude à favoriser la croissance de la flore bactérienne intestinale humaine ou animale, ils sont utilisés dans la formulation de nombreux produits alimentaires (confiseries, gommages, boissons, fromagerie). Ces oses sont obtenus soit par extraction de sources végétales, soit par hydrolyse de polysides, soit par synthèse enzymatique (Talantikite *et al.*, 2015 et Pierre-Louis Bombeck *et al.*, 2016).

✓ Industrie des détergents

les enzymes sont également utilisées dans les détergents afin d'éliminer les tâches tenaces pour la lessive et le lavage et dégrader les lipides les protéines des aliments (Markku Vanhanen *et al.*, 2000) de nouvelles méthodes de protection environnemental et allergique sont additionnés aux détergents (Elyse A. Dunn *et al.*, 2016 et Sanja Grbavčić *et al.*, 2015).

3. Autres enzymes glycolytiques : Cellulases et Pectinases

3.1. Les pectinases, enzymes hydrolysant les pectines

Les pectines sont des polysaccharides hétérogènes complexes (Figure11) présents dans les fruits et les légumes, en particulier : écorce d'oranges, citrons, fruits de la passion, pommes, bananes, mûres, tomates, carottes, mangues (Ognyanov *et al.*, 2016).

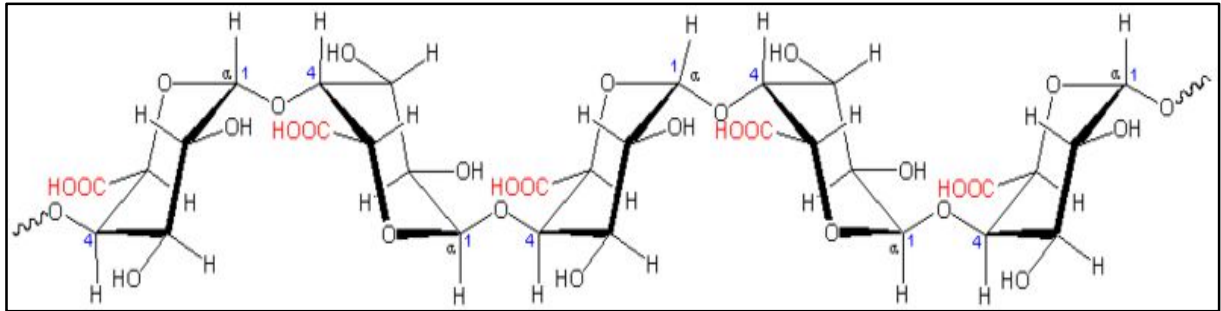


Figure 11 : Structure de l'acide polygalacturonique (pectine) (Christiaens *et al.*, 2016).

Les pectines ont un poids moléculaire de 50 à 150 Kda et sont constituées d'une zone lisse formée d'homogalacturonanes (HG) et d'une zone hérissée composées de rhamnogalacturonanes (RG) et de chaînes latérales (Christiaens *et al.*, 2016). Ces complexes de polysaccharides ont une forte teneur en acide galacturonique et une faible quantité de rhamnose et d'oses neutres (Alazi *et al.*, 2016). Dans la nature, la pectine est une source importante de carbone pour de nombreux champignons : les levures *Candida macedoniensis*, *Kluyveromyces marxianus*, *Saccharomyces paradoxus*, *Saccharomyces uvarum* (Call *et al.*, 1995 ; Serrat *et al.*, 2004; Eschstruth A. *et al.*, 2011 et Naumov *et al.*, 2016) et les moisissures, en particulier *Mucor* et *Aspergillus* (Thakur *et al.*, 2010 et Biz *et al.*, 2016).

Les pectinases ou *polygalacturonases* (EC 3.2.1.15) constituent deux catégories importantes d'enzymes:

- ✓ Les dépolymérase, les estérases (polygalacturonases) agissent au niveau des zones lisses des pectines (Combo *et al.*, 2011).
- ✓ Les rhamnogalacturonases, les arabinanases, les galactanases et parfois les férulatestérases interviennent au niveau des zones hérissées (Voragen *et al.*, 2013).

Les polygalacturonases (Pgases) classés en deux endopolygalacturonase (EC3.2.1.15) ou exopolygalacturonase (EC 3.2.1.67) hydrolysent de façon aléatoire les liaisons α -D 1,4 de l'acide galacturonique dans les régions lisses de la pectine (Figure12) (Parenicova *et al.*, 2000 et Torres *et al.*, 2013) et sont d'une importance particulière par leur implication dans la biodégradation aisée des liaisons glycosidiques internes et externes présentes dans la pectine, ce qui réduit sa taille moléculaire et diminue ainsi la viscosité et le rendement industriel du produit fini (Torres *et al.*, 2013).

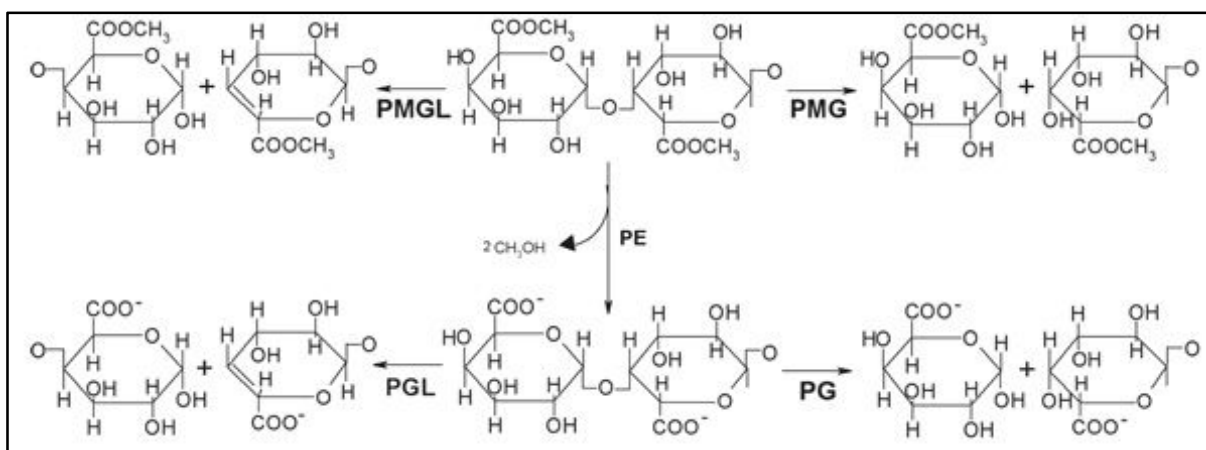


Figure 12 : Mode d'action des pectinases *PMGL* : polyméthylgalacturonate lyase ; *PMG* : polyméthylgalacturonase ; *PE* : pectinestérase ; *PGL* : polygalacturonate lyase ; *PG* : polygalacturonase. (Kouhounde *et al.*, 2014).

Différentes espèces de levures productrices de polygalacturonase sont utilisées industriellement pour améliorer la qualité des jus de fruits, telles que : *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Candida*, *Cryptococcus* et *Geotrichum* sont citées par plusieurs auteurs (Merín María Gabriela *et al.*, 2015 ; Naumov *et al.*, 2016 ; Pagani *et al.*, 2016 ; Belda *et al.*, 2016 ; Moubasher *et al.*, 2016). Le tableau ci-dessous rapporte les propriétés physico-chimiques de quelques polygalacturonase.

Tableau 11 : Propriétés physico-chimiques de quelques polygalacturonase (PG).

| Source | Nature | PM | Pi | AE (U) | T _{op} (°C) | pH _{op} |
|---------------------------------|--------|----|-----|--------|----------------------|------------------|
| Moisissures | | | | | | |
| <i>Aspergillus japonicus</i> | EndoPG | 38 | 5.6 | | 30 | [4-5.5] |
| <i>Aspergillus oryzae</i> | EndoPG | 41 | - | - | 45 | 5 |
| <i>Aspergillus niger</i> | EndoPG | 61 | | 582 | 43 | [3.8-4.3] |
| <i>Aspergillus awamori</i> | EndoPG | 41 | 6.1 | 487 | 40 | 5 |
| <i>Aspergillus alliaceus</i> | ExoPG | 40 | 5.9 | | 35 | 5.5 |
| Levures | | | | | | |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | EndoPG | 39 | - | 2870 | 45 | 5.5 |
| <i>Rhodotorula dairenensis</i> | EndoPG | 40 | - | - | 12 | 3.5 |
| <i>Saccharomyces uvarum</i> | EndoPG | 20 | - | - | 29 | 5 |
| <i>Candida haemulonii</i> | EndoPG | - | - | - | 37 | 7 |

3.2. La cellulase, enzyme hydrolysant la cellulose

La cellulose est l'hydrate de carbone le plus abondant dans la nature. C'est un polymère linéaire de résidus de D-glucose liés par des liaisons β -1,4-glucosidiques et le constituant principal de la paroi cellulaire végétale. Grâce à sa structure semi-cristalline, il est plus récalcitrant à la dégradation enzymatique (Schulz *et al.*, 2000) que d'autres polysaccharides de la paroi cellulaire végétale.

Les cellulases (EC 3.2.1.4) dont le nom systématique est 1,4 - (1,3 ; 1,4) - beta-D - Glucan4-glucanohydrolase sont des enzymes glycosylées de masses moléculaires très variables selon l'origine de la souche microbienne. Elles sont largement répandues dans la nature (Xu *et al.*, 2000). Les bactéries sont les principales souches productrices de cellulases : *Erwinia chrysantharum* (Schwarz, 2001) et les archéobactéries telle que *Pyrococcus orikoshii* (Ando *et al.*, 2002) qui constituent une source importante de cellulases thermostables. Chez les levures, les genres pouvant présenter une activité cellulasique, sont beaucoup plus rares, néanmoins on peut citer les genres cités dans le tableau ci-dessous :

Tableau 12 : Quelques levures productrices de cellulase.

| Levures | Références |
|---------------------------------|--|
| <i>Torulopsis wickerhamii</i> | Himmel <i>et al.</i> , 1986 |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | Merja <i>et al.</i> , 1987 |
| <i>Candida wickerhamii</i> | Gunata <i>et al.</i> , 1990 |
| <i>Candida peltata</i> | Saha et Bothast, 1996 |
| <i>Trichosporon</i> | Scriban, 1999 |
| <i>Khryveromyces lactis</i> | Hasper <i>et al.</i> , 2002 |
| <i>Candida bombicola</i> | Lo Chi-Ming <i>et al.</i> , 2009 |
| <i>Yarrowia lipolytica</i> | Boonvitthya <i>et al.</i> , 2013 |
| <i>Candida konsanensis</i> | Sarawan <i>et al.</i> , 2013 |
| <i>Candida easanensis</i> | Thongekkaew <i>et al.</i> , 2014 |
| <i>Candida tropicalis</i> | Hao Zhou <i>et al.</i> , 2014 Zhou <i>et al.</i> , 2015 |
| <i>Pichia stipitis</i> | Bhatia <i>et al.</i> , 2015 |
| <i>Pichia pastoris</i> | Araújo <i>et al.</i> , 2015 Siadat <i>et al.</i> , 2016 |
| <i>Clavispora NRRL</i> | Wang <i>et al.</i> , 2016 |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | Van Zyl <i>et al.</i> , 2016 |

Il existe 04 classes de cellulase. Le système de dégradation de la cellulase chez les champignons comprend trois classes d'enzymes hydrolytiques: β -1,4-endoglucanases (EGL) et exoglucanases / cellobiohydrolases (CBH) qui hydrolysent la cellulose en gluco-oligosaccharides, qui sont ensuite dégradées en d-glucose par l'action des β -glucosidases (BGL) (van den Brink et de Vries, 2011). Une quatrième classe d'enzymes oxydatives a été décrite récemment: les polysaccharides mono-oxygénases lytiques (Morgenstern *et al.*, 2014).

Le champignon filamentueux industriel, *Trichoderma reesei*, a été largement étudié pour la fabrication de préparations de cellulase. Il produit des niveaux élevés d'endoglucanases et cellobiohydrolases, mais de faibles niveaux de β -glucosidases qui sont essentiels pour hydrolyser complètement la cellulose (Singhania *et al.*, 2013).

Contrairement aux cellulases bactériennes dont le pH optimum est proche de la neutralité (Buchholz *et al.*, 1983) , pH7 pour *Achromobacter xylosoxidans* (Mahalakshmi and Jayalakshmi, 2016) et *Streptomyces griseorubens* (Zhang *et al.*, 2016) et la température varie entre 50 et 100°C (Irfan, 2012), les cellulases fongiques ont une gamme plus limitée, pH de 4 à 6 et une température optimale dans la gamme 40 et 70°C , *Trichoderma sp.* (Bensmira, 2006 et Leghlimi, 2013), *Aspergillus sydowii* (Ketna *et al.*, 2013), *Aspergillus sydowii* (Ketna *et al.*, 2013). Ainsi, l'industrie du textile s'intéresse aux cellulases bactériennes (Gusakov *et al.*, 2000 et Ando *et al.*, 2002).

Les cellulases sont également employées dans différentes industries : la production de produits chimiques, le biocarburant, la brasserie et le vin, les aliments pour animaux, la lessive et les pâtes et les papiers (Receveur *et al.*, 2002).

4. Les protéases, enzymes hydrolysant les protéines

Les protéines sont des macromolécule biologiques formées d'une ou de plusieurs chaînes polypeptidiques (Fournier *et al.*, 2014). Chacune de ces chaînes est constituée de résidus d'acides aminés liés entre eux par des liaisons peptidiques (Fournier *et al.*, 2014). Au-delà de quelques dizaines de résidus il s'agit de peptides (Charmot *et al.*, 2008) et de protéines lorsqu'elles dépassent une cinquantaine de résidus (Petsko *et al.*, 2008). Les protéines sont codées par des gènes, qui spécifient 22 acides aminés, dits protéinogènes, qui sont incorporés directement par les ribosomes lors de la biosynthèse des protéines (Malinge *et al.*, 2016).

Les protéases (ou peptidase) sont des enzymes qui hydrolysent les liaisons peptidiques des protéines, il s'agit de la protéolyse (Hornebeck *et al.*, 2009). Elles impliquent plusieurs mécanismes d'action, ce qui permet de distinguer les grandes familles mécanistiques, selon la nature des acides aminés du site actif (Veyradier *et al.*, 2011) :

- ✓ **Les protéases à serine** : telles que la trypsine (EC 3.2.21.4), spécifique des liaisons peptidiques dans lesquelles l'acide aminé engagé par son carboxyle est une lysine ou une arginine (Tapdiqov *et al.*, 2015); la chymotrypsine (EC 3.4.21.1), s'attaque à des liaisons peptidiques où le carboxyle engagé est un acide aminé hydrophobe ou aromatique et la thrombine qui clive le fibrinogène en fibrine lors de la coagulation sanguine (Ovaere *et al.*, 2009 et Matsuo *et al.*, 2012).
- ✓ **Les protéases à cystéine (ou protéases à thiol)** : qui possèdent une cystéine dans leur sites actifs comme la papaïne (EC 3.4.22.2), spécifique des liaisons peptidiques dans lesquelles l'acide aminé engagé par son carboxyle est un acide aminé basique, aromatique ou apolaire (Shokhen *et al.*, 2011), les caspases ; protéases qui interviennent dans le processus d'apoptose (Jegham *et al.*, 2009 et Cabon *et al.*, 2013).
- ✓ **Les protéases acides** : agissent à pH acide et possèdent un acide aspartique sur leur site actif (Groeme *et al.*, 2015), telle que la pepsine ; spécifique des liaisons peptidiques dans lesquelles est engagé un acide aminé aromatique (fonction amine) (Xuesong *et al.*, 2016).
- ✓ **Les métalloprotéases** : qui possèdent un cation métallique, en général un atome de zinc, telle que la thermolysine (Tauzin *et al.*, 2014).

Ces enzymes sont isolées des microorganismes, tels que les levures : *Candida albicans*, *Pichias pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida lusitaniae* qui produisent les enzymes respectives : caspase, papaïne, caspase, une protéase aspartique (Gabrielli *et al.*, 2015; Werner *et al.*, 2015; Higuchi *et al.*, 2016 et Theron *et al.*, 2014). Elles sont largement utilisées en industrie (présure, lessives, détergents, produits pharmaceutiques...) (Khan *et al.*, 2013; Baglinière *et al.*, 2013; Souza *et al.*, 2015).

5. Le milieu de base pour la production des enzymes : le lactosérum

Le lactosérum est le liquide jaune pâle qui provient de la fabrication du fromage ou de la caséine ; ou l'on retrouve la majeure partie de l'eau avec toutes les substances du lait ; pour chaque kilogramme de fromage fabriqué à partir de 10 litres de lait, 9 litres de lactosérum sont produits (Kosikowski, 1979). Selon son degré d'acidité et le coagulant, deux grandes classes de lactosérums sont souvent distinguées ; le lactosérum acide obtenu par coagulation du lait par acidification provoquée par le métabolisme des bactéries lactiques ou par acidification chimique et le lactosérum doux obtenu par coagulation du lait avec de la présure (ableau 13). 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 sa composition en lactose (Nakais et Modler, 2000), qui se trouve en proportions plus élevées dans le lactosérum doux et constitue la principale source de carbone et d'énergie pour le développement adéquat de nombreux microorganismes possédant le système β -galactosidase dont les levures (Trystram *et al.*, 1991 et Lejeune et Baron, 1995) qui intéresse l'industrie agroalimentaire. Il contient également des protéines solubles ou protéines sériques qui restent en solution quand on précipite le lait, avec en plus des substances azotées non protéiques en concentration plus élevée dans le lactosérum doux, résultant de l'action des enzymes coagulantes ou du métabolisme des bactéries qui se développent dans le lait ou dans le coagulant. Par ailleurs, la matière minérale s'avère plus riche en chlorure et potassium dans le lactosérum doux ; le calcium est plus important dans le lactosérum acide. (Tableau13)(Alais, 1981).

Les usines laitières déversent plus de 145 millions de tonnes de lactosérum liquide par année (Audic *et al.*, 2003), ce sous produit jeté dans la nature devient un facteur de pollution redoutable. Il est devenu indispensable de le recycler et de valoriser ces tonnages élevés pour éviter la menace polluante (Nakais et Modler, 2000).

Depuis 1994, plusieurs laboratoires de recherches, dans la plupart des pays laitiers, se sont intéressés à sa valorisation. De ce fait, le commerce international du lactosérum a connu une hausse annuelle de près de 25% (Nakais et Modler, 2000). La production de levures ou protéines d'organismes unicellulaires par fermentation constitue une des voies les plus attractives.

La disponibilité de cette ressource en grande quantité, présente des avantages nutritifs, technologiques, et commerciaux indéniables. Il est utilisé comme substrat de fermentation pour la production de différents produits : levure de boulangerie (Gana et Touzi, 2001), acide lactique (Mehaia et Cheryan, 1986), éthanol (Tin et Mawson, 1993) et enzymes (protéase, amylase, pectinases, α -galactosidase et cellulase)(Miyakawa, 1992) et matière grasse (Luquet et Boudier, 1984).

Tableau 13 : Composition chimique du lactosérum (Alais, 1981)

| Paramètres | Lactosérum doux (g/l) | Lactosérum acide (g/l) |
|------------------------------|------------------------------|-------------------------------|
| Acidité | 13,83 ₁ | 67,16 ₁ |
| Humidité | 93,5 ₂ | 93 ₂ |
| 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 |

(1): Degré DORNIC. (2) : %

Matériel et méthodes

1. Matériel biologique et repiquage des souches sur boîtes de pétri

Le travail porte sur la production d'enzymes thermostables secrétées par des levures isolées par Dr Dakhmouche-Djekrif Schehrazad à partir des grains de blé d'une région du Sahara Algérien « Biskra » située à l'Est et considérée comme un écosystème extrême (température maximale: 49.5°C, pluviosité annuelle: 120-150 mm). Les souches ont été conservées à (-80°C) dans des cryobilles.

Une seule bille de chaque souche est plongée dans de l'eau distillée stérile avec une agitation modérée afin d'obtenir des suspensions cellulaires. Pour chaque souche, trois boîtes (avec deux répétitions) sont ensemencées en surface sur des milieux de culture puis incubées pendant 48h à 40°C (Annexe 1). Chaque opération est réalisée en triple.

2. Sélection de la souche la plus performante dans la production d'enzymes

A partir des boîtes initiales, des colonies levuriennes sont récupérées dans des tubes à vis contenant de l'eau distillée stérile afin de préparer les solutions de suspensions cellulaires. Après une agitation légère, une goutte de chaque suspension est déposée au centre des dix boîtes de pétri (avec deux répétitions).

La sélection est effectuée sur un milieu additionné de substrat spécifique à 2% servant de source de carbone pour la mise en évidence de l'activité de chaque enzyme. Le milieu de sélection des protéases est additionné de lait UHT (Annexe 2). Les boîtes sont ensuite incubées à 40, 42, 45, 47 et 50°C pendant 24 à 48h. Après incubation, une lecture est effectuée toutes les 24heures par observation de la zone de croissance. Chaque opération est réalisée en triple.

3. Mise en évidence sur boîtes des activités enzymatiques

Le principe de la mise en évidence est la détection des zones de lyse par l'utilisation de réactifs spécifiques.

3.1. La mise en évidence de l'activité de l'alpha amylase

Le réactif utilisé est le lugol qui donne une coloration bleue avec l'amidon (Tatsinkou F.B. *et al.*, 2005). L'hydrolyse de l'amidon par l' α - amylase produite par la levure se visualise par une zone de lyse. Les produits sont les dextrines, le maltose et le glucose (Zareian *et al.*, 2005).

3.2. La mise en évidence de l'activité de la maltase et de la cellulase

Afin de visualiser les activités cellulolytique et maltasique des souches repiquées, les boîtes sont couvertes avec la solution de Rouge Congo à 1% pendant 20minutes permettant au colorant de se fixer. L'excédant de colorant non fixé est éliminé et remplacé par une solution de NaCl (5N) pendant 30minutes. Finalement, le NaCl est éliminé et les boîtes rincées délicatement à l'eau distillée.

Les plages de lyse apparaissent alors décolorées (un jaune-orange) par rapport au reste du milieu qui est rouge (Moubasher *et al.*, 2010). Une collection des souches ayant une activité cellulolytique et/ou maltasique est ensuite constituée.

3.3. La mise en évidence de l'activité de la pectinase

Les boîtes sont recouvertes par une solution d'iode potassium iodide (1g iode, 5g potassium iodide et 330 ml H₂O) et laissées à température ambiante pendant 20 minutes. L'activité pectinolytique est mise en évidence par l'apparition de zones claires autour des colonies (Fernandes-Salomão TM *et al.*, 1996).

3.4. La mise en évidence de l'activité des protéases

L'activité protéasique est estimée par la mesure des diamètres des zones de lyse de la caséine autour des zones de croissance sur gélose additionnée de lait UHT (annexe 2). (Ronald et Harold, 1970).

4. Cinétique de production enzymatique de la souche d'intérêt

L'étude de la cinétique de l' α -amylase et de la maltase a été réalisée pendant 84 heures pour la souche L5 répondant positivement aux tests amylolytique, maltasique et pectique.

4.1. Préparation de l'inoculum

La souche d'intérêt (L5) conservée au réfrigérateur à une température de 4°C est repiquée sur milieu YPGA à 40°C pendant 48h. Une suspension de la souche est ensuite préparée dans un flacon d'eau distillée stérile (20 ml).

4.2. Dénombrement des cellules

Le dénombrement cellulaire se fait par comptage sur la cellule de Thomas (0.100mm/0.0025mm²) par observation optique après une dilution de 1/10 de la solution mère de façon à obtenir une densité optique mesurable par spectrophotomètre. La densité optique de la suspension est déterminée à 600nm (Abs < 0.500). (Annexe 4).

4.3. Milieu de base pour la production des enzymes

Le milieu choisi pour la culture de la levure sélectionnée est à base de lactosérum déprotéiné dans le but de revaloriser ce déchet de l'industrie fromagère. Le lactosérum est déprotéiné par la technique de précipitation des protéines après ajustement du pH à 4.6 puis chauffé à 100°C pendant 45 min dans un bain-marie. Après filtration avec papier Whatman, le surnageant obtenu est stocké à 4 °C dans des flacons fermés hermétiquement.

4.3.1. Préparation du milieu

Le milieu de base est additionné de substrat inducteur, extrait de levure, une solution de sels et une solution d'oligoéléments (Annexe 5). Le pH est ajusté à 5 et le milieu réparti dans vingt huit Erlen-Meyers de 250 ml chacune contenant 50ml, fermée avec du coton cadré et du papier aluminium. Après stérilisation à 120°C pendant 20minutes et refroidissement, les milieux sont ensuite ensemencés avec un taux de 2.5×10^6 cellules/ml et incubés à 40°C avec une agitation de 100 rpm dans un bain Marie agitateur pendant 84 heures.

Afin de déterminer le temps optimal de production des deux enzymes, des prélèvements sont effectués toutes les 12 heures suivis d'une série de centrifugations des échantillons à 7000rpm pendant 20 minutes dans le but de séparer la biomasse du surnageant qui est récupéré par la suite pour le dosage des activités α -amylasique et maltasique et le dosage des protéines.

4.4. Dosage des activités enzymatique

4.4.1. Dosage de l'activité α -amylasique (méthode de Bernfeld 1955)

L'activité amylasique est évaluée par l'hydrolyse enzymatique de l'amidon qui libère du maltose. Ce dernier est dosé par la méthode de Bernfeld (1955) qui utilise l'acide 3-5 dinitrosalicylique (DNSA) comme inhibiteur de l' α -amylase.

La réaction est colorimétrique et l'intensité de la coloration est proportionnelle à la quantité du maltose libérée (Bernfeld, 1955). La concentration des sucres réducteurs correspondants est déterminée à partir de courbe étalon établie avec des concentrations de maltose variant de 0.4mg/ml à 2 mg/ml. (Figure13). L'activité enzymatique est exprimée par unité internationale (U/ml), correspondant à une μ mole de maltose libérée par minute et par millilitre du milieu à 40°C et à pH5.

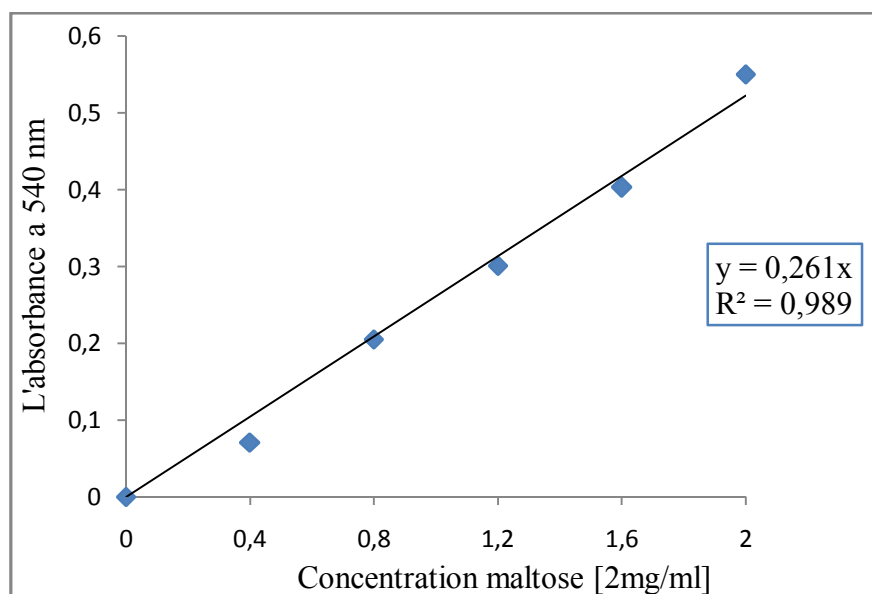


Figure 13 : Courbe étalon maltose

4.4.2. Dosage de l'activité maltasique

L'activité de la maltase est mesurée à l'aide du réactif glucose oxydase selon la méthode de Dingeon, 1975), le kit est fourni par (SPINREACT S.A.U) (Annexe 4).

Le principe de cette méthode est basé sur la mesure du pouvoir réducteur du glucose libéré lors de l'hydrolyse enzymatique du maltose. La réaction est colorimétrique, l'intensité de la couleur est directement proportionnelle à la quantité du glucose libéré. L'activité enzymatique est exprimée en unité internationale qui correspond à une μmole du glucose libérée par minute et par litre de milieu à 40°C et à pH 5. (Figure 14).

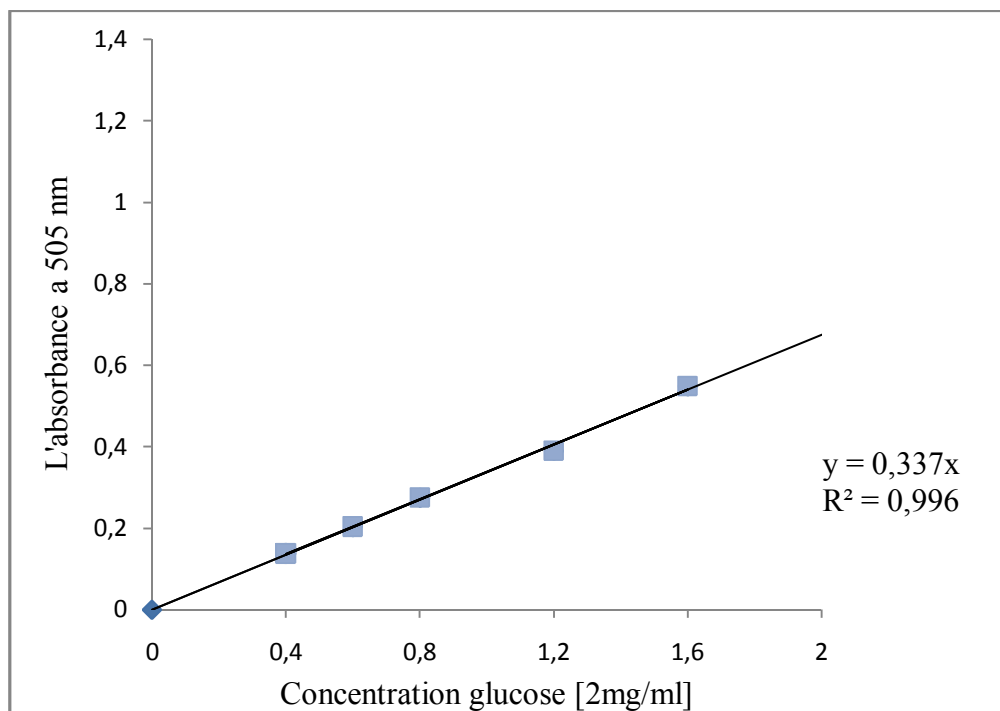


Figure 14 : Courbe étalon glucose.

4.5. Dosage de protéines

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

- Réaction de Biuret qui, en présence de sulfate de cuivre et en milieu alcalin, permet le dosage des liaisons peptidiques des protéines.
- Réaction du réactif de Folin sur la tyrosine, le tryptophane et dans une moindre mesure la cystine, la cystéine et l'histidine. Elle entraîne une réduction, par perte d'un à trois atomes d'oxygène et la fixation du cuivre par chélation, facilitant ainsi le transfert d'électrons vers ce réactif.

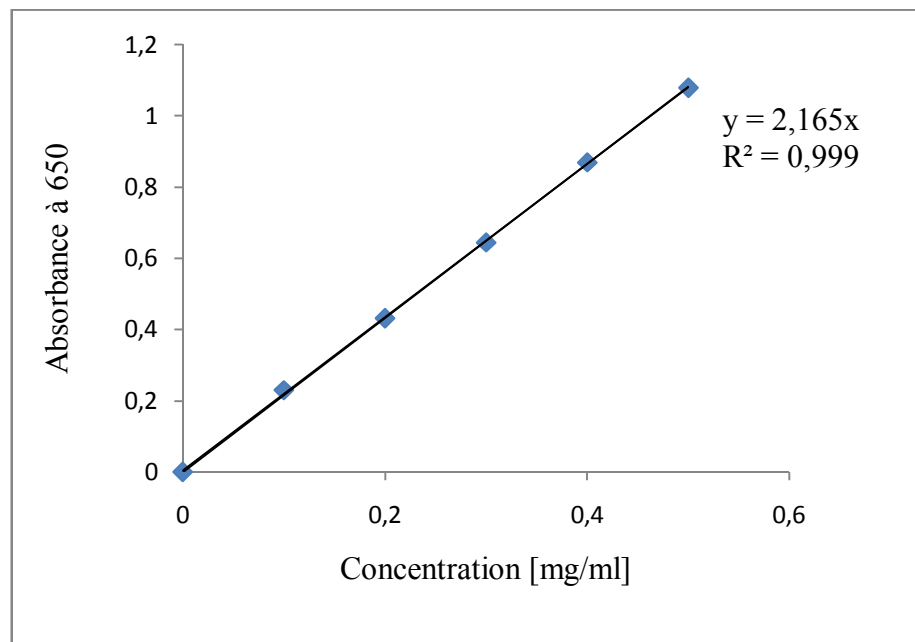


Figure 15 : Courbe étalon des protéines.

5. Etude des propriétés de l' α -amylase et de la maltase de l'extrait brut

5.1. Effet du pH

L'influence du pH sur l'activité est déterminée dans un intervalle de pH [3 à 7] avec des variations de 1 unité, en utilisant les tampons citrate et phosphate :

- Acide citrique (0.5M) / phosphate de sodium dibasique (0.5M) : pour pH 3 et pH 4.
- Phosphate monopotassique (M/15) / phosphate disodique (M/15) pour pH 5, pH 6 et pH 7.

Cette manipulation permet la détermination du pH optimal.

5.2. Effet de la température

L'effet de la température d'incubation est étudié dans l'intervalle de 40 à 100° C (avec un pas de 10°C) en mesurant l'activité enzymatique de l'extrait brut incubé pendant 30 min au pH optimal.

5.3. Stabilité thermique

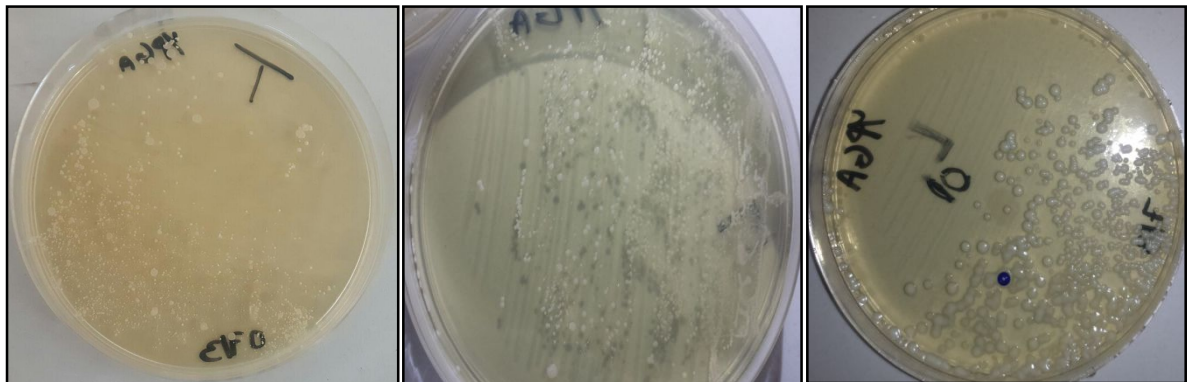
L'activité résiduelle de l'enzyme est estimée à 70, 80, 90 et 100° C chaque 30 min durant 120 minutes. La courbe de l'activité enzymatique en fonction du temps permet le calcul de la demi-vie de l'enzyme pour chaque température testée.

6. Traitement statistique

Les courbes et tableaux ont été réalisés avec le logiciel Excel (2007).

Résultats et discussion

1. Repiquage des souches et sélection des levures ayant une meilleure croissance



(a)



(b)

Figure 16 : Repiquage des quatre souches levuriennes T, L1, L5 et L10 isolées du blé d'écosystèmes arides (Sud algérien, Biskra), aspect macroscopique après 48h d'incubation à 4°C. (a) : T, L1 et L10 sur milieu YPGA ; (b) : L5 sur milieu PDA et Sabouraud.

Les quatre souches testées : L1, L5, L10 et T (isolées d'écosystèmes arides, région de Biskra, Sud Algérien) sont cultivées à 40°C sur des milieux de repiquage et de conservation : YPGA, PDA et Sabouraud dont le substrat commun est le glucose à 2%, comme seule source de carbone pour la croissance de la levure. Les souches L5 et L10 témoignent une bonne croissance, quand aux souches L1 et T, elles présentent une croissance assez faible et ce après plusieurs jours d'essai. Les souches L5 et L10 sont donc sélectionnées pour le test screening afin de sélectionner de la souche la plus performante pour la production des enzymes : α -amylase, maltase, pectinase, cellulase et maltase. D'après l'identification faite par le laboratoire, les souches L5 et L10 s'apparentent à la levure *Clavispora lusitaniae*.

2. Mise en évidence des activités enzymatiques sur milieu de base solide (boite de pétri)

Test screening : la sélection de la souche la plus performante pour les activités maltasique, amylolytique, pectique, cellulosique et protéasique

Nous avons réalisé des tests pour mettre en évidence la production de 05 enzymes (*α -amylose , maltase, pectinase, cellulose et protéase*) par deux souches de levure L5 et L10 isolées du blé stocké dans une niche écologique aride (Biskra, Sud Est, Algérie). L'induction de chaque enzyme est faite par un substrat (2% de substrat) (Annexe2) approprié pour chaque enzyme.

Après révélation spécifique (voir chapitre matériel et méthodes), les résultats sont rapportés dans les tableaux ci-dessous.

L'examen des tableaux rapportant les photos des zones de lyse montre que :

- ✓ La croissance de la levure L10 et la production de l' α -amylase (YPSA) et de la maltase (YPMA) sont possibles à des températures ne dépassant pas les 45°C. La température optimale de croissance et de production est de 42°C.
- ✓ La croissance de la levure L5 et la production des enzymes : α -amylase (YPSA) et maltase (YPMA) sont possibles à des températures ne dépassant pas les 45°C. La température optimale de croissance et de production est de 40°C.
- ✓ La croissance de la levure L5 et la production de la pectinase est possible dans l'intervalle de température allant de 40 à 47°C, avec une meilleure activité à 47°C et des activités relativement faibles sont observées en dehors de cette température.

Tableau 14 : Mise en évidence des activités enzymatiques de la souche L10 sur milieux solides et spécifiques après 48 h d'incubation à différentes températures. (*YPMA*: Yeast Peptone-extract-Maltose-Agar; *YPSA*: Yeast Peptone-extract-Starch-Agar; *YPPA*: Yeast Peptone-extract-Pectin-Agar; *YPCA*: Yeast Peptone-extract-Cellulose-Agar et *Gélose caséinée*).




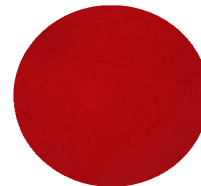




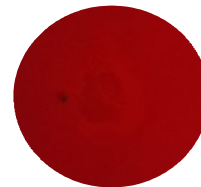

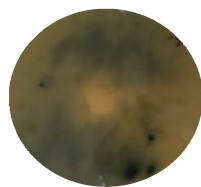




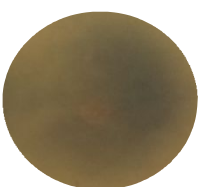




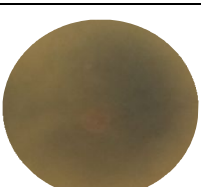
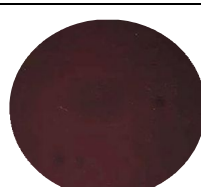
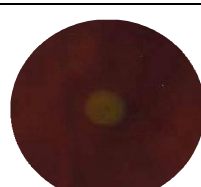


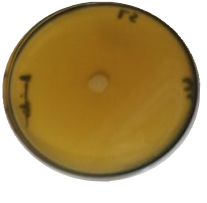
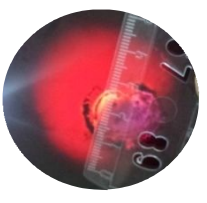



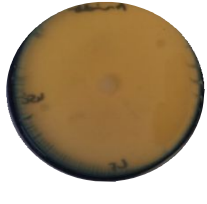
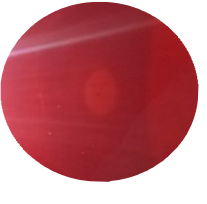

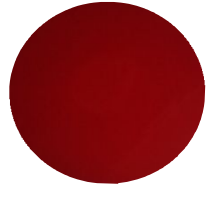

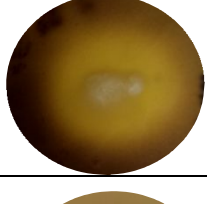
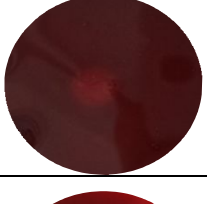
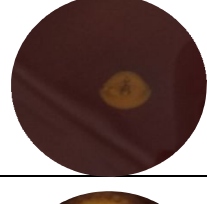
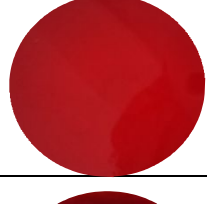
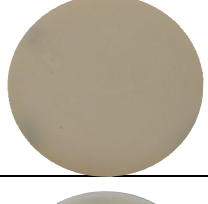
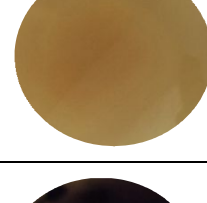
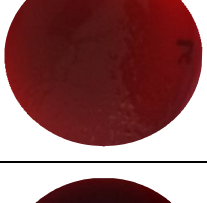
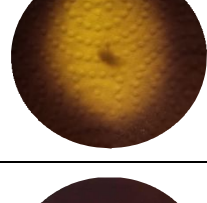
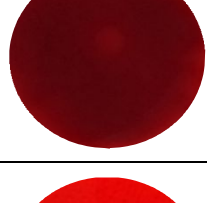



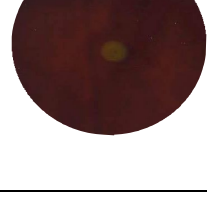
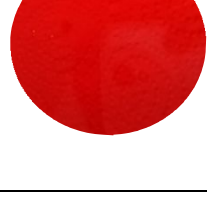

| C° | YPSA | YPMA | YPPA | YPCA | Gélose caséinée |
|----|---|---|---|--|---|
| 40 |  |  |  |  |  |
| 42 |  |  |  |  |  |
| 45 |  |  |  |  |  |
| 47 |  |  |  |  |  |
| 50 |  |  |  |  |  |

Tableau 15 : Mise en évidence des activités enzymatiques de la *souche L5* sur milieux spécifiques après 48h d'incubation à différentes températures. (*YPMA*: Yeast Peptone-extract-Maltose-Agar; *YPSA* : Yeast Peptone-extract-Starch-Agar ; *YPPA* : Yeast Peptone-extract-Pectin-Agar ; *YPCA* : Yeast Peptone-extract-Cellulose-Agar et *Gélose caséinée*).

| C° | YPSA | YPMA | YPPA | YPCA | Gélose caséinée |
|----|---|---|---|---|---|
| 40 |  |  |  |  |  |
| 42 |  |  |  |  |  |
| 45 |  |  |  |  |  |
| 47 |  |  |  |  |  |
| 50 |  |  |  |  |  |

Après 48 h d'incubation à différentes température dans une gamme allant de 40 à 50°C en fonction du milieu, on a pu constater les diamètres de zone de lyse suivants pour les deux souches :

Tableau 16 : Diamètres de zones de lyse des souches L5 et L10.

| Souche L10/Diamètre zone de lyse en mm | 40 °C | | 42 °C | | 45°C | | 47 °C | | 50°C | |
|---|-------|-----------|-------|----|------|----|-------|-----------|------|----|
| | L10 | L5 | L10 | L5 | L10 | L5 | L10 | L5 | L10 | L5 |
| α -amylase | 83 | 85 | 85 | 85 | 2 | 43 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Maltase | 2 | 45 | 10 | 4 | 4 | 4 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Pectinase | 0 | 1 | 0 | 4 | 0 | 4 | 0 | 48 | 0 | 0 |
| Cellulase | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| protéase | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

La lecture du tableau confirme les observations faites à partir des tableaux rapportant les photos des zones de lyse et montre que :

- A 40°C : l'activité α -amylasique est mieux exprimée par la souche L5 avec une zone de lyse de 85 mm.
- A 40°C : l'activité maltasique est mieux exprimée par la souche L5 avec une zone de lyse de 45 mm.
- A 47°C : l'activité pectique est exprimée uniquement par la souche L5 avec une zone de lyse de 48 mm.
- Les deux souches L5 et L10 ne sont pas productrices de cellulase et de protéases.

En conclusion, la souche L5 est productrice des trois enzymes : α -amylase, maltase et pectinase avec une activité α -amylasique et pectique relativement plus importantes que l'activité maltasique après 48 h d'incubation à des températures de croissance dépassant les 40°C. Les deux souches de levures L5 et L10 ne sont pas productrices de cellulase et de protéase.

Par conséquent, la souche L5 de *Clavispora lusitaniae*, par sa performance dans sa production de l' α -amylase et de la maltase sera donc sélectionnée pour la suite des études sur la production des enzymes par culture en batch et leurs caractérisations

3. Cinétique de production en batch de l' α -amylase et de la maltase par *Clavispora lusitaniae*

La cinétique de croissance de *Clavispora lusitaniae* nous a permis de suivre l'évolution les activités enzymatiques et la concentration en protéines durant 84 heures d'incubation. Les résultats de la cinétique de l' α -amylase et la maltase sont représentés respectivement dans la figure ci-dessous.

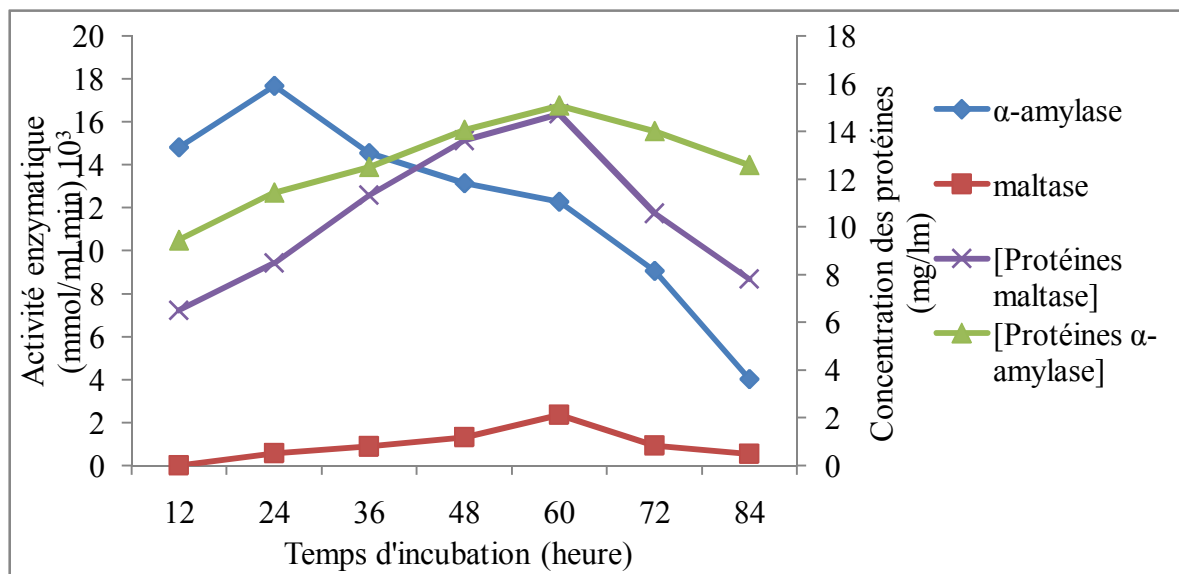


Figure 17 : Evolution cinétique des activités α -amylasique et maltasique au cours de la fermentation par *Clavispora lusitaniae* (sur milieu optimisé à base de lactosérum à 100%, pH 5, 40°C, 100 rpm).

La levure présente donc une cinétique classique de croissance. La synthèse de l'enzyme commence en faible quantité dès le début de la fermentation, permettant une adaptation de la levure au milieu de culture. L' α -amylase est synthétisée d'une façon précoce par rapport la production des protéines avec des pics atteint à **24 h** et **60 h** respectivement, quant à la maltase, la synthèse de l'enzyme et des protéines se fait simultanément, soit des pics observés après **60 h** d'incubation. A ces temps optimums, les activités spécifiques respectives sont **1545,85 U/mg** et **144,8 U/mg**.

Ce décalage dans la synthèse de l' α -amylase permet une séparation aisée de l'enzyme, contrairement à la maltase ou le taux de protéines augmente rapidement durant la phase exponentielle (de 7,2 à 16,37 mg/ml), expliquée par la synthèse d'enzymes et en particulier les hydrolases (Arnaud et Guiraud, 1999). Ensuite, il décroît et se stabilise à une concentration minimale évaluée à 8,69 mg/ml. Cette baisse des protéines s'explique probablement par l'attaque des protéases libérées lors de la lyse cellulaire (Bouix et Leveau, 1999) ou par la variation du pH au cours de la fermentation, qui affecte la perméabilité membranaire entraînant un ralentissement de l'activité enzymatique et de la croissance (Boiron, 1996).

L'évolution rapide de la reproduction cellulaire, caractérisée par une phase d'accélération, puis une phase exponentielle, permet d'atteindre une activité maximale de **17,68.10³ U** pour l' **α -amylase** au bout de **24 h** de fermentation et **2,37.10³ U** pour la **maltase** après **60 h**. La période, au cours de laquelle une enzyme est obtenue à partir de la culture, est un facteur important dans la production d'enzymes. La plupart des rapports de la littérature ont confirmé que la sécrétion maximale d'enzymes se produit généralement à la fin de la phase exponentielle et au début de la phase stationnaire. Ce taux semble faible mais relativement satisfaisant tant que le milieu n'est pas encore optimisé. Nous constatons que la croissance de la souche pour les deux enzymes varie avec la durée d'incubation. Comparativement à d'autres études portées sur des souches de levure productrices d' α -amylase et de maltase, ces quantités d'enzymes sont très importantes :

- ✓ **L' α -amylase** : les activités maximales de la même espèce rapportées par Ranjan et Sahay (2015) et Djekrif (2016) à des temps optimums respectifs de 24 et 28h qui corroborent avec celui constaté pour la souche de la présente étude (24 h) sont : 76.96 U et 22038U. Par ailleurs, des activités beaucoup moins importantes ont été constatées sur d'autres souches levuriennes telles que : *lipomyces sp.* avec 6582 U cultivée sur un milieu à base de déchets de dattes (Merabti, 2006), *Candida guilliermondii* LGZ 14, *Candida famata* LGZ et *Candida sp.* LGZ 12 sur un milieu synthétique liquide avec des activités respectives de 88 U, 17 774 U et 575 U (Lagzouli M. *et al.*, 2007), *Candida tropicalis* LVX8 avec 171.33U (Maïzan *et al.*, 2016) et *Candida guilliermondii* CGL-A10 avec $2,304.19 \pm 31.08$ U (Acourene et Ammouche, 2012). De plus, comparée aux α -amylases recombinantes ayant un système d'expression de levure, l'activité maximale de l'enzyme produite par *Clavispora lusitaniae* à savoir : **17,68.10³ U** ; est supérieure à 2838 U de *Pichia pastoris* après 144 h de fermentation (Zeng *et al.*, 2011) et $65.6.10^{-3}$ U de *Candida albicans* après 105 min.
- ✓ **La maltase** : la production de la maltase est faible comparée à l' α -amylase de la même souche : **17,68.10³U vs 2,37.10³U** à 24h et à 60h respectivement. Mais également inférieure à celle produite par d'autres souches levuriennes comme : *Saccharomyces sp.* (Claude, 1985 ; Sablayrolles *et al.*, 2007 et Blanc, 2008) et *Candida sp.* avec une activité maximale de 72,56U. (Boukail et Maazi, 2015). En revanche, comparée aux maltases recombinantes ayant un système d'expression de levure, l'activité maximale de l'enzyme produite par *Clavispora lusitaniae* à savoir : **2,37.10³ U** ; est supérieure aux activités maximales respectives de : 0.6 U, 0,107 U et 0,0025 U de : *Schizosaccharomyces pombe* à 37°C après 24h (Okuyama *et al.*, 2005), *Ogataea polymorpha* après 24h (Viigand *et al.*, 2016) et *Saccharomyces cerevisiae* après 36h (Zhang *et al.*, 2015) mais inférieure à 3810U de *Saccharomycopsis fibuligera* à 25°C après 2h de fermentation.

Selon Gupta *et al.* (2003), la sécrétion d'enzymes se produit au maximum à la fin de la phase de la croissance en raison de la réduction de la répression catabolique car les nutriments sont épuisés dans le milieu de croissance, ce qui laisse suggérer que l' α -amylase ainsi que la maltase sont produites aux dépens de la dégradation de l'amidon et des oligosaccharides. Le même constat a été signalé par Djoulde (2004), suite à la fermentation du manioc par sa propre microflore (levures, moisissures et bactéries). Ce type de profil, a également été rapporté par Tatsinkou et ses collaborateurs (2005) et par Kocher et Katyal (2003), *Aspergillus niger* pour des levures ascomycètes cultivées respectivement, sur des milieux à base de blé et de pomme de terre ainsi que pour la levure *Saccaromyces cerevisiae* cultivée sur un milieu à base de jus de raisin (Nehme, 2008).

A partir de la 24^{ème} heure pour l' α -amylase et la 60^{ème} heure pour la maltase, les activités enzymatiques ralentissent, puis arrive la phase stationnaire (d'une durée de 48h et 24h, respectivement) où la croissance exponentielle s'arrête et les cellules conservent une activité métabolique, mais leur structure biochimique subit des modifications (Leclerc *et al.*, 1995 et Bouix et Leveau, 1999) entraînant ainsi une baisse progressive de l'activité arrivant à la phase de déclin (décroissance) caractérisée par une diminution de la concentration cellulaire et donc du poids sec des cellules productrices d'enzymes qui résulte de l'inactivation des enzymes, due aux conditions défavorables du milieu (épuisement en source d'énergie), à l'interaction avec d'autres métabolites sécrétés dont certains peuvent avoir un effet inhibiteurs (enzymes telles que les protéases ou substances toxiques : l'eugénol 4-allyl-2-méthoxyphénol, 1,2,4-triazine Carbazole...) (Priyanka Singh *et al.*, 2016 ; Guangcheng Wang *et al.*, 2016), ou aux changements de pH affectant négativement le rendement en enzymes ; jusqu'à atteindre des activités minimales respectives de $11,2 \cdot 10^3$ U et 550U à la fin de la fermentation. (Hesseltine *et al.*, 1976, Leclerc *et al.*, 1995, Romero *et al.*, 1998, Scriban., 1999, Haq *et al.*, 2002, Ramachandran *et al.*, 2004, Nehme *et al.*, 2008).

En conclusion, en batch (Erlen de 250 ml contenant 50 ml de milieu de production), dans des conditions de température à 40°, pH5 et une agitation de 100 rpm, après 24h et 60h d'incubation, la souche *Clavispora lusitaniae* produit respectivement, des activités de l'ordre de **17,68.10³U** pour l' **α -amylase** et de **2,37.10³U** pour la **maltase**. Le décalage dans la synthèse de l' α -amylase permet une séparation aisée de l'enzyme, contrairement à la maltase. Ce résultat indique que les deux enzymes ne sont pas associées en un complexe binaire, cette hypothèse doit être vérifiée par l'électrophorèse PAGE et SDS PAGE.

4. Etude physico-chimique de l' α -amylase et de la maltase de *Clavispora lusitaniae* de l'extrait brut

4.1. Effet de la variation du pH sur les activités α -amylasique et maltasique de *Clavispora lusitaniae*

La courbe de l'activité α -amylasique et maltasique de *Clavispora lusitaniae* en fonction du pH, dans une gamme de 3 à 7, a l'allure d'une cloche indiquant des valeurs maximales de $96,77.10^3$ U à pH 6 et $23,9.10^3$ U à pH 5, respectivement. (Figure18).

Les deux enzymes sont actives dans les intervalles respectifs de pH 5-6 et pH 4,5- 6, avec des optimums à pH 6 et 5. Au delà de ces valeurs, on remarque une nette réduction respective de l'activité de 74% et 71%. Cette perte est certainement due à l'effet du pH sur l'ionisation des groupements des chaînes latérales qui maintiennent la structure de l'enzyme d'une part et interviennent dans l'activité du site actif d'autre part (Save, 2011, Giancarlo Viberti *et al.*, 1994 et Soro, 2007).

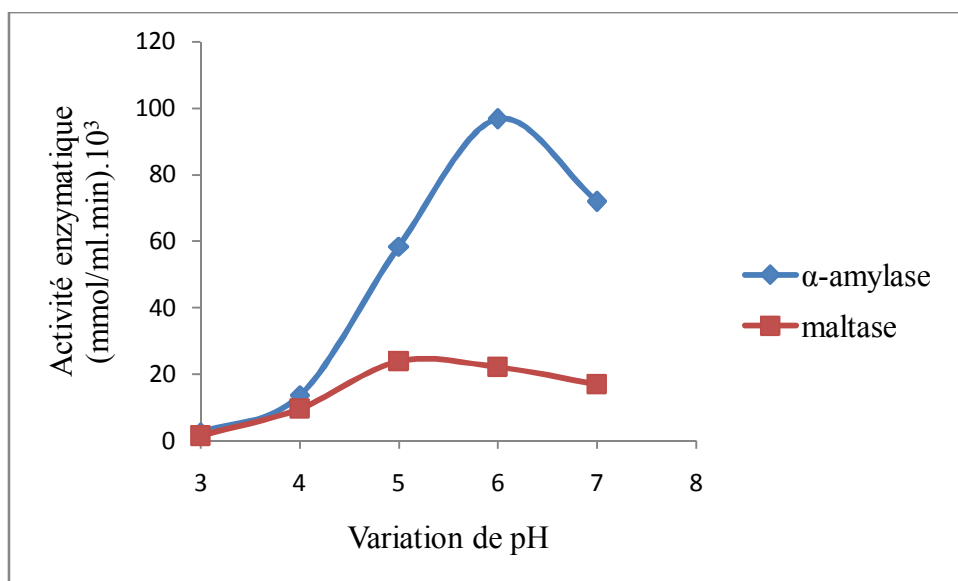


Figure 18 : Effet du pH sur l'activité de l' α -amylase et la maltase de *Clavispora lusitaniae*.

Le pH optimum de 6 de l' α -amylase produite par *Clavispora lusitaniae* se rapproche du pH 6.8 rapporté par Ranjan et Sahay (2015) pour la même espèce, mais également de celui de l'enzyme produite par les levures : pH 6.3 pour *Schwanniomyces alluvius* (Moranelli *et al.*, 1987), pH 6.2 pour *Pichia burtonii* (Moulin *et al.*, 1978) et pH 5.6 pour *Filobasidium capsuligenum* (De Mot et Verachlert, 1985) et les moisissures *Aspergillus tamarisii* (Moreira *et al.*, 2004) et *Aspergillus niger* (Khan *et al.*, 2011 et Djekrif *et al.*, 2016) avec pH 6.5. Ce pH est identique à celui d'autres levures, soit un pH 6 pour : *Schwanniomyces sp.* (Benaouida, 2008), *Lipomyces sp* (Merabti, 2006), *Lipomyces starkeyi* (Kang *et al.*, 2004) et *Saccharomyces castelli* (Fogarty et Kelly, 1980 et Panchal, 1990).

Par ailleurs, l' α -amylase de *Clavispora lusitaniae* a un pH plus alcalin que les genres levuriens : pH 4 pour *Pichia polymorpha* (Forgarty et Kelly, 1980 et Panchal, 1990), pH 4.5-5 pour *Lipomyces kononenkoae* (Prieto *et al.*, 1995) et 5.5 pour *Schwanniomyces occidentalis* (Wang *et al.*, 1989 et Kim *et al.*, 2010). En revanche, il est plus acide que le pH 9 trouvé chez : *Schwanniomyces alluvirus* (Moranelli *et al.*, 1987) et *candida sp.* (Boukhennane et Boudebza, 2014).

La figure 18 montre également que **la maltase** de l'extrait brut de *Clavispora lusitaniae* a un pH optimum acide de **5** avec une activité correspondant à **23,9.10³ U**. Ce pH acide limite les contaminations bactériennes.

Le pH optimum de 5 est signalé par un certain nombre d'études sur les levures telles que : *Candida guilliermondii* (Iwona Gientka *et al.*, 2016), *Candida sp.* (Boukail et Maazi, 2015) et *Clavispora lusitaniae* (Xu Wang *et al.*, 2016). Ce pH est légèrement inférieur à ceux constatés par Pedro Garcia-Martos *et al.*, 2005 et Z. Lewis *et al.*, 2013 et 2015 pour la même espèce ; mais aussi pour des genres levuriens : pH 8.5 pour *Wickerhamomyces anomalus* (Restuccia *et al.*, 2011), pH7.5 pour *Saccharomyces cerevisiae* (Pascal *et al.*, 2010), pH 7 pour *Candida albicans* (Frade-Perez, 2016), pH 6.9 pour *Pichia kudriavzevii* (Silvana *et al.*, 2016), pH 6.7-6.8 pour *Saccharomyces carlsbergensis* (Needleman *et al.*, 2014), pH 6.5 pour *Xanthophyllomyces dendrorhous* (Gutiérrez-Alonso *et al.*, 2016) et pH 5.5 pour *Saccharomycopsis fibuligera* (Reiser V. *et al.*, 1995). Au contraire, un pH plus acide est enregistré chez quelques levures telles que : pH 4.2 de *Saccharomyces cerevisiae* (Tdera *et al.*, 2006), pH 4.5 de *Schizosaccharomyces pombe* (Okuyama *et al.*, 2005) et un pH variable de 4 à 4.5 chez *Lipomyces staekeyi* (Kelly *et al.*, 1995).

Ces différences sont probablement dues à une variation de la composition en acides aminés et donc de la conformation structurale du le site actif (Giancarlo Viberti *et al.*, 1994 et Soro, 2007) qui diffère d'une souche à une autre (Vijai K. Gupta *et al.* 2016) où chaque enzyme pour une activité optimale, développe un état de protonation spécifique (Save, 2011) et d'une niche écologique à une autre, si bien que les caractéristiques physicochimiques de *Clavispora lusitaniae* isolée d'écosystèmes différents sont variables (Z. Lewis *et al.*, 2013, Z. Lewis Liu *et al.*, 2015, Ranjan et Sahay 2015, Djekrif, 2016).

En conclusion, l' α -amylase de *Clavispora lusitaniae* a un pH optimum de 6, semblable a celui des α -amylases fongiques mais différent de celui des α -amylases bactériennes, qui ont parfois des pH optimums plus alcalins (pH 8) (De Souza et Martins, 2000 et Cordeiro *et al.*, 2002) quant à la maltase, elle a un pH 5 acide, proche de celui d'autres levures et moisissures (Vijai K. Gupta *et al.*, 2016). *Clavispora lusitaniae* produit donc une α -amylase neutre et une maltase acide.

4.2.Effet de la température sur les activités α -amylasique et maltasique de *Clavispora lusitaniae*

La courbe de l'activité amylasique et maltasique de la souche *Clavispora lusitaniae* en fonction de la température dans une gamme de 40 à 100°C à pH optimum, a l'allure d'une cloche. (Figure19).

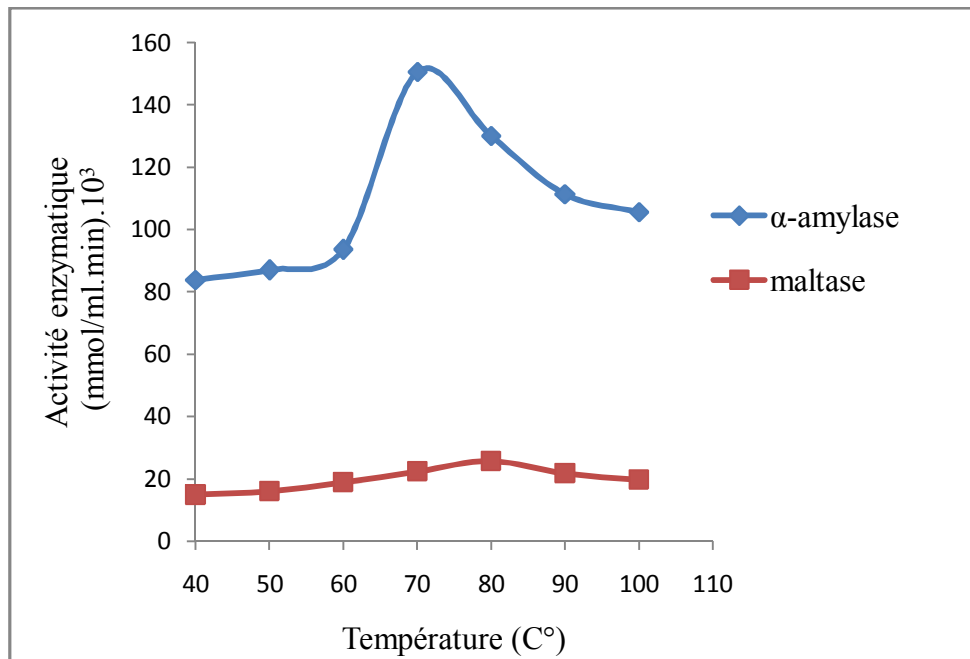


Figure 19 : Effet de la température sur l'activité de l' α -amylase (pH 6) et la maltase (pH 5) de *Clavispora lusitaniae*.

De 40 à 50°C, l'activité reste relativement faible, l'enzyme est active dans l'intervalle de températures de 65 à 80°C avec un optimum à 70°C avec une activité maximale de **150,64.10³ U**. En effet, la température optimale des amylases levuriennes varie entre 40°C à 60 °C et peut atteindre les 70°C (Panchal, 1990). Quant à la maltase, l'activité augmente négligemment, l'enzyme est active entre 75 et 90°C et atteint une activité maximale (**260 U**) à 80°C, cette température élevée est directement corrélée à la source de croissance de la levure (Daniel *et al.*, 2009) ; Biskra, Sahara, Sud Algérie dans la présente étude.

Au delà de ces valeurs, une baisse progressive de l'activité **maltasique** est enregistrée à **100C°** : variation de 200 U soit une perte de **77%** ; et une chute brutale de **74%** pour l' **α -amylase**, lorsque la température passe de 70°C à 90°C et reste stationnaire au-delà de **90°C**. Ces résultats montrent que la température exerce un effet significatif sur l'activité des enzymes. Ceci peut être expliqué par un changement structural et fonctionnel des enzymes suite à la rupture des liaisons fortes qui les stabilisent et par conséquent, leur dénaturation (Wolberg *et al.*, 2004 et Qiao W *et al.*, 2014).

Des études menées sur l' α -amylase de la même souche montrent une variation de la température optimale : 54° C (Djekrif *et al.*, 2014) ou 37°C (Ranjan et Sahay, 2015). Malgré une température optimale élevée (60 °C), elle demeure inférieure à celle d'autres espèces de levures : 70°C pour *Pichia polymorpha* et *Lipomyces starkeyi* (Kelly *et al.*, 1985, Panchal, 1990, Kang *et al.*, 2004). Par ailleurs, l' α -amylase de certaines souches levuriennes à une température optimale moyennement inférieure à l'enzyme de notre souche ou la température optimale varie entre 40 et 60°C : 40°C pour *Saccaromyces alluvirus* et *Schwanniomyces alluvius* (Fogarty et Kelly, 1980 et Panchal, 1990), 50°C pour *Filobasidium capsuligenum* (De mot et Verachtert, 1985), *Cryptococcus flavus* (Wanderley *et al.*, 2004), et *Schwanniomyces alluvius* (Moranelli *et al.*, 1987), *Schwanniomyces occidentalis* (Wang *et al.*, 1989), 55°C pour *Lipomyces sp* (Merabti, 2006) et 60°C pour *Schwanniomyces sp* (Benaouida, 2008) , *Lipomyces kononenkoa* et *Saccharomyces castelli* (Kelly *et al.*, 1985 et Prieto *et al.*, 1995).

Comparés aux bactéries et moisissures productrices d' α -amylases, cette température est proche des bactéries thermophiles, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Thermonospora viridis* et *Bacillus cohnii* (Fogarty et Kelly, 1980 ; Panchal, 1990 ; Cordeiro *et al.*, 2002 et Yasser *et al.*, 2013) avec des températures optimales oscillant de 65 à 76°C.

Les résultats obtenus pour la maltase, montrent que la température optimale de cette enzyme produite par *Clavispora lusitaniae*, de 80°C, dépasse largement les valeurs rapportées par la littérature sur la même espèce à savoir : 35, 45, 60 et 50°C (Pedro Garcia-Martos *et al.*, 2005 ; Z. Lewis *et al.*, 2013 et 2015 et Xu Wang *et al.*, 2016) mais aussi celles d'autres genres levuriens ayant des optimums compris entre 30 et 60°C : 30°C pour *Saccharomyces cerevisiae* (Tdera *et al.*, 2006), 35°C pour *Schizosaccharomyces pombe* (Okuyama *et al.*, 2005), 38°C pour *Candida guilliermondii* (Iwona Gientka *et al.*, 2016), 40°C pour *Candida sp.*(Boukail, 2015), 40°C *Saccharomyces logos* (Chiba *et al.*, 2003), 42.5°C pour *Saccharomycopsis fibuligera* (Reiser *et al.*, 1995), 45°C pour *Culex quinquefasciatus* dans *Pichia pastoris* (Akinloye *et al.*, 2012), 48°C pour *Candida albicans* (Frade Perez *et al.*, 2016) et *Saccharomyces carlsbergensis* (Needleman *et al.*, 2014), 50°C pour *Pichia kudriavzevii* (Silvana *et al.*, 2016), 52.5°C pour *Saccharomyces cerevisiae* (Matsusaka *et al.*, 1999) et 60°C pour *Xanthophyllomyces dendrorhous* (Gutiérrez *et al.*, 2016), *Lipomyces staekeyi* (Kelly *et al.*, 1995) et *Neurospora crassa* dans *Pichia pastoris* (Xue Pei *et al.*, 2016).

Le comportement thermique des enzymes de notre souche peut être expliqué par la caractéristique du climat aride (Biskra, Algérie) (Daniel *et al.*, 2009 et Bhalla *et al.*, 2013).

Nous pouvons conclure que *Clavispora lusitaniae* a un potentiel de produire une α -amylase et une maltase thermostables, que l'on peut qualifier de thermophiles ; car elles conservent leur intégrité structurale et par conséquent, leur activité dans un intervalle de 65°C à 80°C pour l' α -amylase et 75°C à 90°C pour la maltase, température pas en dessous de 50°C, caractéristique des enzymes thermophiles (Vieille et Zeikus, 2001). Ces températures optimales élevées nous ont motivées à étudier la stabilité des enzymes à des températures supérieures.

4.3. Effet de la thermostabilité sur les activités α -amylasique et maltasique de *Clavispora lusitaniae*

L'étude de la stabilité thermique de l' α -amylase et la maltase produites par *Clavispora lusitaniae* isolées de Biskra (Sud Algérien), est testée à différentes températures : 70, 80, 90 et 100°C. Les résultats sont représentés dans les figures 20 et 21.

4.3.1. Effet de la thermostabilité sur l'activité α -amylasique

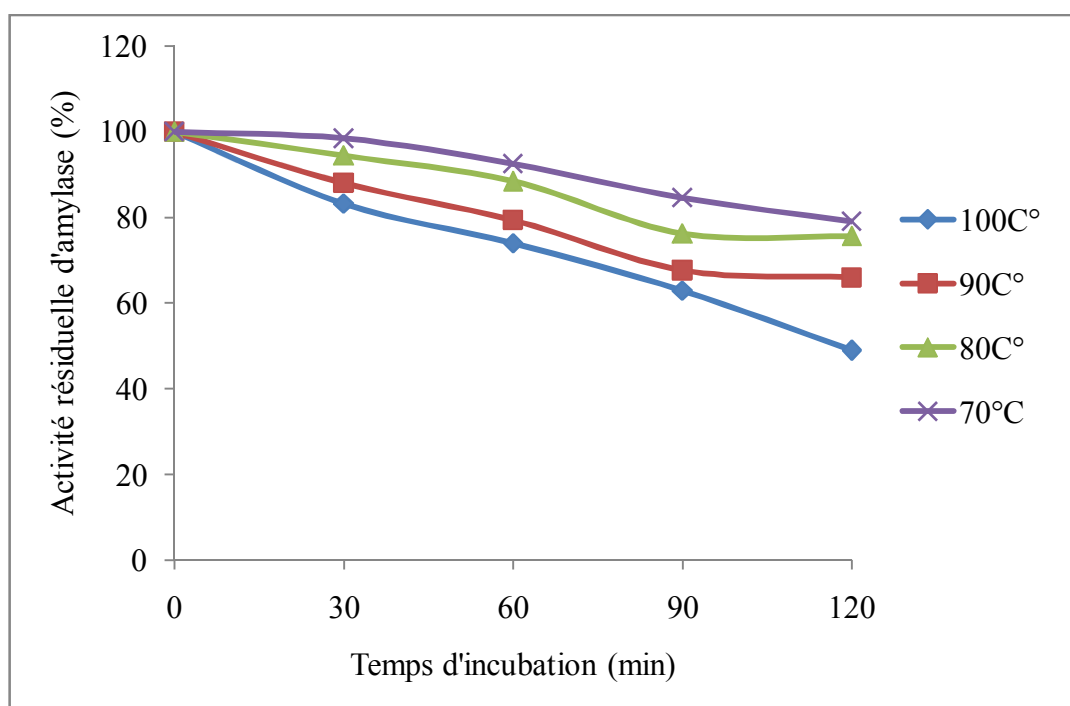


Figure 20 : Effet de la thermostabilité sur l' α -amylase de *Clavispora lusitaniae*.

L'analyse de la figure 20 montre qu'à 70°C, l'enzyme est pratiquement stable et conserve 79% de son activité pour un traitement de 2 heures. Une exposition de l' α -amylase à des températures de 80°C et 90°C pendant 90 min lui fait perdre 24% et 23% de son activité initiale, respectivement. A 100°C, l'enzyme perd progressivement son activité jusqu'à 61% pour un traitement thermique de 120 min. Les demi-vies sont les suivantes :

- Supérieure à 120 min à 70°C.
- Supérieure à 120 min à 80°C.
- Supérieure à 120 min à 90°C.
- Est de 120 min à 100°C.

En effet, l' α -amylase de plusieurs souches isolées du blé de la même région que *Clavispora lusitaniae*, montre une stabilité relativement semblable à la notre, des demi-vies de 150 min à 80°C et de 90 min à 90°C pour la moisissure *Rhizopus oryzae* (Ait kaki, 2004) et des demi-vies respectives de : 150 min et 130 min à 80°C et à 90°C pour *Lipomyces sp.* (Merabti, 2006). La levure *Candida sp.* a une thermostabilité relativement faible à 60°C, avec une demi-vie de 30 min (Boukhennane et Boudebza, 2014). D'autres souches de *Schwanniomyces sp.* isolées de différents sites de deux régions de sources thermales (Hammam Debagh-Guelma et Hammam Téléghma-Mila ; considérés comme des écosystèmes extrêmes) montrent une thermostabilité assez élevée, voisine de celle de *Clavispora lusitaniae* à 100°C avec une demi-vie de 120 min (Benaouida, 2008).

Nos résultats se rapprochent également de ceux obtenus à partir des levures : *Schwanniomyces alluvius* jugées par Moranelli *et al.*, 1987 productrices d' α -amylases très thermostables, *Lipomyces kononenkoe* (Prieto *et al.*, 1995) et certaines bactéries telle que *Bacillus sp.* (Cordeiro *et al.*, 2002), mais différents de ceux des levures non productrices d' α -amylases thermostables (Barbier, 1997), exceptées celles qui sont génétiquement modifiées. Par ailleurs certaines levures et moisissures comme : *Pichia burtonii* (Powers *et al.*, 2001) et *Paecilomyces sp.* (Zenin *et al.*, 1993), possèdent à 45°C (température assez faible) une thermostabilité inférieure à celle enregistrée chez *Clavispora lusitaniae* avec des demi-vies respectives de : 10 min et 120 min.

En revanche, la thermostabilité de notre enzyme dépasse largement les valeurs rapportées par Ranjan et ses collaborateurs (2015) sur la même levure dans une gamme de température de 5 à 40°C ou l' α -amylase est stable à 37°C pendant 48h ; celle de *Cryptomyces sp.* (Lefuji *et al.*, 1996) où l'enzyme conserve uniquement 20% et 10% de son activité après des traitements thermiques de 30 min à 80°C et à 90°C. A 45°C, *Pichia burtonii* a une demi-vie de 120 min (Powers *et al.*, 2001).

L' α amylase recombinante de *Pichia pastoris* est thermostable à 60°C pendant 60 min avec une conservation de 80% de son activité initiale, les demi-vies sont de : 40 min à 80°C et 10 min à 90 (Chen *et al.*, 2007).

4.3.2. Effet de la thermostabilité sur l'activité maltasique

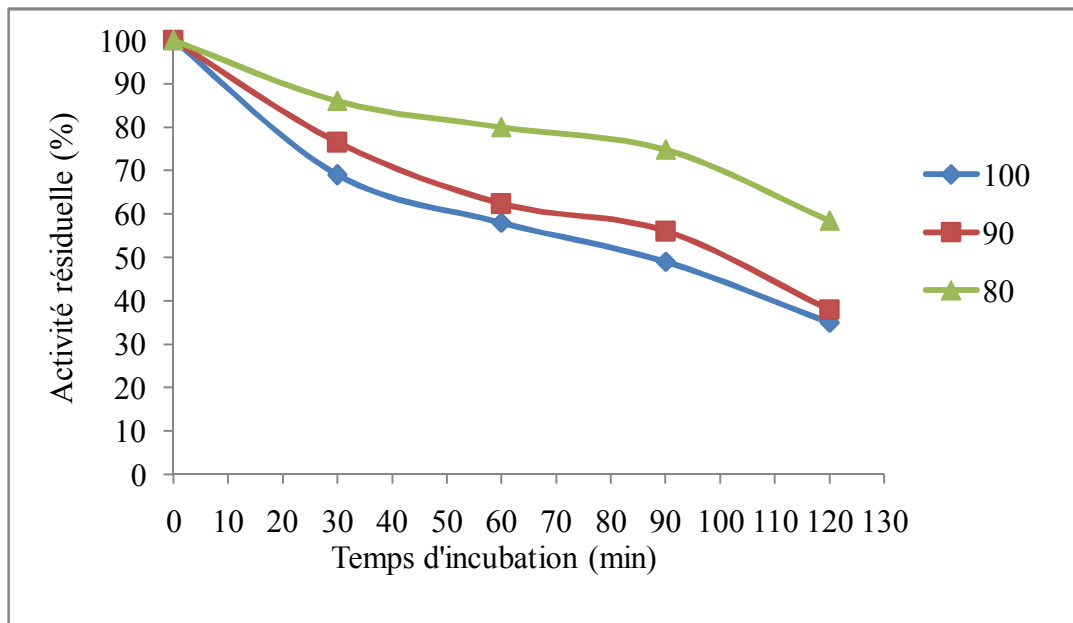


Figure 21 : Effet de la thermostabilité sur la maltase de *Clavispora lusitaniae*.

D'après la figure 23, la maltase de *Clavispora lusitaniae* reste stable à 80°C après 30min de traitement thermique ou la levure conserve 86% de son activité initiale et perd 41,6% après un traitement thermique de 2heures. L'enzyme conserve 38 et 35% de son activité initiale à 90 et 100°C, respectivement, après 120min d'incubation. Cela indique qu'au delà de sa température optimale, la maltase commence à perdre sa stabilité progressivement. Les demi-vies sont de :

- 85 min à 100°C.
- 100 min à 90°C.
- Supérieure à 120 min à 80°C.

Comparée à des études antérieures, des similitudes de thermostabilité de l'enzyme sont signalées chez la maltase recombinante de *Clostridium acetobutylicum* GX01 dont le système d'expression est *Thermoascus aurantiacus* QS 7-2-4 (Pang ZW et al., 2016) et la maltase de : *Ganoderma lucidum* ou l'enzyme possède une demi-vie de 10 min à 80°C (Guizhi Liu et al., 2016), *Pichia kudriavzevii* (Silvana et al., 2016), *Xanthophyllomyces dendrorhous* (Gutiérrez et al., 2016), *Candida guilliermondii* (Iwona Gientka et al., 2016) et *Candida sp* (Boukail et Maazi, 2015) ainsi que chez les moisissures : *Thermotoga naphthophila* (Kaleem Iqbal et al., 2016) et *Thermoascus aurantiacus* (Carvalho et al., 2010), *Sporotrichum thermophila* (Bala et al., 2016) et *Sporotrichum thermophila* (Bala et al., 2016). Chez *Fusarium oxysporum*, l'enzyme montre une stabilité à 80°C avec une demi-vie de 180 min et conserve 83% de son activité initiale (Folasade M et al., 2016).

Les résultats obtenus se rapprochent de ceux de *Lipomyces staekeyi* (Kelly *et al.*, 1995) et *Candida sp.* (Boukail, 2015). Par ailleurs, Pedro Garcia-Martos (2005), Lewis (2013 et 2015) ainsi que Wang (2016) et leurs collaborateurs, ont trouvé pour la même espèce des thermostabilités inférieures à celle de notre souche.

Cette thermostabilité à une température élevée (80°C) et une demi-vie de 120 min dépasse largement celle enregistrée chez un certain nombre de levures avec des températures beaucoup moins importantes dont : *Saccharomycopsis fibuligera*, *Schizosaccharomyces pombe* et *Saccharomyces logos* avec les demi-vies respectives de : 60 min à 25°C (Reiser *et al.*, 1995), 480 min à 40°C (Okuyama *et al.*, 2005) et 2160 min à 27°C (Chiba *et al.*, 2003) et d'autre part, les moisissures : *Aspergillus niveus*, avec des demi-vies de 104 et 78 min à 60 et 65°C respectivement (Da Silva *et al.*, 2009) et *Xanthophyllomyces dendrorhous*, *Aspergillus niveus* et *Thermus thermophilus* avec les demi-vies respectives de : 60 min à 40°C (Marín *et al.*, 2006) et 78 min à 65°C (Tony Marcio da Silva *et al.*, 2009) et 195 min à 70°C (Cheng Zhou *et al.*, 2015).

En revanche, d'autres études rapportent une maltase plus thermostable à des températures supérieures à celle de *Clavispora lusitaniae* telles que : *Thermococcus sp* qui reste stable à une température très élevée : 130°C avec une demi-vie se situant entre 30 min et 60 min (Kay Terpe *et al.*, 2013), *Sulfolobus acidocaldarius*, *Pyrococcus furiosus*, *Pyrococcus woesei*, *Thermotoga naphthophila* et *Pyrococcus furiosus* avec les demi-respectives de : 108 min à 105°C (Chen L. *et al.*, 2005), 60 min à 105°C (Gal *et al.*, 2013), 15 min à 98°C (Freddy Boehmwald *et al.*, 2016), 15 min à 98°C (Freddy Boehmwald *et al.*, 2016), 5.21 min à 97 (Kaleem Iqbal *et al.*, 2016) et 12h à 95°C (Ping Wang *et al.* 2016).

Ces différences de comportement vis-à-vis du traitement thermique s'expliquent probablement par le patrimoine génétique particulier à chaque espèce, leur origine, l'influence du biotope (zone aride désertique et semi-aride) ainsi que les conditions expérimentales (la température, le pH et la composition du milieu de fermentation) qui font que les souches développent des mécanismes de lutte et d'adaptation, spécifiques à leur niche écologique (Hasper *et al.*, 2002 et Michele Michelin *et al.*, 2010) entraînant la sécrétion d'enzymes dont la structure particulière est en lien avec la thermostabilité, en particulier grâce la richesse en résidus cystéines et en glucides (une glycosylation excessive) (Xu *et al.*, 2002 ; Prakash et Jaiswal, 2010 et Vieille et Zeikus, 2011).

Les levures ne sont pas connues par leur résistance à la température élevée, alors que certaines bactéries sont considérées comme thermorésistantes. Des études ont montré que la cohabitation des bactéries et des levures dans le même milieu peut avoir pour conséquence un transfert de gènes des bactéries vers les levures, justifiant ainsi le comportement thermique inhabituel des deux enzymes de la souches levurienne étudiée, *Clavispora lusitaniae*, comparables à celui des amylases bactériennes (Fossi *et al.*, 2005). En effet, la transformation génétique se produit lorsque différents

microorganismes sont cultivés sur le même milieu (Gasson et Davies, 1984 ; Hofer, 1985; Deak *et al.*, 1986 ; Cocconcelli *et al.*, 1986). La composition du milieu et les conditions environnementales sont des facteurs qui régissent ce processus (Fossi *et al.*, 2005).

Par ailleurs, d'autres facteurs, comme la composition en acides aminés, les interactions hydrophobes (Dill, 1990), la présence de certaines liaisons dans la structure secondaire et tertiaire des protéines enzymatiques : liaisons hydrogènes, liaisons secondaires, liaisons ioniques et ponts disulfures (Matsumura *et al.*, 1989 et Boel *et al.*, 1990, Mallick *et al.*, 2002 ; Roovers *et al.*, 2004 et Elleuche et Antranikian, 2013), ponts salins et cofacteurs (Vieille *et al.*, 2001), permettent de consolider la structure de l'enzyme et donc sa résistance au traitement thermique (Scriban, 1999). D'autres paramètres extrinsèques, comme les sels et le substrat influencent également la stabilité (Vieille et Zeikus, 2001). Tous ces facteurs accentuent la résistance des enzymes à des traitements thermiques élevées (Mallick *et al.*, 2002 ; Roovers *et al.*, 2004). Par ailleurs, les ions Ca^{2+} et Zn^{2+} participent à la structure des amylases (métallo-enzyme à Ca^{2+} et Zn^{2+}) et augmentent considérablement leur stabilité (Saxena et Singh, 2011 et Smitha *et al.*, 2015). La thermostabilité de nos enzymes s'explique probablement par l'un ou l'ensemble des facteurs évoqués.

En conclusion, les pourcentages particulièrement élevée de conservation des deux activités enzymatiques et dépassant largement les valeurs rapportées par la littérature sont des indices qui qualifient les enzymes produites par la levure *Clavispora lusitaniae* isolée du blé d'une région du Sahara Algérien (Biskra) parmi les enzymes thermostables. L' α -amylase semble être plus stable que la maltase produite par la même souche.

Cette propriété thermique, confère aux enzymes une grande stabilité, une activité élevée et donc un meilleur rendement pendant des durées prolongées d'hydrolyse. De plus, le risque de contamination par des bactéries mésophiles communes diminue ; un avantage important du point de vue de la production enzymatique ainsi que la purification (Vieille et Zeikus, 2001) ce qui offrent des aptitudes industrielles.

Conclusion générale

Le Laboratoire dans lequel est fait ce travail, a fait plusieurs études sur la production d'enzymes diversifiées à partir de souches fongiques. Ainsi, il dispose d'une mycothèque enrichie en moisissures et levures vivant dans plusieurs niches écologiques arides en Algérie (SAHARA, SUD ALGERIE). Aussi, les souches levuriennes utilisées pour cette étude sont gracieusement offertes par le Docteur DJEKRIFF-DAKHMOUCHE S. qui les a isolées du blé dur stocké à Biskra (Sud-est Algérie).

L'objectif principal de cette étude est la sélection de levures productrices d'enzymes thermostables. Quatre souches : T, L1, L5 et L10 ont été repiquées sur milieux solides ; les souches L5 et L10 ont donné une meilleure croissance et ont été sélectionnées pour un screening réalisé sur milieu solide (Boite de Pétri) pour la mise en évidence de 05 enzymes : α -amylase, maltase, pectinase, cellulase et protéase. Les deux souches testées, L5 et L10 sont cultivées sur un milieu à base de substrat inductible pour chaque enzyme. Ces milieux solides sont incubés dans une gamme de température allant de 40°C à 50°C. Après plusieurs jours de culture, les levures ont montré une bonne croissance et ont produit 02 enzymes amylolytiques (α -amylase et maltase dans l'intervalle de température 40 – 45°C) et la pectinase à 47 °C pour la L5. Cependant, **la souche L5** s'avère plus performante.

La production est ensuite réalisée sur un milieu liquide (en batch). Une cinétique de production de l' α -amylase et de la maltase par la levure L5, *Clavispora lusitaniae*, sur une durée de fermentation de 84 heures à 40°C et à 100 rpm, est menée sur un milieu optimisé à base de lactosérum ajusté à pH 5. Les profils cinétiques montrent que les deux enzymes ne sont pas produites en quantité égale et en même temps : **l' α -amylase a une activité de $17,68.10^3$ U après 24 heures** d'incubation alors que **la maltase a une activité de $2,37.10^3$ U après 60 heures** de fermentation. La production de l' α -amylase est précoce par rapport à la maltase, cependant les deux produits sont associés (l'activité maltasique est directement corrélée à l'activité amylosique).

L'extrait brut de *Clavispora lusitaniae* a un pH optimum de 6 pour l' α -amylase et une température optimale de 70°C et un pH optimum de 5 et une température optimale de 80°C pour la maltase. Ces caractéristiques de cinétiques, de pH et de températures optimales laissent supposer que les deux enzymes ne constituent pas un complexe binaire. Cette hypothèse doit être vérifiée par l'électrophorèse PAGE et SDS PAGE.

Ces températures optimales élevées nous ont motivées à étudier la stabilité des enzymes à des températures supérieures.

- ✓ L' α -amylase de l'extrait brut demeure pratiquement stable à 70°C pendant toute la durée du traitement thermique (2 heures). Une exposition de l'enzyme à des températures de 80°C et 90°C pendant 90 min, lui fait perdre 24% et 23% de son activité initiale, respectivement. A 100°C, l'enzyme perd progressivement son activité, sa demi-vie est de 120 min. A 70 °C, l' α -amylase de *Clavispora lusitaniae* a une demi-vie illimitée (à voir au-delà de 84 Heures).
- ✓ La maltase de *Clavispora lusitaniae* reste stable à 80°C après 30min de traitement thermique : conservation de 86% de son activité initiale. Après un traitement thermique de 2 heures, la maltase perd 42 % avec une demi-vie d'environ 120min à 80°C. A 90 et 100°C, l'enzyme conserve 38 et 35% de son activité initiale respectivement après 120 min d'incubation : demi-vies respectives de 100 et 90min. A 80 °C, les deux enzymes (α -amylase et la maltase) ont des demi-vies supérieures à 120 min.
- ✓ **L' α -amylase de *Clavispora lusitaniae* semble être plus stable que la maltase produite de la même souche.**

Avec ces quantités appréciables d'enzymes et ces propriétés physico-chimiques exceptionnelles, l' α -amylase et la maltase de la levure *Clavispora lusitaniae* peuvent être utilisées en industries pharmaceutiques ou autres après leur purification et leur immobilisation pour les rendre encore plus stables et les et recycler les enzymes en fin de processus.

Au terme de cette étude, nous envisageons les perspectives suivantes :

- ✓ Une optimisation du milieu de production, pour un meilleur rendement.
- ✓ Une culture en semi-pilote pour vérifier l'adaptation de la souche aux conditions industrielles.
- ✓ Une purification des enzymes produites, pour un usage alimentaire ou pharmaceutique.
- ✓ Une immobilisation pour augmenter la thermostabilité et recycler les enzymes en fin de processus.
- ✓ Une analyse protéomique des enzymes pour connaître les raisons de cette stabilité thermique.
- ✓ Produire ces enzymes par la même souche, par fermentation solide (SSF pour se rapprocher des conditions initiales de vie de la levure) et choisir le procédé le plus rentable.
- ✓ Produire la pectinase, autre enzyme glycolytique par la souche *Clavispora lusitaniae*, la purifier et la caractériser.
- ✓ Rechercher chez *Clavispora lusitaniae* d'autres enzymes d'intérêt, pouvant ouvrir à d'autres applications industrielles.

Yeast Producer of Glycolytic Extracellular Thermostable Enzymes, Production (Solid Media and Batch Mode) and Characterisation of Produced Enzymes.

The main aim of this study is to select yeasts which produce two thermostable enzymes. We have proceeded by monitoring 2 yeast strains in solid media (cell-culture dish) and brought out 5 enzymes: α -amylase, maltase, pectinase, cellulase and protease. The two tested strains: L5 and L10 (isolated from an arid ecosystem, Biskra, south Algeria) are cultured in media essentially made of substrate which is inducible for each enzyme. The temperature at which these solid media are incubated range from 40°C to 50°C. After a few days of culture, L5 and L10 have grown well and produced 2 amylolytic enzymes (α -amylase and maltase in temperatures ranging from 40°C to 50°C) as for the pectinase, it was produced at 47°C by L5. This L5 strain proved to be more efficient. According to the lab identification, the latter strain is linked to the yeast called *Clavispora lusitaniae*. Then, the strain in question is cultured in batch mode in 100% acid lactoserum media (deproteinised, enriched and supplemented with inducing substrates for α -amylase and maltase) in order to keep track of the two enzymes' excretion kinetics in the following conditions: 50 ml of deproteinised lactoserum adjusted to pH 5 put inside a 250 ml conical flask and incubated at a temperature of 40°C with a stirring speed of 100 rpm. The results show that the two enzymes are not synthesised at the same time i.e. 24 hours for the α -amylase with 1545.85 U and 60 hours for the maltase with 144.8 U. This result indicates that the two enzymes are not linked in a binary complex. However this hypothesis should be verified using electrophoresis type PAGE and SDS PAGE. Upon studying pH and temperature effects on both enzymes, we have concluded that α -amylase produced by *Clavispora lusitaniae* is active at a pH range of 5/6.5 and a temperature range of 65°C/85°C reaching optimum state at pH 6 and 70°C whereas maltase is active at a pH range of 4.5/5 and a temperature range of 75°C/90°C reaching optimum state at pH 5 and 80°. Both enzymes have undergone a 120-minute thermal treatment with different temperatures: 70°C, 80°C, 90°C and 100°C. At 80°C the half-lives of both enzymes are longer than 120 minutes, at 100°C the half-life of α -amylase is 120 minutes whereas the maltase is less stable with a 90 minute half-life. The *Clavispora lusitaniae*'s α -amylase is then more stable than maltase produced by the same strain. With these noticeable quantities of enzymes and these exceptional physicochemical properties, the α -amylase and the maltase of the yeast *Clavispora lusitaniae* can be of great use in pharmaceutical and other industries when they are made more stable and recyclable by purification and immobilisation

Keywords: Yeast, *Clavispora lusitaniae*, α -amylase, Maltase, Thermostability, Arid Ecosystem

نهدف من هذه الدراسة لتحديد الخمائر التي لها امكانية انتاج انزيمين ذو مقاومة حرارية. ركزنا بحثنا على سلالتي L5 و L10 التي حصل عليهما من حبوب القمح من بيئة قاحلة بمنطقة بسكرة (الجزائر). زرعنا في ركائز تفاعل لكلا الانزيمين. تمت مقارنة الانتاج و الثبات الحراري عند السلالتين فظهرت كل منهما نتيجة ايجابية من حيث إنتاج الأميلاز و المالتاز بالاضافة إلى البكتيناز L5 وذلك في مجال درجة حرارة [40-50]°م مما سمح لنا بانتقاء السلالة L5 لمتابعة الدراسة. وأظهرت دراسة خصائص السلالة المورفولوجية البيوكيميائية و الفيزيولوجية المجرات في المخبراتها تنتمي لجنس *Clavispora lusitaniae*. تم زرع L5 في بيئة مصل الحليب المنزوع البروتين و المزود بمادة التفاعل الخاصة بكل من الانزيمين . عملية متابعة حركية انتاجهما تمت في des Erlen-Meyers ذو حجم 250 ملل تحتوي كل منها على 50 ملل من هذه البيئة (درجة حرارة 40°م ، pH5 ، بسرعة دوران 100 د/د). تحصلنا بهذه الشروط على نمو بقدر 1545,84 U بعد 24 ساعة للاميلاز و 144,8 U للمالتاز بعد 60 ساعة من التخمر . تبين هذه النتائج أن الانزيمين لا يشكلان معقد ثنائي إلا أن هذه النتائج تبقى فرضية والتأكد منها يتم بجهاز استشراد كهربائي من نوع PAGE أو SDS-PAGE . أظهرت دراسة بعض الخصائص الفيزيائية و الكيميائية للانزيمين أن : الأميلاز ناشطة في مجال pH [5-6.5] مع تسجيل درجة حموضة مثلى عند 6 و درجة حرارة مثلى عند 70°م في مجال نشاطها [65-80]°م ، أما المالتاز فهي ناشطة في مجال pH [4.5-6] مع تسجيل درجة حموضة مثلى عند 5 و درجة حرارة مثلى عند 80°م في مجال نشاطها [75-90]°م . اختبار مقاومة انزيمي السلالة *Clavispora lusitaniae* للعلاج الحراري في درجات حرارة متباينة : 70, 80, 90 و 100°م بين ان عند 80°م نصف حياة الانزيمين يتجاوز 120 دقيقة . عند 100°م , الأميلاز لها نصف عمر مقدر ب 120 دقيقة أما المالتاز فمي أقل استقرار بحيث مدة حياتها 90 دقيقة. هذه النتائج توّهل الانزيمات المدروسة بإمكانية إستغلالها صناعيا و صيدلانيا.

الكلمات المفتاحية : خميرة ، *Clavispora lusitaniae* ، اميلاز ، مالتاز ، مقاومة حرارية ، بيئة قاحلة.

Références bibliographiques

- A. Cracco**, R. Caiazza, M. Pigeure, L. Arnalsteen, H. Verkindt, A. Sterkers, M. Romon, F. Pattou, et CHRU de Lille. (2011). Chirurgie métabolique diabète.
- Abdulhair**, Waleed M., et Mousa A. Alghuthaymi. (2016). Enzymes and phytohormones from micromonospora. *Extremophiles enzyme*. 9(5) : 41-10.
- Açourène S. et Ammouche A.** (2011). Optimization of ethanol, citric acid, and α -amylase production from date wastes by strains of *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus niger*, and *Candida guilliermondii*. *Society for Industrial Microbiology and Biotechnology*.1-8.
- Acourene Said**, Amourache Leila, Djafri kaouther, et Bekal Sadia. (2014). Date wastes as substrate for the production of α -amylase and invertase. *Iranian journal of biotechnology*. 12(3) : 41-49.
- Acourene S. et Ammouche A.** (2012). Optimization of ethanol, citric acid, and α -amylase production from date wastes by strains of *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus niger*, and *Candida guilliermondii*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. 39(5): 759-766.
- Açourene, S.**, Buelguedj, M., Tama, M. et Taleb, B. (2001). Caractérisation, évaluation de la qualité de la datte et identification des cultivars rares de palmier dattier de la région des Ziban. *Revue Recherche Agronomique*. (8):819-39.
- Adekunle O. A.**, Olanike O. et Olabisi A. (2012). Production of amylase from *Aspergillus niger* using a defined synthetic growth medium and also rice (*Oryza sativa*) as growth substrate, *E3 Journal of Medical Research*.1(7) : 091-094.
- Adekunle Odunayo Adejuwon1**, Olajumoke Elizabeth Abe., Bukola Ayodeji Bamkefa., Adesola Adetutu Ajayi., Kehinde Olusayo Awojobi, Mary Ajibola Adejuwon, Oluwatosin Ologbosere. (2013). Alpha-amylases by strains of *Candida albicans* and *Fusarium sp* : Expression and characterization. *Report and Opinion*. 5:6.
- Adewara A.O.** & Ogunbanwo S.T. (2013). Effects of processing variables on the production of “Burukutu”. a Nigerian fermented beverage. *Nat. Sci*.11:16-28.
- Adrian J.**, Legrand G., Frangne R. (1991). Dictionnaire de biochimie alimentaire et de
- Agrawal**, Pramodkumar B., Aniruddha B. Pandit. (2003). Isolation of α -glucosidase from *Saccharomyces cerevisiae*: cell disruption and adsorption. *Biochemical engineering*. 15(3) : 37–45.
- Aït Kaki A. (2004)**. Isolement de la moisissure *Rhizopus oryzae* et optimisation d un milieu à base de lactosérum pour la production de l -amylase. Thèse de magistère. Université Mentouri Constantine.
- Ait kaki- El-Hadef El-Okki A.**, Leghlimi H., Dakhmouche S., Bennamoun L. et Meraihi Z. (2012). Utilisation de la planification expérimentale pour l’optimisation de la production de l’ α -amylase par *Rhizopus oryzae*. *Rev.Microbiol. Ind. San et Environn*. 6 (1): 1-17.
- Akinloye**, Oluseyi A., Elizabeth A. Balogun, Sarafadeen O. Kareem, Olakunle S. Mosaku. (2013). Partial purification and some properties of α -glucosidase from *Trichoderma longibrachiatum*. *Biokemistri*. 24(1): 31–37.
- Akinloye**, Phanthila Sirichaiyakul, Sungsit Sungvornyothin, Apanchanid Thepouyporn, Jisnuson Svasti, Dumrongkiet Arthan. (2012). Functional expression and molecular characterization of *Culex quinquefasciatus* salivary α -glucosidase (Mall). *Protein expression and purification*. 110 : 145–150.
- Akshatha V. j.**, M. S. Nalini, C. D’Souza, H. S. Prakash. (2014). Streptomycete endophytes from anti-diabetic medicinal plants of the western ghats inhibit alpha-amylase and promote glucose uptake. *Letters in applied microbiology*. 58(5) : 433-39.
- Alais C.** (1975). *Sciences du lait. Principes et techniques laitières*. Masson. Paris. 108-645.
- Alais C.** (1981). La valorisation du lactosérum, les bases et les problèmes. *Techniques and dairy co-products. A review INRA EDP Sciences*. 417-438.
- Alais C.**, Linden G. et Miclo L. (2008). *Biochimie alimentaire*, DUNOD. 6ème édition Paris.: 67-71.
- Alarico**, Susana, Milton S. da Costa, Nuno Empadinhas. (2008). Molecular and physiological role of the trehalose-hydrolyzing alpha-glucosidase from *Thermus Thermophilus HB27*. *Journal of bacteriology*. 190(7): 2298-2305.
- Alazi**, Ebru, Jing Niu, Joanna E. Kowalczyk, Mao Peng, Maria Victoria Aguilar Pontes, Jan AL Kan, Jaap Visser, Ronald P. Vries, Arthur FJ Ram. (2016). The transcriptional activator GaaR of *Aspergillus niger* is required for release and utilization of d-galacturonic acid from pectin. *FEBSletters*.
- Ali, F. S.**, et A. A. Abdel-Moneim. (1999). Physico-chemical properties of *aspergillus flavus* var *columnaris* alpha-amylase. *Zentralblatt für mikrobiologie*. 144(8) : 615-21.
- alpha- amylase by chemically treated mutant of *Bacillus subtilis*. *J.Biol. Sci*. 2 (2): 73-75.
- Amit Kessel Ph.** (2012). The Molecules of life maltase. <https://amit1b.wordpress.com/the-molecules-of-life/>.
- Amouyal, C.**, et F. Andreelli. (2015). Chirurgie métabolique du diabète de type 2. *Médecine des maladies métaboliques*. 9(5) : 473–481.
- Ando S.**, Ishia H., Kosugi Y., Ishikawa K. (2002). Hyperthermostable Endoglucanase from *Pyrococcus horikoshii*. *Applied and Environmental Microbiology*. 68(1):430-433.
- Andreotti**, Giuseppina, Assunta Giordano, Annabella Tramice, Ernesto Mollo, et Antonio Trincone. (2006). Hydrolyses and transglycosylations performed by purified alpha-d-glucosidase of the marine mollusc *aplysia fasciata*. *Journal of biotechnology*. 122(2) : 274-84.

- Andriotis**, Vasilios M. E., Gerhard Saalbach, Robbie Waugh, Robert A. Field, et Alison M. Smith. (2016). The maltase involved in starch metabolism in barley endosperm is encoded by a single gene. 11(3): 151-642.
- Angelov**, A., Jung-Eun, So Hae Park, Jung Yoon Woo, Hye Sun Hwang, Jaeho Cha, et Heeseob Lee. (Janvier 2016). Enzymatic properties of a thermostable α -glucosidase from acidothermophilic *Crenarchaeon sulfolobus tokodaii* strain 7. Journal of microbiology and biotechnology. 23(1) : 56-63.
- Anthi C.**, Anthi, Evangelos Topakas, Thomas Paschos, Ioanna Taouki, et Paul Christakopoulos. (2013). Cloning, expression and characterization of an ethanol tolerant GH3 β -glucosidase from *Myceliophthora thermophila*. 24(2) : 46-59.
- Araújo**, Juliana Amorim, Túlio César Ferreira, Marciano Régis Rubini, Ana Gilhema Gomez Duran, Janice Lisboa De Marco, Lidia Maria Pepe Moraes, Fernando Araripe Gonçalves Torres. (2015). Coexpression of cellulases in *Pichia pastoris* as a self-processing protein fusion. AMB Express. 5(1) : 1.
- Archana Sharma** et T. Satyanarayana (2013). Process Biochemistry Microbial acid-stable α amylases: Characteristics, genetic engineering and applications. 48(2): 201-211.
- Arnaud A. et Guiraud J.P.** (1999). Le métabolisme microbien. In Scriban. R. Biotechnologie. 5ème édition. Techniques et Documentation-Lavoisier (Ed.). 91-96.
- Arvindekar**, A. U., et K. S. Laddha. (2016). An efficient microwave-assisted extraction of anthraquinones from *Rheum emodi*: Optimisation using RSM, UV and HPLC analysis and antioxidant studies. Industrial crops and products. 53(4) : 42-89.
- Arvindekar**, Aditya, Tanaji More, Pavan V. Payghan, Kirti Laddha, Nanda Ghoshal, et Akalpita Arvindekar. (2016). Evaluation of anti-diabetic and alpha glucosidase inhibitory action of anthraquinones from *Rheum emodi*. Food & function. 35(6) : 2693–2700.
- Assoi Yapi**, et Russell E. Patrice YAPI. (Septembre 2008). Caractérisation biochimique et applications potentielles des glucosidases et de l' α -galactosidase du suc digestif de la larve de *Rhynchophorus Palmarum* (Curculionidae). Mémoire Online. 46(6) : 541-46.
- Audic J.L.**, Chaufer B. and Daufin G. (2003). Non-food applications of milk components and dairy co-products : A review. INRA, EDP Sciences. 417-438.
- Babacan**, Sibel, et Arthur G. Rand. (janvier 2007). Characterization of honey amylase. Journal of Food Science 72(1) : 210-340.
- Badot R.M.** et Merlin D. (1984). Métabolisme énergétique et mouvement révolutif chez le haricot (*Phaseolus vulgaris*). Ann. Sci. Uni. Franche-Comté, Biol. Veg. (4) : 7-12.
- Baglinière**, François. (2013). Impacts des souches du genre *Pseudomonas* protéolytiques sur la stabilité des produits laitiers transformés : maîtrise et prédiction de la qualité des laits UHT.
- Bakri Y.**, Jacques P-H. et Thonart P-H. (2003). Xylanase production by *Penicillium canescens* solidstate fermentation. Appl. Biochem. Biotechnol. 108 : 737-748.
- Bala**, Anju, et Bijender Singh. (2016). Cost-effective production of biotechnologically important hydrolytic enzymes by *Sporotrichum thermophile*. Bioprocess and biosystems engineering 39(1) : 181–191.
- Barker**, Megan K., David R. (2013). Rose. Specificity of processing α -glucosidase i is guided by the substrate conformation crystallographic and in silico studies. Journal of biological chemistry. 288(19) : 13563–13574.
- Barnett J. A.**, Payne R. W. and Yarrow D. (2000). Yeast: Characteristics and identification. Third edition 2000, reprinted 2007. Cambridge University Press.
- Béatrice Py**, Béatrice, George P.C. Salmond, Marc Chippaux, Frédéric Barras. (2006). Secretion of Cellulases in *Erwinia Chrysanthemi* and *E. Carotovora* in Species-Specific. FEMS microbiology letters. 79(2) 3: 315-22.
- Behal A.**, Singh J., Sharama M.K., Pur P. and Batra N. (2006). Characterisation of Alkaline Amylase from *Bacillus sp* AB 04. International Journal of Agriculture & Biology. 08(1) : 80 83. *Borassus indica*. African Journal of Biotechnology. 4 : 289-291.
- Bekatorou A.**, Psarianos C. and Koutinas A. A. (2006). Production of food grade yeasts. Food technol. biotechnol. 44 : 407-415.
- Bel'en O.**, Juliana K., Ana M., Pedregos A., Inmaculada F. Monistro L., Fernando L. et Carmen S.E. (2006). Bacterial biofilm removal using fungal enzymes. Enzyme and Microbial Technology. 40 : 51-56.
- Belda**, Ignacio, Lorena B. Conchillo, Javier Ruiz, Eva Navascués, Domingo Marquina, Antonio Santos. (2016). Selection and use of pectinolytic yeasts for improving clarification and phenolic extraction in winemaking. International journal of food microbiology. 223(45) : 1–8.
- Ben Abdelmalek-Khedher**, Imen, Maria Camino Urdaci, Ferid Limam, Jean Marie Schmitter, M. Nejib Marzouki, et Philippe Bressollier. (2008). Purification, characterization, and partial primary sequence of a major-maltotriose-producing alpha-amylase, scamy43, from sclerotinia sclerotiorum . Journal of microbiology and biotechnology. 18(9) : 1555-63.
- Benaouida K.** (2008). Etude de l' α -amylase des levures isolées d'un écosystème extrême (sol environnant les sources thermale) et cultivées sur milieu à base de lactosérum. Thèse de Magister ; Option Biotechnologie microbienne. Université Mentouri, Constantine, 67p.

- Benlounissi A.** (2004). La protéase acide de *Penicillium camemberti* Production sur lactosérum, précipitation par le sulfate d'ammonium et action sur le lait de chèvre. Thèse de magistère. Université Mentouri. Constantine.
- Bennamoun L.** (2001). Production de l' α -amylase par *Aspergillus oryzae* cultivée sur un milieu à base de déchets d'oranges, optimisation du milieu de culture, purification partielle et étude des propriétés physico-chimiques de l'enzyme. Thèse de Magister. Faculté des Sciences, Université Mentouri de Constantine.
- Bensmira S.** (2006). Isolement et caractérisation de souches fongiques de milieux extrêmes (Sol et Sebkhha de la région de Biskra) productrices de cellulase thermostable à intérêt industriel. Thèse de magister. Université Mentouri Constantine.
- Bensmira, Meriem, Bo Jiang, Consolate Nsabimana, et Tang Jian.** (2007). Effect of lavender and thyme incorporation in sunflower seed oil on its resistance to frying temperatures. *Food research international*. 40(3) : 341–346.
- Bergin, Naomi Á, Bróna Fletcher, Orla Franklin, et Ellen Crushell.** (2016). Unexpected resolution of cardiomyopathy in severe alpha-mannosidosis. *Molecular genetics and metabolism* 117(2) : 27-2324.
- Bernard Henrissat.** (1995). Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. *Structure* . 3(9) : 853–859.
- Bernfeld P.** (1955). Amylase α and β . *Methods in enzymology* (Kaplan ed), academic press. 1: 149-158.
- Berry D. et Paterson A.** (1990). Enzymes in food industry. *In: Sucking C.J. (ed.), Enzyme biotechnological perspective, Process. Biochem.* 38 : 1599-1616.
- Bertheau Y., Kotoujansky A. et Colenoa A.** (1985). Sources actuelles et potentielles d'enzymes d'hymolyses et de dépolymérisation. *In : Mouranche A. et Coste C. (Ed) : Hydrolyses et dépolymérisation enzymes, d'intérêt industriel. Ed. Gautier-Villard. : 47-108.*
- Bertoldo, Costanzo, et Garabed Antranikian.** (2002). Starch-hydrolyzing enzymes from thermophilic archaea and bacteria. *Current opinion in chemical biology*. 6(2) : 151–160.
- Bhalla, Aditya, Namita Bansal, Sudhir Kumar, Kenneth M. Bischoff, et Rajesh K. Sani.** (2013). Improved lignocellulose conversion to biofuels with thermophilic bacteria and thermostable enzymes. *Bioresource Technology*. 128(2) : 751–759.
- Bharathiraja, M. Jayakumar, M. J. T. Nithyananthi, P. Vinosh Muthukumar, A. Saravananaraj, et K.**
- Bhatia, Latika, et Sonia Johri.** (2015). Biovalorization potential of peels of *Ananas cosmosus* (L.) Merr. for ethanol production by *Pichia stipitis* NCIM 3498 & *Pachysolen tannophilus* MTCC 1077. *Indian journal of experimental biology*. 53 : 819–827.
- Binetti A., Carrasco M., Reinheimer J. and Suarez V.** (2013). Yeasts from autochthonal chees starters: technological and functional properties. *Journal of applied microbiology*. 115 : 434-444.
- Bitter G. A., Kevin M. E.** (1984). Expression of heterologous genes in *Saccharomyces cerevisiae* from vectors utilizing the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene promoter. *Gene*. 32 : 263-274.
- Biz, Alessandra, Anelize Terezinha Jung Finkler, Luana Oliveira Pitol, Bruna Schweitzer Medina, Nadia Krieger, David Alexander Mitchell.** (2016). Production of pectinases by solid-state fermentation of a mixture of citrus waste and sugarcane bagasse in a pilot-scale packed-bed bioreactor. *Biochemical engineering journal*. 111 : 54–62.
- Blin C.P. (2002).** Etude comparative du catabolisme de l'acide ricinoléique chez les levures du genre *Sporidiobolus* : mise en évidence et caractérisation du système bêta-oxydase impliqué. Thèse de doctorat. Ecole nationale supérieure de biologie appliquée à la nutrition et à l'alimentation, université de Bourgogne, France.
- Blumer-Schuetz, Sara E., Irina Kataeva, Janet Westpheling, Michael W. W. Adams, Robert M. Kelly.** (2008). Extremely thermophilic microorganisms for biomass conversion: status and prospects. *Current opinion in biotechnology*. 19(3) : 210–217.
- Bodri e.A. Bower B. Berka R.M. and Dunn-Coleman N.S.** (1997). Economically important organic acid and enzyme products. *In: Martinelli S-D and Kinghorn J-R. (Ed): Aspergillus 50 years on progress in industrial microbiology. Elsevier. (29) : 561-602.*
- Boel E., Brady L., Brzozowski A., Derewenda Z., Dodson G., Jensen V., Petersen S., Swift H., Thim L and Woldike, H.** (1990). Calcium binding in α -amylases: an x-ray diffraction study at 2.1-Å resolution of two enzymes from *Aspergillus*. *Biochemistry*. 29 : 6244–6249.
- Boiron P. (1996).** Organisation et biologie des champignons. Edition Nathan, 149.
- Boisnard, Stéphanie, Gwenaél Ruprich-Robert, Martine Florent, Bruno Da Silva, Florence Chapeland-Leclerc, et Nicolas Papon.** (2014). Insight into the role of HOG pathway components Ssk2p, Pbs2p, and Hog1p in the opportunistic yeast *Candida lusitanae*. *Eukaryotic Cell*. 7(12) : 2179-83.
- Bombeck, Pierre-Louis, Aurore Richel, et Jacques Hébert.** (7 mars 2016). L'utilisation de l'hydrolyse enzymatique pour la production de nanocellulose dans une stratégie de bioraffinage forestier intégré (synthèse bibliographique). 20(4) : 310-315.
- Bonivento, Daniele, Daniela Pontiggia, Adele Di Matteo, Juan Fernandez-Recio, Gianni Salvi, Demetrius Tsernoglou, Felice Cervone, Giulia De Lorenzo, Luca Federici.** (2008). Crystal structure of the endopolygalacturonase from the phytopathogenic fungus *Colletotrichum lupini* and its interaction with polygalacturonase-inhibiting proteins. *Proteins*. 70(1) : 294-99.
- Boonvitthya, Nassapat, Sophie Bozonnet, Vorakan Burapatana, Michael J. O'Donohue, et Warawut Chulalakasanukul.** (2013). Comparison of the heterologous expression of *Trichoderma reesei* endoglucanase II and

- cellobiohydrolase II in the yeasts *Pichia pastoris* and *Yarrowia lipolytica*. *Molecular biotechnology*. 54(2) : 158–169.
- Botton B. (1991)**. La physiologie des levures ds : Larpent J.P., *Biotechnologie des levures*. Masson, Milan Barcelone Bonn. Paris. 97-127.
- Botton B., Breton A., Fevre M., Gauthier S., Guy P.H., Larpent J.P., Reymond P., Sanglier J.J., Vayssier Y., Veau P. (1990)**. Moisissures utiles et nuisibles importance industrielle. 2ème édition. Masson. Collection Biotechnologies. 34-428.
- Bouix M. et Leveau J.Y. (1999)**. Production des enzymes. In : Scriban R. (Ed) : *Biotechnologies* . Ed. Lavoisier. 344-400.
- Bouix M., Leveau J. Y. (1991)**. Les levures dans : Bourgeois C. M., Leveau J.Y., techniques d'analyse et de contrôle dans les industries agroalimentaires. Edition 2 Lavoisier-Tec & Doc, Paris. 3: 206-229.
- Boukail, Maazi.(2015)**. α -glucosidase thermostable de la levure *Candida sp.* : Production, purification et caractérisation. Recherche Google.
- Boukhennane M. et Boudebza D. (2014)**. Production mixte d' α -amylase et de maltase par *Candida sp.* Fermentation dans un milieu de culture, cinétique de production et caractérisation des enzymes. Mémoire de Master. Université Mentouri. Constantine.
- Bourgeois C. M. et Larpent J. P. (1996)**. Microbiologie alimentaire. Tome II aliment fermenté et fermentations alimentaires. Ed. Tec. et Doc. Lavoisier, Paris. : 100-450.
- Bousseboua H. (2002)**. Eléments de microbiologie générale. Programmes de graduation. Editions de l'Université Mentouri. Constantine Algerie. : 230-231.
- Brawn S.H. et Kelly R.M. (1993)**. Characterization of amylolytic enzymes having both (alpha)-1,4 and (alpha)-1,6 hydrolytic activity from the thermophilic archae *Pyrococcus furiosus* and *Thermococcus litoralis*. *Applied and environmental microbiology*. 59(8) : 2614-2621.
- Brizová, K. B. Králová, K. Demnerová, I. Vins. (28 février 2012)**. Isolation and Characterization of Alpha-glucosidase from *Aspergillus Niger*. *Journal of chromatography*. 59(1) : 125-31.
- Brondijk T., Konings demir N., Poolman B. (2001)**. Regulation of maltose transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Archives of microbiology*. 176 : 96-105.
- Buisson G., Duee E., Hasen R and Payan F. (1987)**. Three dimensional structure of porcine pancreatic α - amylase at 2.9Å° resolution In : Embo J. G . Role of calcium in structure and activity. 3909-3916.
- Burhan A., Unaldi N., Coral G., Colak O., Aygan A., Gulnaz O. (2003)**. Enzymatic properties of a novel thermostable, thermophilic,alkaline and chelator resistant amylase from an alkaliphilic *Bacillus sp.* Isolate ANT-6. *Process biochemistry*. 38 : 1397-1403.
- Buzzini P. (2000)**. An optimization study of carotenoid production by *Rhodotorula glutinis* DBVPG 3853 from substrates containing concentrated rectified grape must as the sole carbohydrate source. *Journal of industrial microbiology and biotechnology*. 24: 41-45.
- Cabon, Lauriane, Ana-Carolina Martinez-Torres, Santos A. Susin. (2013)**. La mort cellulaire programmée ne manque pas de vocabulaire. *Médecine sciences*. 29(12) : 1117–1124.
- Call, H. P., J. Walter, et C. C. Emeis. (1995)**. Maceration activity of an endopolygalacturonase from *Candida macedoniensis*. *Journal of food biochemistry*. 9(4) : 325–348.
- Calugi, Chiara, Antonio Guarna, et Andrea Trabocchi. (2013)**. Insight into the structural similarity between HIV protease and secreted aspartic protease-2 and binding mode analysis of HIV-*Candida albicans* inhibitors. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*. 28(5) : 936-943.
- Cao, Pinghua, Lei Wang, Yaoyue Wang, Ning Zhou, Yulin Chen. (2015)**. Alkali-tolerant glucosidase produced by newly isolated *Aspergillus fumigatus* WL002 from rotten wood. *International biodeterioration & biodegradation*. 105 : 276–282.
- Carl J. Yeoman, Guohua Yin, Ilya Borovok, Margret E. Berg Miller, Bareket Dassa, Itzhak Mizrahi, Harry J. Flint, Edward A. Bayer. (2015)**. Functional phylotyping approach for assessing intraspecific diversity of *Ruminococcus albus* within the rumen microbiome. *FEMS microbiology letters*. 362(3) : 1–10.
- Carvalho, Ana Flávia Azevedo, Maurício Boscolo, Roberto da Silva, Henrique Ferreira, et Eleni Gomes. (août 2010)**. Purification and characterization of the alpha-glucosidase produced by thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus* CBMAI 756. *Journal of microbiology (Seoul, Korea)*. 48(4) : 452-59.
- Chahed, Haifa, Aymen Ezzine, Mohamed Amine Ben Mlouka, Christophe Rihouey, Julie Hardouin, Thierry Jouenne, et M. Nejib Marzouki. (2015)**. A novel three domains glycoside hydrolase family 3 from *sclerotinia sclerotiorum* exhibits β -glucosidase and exoglucanase activities : molecular, biochemical, and transglycosylation potential analysis. *Molecular biotechnology*. 57(11-12) : 993–1002.
- Chan, K.Y., François, Christophe Bignon, Gerlind Sulzenbacher, Bernard Henrissat, et Mirjam Czjzek. (2003)**. The three-dimensional structure of invertase (β -fructosidase) from *Thermotoga maritima* reveals a bimodular arrangement and an evolutionary relationship between retaining and inverting glycosidases. *Journal of biological chemistry*. 279(18) : 18903–18910.

- Chanchao**, Chanpen, Rumpalai Padoongsupalai, et Polkit Sangvanich. (2007). Expression and characterization of α -glucosidase III in the dwarf honeybee, *Apis florea* (Hymenoptera: Apoidea: Apidae). *Insect Science*. 14(4) : 283–293.
- Chang**, S. T., K. N. Parker, M. W. Bauer, et R. M. Kelly. (2001). Alpha-glucosidase from *Pyrococcus Furiosus*. *Methods in enzymology*. 330(2) : 260-69.
- Chao**, C., J. R. Zatarain, Y. Ding, C. Coletta, A. A. Mrazek, N. Druzhyňa, P. Johnson. (2016). Cystathionine-beta-synthase inhibition for colon cancer : Enhancement of the efficacy of aminooxyacetic acid via the prodrug approach. *Molecular medicine (Cambridge, Mass)*. 22(5) : 420-53.
- Chapeland**-Leclerc, Florence, Paméla Paccallet, Gwenaél Ruprich-Robert, David Rebutier, Christiane Chastin, et Nicolas Papon. (2007). Differential involvement of histidine kinase receptors in pseudohyphal development, stress adaptation, and drug sensitivity of the opportunistic yeast *Candida lusitaniae*. *Eukaryotic cell*. 6(10) : 1782–1794.
- Charles A.**, Guy L. et Laurent M. (2003). *Biochimie alimentaire, 5ème édition de l'abrégé*. Dunod, Paris.
- Charles M. Schroeder**, et Arnab Mukherjee. Flavin-based fluorescent proteins: emerging paradigms in biological imaging. (2015). *Current opinion in biotechnology*. 31(4) : 16–23.
- Charlotte Urien**. (2015). Diversité des espèces de levures dans des levains naturels français produits à partir de farine issue de l'Agriculture Biologique : une étude pilote pour analyser les pratiques boulangères et les patterns des communautés microbiennes. Thèse de doctorat en Sciences de la vie et de la santé, dans le cadre d' école doctorale gènes, génomes, cellules (Orsay, Essonne).
- Charmot**, Dominique, Dagmar Ringe, Mme Chrystelle Sanlaville, Gregory Petsko. (2008). Structure et fonction des protéines. *De boeck supérieur*. 25(3) : 236-635.
- Chatterton J-R**, Vogel song K-M., Lu Y- Ellman A-B. et Hudgens G-A. (1996). Salivary amylase as a measure of endogenous adrenergic activity. *Clin. Physiol. J*. 16 (4) : 344-348.
- Chaves-López**, Clemencia, Rosanna Tofalo, Annalisa Serio, Antonello Paparella, Giampiero Sacchetti, et Giovanna Suzzi. (2012). Yeasts from colombian kumis as source of peptides with angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory activity in milk. *International journal of food microbiology*. 159(1) : 39–46.
- Chen**, Dong-Li, Xing Tong, Shang-Wei Chen, Sheng Chen, Dan Wu, Shu-Guang Fang, Jing Wu, et Jian Chen. (28 avril 2010). Heterologous expression and biochemical characterization of alpha-glucosidase from *Aspergillus Niger* by *Pichia Pastoris*. *Journal of agricultural and food chemistry*. 58(8) : 4819-24.
- Chen**, J., Y. Q. Zhang, C. Q. Zhao, A. N. Li, Q.-X. Zhou, D.-C. Li. (1 décembre 2007). Cloning of a gene encoding thermostable glucoamylase from *Chaetomium thermophilum* and its expression in *Pichia pastoris*. *Journal of applied microbiology*. 103(6) : 2277-84.
- Chi Z.**, Chi Z., Liu G., Wang F., Ju L., Zhang T. (2009). *Saccharomycopsis fibuligera* and its applications in biotechnology. *Biotechnol Adv*. 27 (4) : 423-431.
- Chiba**, Seiya, Takeshi Saeki, et Tokuji Shimomura. (2003). Purification and some properties of *Saccharomyces logosa*-glucosidase. *Agricultural and biological chemistry*. 37(8) : 1823–1829.
- Choi**, Hyejeong, M. A. Donati, R. Parini, D. Melis, R. Gatti, N. Bresolin, G. Scarlato, et G. P. Comi. (2013). Molecular characterisation of GSD III subjects and identification of six novel mutations in AGL. *Human mutation*. 20(6) : 480–480.
- Christiaens**, Stefanie, Sandy Van Buggenhout, Ken Houben, Zahra Jamsazzadeh Kermani, Katlijn RN Moelants, Eugénie D. Ngouémazong, Ann Van Loey, Marc EG Hendrickx. (2016). Process structure function relations of pectin in food. *Critical reviews in food science and nutrition*. 56(6) : 1021–1042.
- Clementi Francesca** and Jone Rossi. (1986). α -amylase and glucoamylase production by *Schwanniomyces castellii*. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 52: 343-352.
- Cocconcelli P. S.**, Morelli L., Vescovo M. and Bottazzi V. (1986). Intergeneric protoplast fusion in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Lett*. 35(2-3): 211-214.
- Cofalec**. (2006). Caractérisation des levures de boulangerie. Adopté par Comité de fabrication de levures de panification de l'union Européenne. Paris. : 1-10.
- Combo**, Agnan Marie Michel, Mario Aguedo, Michel Paquot. (2011). Les oligosaccharides pectiques : production et applications possibles/Pectic oligosaccharides : production and potential applications. *Biotechnologie, agronomie, société et environnement*. 15 (1) : 153.
- Comi K.**, Akeno T., Minitoki T., Ozeki K., Kumagai C., Okazaki N and Linura Y. (2000). Molecular cloning and caractérisation of a transcriptional activator gene amy involved in the amylolytic gene expression in *Aspergillus oryzae*. *Basic biotechnol. biochem*. 64 (4) : 816-827.
- Cordeiro C.A.**, Leal M.L. and Luciano A.B. (2002). Production and proprieties of α -amylase from thermophilic *Bacillus sp. Braz. J. Microbial*. 33(1).
- Cortis**, Pierluigi, Candida Vannini, Annalena Cogoni, Fabrizio De Mattia, Marcella Bracale, Valerio Mezzasalma, et Massimo Labra. (2015). Chemical, molecular, and proteomic analyses of moss bag biomonitoring in a petrochemical area of Sardinia (Italy). *Environmental science and pollution research*. 23(3).
- Coulibaly W.H.**, N'guessan K.F., Coulibaly I. et al. (2014). *Biotechnol. Agron. Soc. Environ*. 18(2) : 209-219

- Couto S. R.**, Sanromán MA. (2006). Application of solid-state fermentation to food industry- a review. Food engineering. 76 : 291-302
- Covadonga R.** Arias, Jacqueline K. Burns, Lorrie M. Friedrich, Renee M. Goodrich, and Mickey E. Parish. (2002). Yeast species associated with orange juice: Evaluation of different identification methods. Applied and environmental microbiology. 68(4) : 1955-1961.
- Cui Jie**, Xin Gu, Qiaohui Zhang, Yangjie Ou, et Jianzhong Wang. (2016). Production and anti-diabetic activity of soluble dietary fiber from apricot pulp by *Trichoderma viride* fermentation. Food & function. 6(5) : 1635–1642.
- D. H. Kwan**, Yi Jin, Jianbing Jiang, Hong-Ming Chen, Miriam P. Kötzler, Herman S. Overkleeft, Gideon Davies, et Stephen G. Withers. (2016). Chemoenzymatic synthesis of 6-phospho-cyclophellitol as a novel probe of 6-phospho- β -glucosidases. 1873-3468.
- Da Silva**, Douglas Chodi, Ana Lucia Ribeiro Latorre Zimbardi, Flávio Henrique Moreira Souza, Luis Henrique Souza Guimaraes, Rosa Prazeres Melo Furriel, et Joao Atilio Jorge. (2009). Production of a glucosidase-stimulated β -glucosidase and a cellulase-free thermostable xylanase by the *Thermophilic fungus Humicola Brevis var. Thermoidea Paecilomyces thermophila* under solid state fermentation. World journal of microbiology and biotechnology. 28(8) : 2689–2701.
- Da Silva**, Tony Marcio, Michele Michelin, Andre Ricardo de Lima Damásio, Alexandre Maller, Fausto Bruno Dos Reis Almeida, Roberto Ruller, Richard John Ward. (2009). Purification and biochemical characterization of a novel Alpha-glucosidase from *Aspergillus Niveus*. AntonieVan Leeuwenhoek. 96(4) : 569-78.
- Dahlqvist**, Arne. (1961). Pig intestinal β -glucosidase activities I. Relation to β -galactosidase (lactase). Biochimica et biophysica acta. 50(1) : 55–61.
- Daniel R. M.**, Peterson M. E., Danson M. J., Price N. C., Kelly S. M., Monk C. R., Weinberg C. S., Oudshoorn M. L., Lee C. K. (2009). The molecular basis of the effect of temperature on enzyme activity. Biochemical Journal. 425:353-60.
- Dastager G Syed**, Dayanand Agasar, Ashok Pandey. (2008) .Production and partial purification of α -amylase from a novel isolate *Streptomyces gulbargensis*. J Ind Microbiol biotechnol. Journal of industrial microbiology. 6(2) : 189-94.
- Dauter Z.** et al., (1999). X-ray structure of the maltogenic α -amylase from *Bacillus stearothermophilus*, novamyl, maltose and acarbose complexed at 1,7 Å resolution. Biochem. (38) : 8385-8392.
- Davies**, Gideon, et Bernard Henrissat. (1995). Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. Structure. 3(9) : 853–859.
- De Melo**, Ana Cristina Macrae, Sérgio Eduardo Longo Fracalanza, et Alane B. Vermelho. (2007). Peptidase profiles from non-*albicans Candida sp.* isolated from the blood of a patient with chronic myeloid leukemia and another with sickle cell disease. FEMS yeast research. 7 (6) : 1004–1012.
- De Mot R.** and Verachtert H.(1986). Secretion of alpha-amylase and multiple forms of glucoamylase by the yeast *Trichosporon pullulans*. can j microbial. 32 (1): 47-51.
- De Mot R.** Et Verachtert H. Purification and characterization of extracellular amylolytic enzymes from the yeast *Filobasidium capsuligenum*. (1985). Applied and Environmental microbiology.50 (6) : 1474-1482.
- De Mot René** and Verachtert Hubert. (1987). Purification and characterization of extracellular α -amylase and glucoamylase from the yeast *Candida Antarctica* CBS6678. Eur. J. Biochem. 164:643 654. 149.
- De Souza C.E.** et Martins M.L. (2000). Culture conditions for the production of thermostable amylase by *Bacillus sp.* Martins Brazilian journal of microbiology C.E. de S.Teodor and M.L.L. 31: 298-302.
- De Souza PM** and **De Oliveira Magalhães P.** (2010). Application of microbial α -amylase in industry. A review Braz J. microbiol. 41(4) : 850-61.
- Deak M.**, Kiss G. B., Koncz C. and Dudits D. (1986). Transformation of Medicago by Agrobacterium mediated gene transfer. Plant Cell Rep. 5(2): 97-100.
- Deak Tibor.** (2006). Chapitre 8: environmental Factors. Influencing yeasts, in yeast handbook : biodiversity and ecophysiology of yeasts, Carlos rosa, gabor peter (eds.). Springer Verlag Berlin Heidelberg. : 155-174.
- Deive F. J.**, Costas M., Longo M. A. (2003). Production of a thermostable extracellular lipase by *Kluyveromyces marxianus*. Biotechnology Letters. 25: 6-1403.
- Deming**, Derrick T., et Scott C. Garman. (2016). The molecular basis of Pompe disease : Crystal structure of acid alpha glucosidase. Molecular genetics and metabolism. 117(2) : S40–S41.
- Deng**, Zhuangmei, Haiquan Yang, Hyun-dong Shin, Jianghua Li, Long Liu. (10 mai 2014). Structure-based rational design and introduction of arginines on the surface of an alkaline α -amylase from *Alkalimonas amylolytica* for improved thermostability. Applied microbiology and biotechnology. 98(21) : 8937-45.
- Dias**, Paulo Jorge, et Isabel Sá-Correia.(2014). Phylogenetic and syntenic analyses of the 12-spanner drug: H⁺ antiporter family 1 (DHA1) in pathogenic *Candida* species: Evolution of MDR1 and FLU1 genes. Genomics. 104 (1) : 45–57.

- Dingeon B.**, Ferry J. P., Roulet A. (1975). Automatic assay of blood sugar by trinder's method. *Annales de Biologie Clinique*. (33) : 3-13.
- Diomi M.**, Elisavet K. et Paul C., 2008. Fungal multienzyme production on industrial byproducts of the citrus-processing industry, biotechnology laboratory. *Technology*. (99).
- Djekrif D. S.**, Gillmann L., Cochet N., Bennamoun L., Ait-kaki A., Labbani K., Nouadri T. and Meraihi Z. (2014). Optimization of thermophilic pullulanase and α -amylase production by amylolytic yeast. *International journal of microbiology research*. 6 (2) : 559-569.
- Djekrif, D. S.**, Leila, B., Amel, A.K., Kenza, L., Tahar, N., Zoubida, G.-A. and Zahia, M. (2016). An Optimization Study of α -Amylase Production by *Aspergillus niger* ATCC 16404 Grown on Orange Waste Powder. *Advances in Bioscience and Biotechnology*. 7 : 123-132.
- Djekrif-Dakhmouche S.** (2016). Production et caractérisation de l'amylopullulanase de la levure *Clavispora lusitaniae* ABS7 isolée de blé cultivé et stocké en zones arides. Thèse de Doctorat. Université Mentouri Constantine.
- Dohmen R.**, Jurgen, Alexander W. M. Strasser, Richard S. Zitomer and Cornelis P. Hollenberg. (1989). Regulated overproduction of α -amylase by transformation of the amylolytic yeast *Schwanniomyces occidentalis*. *Current Genetics*. 15 : 319-325.
- Dörr**, Tobias, Laura Alvarez, Fernanda Delgado, Brigid M. Davis, Felipe Cava, et Matthew K. Waldor. (2016). A Cell Wall Damage response mediated by a sensor kinase/response regulator pair enables beta-lactam tolerance. *Proceedings of the national academy of sciences*. 113(2) : 404-9.
- Doyon, Y.**, Home, W., et al. (2002). Effect of C-domain N-glycosylation and deletion on rat pancreatic alpha-amylase secretion and activity. *The Biochemical Journal*. 362 : 259-264.
- Dujin, B.** (2010). Yeast evolutionary genomics. *Nat. Rev. Genet*. 11: 512-524.
- Duo-Chuan L.**, Yijun Y., You-liang P., Chong-yao S., Peijin Z., Yicun H. (1997). Purification and properties of a thermostable alpha amylase from the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus*. *Acta Microbiol. Sin.* (37) : 107-114.
- Ecalard J.P.** (1990). Lait et biotechnologie. *New Zealand J. Dairy. Sci. Technol.* 21 (3) : 29-34.
- Eichler**, Jerry. (juillet 2001). Biotechnological uses of archaeal extremozymes. *Biotechnology advances*. 19(4) : 261-78.
- Elleuche S.** and Antranikian G. Starch-hydrolyzing enzymes from thermophiles. (2013). In: Satyanarayana T, Littlechild J, Kawarabayasi Y (Ed.), thermophilic microbes environmental and industrial biotechnology. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo. 509-533.
- Elyse A.**, Dunn, Gregory M. Cook, et Adam Heikal. (janvier 2016). Comparison of lipid and detergent enzyme environments for identifying inhibitors of membrane-bound energy-transducing proteins. *Journal of microbiological methods*. 120 : 41-43.
- Ernest V.**, Sekar G., Mukherjee A. and Chandrasekaran N. (2014). Studies on the effect of AgNP binding on α -amylase structure of porcine pancreas and *Bacillus subtilis* by multi-spectroscopic methods. *Journal of Luminescence*. (146) : 263-268.
- Ernst, Heidi A.**, Leila Lo Leggio, Martin Willemoës, Gordon Leonard, Paul Blum, et Sine Larsen. (2006). Structure of the *Sulfolobus solfataricus*-Glucosidase : Implications for domain conservation and substrate recognition in GH31. *Journal of molecular biology*. 358(4) : 1106-24.
- Ertan**, Figen, Hulya Yagar, et Bilal Balkan. (2006). Some Properties of free and immobilized alpha-amylase from *Penicillium Griseofulvum* by Solid state fermentation. *Preparative biochemistry & biotechnology*. 36(1) : 81-91.
- Eschstruth**, Alexis, et Benoit Divol. (août 2011). Comparative characterization of endo-polygalacturonase (PGU1) from *Saccharomyces Cerevisiae* and *Saccharomyces Paradoxus* under Winemaking Conditions. *Applied microbiology and biotechnology*. 91(3) : 623-34.
- Ettalibi Moussa** and Baratti Jacques C. (1988). Isolation and characterization of an amylolytic yeast : *Candida edax*. *World journal of microbiology and biotechnology*. 4 (2) : 193-202.
- Falkenberg**, Katrina J., et Ricky W. Johnstone. (2015). Histone deacetylases and their inhibitors in cancer, neurological diseases and immune disorders. *nature reviews drug discovery*. 14(3) : 219-219.
- Fall**, Maouly. (2016). Thrombose veineuse cérébrale en tout début de grossesse avec déficit en protéine S : une association assez rarement diagnostiquée en zone tropicale : à propos d'un cas. *Pan african medical journal*. 23(2) : 243-520.
- Fernandes-Salomão TM**, Amorim ACR, Chaves-Alves VM, Coelho JLC, Silva DO, Araújo EF. (1996). Isolation of pectinase hyperproducing mutants of *Penicillium expansum*. *Revista de Microbiol.* (27) : 15-18.
- Fogarty W. M.** et Kelly, C. T. (1994). *Microbial enzymes and biotechnology*. Applied science, London, New York. (43) : 71-132.
- Fogarty W.M.** and Kelly A. (1980). Amylases amyloglycosidases and related glucanases in Ecanon. *microbiology*. Acad press, New York and London. : 17-24.

- Fogarty**, William M., Catherine T. Kelly, et Sunil K. Kadam. (1985). Separation and characterization of α -glucosidase and maltase from *Bacillus amyloliquefaciens*. Canadian journal of microbiology. 31(8) : 670–674.
- Foresti M. L.**, María del Pilar Williams, Ricardo Martínez-García, Analía Vázquez. (2014). Analysis of a preferential action of α -amylase from *B. licheniformis* towards amorphous regions of waxy maize starch. Carbohydrate Polymers. Vol 102 : 80–87.
- Fossi Bertrand Tatsinkou**, Tavea Frederic and Ndjouenkeu Robert. (2005). Production and partial characterization of a thermostable amylase from *ascomycetes* yeast strain isolated from starchy soils. African Journal of Biotechnology. 4(1): 14-18.
- Fournier**, Jean-Baptiste. (2014). Evolution des mécanismes d'accumulation et de transport de l'iode dans les organismes marins : étude de la structure fonction des protéines du métabolisme iodé chez la bactérie *Zobellia galactanivorans*. Université Pierre et Marie Curie-Paris VI.
- Frade-Perez**, M. D., Jing Chen, Wei Li, Yan Cheng, Hai-pu Zhang, Li-na Zhang, et Tian-wen Hou. (2016). Serological response and diagnostic value of recombinant *candida* cell wall protein enolase, phosphoglycerate kinase, and α -glucosidase. Frontiers in microbiology. 52(6) : 410-652.
- Frade-Pérez**, María D., Arturo Hernández-Cervantes, Arturo Flores-Carreón, Héctor M. Mora-Montes. (2010). Biochemical characterization of *Candida albicans-glucosidase I heterologously expressed in *Escherichia coli*. Antonie van Leeuwenhoek. 98(3) : 291–298.*
- François F.**, Noël T., Pépin R., A Brulfert., Chastin C., Favel A. and Villard J. (2001). Alternative identification test relying on sexual reproductive abilities of *Candida lusitaniae* strains isolated from hospitalized patients. J. Clin. Microbiol. 39: 3906-14.
- François**, Fabienne, Florence Chapeland-Leclerc, Jean Villard, et Thierry Noël. (2016). Development of an Integrative Transformation System for the Opportunistic Pathogenic Yeast *Candida Lusitaniae* Using URA3 as a selection marker. *Yeast (Chichester, England)*. 21 (2): 95-106.
- Frandsen T**, Svensson B (1998). Plant α -glucosidases of the glycoside hydrolase family 31. Molecular properties, substrate specificity, reaction mechanism, and comparison with family members of different origin. Plant Mol Biol. 37(2) : 1–13.
- Frost**, David J., Kim Brandt, John Capobianco, Robert Goldman. (1994). Characterization of (1, 3)- β -glucan synthase in *Candida albicans*: microsomal assay from the yeast or mycelial morphological forms and a permeabilized whole-cell assay. Microbiology. 140(9) : 2239–2246.
- Funk**, Jana, Barbara Schaarschmidt, Silvia Slesiona, Teresia Hallström, Uwe Horn, et Matthias Brock. (2016). The glycolytic enzyme enolase represents a plasminogen-binding protein on the surface of a wide variety of medically important fungal species. International journal of medical microbiology 306(1) : 59-68.
- G. Styevkó**, Cs Styevkó, Á Hoschke, et Q. Nguyen. (2013). Oligosaccharide synthesized by glycosyltransferase activity from pectinex ultra SP-L enzyme preparation. Acta alimentaria. 42(1) : 99–106.
- Gabrielli**, Elena, Eva Pericolini, Eugenio Luciano, Samuele Sabbatini, Elena Roselletti, Stefano Perito, Lydia Kasper, Bernhard Hube, Anna Vecchiarelli. (2015). Induction of caspase-11 by aspartyl proteinases of *Candida albicans* and implication in promoting inflammatory response. Infection and immunity. 83(5) : 1940–1948.
- Gaëlle Fleitour**. (2012). Les génériques des biotechs débarquent. L'Usine Nouvelle 3277. <http://www.usinenouvelle.com/>.
- Galichet**, Arnaud, et Abdel Belarbi. (1999). Cloning of α -Glucosidase gene from *Thermococcus Hydrothermalis* by functional complementation of a *Saccharomyces Cerevisiae* mal11 mutant strain. FEBS letters. 458(2) : 188-92.
- Gana S. & Touzi A.** (2001). Volarisation du lactosérum par la production de levures lactiques avec les procédés de fermentation discontinue et continue. Rev. Energ. Ren : 51-58.
- Garcia-Martos**, Pedro, et Jose Mira-Gutierrez. (1995). Contribution to the Knowledge of the Enzymatic activity of yeasts of clinical Interest. Mycopathologia. 132(1) : 9-13.
- Gasson M. J.** and Davies F. L. (1984). The genetics of dairy lactic-acid bacteria. In : Davies F. L. and Law B. A. (eds). Advances in the microbiology and biochemistry of cheese and fermented-milk. Elsevier applied science publishers Ltd.; Barking, Essex; UK. 99-126.
- Giannesi G. C.**, de Lourdes Teixeira de Moraes Polizeli M., Terenzi H. F., Jorge J.A. A. Giannesi, John D., et Stephen G. Withers. (2006). Unequivocal identification of Asp-214 as the catalytic nucleophile of *Saccharomyces cerevisiae-glucosidase using 5-fluoro glycosyl fluorides. Journal of biological chemistry. 271(12) : 6889–6894.*
- Giannesi Giovana Cristina**, de Lourdes Teixeira de Moraes Polizeli Maria., Francisco Héctor Tierenz., Gournier-Chateau N., Larpent J.P., Castellanos M.I., Larpent J.L. (1994). Les Probiotiques en alimentation animale et humaine, Ed. Tee & Doc –Lavoisier. 192.
- Gientka**, Iwona, Anna l Bzducha-Wróbel, Lidia Stasiak-Róžańska, Aleksandra Agnieszka Bednarska, et Stanis lażejak. (2016). The exopolysaccharides biosynthesis by *Candida* yeast depends on carbon sources. Electronic journal of biotechnology.

- Gogoi, B. K., R. L. Bezbaruah, K. R. Pillai, et J. N. Baruah.** (1987) Production, purification and characterization of an α -amylase produced by *Saccharomycopsis fibuligera*. *Journal of applied bacteriology*. 63(5) : 373–379.
- Gonzalez C. F., Farina J. I. and de Figueroa L. I. C.** (2008). Optimized amylolytic enzymes production in *Saccharomycopsis fibuligera* DSM-70554: An approach to efficient cassava starch utilization. *Enzyme and microbiol technology*. 42 : 272-277.
- Graham T.** (1996). *Acid -amylase biochemistry*. 2nd Ed., Rathews & Van
- Greppi A. et al.** (2013). Yeast dynamics during spontaneous fermentation of mawè and tchoukoutou, two traditional products from Benin. *Int. J. Food microbiol*. 165 : 200- 207
- Groeme, R., J. Jaekel, M. Le Mignon, K. Jain, E. Nony, V. Baron-Bodo, P. Briozzo, V. Bordas-Le Floch, L. Mascarell, P. Moingeon.** (2015). Production et caractérisation d'Amb a 11 mature, un nouvel allergène majeur du pollen d'ambrosie (*Ambrosia artemisiifolia*) avec une activité cystéine protéase, à pH acide. *Revue Française d'Allergologie*. 55(3) : 222-256.
- Grün C. H. , Alice L., Jan van Marle, Enno CI Veerman, Marianne Valentijn-Benz, Kamran Nazmi, Hakan Kalay, Christian H. den Hertog, Wim van't Hof, Jan GM Bolscher, et Arie V. Nieuw Amerongen.** (2006). The human cathelicidin peptide LL-37 and truncated variants induce segregation of lipids and proteins in the plasma membrane of *Candida albicans*. *Biological chemistry*. 387(10) : 1495–1502.
- Gryta M., Morawki A. and Tomaszewska M.** (2000). Ethanol production in membrane distillation bioreactor. *Catalysis today*. (16) : 159-165.
- Guglani, Lokesh, Devin Moir, et Amrish Jain.** (2016). Sweat chloride concentrations in children with Idiopathic nephrotic syndrome. *Pediatric pulmonology*. 51(1) : 49–52.
- Guiraud J. P.** (1998). *Microbiologie alimentaire*. Dunod, Paris. : 310-321.
- Gunata Y.Z., Bayonove C.L., Arnaud A., Galzy P.** (1990). Hydrolysis of grape monoterpenyl glycosides by *Candida molishiana* and *Candida wickerhamii* β -glucosidases. *J.Sci. Food Agric.* (50) : 499-509.
- Gupta A., Gupta V-K., Modi D-R. et Yadava L-P.** (2008). Production and characterization of α - amylase from *Aspergillus niger*. *Biotechnologie*. 7 (3) : 551-556. Asian Network For Scientific Information. ISSN 1686-296X.
- GUPTA R, GIGRAS P, MOHAPATRA H, et al.** (2003). Microbial α - amylases: a biotechnological perspective. *Process biochem*. 38 :1599 -1616.
- Gupta, Anil K., Sant P. Gautam.** (1993). Purification and properties of an extracellular α -glucosidase from the thermophilic fungus *Malbranchea sulfurea*. *Microbiology*. 139(5) : 963–967.
- Gusakov A.V., Sinitsyn A.P., Markov A.V., Skomarovsky A.A., Sinitsyna O.A., Berlin A.G., Ankudimova N.V.** (2000). Indigo-binding domain in cellulase molecule. *Biocatalysis fundamentals and applications*.
- Gusakov, Alexander V., Tatyana N. Salanovich, Alexey I. Antonov, Boris B. Ustinov, Oleg N. Okunev, Richard Burlingame, Mark Emalfarb, Marco Baez, Arkady P. Sinitsyn.** (2007). Design of highly efficient cellulase mixtures for enzymatic hydrolysis of cellulose. *Biotechnology and bioengineering*. 97(5) : 1028–1038.
- Gutiérrez-Alonso, Patricia, María Gimeno-Pérez, Mercedes Ramírez-Escudero, Francisco J. Plou, Julia Sanz-Aparicio, et María Fernández-Lobato.** (2015). Molecular characterization and heterologous expression of a *Xanthophyllomyces dendrorhous* α -glucosidase with potential for prebiotics production. *Applied microbiology and biotechnology*. 15(2) : 1–11.
- H. Husebye, Supachitra Chadchawan, Per Winge, Ole P. Thangstad, et Atle M. Bones.** (2002). Guard cell- and phloem idioblast-specific expression of thioglucoside glucohydrolase 1 (myrosinase) in arabidopsis. *Plant physiology*. 128(4) : 1180-88.
- H. Nadeem, Muhammad Hamid Rashid, Muhammad Hussnain Siddique, Farrukh Azeem, Saima Muzammil, Muhammad Rizwan Javed, Muhammad Amjad Ali, Ijaz Rasul, et Muhammad Riaz.** (2016). Microbial invertases : a review on kinetics, thermodynamics, physiochemical properties. *Process biochemistry*. 50(8) : 1202–1210.
- Haifeng L., Zhenming C., Xiaohong W., Xiaohui D., Liyan M et Lingmei G.** (2006). Purification and characterization of extracellular amylase from the marine yeast *Aureobasidium pullulans* N13d and its raw potato starch digestion. *Enzymatic and microbial technology*. 40 :1006-1012.
- Halasz A. and Lasztity R.** (1991). *Use of Yeast Biomass in Food Production*. CRC Press, Boca Raton, FL. : 312.
- Hall, Barry G., Andreas Pikiş, et John Thompson.** (2009). Evolution and biochemistry of family 4 glycosidases : implications for assigning enzyme function in sequence annotations. *Molecular biology and evolution*. 26(11) : 2487–2497.
- Hao Zhou, Cheng-Zhang Wan, Jian-Zhong Ye, Hong-Xia Chen, Ran Tao, Yu Si Zhang.** (2015). Solid-state fermentation of *Ginkgo biloba*. Residue for optimal production of cellulase, protease and the simultaneous detoxification of *Ginkgo biloba* L. Residue using *Candida tropicalis* and *Aspergillus oryzae*. *European food research and technology*. 240(2) : 379-388.

- Haq I.**, Ahsraf H., Iabal J. and Qadeer M.A. (2003). Production of α -amylase by *Bacilluslicheniformis* using an economical medium, in: Behal A., Singh J., Sharama M.K., Pur P and Batra N., Characterisation of alkaline - amylase from *Bacillus sp* AB 04. International Journal of Agriculture & Biology. 08(1): 80-83.
- Haridas, Sajeet**, Ye Wang, Lynette Lim, Sepideh Massoumi Alamouti, Shaun Jackman, Rod Docking, Gordon Robertson, Inanc Birol, Jörg Bohlmann, et Colette Breuil. (2013). The genome and transcriptome of the pine saprophyte *Ophiostoma piceae*, and a comparison with the bark beetle-associated pine pathogen *Grosmannia clavigera*. BMC genomics. 14(1) : 154-250.
- Hart H.E.**, Parish M.E., Burns J.K. et Wicker L. (1991). Orange finisher-pulpe as substrat of polygalacturonase production by *Rhizopus oryzae*. J. of food sciences. 55 : 480-83.
- Hasper A.A.**, Dekkers E., Mil M.V., Van de Vondervoort P.j.i., De Graaff L.H. (2002). Egl C, a new endoglucanase from *Aspergillus niger* with
- Hawang K.Y.**, Chang C., Lee J., Lee S.Y., Kim K.K., Choe S., Sweet R.M and Such S.W. (1997). Crystal structure of thermostable- α -amylase from *Bacillus licheniformis* refined at 1.7 Å resolution. Mol. Cells. (7) : 251-258.
- He, Zheng-xin**, Jing Chen, Wei Li, Yan Cheng, Hai-pu Zhang, Li-na Zhang, et Tian-wen Hou. (2015). Serological response and diagnostic value of recombinant *candida* cell wall protein enolase, phosphoglycerate kinase, and α -glucosidase. Frontiers in microbiology. 62(25) : 1420-2050.
- Henrik Naested**, Birte Kramhøft, Finn Lok, Kirsten Bojsen, Shukun Yu, Birte. (2014). Characterization of the maltase activity from *candida.sp*. Microbiology. 120(3) : 125 : 201.
- Henrik Naested**, Peter HW Biedermann. (2006). Patterns of functional enzyme activity show that larvae are the key to successful fungus farming by ambrosia beetles. Evolution of cooperation in ambrosia beetles. 24(2) : 123-232.
- Hernandez-Montanez Z.**, Juarez-Montiel M., Velazquez-Avila M., Cristiani-Urbina E., Hernandez Rodríguez C., Villa-Tanaca L. and Chavez-Camarillo G. (2012). Production and characterization of extracellular α -amylase produced by *Wickerhamia sp*. X-Fep. Appl Biochem Biotechnol. 167(7) : 2117-29.
- Heslot H.** (1996). L'ingenierie des proteines et ses applications. Lavoisier Tcc et Doc. : 424- 432.
- Higuchi**, Naoki, Yasuhiro Ito, Jun Kato, Jun Ogihara, Takafumi Kasumi. (2016). NP24 induces apoptosis dependent on caspase-like activity in *Saccharomyces cerevisiae*. Journal of bioscience and bioengineering. 121(6) : 619–624.
- Himmel Michae**, Melvin P. Tucker, Stanley M. Lastick, Kenneth K., Jay W. FoxII, Diane D. Spindler, and Karel Grohmann.(1986). Isolation and characterization of a 1,4-/3-D-Glucan Glucohydrolase from the Yeast, *Torulopsis wickerhamii*. 261(5) : 12948-12955.
- Hofer F.** (1985). Transfer of lactose fermenting ability in *Lactobacillus lactis*. New Zealand J. Dairy Sci. Technol. 20(3) : 179-183.
- Hofman**, Zonne LM, Anurag Relan, Sacha Zeerleeder, Christian Drouet, Bruce Zuraw, et C. Erik Hack. (2016). Angioedema attacks in patients with hereditary angioedema: Local manifestations of a systemic activation process. Journal of allergy and clinical immunology. Holde. p : 132.
- Hori, Hiroyuki**, Yusuke Terui, Chisato Nakamoto, Chikako Iwashita, Anna Ochi, Kazunori Watanabe, et Tairo Oshima. (2016). Effects of polyamines from *Thermus Thermophilus*, an extreme-thermophilic eubacterium, on tRNA methylation by tRNA (Gm18) methyltransferase (TrmH). Journal of biochemistry. 159(5) : 509-17.
- Hornebeck**, W. (2009). Cascades protéolytiques. Médecine & longévité. 1(1) : 38–43.
- Horváthová, V.**, Janeček, Š. & Šturdík, E.(2001). Amylolytic enzymes: molecular aspects of their properties. Gen. Physiol. Biophys. 20 : 7–32.
- Hostinová**, Eva, Stefan Janecek, et Juraj Gasperík. (juillet 2010). Gene sequence, bioinformatics and enzymatic characterization of alpha-amylase from *Saccharomycopsis Fibuligera* K. Z. The protein journal. 29(5) : 355-64.
- Huang**, Lin, Kousuke Haratake, Hatsumi Miyahara, et Tomoki Chiba. (2016). Proteasome activators, PA28 γ and PA200, play indispensable roles in male fertility. Scientific reports 6.
- Huaxin Chen.**, Chu Ju., Zhang Siliang., Zhuang Yingping., Qian Jiangchao., Wang Yonghong., Hu Xiaoqing . (2007). Intra cellular expression of *Vitreoscilla* hemoglobin improves S –Adenosyl methionine production in a recombinant *Pichia pastoris*. Applied microbiology and biotechnology. 74 : 1205-121.
- Huiyong Jia**, Qiaojuan, Chengwei Hua, Shaoqing Yang, Yinan Li, et Zhengqiang Jiang. (2012). High level expression of extracellular secretion of a glucosidase gene (PtBglu3) from *Paecilomyces Thermophila* in *Pichia Pastoris*. Protein expression and purification. 84(1) : 64-72.
- Ian Spencer** Homsey. (2012). Alcohol and its role in the evolution of human society. RSC publishing : 471.
- Iefuji H**, Chino M., Kato M. and Iimura Y. (1996). Raw starch digesting and thermostable alpha-amylase from the yeast *Cryptococcus sp*. S-2 : Purification, characterization cloning and sequencing. Biochem. J. (318) : 989-996.
- Ihavenil**, Soundharrajan, Mayakrishnan Vijayakumar, Da Hye Kim, Mariadhas Valan Arasu, Hyung Su Park, Sivanesan Ravikumar, et Ki Choon Choi. (2016). Assessment of probiotic, antifungal and cholesterol lowering properties of *Pediococcus pentosaceus* KCC-23 isolated from Italian ryegrass. Journal of the science of food and agriculture. 96(2) : 593–601.
- Im, Hana**, et Cynthia A. Henson. (7 novembre 1995). Characterization of high pI α -glucosidase from germinated barley seeds : substrate specificity, subsite affinities and active-site residues. Carbohydrate research 277(1) : 145-59.
- Imrie F.K** and A.J. Vlitos. (1975). Production of fungal protein from carob (ceratonia siliqual.), *In* : S.R. Tannenbaum and D.I.C. Wang, eds., Single-cell protein II .MIT Press. : 223-243.

- Irfan**, Muhammad, Asma Safdar, Quratulain Syed, Muhammad Nadeem. (2012). Isolation and screening of cellulolytic bacteria from soil and optimization of cellulase production and activity. *Turkish Journal of biochemistry turk biyokimya dergisi*. 37(4) : 123-532.
- Iwona**, Gientka, Anna I Bzducha-Wróbel, Lidia Stasiak-Róžańska, Aleksandra Agnieszka Bednarska, et Stanis, Law B., lażej. (2016). The exopolysaccharides biosynthesis by *Candida* yeast depends on carbon sources. *Electronic journal of biotechnology*. 12(4) : 120-201.
- Jacob A.** Rendleman Jr, Enhancement of cyclodextrin production through use of debranching enzymes. (1997). *Biotechnology and applied biochemistry*. 26(1) : 51-61.
- Jacques Noémie** and Serge Caseregola. (2008). Safety assessment of dairy microorganisms : The hemiascomycetous yeasts. *International Journal of food microbiology*. 126 : 321-326.
- Jairath Saloni**, Parampal Sahota and Gulab Pandove. (2012). Preparation of non-alcoholic naturally carbonated beverage using yeast isolate from whey beverage. *Czech J. Food Sci*. 30 (2) : 135-143.
- Jannot P.**, Luu Tien H., Divies C. & Cachia J. P. (1984). Utilisation de la méthodologie expérimentale pour quantifier l'action des facteurs du milieu sur la croissance et l'activité microbienne. Cas des bactéries lactiques. *Sci. Aliments*. 4 : 55-59.
- János A.** Mótyán, Gyöngyi Gyémánt János Harangi Péter Bagossi (2011). Computer-aided subsite mapping of α -amylases. *Carbohydrate Research*. 346 (3) : 410-415
- Jegham**, Hajer. (2009). Etude de l'activité biologique et du mécanisme d'action de dérivés stéroïdiens à potentiel anticancéreux. *Science et vie*. 12(3) : 123-632.
- Jemli S**, Ben ME. (2008). The cyclodextrin glycosyltransferase of *Paenibacillus pabuli* US132 strain : molecular characterization and overproduction of the recombinant enzyme. *J. Biomed biotechnol* : 692-573.
- Jensen B.**, Olsen J. et Allermann K. (1987). Effect of media composition on the production of extracellular amylase from the thermophilic fungus, *Thermomyces lanuginosus*. *Biotechnol. Lett*. 9 : 313–316.
- Jeon**, Hyeyeon, Hyewon Lee, Dahye Byun, Hyejeong Choi, Jae-Hoon Shim. (28 février 2015). Molecular cloning, characterization, and application of a novel thermostable α -glucosidase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrobaculum Aerophilum* Strain IM2. *Food science and biotechnology*. 24(1) : 175-82.
- Jia**, Xiaojing, Shuofu Mi, Jinzhi Wang, Weibo Qiao, Xiaowei Peng, Yejun Han. (2014). Insight into glycoside hydrolases for debranched xylan degradation from extremely thermophilic bacterium *Caldicellulosiruptor lactoaceticus*. *Plos one*. 9(9) : 106-482.
- Jihene**, Bouguila, Mabrouk Sameh, Ben Turkia Hadhemi, Mokni Mourad, Boughammoura Lamia. (2014). Diagnosis of fucosidosis through cutaneous manifestations. *Open journal of pediatrics*. 4(1) : 76-95.
- Jimoh S.O.**, Ado S.A., Ameh J.B. & Whong C.M.Z. (2012). Characteristics and diversity of yeast in locally fermented beverages sold in Nigeria. *World J. Eng. Pure Appl. Sci*. 2 : 40-44.
- Johnson E. A.** and Echavarrri C. Erasm. (2011). Part II, Chapter 3 : Yeast biotechnology in Kurtzman C. P., Fzll J. W. and Boekhout T. (eds). *The yeast. A taxonomic study*. Fifth edition. Elsevier. 1: 21-45.
- Jollivet N.** & Belin J.M. (1993). Comparison of volatile flavor compounds produced by ten strains of *Penicillium camemberti* thom. *J. Dairy Sci*. 76 : 1837-1844.
- Jong-Sang Kim**, Chong-Suk Kwon, Kun Ho Son. (2000). Inhibition of alpha-glucosidase and amylase by luteolin, a flavonoid. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*. 64(11) : 2458–2461.
- K. Ghédira**, P. Goetz. (2016). *Malva sylvestris* L. (Malvaceae) : Mauve. *Phytothérapie*. 14(1) : 68-72.
- Kadziola A.**, Abe J., Svensson B. and Aser R. (1994). Crystal and molecular structure of barley -amylase. *J. Mol. Biol*. 239 : 104-121
- Kandra L.** , Gyemant G., Farakas E and Liptak A. (1997). Action pattern of porcine pancreatic α -amylase on three different series of beta –maltooligosaccharide glycoside. *Carbohydr.Res*. 289 (3) : 237-242.
- Kang H.K.** , Lee J.H., Kim D., Day D.F., Robyt J.F., Park K .H and Moon T.W. (2004). Cloning and expression of *Lipomyces starkeyi* alpha-amylase in *Escherichia coli* and determination of some of its properties. *FEMS Microbiol. Lett*. 233 (1) : 53-64.
- Kang H.K.**, Lee J. H., Kim D., Day D. F., Robyt J. F., Park K. H. and Moon T. W. (2004). Cloning and expression of *Lipomyces starkeyi* alpha-amylase in *Escherichia coli* and determination of some of its properties. *FEMS Microbiol Lett*. 233(1): 53-64.
- Kanwal**, B., M. A. Zia, M. Yasin, K. Rahman, et M. A. Sheikh. (2004). Purification and characterization of alpha-amylase from apple (*Malus pumila*). *International journal of agriculture and biology (Pakistan)*. 12(6) : 120-140.
- Kashin V. K.** Biogeochemistry, phytophysiology and chemistry of iodine. (1987).
- Kato S.**, Shimizu Ibuka A., Mura K., Takeuchi A., Tokue C. and Arai S. (2007). Molecular cloning and characterization of an alpha amylase from *Pichia burtonii* 15-1. *Biosci. Biotechnol. Biochem*. 71 (12) : 3007-3013.
- Kato**, Naoki, Sachie Suyama, Masao Shirokane, Masashi Kato, Tetsuo Kobayashi, et Norihiro Tsukagoshi. (mars 2002). Novel alpha-glucosidase from *Aspergillus nidulans* with strong transglycosylation activity. *Applied and environmental microbiology*. 68(3) : 1250-56.

- Katrin Viigand**, Triinu Visnapuu, Karin Mardo, Anneli Aasamets, Tiina Alamäe. (25 février 2016). Maltase protein of *ogataea (hansenula)* polymorpha is a counterpart to resurrected ancestor protein ancMALS of yeast maltases and isomaltases. *Yeast* (Chichester, England). 5(2) : 250-530.
- Kelly C. T.**, Moriarty M. E and Fogarty W. M. (1985). Thermostable extracellular α -amylase and α -glucosidase of *Lipomyces starkeyi*. *Applied microbiology and biotechnology publisher* : Springer-Verlag GmbH. 22 (5) : 352–358.
- Kelly**, Catherine T., Mary Giblin, et William M. Fogarty. (2014). Resolution, purification, and characterization of two extracellular glucohydrolases, α -glucosidase and maltase, of *Bacillus licheniformis*. *Canadian journal of microbiology*. 32(4) : 342–347.
- Kelly**, R.M., L. Dijkhuizen and H. Leemhuis. (2009). Starch and α -glucan acting enzymes, modulating their properties by directed evolution. *J. Biotechnol.* 140 : 184-193.
- Ketna Matkar**, Digantkumar Chapla, Jyoti Divecha, Anand Nighojkar, Datta Madamwar. (2013). Production of cellulase by a newly isolated strain of *Aspergillus sydowii* and its optimization under submerged fermentation. *International biodeterioration & biodegradation*. (78) : 24–33.
- Khan**, Feroz. (2013). New microbial proteases in leather and detergent industries. *Innovative research in chemistry*. 1(1) : 1–6.
- Khan, J.A.** and Yadav, S.K. (2011). Production of alpha amylases by *Aspergillus niger* Using cheaper substrates employing solid state fermentation. *International Journal of Plant, Animal and environmental sciences*. 1 : 100-108.
- Khoo S.L.** , Amirul A .A., Kamaruzaman M., Nazalan N and Azizan M .N. (1994). Purification and characterization of alpha-amylase from *Aspergillus flavus*. *Folia Microbiol(Praha)*. 39(5) : 392-8.
- Kim**, Ji-Hye, Ha-Ram Kim, Mi-Hyeon Lim, Hyun-Mi Ko, Jong-Eon Chin, Hwanghee Blaise Lee, Il-Chul Kim, et Suk Bai. (mai 2010). Construction of a direct starch-fermenting industrial strain of *Saccharomyces Cerevisiae* producing glucoamylase, alpha-amylase and debranching enzyme. *Biotechnology letters*. 32(5) : 713-19.
- Kim**, Kyoung Woo, Soo Hyun Park, Doo Hwan Oh, Seung Hoon Lee, Kyung Sub Lim, Kwangsic Joo, Yeoun Sook Chun, Soo-Ik Chang, Kyong-Mi Min, et Jae Chan Kim. (2016). Ribonuclease 5 coordinates signals for the regulation of intraocular pressure and inhibits neural apoptosis as a novel multi-functional anti-glaucomatous strategy. *Biochimica et biophysica acta (bba)-molecular basis of disease*. 1862(2) : 145–154.
- Kindle K . L.** (1983). *Appl .Biochem . Biotechnol.* 8 : 153 -170.
- Kita A.**, Akihiko, Hirokazu Matsui, Akishige Somoto, Atsuo Kimura, Masuhiro Takata, et Seiya Chiba. (2009). Substrate specificity and subsite affinities of crystalline α -glucosidase from *Aspergillus niger*. *Agricultural and biological chemistry* 55(9) : 2327–2335.
- Klein R. D.**, and M. A. Favreau. (1995). The *Candida* species : biochemistry, molecular biology, and industrial applications. In : Y.H. Hui and G. G. Khachatourians (Eds). *Food biotechnology. microorganisms*. VCH publishers, New York. 297-371.
- Kobayashi**, Isao, Masahiro Tokuda, Hiroyuki Hashimoto, Takashi Konda, Hirofumi Nakano, et Sumio Kitahata. (janvier 2003). Purification and characterization of a new type of alpha-glucosidase from *Paecilomyces Lilacinus* that has transglucosylation activity to produce alpha-1,3- and alpha-1,2-linked oligosaccharides. *Bioscience, biotechnology and biochemistry*. 67(1) : 29-35.
- Koivistoinen**, Outi M., Mikko Arvas, Jennifer R. Headman, Martina Andberg, Merja Penttilä, Thomas W. Jeffries, et Peter Richard. (2012). Characterisation of the gene cluster for l-rhamnose catabolism in the yeast *Scheffersomyces (Pichia) stipitis*. *Gene*. 492(1) : 177–185.
- Konopka**, James B. (2012). N-acetylglucosamine functions in cell signaling. *Scientifica*. 4(1) : 120-851.
- Kosikowski F.V.** (1979). Utilisation du lactosérum et produits à base de lactosérum. *Revue laitière Français*. 11-21.
- Kouhonde**, Sonagnon Hermann Serge, Kifouli Adéoti, Frank Delvigne, Aly Savadogo, Alfred S. Traore, Philippe Thonart. (2014). The use of microorganisms of cassava retting for the production of pectinolytic enzymes. *Journal of microbiology, biotechnology and food sciences*. 4(3) : 277–281.
- Kreger-Van- N.J.** (1984). *The yeasts, a taxonomic study*. Elsevier Science publishing, Amsterdam.
- Kregiel D.** (2016). Amylolytic activity of kluver-positive *debaryomyces occidentalis* cells immobilized in Foamed alginate gel. *Journal of microbiology, biotechnology and food sciences*. 90-924.
- Kumari**, Amit, T. Satyanarayana, et Bijender Singh. (janvier 2016). Mixed substrate fermentation for enhanced phytase production by thermophilic mould *Sporotrichum thermophile* and its application in beneficiation of poultry feed. *Applied biochemistry and biotechnology*. 178(1) : 197-210.
- Kurtzman C. P.**, Part Iva. (2011). Classification of the Ascomycetous Taxa Chapitre 13. Discussion of Teleomorphic and anamorphic *Ascomycetous* and yeasts-like-taxa. In Kurtzman C. P., Fell J.157 W. and Boekhout T (Eds). *The yeasts, a taxonomic study*. Fifth edition. Elsevier. 2 : 293-311.
- Kurtzman Cletus P.**, Jack W. Fell, Teun Boekhout and Vincent Robert. (2011). Methods for isolation, phenotypic characterization and maintenance of yeasts. In Kurtzman C. P., Fell J. W. and Boekhout T. (Eds). *The yeasts, a taxonomic study*. Elsevier. 1(5) : 87-111.
- Kurtzman, C. P.** and Suzuki M. (2010). coenzyme Q-9 and the proposal of the new genera *Babjeviella*, *Meyerozyma*, *Millerozyma*, Phylogenetic analysis of ascomycete yeasts that form *Priceomyces* and *Scheffersomyces*. *Mycoscience*. 51(1) : 2-14.

- Kwon-Chung K. J** and Bennett J.E. (1992). Medical mycology. Lea & Febiger, Philadelphia.Press, Amsterdam.
- Lachance Marc-André.** (2011). Clavispora Rodrigues de Miranda in Kurtzman C; P., Fzll J. W. and Boekhout T. The yeast a taxonomic study. Elsevier. 2(5).
- Lachance Marc-André.**(2011a).Yeast. Encyclopaedia of Life Sciences, Wiley John Wiley and sons, p.12-56.
- Lamers, Dennis, Nick van Biezen, Dirk Martens, Linda Peters, Eric van de Zilver, Nicole Jacobs-van Dreumel, René H. Wijffels, et Christien Lokman.** (2016). Selection of oleaginous yeasts for fatty acid production. BMC biotechnology. 16(1) : 120-210.
- Laplanche J.** (2004). Système d'épuration du lactosérum d'alpage par culture fixée sur lit de compost. Rev. suisse Agric. 36(5) : 220-224.
- Larpent J. P.** (1991). Biotechnologie des Levures Ed. Masson, Paris. 426.
- Larpent J. P.** et Larpent-Gourgaud M. (1997). Mémento technique de microbiologie. 3e édition, Lavoisier-Tec & Doc, Paris. (8) : 217-240.
- Larpent-gourgaud M. et Sanglier J.J.** (1992). Biotechnologies, principes et méthodes. Ed Doin. 574-581.
- Lateef A., Oloke J-K., Gueguim-Kana E-B. et Adebayo I.,** 2004. Aspects of the isolation and characterizat on of thermostable α -amylase from *Alternaria alternata*. Global Journal of pure and applied sciences. 10(1):75-79.
- Leblon C.** (1988). Etude des levures de vinification et des facteurs agissant sur la fermentation alcoolique. Thèse: Pharmacie: Nancy I. (51) : 235.
- Leclerc H.** (1975). Microbiologie générale, doin éditeurs, Paris. : 28.
- Leclerc H., Meyer A. et Deiana J.,** (1995). Cours de microbiologie générale. Nouveau programme. Biosciences et techniques. Doin éditeurs, Paris.73-92.
- Leghlimi H.** (2004). Optimisation de la production de la cellulase d'*Aspergillus niger* ATCC 16 404 cultivé sur un milieu à base de lactosérum : étude comparative entre *Aspergillus niger* ATCC 16 404 et *Aspergillus niger* O.Z. isolée localement. Thèse de magistère. Université Mentouri. Constantine.
- Leghlimi, Hind, Zahia Meraihi, Hayet Boukhalfa-Lezzar, Estelle Copinet, Francis Duchiron.** (2013). Production and characterization of cellulolytic activities produced by *Trichoderma longibrachiatum* (GHL). African journal of biotechnology. 12(5) : 123-325.
- Lejeune R. and Baron G. V.** (1995). Effet of agitation on growth and enzyme production of *Trichoderma reeseum* in batch fermentation. Appl. Microbiol. Biotechnol. 43 : 249-258.
- Leveau J.Y and Bouix M.** (1979). Etude des conditions extrêmes de croissance des levures osmophiles. Ind. Alim. Agric. (11) : 1147-1151.
- Leveau J.Y.** et Bouix M. (1993). Microbiologie industrielle. Les micro-organismes d'intérêt industriel. Lavoisier TEC et DOC, Paris. 08 : 2-92.
- Li Ming, Liying Zhou, Xin Sun, Shuya Wang, Hongxin Wang, Dongxia Li, Fuping Lu.** (2014). Cloning of glucoamylase gene from *Aspergillus niger* and its expression in *Saccharomyces Cerevisiae* W303-1B. Springer Berlin heidelberg. 80 : (4) 249-71.
- Li, C. et al.** (2014). Close relationship of a novel *Flavobacteriaceae* α -amylase with archaeal α -amylases and good potentials for industrial applications. Biotechnol. Biofuels. (7) 18 : 7-18.
- Liang Xian, Fei Wang, Xiang Luo, Yu-Liang Feng, and Jia-Xun Feng.** (2015). Purification and Characterization of a Highly Efficient Calcium-Independent α -Amylase from *Talaromyces pinophilus* PLoS One. 10(3) : 1-95.
- Liese A., Seelbach S., Wandrey C. et Wileyu VCH.,** 2000. Industrial biotransformations.
- Linxia, Liu, Jun Zhang, Chuan Chen, Jitao Teng, Chengshu Wang, Duqiang Luo.** (2015). Structure and biosynthesis of fumosorinone, a new protein tyrosine phosphatase 1B inhibitor firstly isolated from the entomogenous fungus *Isaria fumosorosea*. Fungal genetics and biology. 81(7) : 191-200.
- Liu, Z. Lewis, et Michael A. Cotta.** (2015). Technical assessment of Cellulosic ethanol production using β -Glucosidase producing yeast *Clavispora* NRRL Y-50464. Bioenergy Research. 8(3) : 1203-11.
- Liu, Z. Lewis, Scott A. Weber, et Michael A. Cotta.** (2013). Isolation and Characterization of a β -Glucosidase from a *Clavispora* strain with potential applications in bioethanol production from cellulosic materials. Bioenergy research. 6(1) : 65-74.
- Liu, Z. Lewis, Scott A. Weber, Michael A. Cotta, et Shi-Zhong Li.** (2012). A new α -glucosidase producing yeast for lower-cost cellulosic ethanol production from xylose-extracted corncob residues by simultaneous saccharification and fermentation. Bioresource technology. 104(4) : 410-416.
- Lo Chi-Ming, et Lu-Kwang Ju.** (2009). Sophorolipids-induced cellulase production in cocultures of *Hypocrea jecorina* Rut C30 and *Candida bombicola*. Enzyme and microbial technology. 44(2) : 107-111.
- Lo H.F., Lin L.L., Chen H.L., Hsu H.H., Chang C.T.** (2001). Enzymatic properties of a SDSresistant Bacillus sp. TS-23 Alpha-amylase produced by recombinant *Escherichia coli*. Process biochemistry. (36) : 743-750.
- Lo, Chi-Ming, et Lu-Kwang Ju.** (2009). Sophorolipids-induced cellulase production in cocultures of *Hypocrea jecorina* Rut C30 and *Candida bombicola*. Enzyme and microbial technology. 44(2) : 107-111.

- Loiudice FH**, et al. (2001). Overexpression of glucose-6-phosphate dehydrogenase in genetically modified *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 91-93 : 161-9
- Long**, Ruicai, Mingna Li, Tiejun Zhang, Junmei Kang, Yan Sun, Lili Cong, Yanli Gao, Fengqi Liu, et Qingchuan Yang. (2016). Comparative proteomic analysis reveals differential root proteins in medicago sativa and medicago truncatula in response to salt stress. *Frontiers in plant science* 7.
- Longhi L.G.S.**, Luvizetto D.J., Ferreira L.S., Rech R., Ayub M.A.Z., Secchi A.R. (2004). A growth kinetic model of *Kluyveromyces marxianus* cultures on cheese whey as substrate. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 31: 35-40.
- Lopandic K.**, Zelger S., Banzsky L. K., Eliskases-Lechner F. and Prillinger H. (2006). Identification of yeasts associated with milk products using traditional and molecular techniques. *Food Microbiol.* 23 : 341-350.
- López**, María Consuelo, José Juan Mateo, Sergi Maicas. (2015). Screening of β -glucosidase and β -xylosidase activities in four non-*Saccharomyces* yeast isolates. *Journal of food science.* 80(8) : C1696–C1704.
- Lundquist**, S., A. Zibae, et M. R. Abbei-Mozddehi. (2006). Effects of olive varieties on a-and b-glucosidase activities in the larvae of bacterocera oleae gmelin (diptera : tephritidae). *Trakia journal of sciences.* 13(1) : 41-87.
- Luquet F.M. et Boudier J.F.** (1984). Utilisation des lactosérums en alimentation humaine et animale. *Apria.* (21) : 1-7, 66, 83-90.
- M. Asgher** , M. Javaid Asad, S.U. Rahman,R.L. Legge. (2007). A thermostable α -amylase from a moderately thermophilic *Bacillus subtilis* strain for starch processing. *Journal of food engineering.* 179(3) :950–955.
- M. D. Ogunbadejo.** Oboh Ganiyu. (2015). Influence of gallic acid on α -amylase and α -glucosidase inhibitory and antioxidant properties of acarbose. Thesis, federal university oye ekiti. 20(5) : 125-650.
- M. Wang**, Q., D. Begerow, M. Groenewald, X. -Z. Liu, B. Theelen, F. -Y. Bai, et T. Boekhout. (2015). Multigene phylogeny and taxonomic revision of yeasts and related fungi in the Ustilaginomycotina. *studies in mycology, multigene phylogeny and reclassification of yeasts and related filamentous taxa in basidiomycota.* 81(5) : 461-248.
- Macgregor EA**, Janecek S, Svensson B. (2001). Relationship of sequence and structure to specificity in the alpha-amylase family of enzymes. *Biochim. Biophys. Acta.* 1546 : 1-20.
- Madigan M. T.**, Martino J. M. (2006). Brock biology of microorganisms. pearson education. Upper Saddle River, NJ, USA.
- Mahalakshmi**, N., S. Jayalakshmi. (2016). Amylase, cellulase and xylanase production from a novel bacterial isolate achromobacter xylosoxidans isolated from marine environment. *Int. J. Adv. Res. Biol. Sci.* 3. 12(1) : 230–233.
- Mahmoud A.U.**, Greenman J., Scragg A.I.I.(1998). Orange and potato peel extracts. Analysis and use as *Bacillus* substrat for the production of extracellular enzymes in continuous culture. *Enzyme and microbial technology.* 22(2) : 130-37.
- Maïzan Jean-Paul**, Bouatenin Koffi; Djéni N'dédé Théodore; Abodjo Célah Kakou; Eby Hervé Menan; Koffi Marcellin Dje. (2016). Optimisation de la production de l' [alpha]-amylase par les microorganismes isolés des ferments traditionnels de Manioc provenant de trois zones de production de L'attiéké en Côte d'Ivoire. *European scientific journal.* 12-9.
major activity towards xyloglucan. *Appl. Environ. Microbiol.* 68(4) : 1556-1560.
- Majzlová**, Katarína, Zuzana Pukajová, Štefan Janeček. (2013). Tracing the evolution of the α -amylase subfamily GH13_36 covering the amylolytic enzymes intermediate between oligo-1, 6-glucosidases and neopullulanases. *Carbohydrate research.* 367(4) : 48–57.
- Maleki**, Maryam, et Mehdi Nematbakhsh. (2016). Renal blood flow response to angiotensin 1-7 versus hypertonic sodium chloride 7.5% administration after acute hemorrhagic shock in rats. *International journal of vascularmedicine.* 56(5) : 452-632.
- Malhotra R.**, Noorwez S. M., SatyanaraYana T. (2002). Production and partial characterization of thermostable and calcium-independent alpha-amylase of an extreme thermophile *Bacillus thermooleovorans* NP54. *Lett. Appl. Microbiol.* 31(5) : 378-384.
- Malinge**, S., E. Delabesse, G. Soler, I. Radford-Weiss, S. Romana, M. Debre, R. Berger. (2016). Recherche de nouvelles anomalies des gènes codant pour des protéines à activité tyrosine kinases dans les hémopathies malignes : analyse de la famille JAK.
- Mallick P.**, Broutz D. R., Eisenberg D., Yeates T O. (2002). Genomic evidence that the intracellular proteins of archaeal microbes contain disulfide bonds. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99 (15) : 9679-9684.
- Malumba P**, Sebastien J, Claude D. (2011). Structure de l'amidon de maïs et principaux phénomènes impliqués dans sa modification thermique. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 15(2) : 315-326.
- Mamo G.**, Gessesse A. (1999). Purification and characterization of two raw-starch-digesting thermostable a-amylase from a thermophilic *Bacillus*. *Enzyme and microbial technology.* (25) : 433-438.
- Mantsala P** and Zalkin H.(1979). *J. Biol. Chem.* (254) : 8540 -8547.
- Manzoni, P.**, M. Mostert, et E. Castagnola. (2015). Update on the management of *Candida* infections in preterm neonates. *Archives of disease in childhood-fetal and neonatal.* 100(5) : F454–F459.

- Maria Simitopoulou**, Athanasios Chatzimoschou, et Emmanuel Roilides. (2016). Biofilms and antifungal susceptibility testing *Candida species*: Methods and protocols. 58(8) : 183–197.
- Marie S.**, Møller, Folmer Fredslund, Avishek Majumder, Hiroyuki Nakai, Jens-Christian N. Poulsen, Leila Lo Leggio, Birte Svensson, Maher Abou Hachem. (2012). Enzymology and structure of the GH13_31 glucan 1, 6- α -glucosidase that confers isomaltooligosaccharide utilization in the probiotic *Lactobacillus acidophilus* N. C. F. M. Journal of bacteriology. 194(16) : 4249–4259.
- Marija Pavlović**, Aleksandra Dimitrijević, Dejan Bezbradica, Nenad Milosavić, Marija Gavrović-Jankulović, Dejan Šegan, et Dušan Veličković. (2014). Dual effect of benzyl alcohol on α -glucosidase activity : efficient substrate for high yield transglucosylation and non-competitive inhibitor of its hydrolytic activity. Carbohydrate research. 387(4) : 14–18.
- Marín**, Dolores, Dolores Linde, María Fernández Lobato. (30 janvier 2006). Purification and biochemical characterization of an alpha-glucosidase from *Xanthophyllomyces Dendrorhous*. Yeast (Chichester, England). 23(2) : 117–25.
- Markku**, Vanhanen. (2000). Risk of enzyme allergy in the detergent industry. Occupational and environmental medicine. 57 (2) : 121–232.
- Martín M.T.**, Plou F.J., Alcade M., Ballasteros A. (2003). Immobilization on Eupergit C of cyclodextrin glucosyltransferase (CGTase) and properties of immobilized biocatalyst, J. Mol. Catal. 21 : 299–308.
- Masoumeh**, Yousefi-Nejad, Hossein Naderi- Manesh, Khosro Khajeh. (6 septembre 2011). Proteomics of early and late cold shock stress on *Thermophilic Bacterium*, *Thermus Sp. GH5*. Journal of proteomics. 74(10) : 2100–2111.
- Matsubara**, Takayoshi, Youssef Ben Ammar, Trisanti Anindyawati, Satoru Yamamoto, Kazuo Ito, Masaru Iizuka, et Noshi Minamiura. (2004). Degradation of raw starch granules by α -amylase purified from culture of *Aspergillus awamori* KT-11. BMB reports. 37(4) : 422–428.
- Matsuo**, Takashi, Chie Imai, Takefumi Yoshida, Takashi Saito, Takashi Hayashi, Shun Hirota. (2012). Creation of an artificial metalloprotein with a hoveyda–grubbs catalyst moiety through the intrinsic inhibition mechanism of α -chymotrypsin. Chemical communications 48(11) : 1662–1664.
- Matsusaka**, K., Chiba, S, et Stephen G. Shimomura. (1999). Unequivocal identification of Asp-214 as the catalytic nucleophile of *Saccharomyces cerevisiae*-glucosidase using 5-fluoro glycosyl fluorides. Journal of biological chemistry. 271(12) : 6889–6894.
- Matsusaka**, Kouetsu, Seiya Chiba, et Tokuji Shimomura. (2007). Purification and substrate specificity of brewer's yeast α -glucosidase. Agricultural and biological chemistry. 41(10) : 1917–1923.
- Mattanovich D**, Branduardi P, Dato L, Gasser B, Sauer M, Porro D. (2012). Recombinant protein production in yeasts. Methods Mol Biol. 824: 329–58.
- Mazur A. K** and Nakatani H. (1993). Multiple attack mechanisms in the porcine pancreatic amylase hydrolysis of amylose and amylopectine. Arch. Biochem. Biophys. 306(1) : 29–38.
- Mc Tighe**, Kelly C.T., Doyle E.M. et Fogarty W.M. (1995). The alkaline amylase of the alkalophilic *Bacillus sp.* IMD 370. Enzyme and Microbial Technology. 17 : 570–573.
- McCarter J.D and Withers S.G.** (1996). Unequivocal identification of Asp-214 as the catalytic nucleophile of *Saccharomyces cerevisiae* -glucosidase using 5-fluoro glycosyl fluorides. *J. Biol. Chem.* (271): 6889–6894.
- McCarter**, John D., et G. Stephen Withers. (1994). Mechanisms of enzymatic glycoside hydrolysis. Current opinion in structural biology. 4(6) : 885–892.
- McMahon E .M.**, Kelly C.T. and Fogarty W.M. (1999). High maltose producing amylolytic system of a *Streptomyces* species. Biotechnology Letters. 21: 23–26.
- Mechakra A.**, Auberger B., Remeuf F. & Lenoir J. (1999). Optimisation d'un milieu de culture pour la production d'enzymes protéolytiques acides par *Penicillium camemberti*. Sci. Aliments. 19(6) : 663–675.
- Mehaia M. A.**, Cheryan M. (1986). Lactic acid from whey permeate in a membrane recycle bioreactor. Enzyme Microb. Technol. (8): 289–292.
- Melo**, Ana Cristina Nogueira, Marcos Dornelas-Ribeiro, Edilma Paraguai De Souza, Andrew Macrae, Sérgio Eduardo Longo Fracalanza, Alane B. Vermelho. (2007). Peptidase profiles from non-*albicans* *Candida* sp. Isolated from the blood of a patient with chronic myeloid leukemia and another with sickle cell disease. *FEMS yeast research*. 7(6) : 1004–1012.
- Meng**, Peng, Xizhen Qi, Fang Zheng, Limei Ren, Fang Bai, Gang Bai. (août 2010). Establishment and application of a high-throughput model for screening alpha-glucosidase inhibitors. *Acta microbiologica sinica*. 50(8) : 1088–86.
- Merabti R.** (2006). Isolement et caractérisation de souches levuriennes amylolytiques à partir de sol saharien algérien. Thèse de Magistère. Université Mentouri Constantine.
- Mercier C.** (1985). Les enzymes amylolytiques. In Mauranch A & Costes C. (Ed): Hydrolase et polymerases. Ed. Gauthier Villars. : 109–142.
- Merín**, María Gabriela, María Carolina Martín, Kalliopi Rantsiou, Luca Cocolin, et Vilma Inés Morata de Ambrosini. (2015). Characterization of pectinase activity for enology from yeasts occurring in *Argentine bonarda* grape. *Brazilian journal of microbiology*. 46(3) : 815–823.
- Merja E.** Panttilä, Lars André, Markku Saloheimo, Päivi Lehtovaara, Jonathan K. C. Knowles. (1987). Expression of two *Trichoderma reesei* endoglucanases in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Wiley online library. 3(3):175–185.

- Metz J.**, Zalusky R. & Herbert V. (1968). Folic acid binding by serum and milk. *Amer. J. clin. Nutr.* 21: 289-297.
- Michelin M.**, Silva T.M., Benassi V.M., Peixoto-Nogueira S.C., Moraes L.A., Leao J.M., Jorge J.A., Terenzi H.F. and Polizeli Mde L. (2010). Purification and characterization of a thermostable α -amylase produced by the fungus *Paecilomyces variotii*. *Carbohydr. Res.* 345 (16): 2348-2353.
- Michelin**, Michele, Alexandre Maller, André Ricardo de Lima Damásio, Tony Marcio Da Silva, Richard John Ward, Izaura Yoshico Hirata, João Atilio Jorge, Héctor Francisco Terenzi, Maria Lourdes TM de Polizeli. (2009). Properties of a purified thermostable glucoamylase from *Aspergillus niveus*. *Journal of industrial microbiology & biotechnology.* 36(12) : 1439–1446.
- Milner J.A.**, Martin D.J. et Smith A., 1997. Two-stage inoculate for the production of alphaamylase by *bacillus amyloliquefaciens*. *Enzyme and microbial technology.* 21: 382-386.
- Miyakawa H.**, Kobayashi A., Shimamura S. & Tomita M. (1992). Purification and characterization of an aminopeptidase from *Lactobacillus helveticus* LHE-511. *J. Dairy Sci.* 75:27-35.
- Mohamed S. A.**, Afaf S. Fahmy, Tarek M. Mohamed. (2007). Carbohydrases in camel (*Camelus dromedarius*) pancreas, purification and characterization of glucoamylase, comparative biochemistry and physiology part B. *Biochemistry and molecular biology.* 140(1) : 73–80.
- Moller K.**, Sharif M. Z. and Olsson L. (2004). Production of fungal alpha-amylase by *Saccharomyces kluyveri* in glucose-limited cultivations. *J. Biotechnol.* 111: 311-318.
- Montaño**, Adriana M., Ngu Lock-Hock, Robert D. Steiner, Brett H. Graham, Marina Szlago, Robert Greenstein, Mercedes Pineda. (2016). Clinical course of sly syndrome (mucopolysaccharidosis type VII). *Journal of medical genetics.* 25(8) : 259-963.
- Moranelli F.**, Yaguchi M., Calleja G. B and Nasim A. (1987). Purification and characterization of the extracellular alpha-amylase activity of the yeast *Schwanniomyces alluvius*. *Biochem Cell Biol.* 65(10): 899-908.
- Moreira F.G.**, Veridiana L and Peralta R.M. (2004). A thermostable maltose-tolerant α -amylase from *Aspergillus tamarii*. *Journal of Basic Microbiology.* 44 (1): 29-35.
- Morgenstern I**, Powlowski J, Tsang A (2014) Fungal cellulose degradation by oxidative enzymes: from dysfunctional GH61 family to powerful lytic polysaccharide monoxygenase family. *Brief Funct Genomics* 13:471–481.
- Morvan J.** (2010). Marché européen des enzymes dans les applications alimentaires. M55B. <http://www.frost.com>.
- Moubasher**, Abdel-Aal H., Mady Ahmed Ismail, Nemmat A. Hussein, Hassan A. Gouda. (2016). Enzyme producing capabilities of some extremophilic fungal strains isolated from different habitats of Wadi El-Natrun, Egypt : Cellulase, xylanase and pectinase. *European journal of biological research.* 6(2) : 103–111.
- Moulin G.**, Galzi Dr. P. (1878). Remarque sur la régulation de la biosynthèse de l' α amylase de *Pichia burtonii* B. *Journal of basic Microbiology.* Volume 18, Issue 5 1978 Pages 329–333
- Moulin, G.**, et P. Galzy. (1978). Study of alpha-amylase of the cell wall of *Pichia Burtonii* Boidin. *Zeitschrift Für Allgemeine Mikrobiologie.* 18(4) : 269-74.
- MS Tanyildizi**; D Ozer; M Elibol. *Process Biochem.*, 2005, 40, 2291 – 2296.
- Muhammad Asif**, Nawaz, Asad Karim, Zainab Bibi, Haneef Ur Rehman, Afsheen Aman, Dilshad Hussain, Midrar Ullah, et Shah Ali Ul Qader. Maltase entrapment approach as an efficient alternative to increase the stability and recycling efficiency of free enzyme within agarose matrix. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers.*
- Murado**, M.A., Gonzalez, M.P., Torrado, A. and Pastrana, L.M. (1997). Amylase Production by Solid State Culture of *Aspergillus oryzae* on Polyurethane Foams. Some Mechanistic Approaches from an Empirical Model. *Process Biochemistry.* 32: 35-42.
- Mury**, Flávia Borges, José Roberto da Silva, Ligia Souza Ferreira, Beatriz dos Santos Ferreira, Gonçalo Apolinário de Souza-Filho, Jayme Augusto de Souza-Neto, Paulo Eduardo Martins Ribolla. (2009). Alpha-glucosidase promotes hemozoin formation in a blood-sucking bug : an evolutionary history. *journal of Pone Plos One.* 4(9) : 6966-6528.
- Musa, Marina**, Miroslav Radman, et Anita Krisko. (2016). Decreasing translation error rate in *Escherichia coli* increases protein function. *BMC biotechnology.* 16(2) : 28-59.
- N. Agnès.** (1986). Production de Protéines à partir de Lactosérum Brut, Thèse de 3ième cycle, Université de Lyon.
- Nadirman H.** and Yoshiyuki O. (2006). Mechanism of Hydrolysis of the Treated Starch Granules by Raw Starch Digesting Amylase from *Penicillium brunneum*, *Journal Starch Starke.* 7 : 25- 28.
- Nakais S.** and Modler H. W. (2000). Processing applications milk. *Ameri. J. clinical nutrition.* (59): 929-934.
- Nancy J. Moon.** (1983). Inhibition of the Growth of acidtolerant yeasts by acetate, lactate and propionate and their synergistic mixtures. *Journal of Applied Bacteriology.* 55: 453–460.
- Naumov**, G. I., M. Yu Shalamitskiy, et E. S. Naumova. (2016). New family of pectinase genes PGU1b–PGU3b of the pectinolytic yeast *Saccharomyces bayanus var uvarum*. In *doklady biochemistry and biophysics.* 467:89–91. Springer,

- Nawaz**, Muhammad Asif, Asad Karim, Afsheen Aman, Roberta Marchetti, Shah Ali Ul Qader, et Antonio Molinaro. (2015). Continuous degradation of maltose: improvement in stability and catalytic properties of maltase (α -glucosidase) through immobilization using agar-agar gel as a support. *Bioprocess and biosystems engineering*. 38(4) : 631-38.
- Needleman**, Richard B., Howard J. Federoff, T. Ross Eccleshall, Barbara Buchferer, et Julius Marmur. (2014). Purification and characterization of α -glucosidase from *Saccharomyces carlsbergensis*. *Biochemistry*. 17(22) : 4657–4661.
- Nguyen Q.D.**, Rezessy-szab J.M. et Hoschke D. (2000). Optimisation of composition of media for the production of amylolytic enzymes by *Thermomyces lanuginosus* ATCC 34626. *Food Technol. Biotechnol.* 38 (3) : 229-234.
- Niehaus F.**, Bertoldo C., Kahler M. et Antranikian G. (1999). Extremophiles as a source of novel enzymes for industrial application. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 50: 711-729.
- Nielsen J.E.**, Borchert T. V and Vriend .G. (2001). The determinants of α -amylase pH-activity profiles . *Protein Engineering, Oxford University Press*. 14 (7):505-512.
- Nigam J. N.**, Margaritis A. and Lachance M. A. (1985) Aerobic fermentation of D-xylose to ethanol by *Clavispora sp.* *Applied and Environmental Microbiology*. 50(4): 763-766.
- Nigam P.** et Singh D., 1995. Enzymes and microbial systems involved in starch processing.
- Nimpiboon, Pitchanan**, Santhana Nakapong, Rath Pichyangkura, Kazuo Ito, Piamsook Pongsawasdi. (2011). Synthesis of a novel prebiotic trisaccharide by a type I α -glucosidase from *B. licheniformis* strain TH4-2. *Process biochemistry*. 46(2) : 448–457.
- Nirmala**, M., et G. Muralikrishna. (2003). Three α -amylases from malted finger millet (Ragi, *Eleusine coracana*, Indaf-15), purification and partial characterization and novel alpha glucosidase from *Chaetomium thermophilum* var coprophilum. *Phytochemistry*. 62(1) : 21-30.
- Nouadri T.** (2011). L' α -amylase de *Penicillium camemberti* PL21: Production, Purification, nutrition. Tec. et doc. Lavoisier. 3ème édition : 116.
- Ogawa**, M, Nishio, T., Minoura, K, Uozumi, T, Wada, M, Hashimoto, N, Kawachi, R, Oku, T. (2006). Recombinant alpha.-glucosidase from *Aspergillus niger*, overexpression by *Emericella nidulans*, Purification and Characterization. *Journal of appliedglycoscience*. 53(1) : 13–16.
- Ognyanov**, Manol, Connie Remoroza, Henk A. Schols, Yordan Georgiev, Maria Kratchanova, Christo Kratchanov. (2016). Isolation and structure elucidation of pectic polysaccharide from rose hip fruits (*Rosa canina* L.). *Carbohydrate polymers*.
- Okuyama**, Masayuki, Masayuki Saburi, Yuya Kumagai, Atsuo Kimura, Haruhide Mori. (2015). Biochemical properties and substrate recognition mechanism of GH31 α -glucosidase from *Bacillus sp.* AHU 2001 with broad substrate specificity. *Biochimie*. 108(4) : 140–148.
- Okuyama**, Masayuki, Yoshihiro Tanimoto, Tatsuya Ito, Akiko Anzai, Haruhide Mori, Atsuo Kimura, Hirokazu Matsui, Seiya Chiba. (2005). Purification and characterization of the hyper-glycosylated extracellular α -glucosidase from *Schizosaccharomyces pombe*. *Enzyme and microbial technology*. 37(5) : 472–480.
- Olajuyigbe**, Folasade M., Chidinma M. Nlekerem, Olusola A. Ogunyewo. (2016). Production and characterization of highly thermostable α -glucosidase during the biodegradation of methyl cellulose by *Fusarium oxysporum*. *Biochemistry research international*. 58(8) : 256-658.
- Olivia**, Sandra N., Joost T. Van Dongen, Sanjeev C. Alfred, Ezaz A. Mamun, Xiaochun Zhao, Hargurdeep S. Saini, Sussan F. Fernandes. (2005). Cold-induced repression of the rice anther-specific cell wall invertase gene OSINV4 is correlated with sucrose accumulation and pollen sterility. *Plant cell & environment*. 28(12) : 1534-51.
- Olson**, Linda J., Ramiro Orsi, Francis C. Peterson, Armando J. Parodi, Jung-Ja P. Kim, Cecilia D'Alessio, Nancy M. Dahms. (2015). Crystal structure and functional analyses of the lectin domain of glucosidase ii: insights into oligomannose recognition. *Biochemistry*. 54(26) : 4097-4111.
- Olson**, Linda J., Ramiro Orsi, Solana G. Alculumbre, Francis C. Peterson, Ivan D. Stigliano, Armando J. Parodi, Cecilia D'Alessio, Nancy M. Dahms. (2013). Structure of the lectin mannose 6-phosphate receptor homology (mrh) domain of glucosidase ii, an enzyme that regulates glycoprotein folding quality control in the endoplasmic reticulum. *The journal of biological chemistry*. 288(23) : 16460-75.
- ÖNER ET.**(2006). Optimization of ethanol production from starch by an amylolytic nuclear petite *Saccharomyces cerevisiae* strain. *Yeast*. 23: 849-856.
- Orenga**, Sylvain, Céline Roger-Dalbert, John Perry, Vanessa Chantepedrix, Gilles Zambardi, Nathalie Bal. (2015). Medium for the specific detection of resistant microorganisms galactosidase from *Candida sp.* *Biochemistry*. 52(5) : 256-658.
- Oteng-Gyang K.**(1984). Introduction à la microbiologie alimentaire dans les pays chauds. Edition Technique et documentation, Paris.
- Ouédraogo N.**, Savadogo A., Zongo C., Somda K. M. A. and Traoré S. (2012). High performance amylolytic yeast strains isolation and identification for valorization of potatoes waste available in Burkina Faso. *Int. Food Res. J.* 19(4): 1463-1469.
- Ovaere**, Petra, Saskia Lippens, Peter Vandenabeele, Wim Declercq. (2009). The emerging roles of serine protease cascades in the epidermis. *Trends in biochemical sciences*. 34(9) : 453–463.

- Oyekanmi Nashiru**, Sukhoon Koh, Se-Yong Lee, Dae-Sil Lee. (July 2001). Novel α -glucosidase from extreme thermophile *Thermus caldophilus* GK24. *Journal of biochemistry and molecular biology*. 34(4) : 347-354.
- P. Asha**, Jose Divya, IS Bright Singh. (2016). Purification and characterisation of processive-type endoglucanase and glucosidase from *Aspergillus ochraceus* MTCC 1810 through saccharification of delignified coir pith to glucose. *Bioresource technology*. 58(8) : 256-968.
- P. J. Dias**, Isabel Sá-Correia. (2014). Phylogenetic and syntenic analyses of the 12-spanner drug : H+ antiporter family 1 (DHA1) in pathogenic *Candida* species, evolution of MDR1 and FLU1 genes. *Genomics* 104, n° 1: 45–57.
- P. Manzoni**, M. Mostert, E. Castagnola. (2015). Update on the management of *Candida* infections in preterm neonates. *Archives of disease in childhood-fetal and neonatal*. 100(5) : 454–459.
- Pagani**, Danielle M., Daiane Heidrich, Gustavo VB Paulino, Karine de Oliveira Alves, Paula T. Dalbem, Caroline F. de Oliveira, Zélia MM Andrade. (2016). Susceptibility to antifungal agents and enzymatic activity of *Candida haemulonii* and *Cutaneotrichosporon dermatis* isolated from soft corals on the Brazilian reefs. *Archives of microbiology*. 45(2) : 1–9.
- Palmer T. A.** (1975). Glucose syrups in food and drink. *Process Biochemistry* Baldwin P., Van E. C., Istasse L., Bienfait J.M., 1986. Fermentation en silos de laboratoire de pulpes de bettraves sucrières. *Belgian Journal of Food Chemistry and Biotechnology*. 98 :792-797.
- Panchal C.J.** (1990). Yeats strain selection. Marcel Dekker (ed) USA, : 189.
- Pandey A**, Nigam P, Soccol CR, Soccol, VT, Singh D, Mohan R. (2000). Advances in microbial amylases. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 31: 135–152.
- Pandey A**, Webb C., Soccol C.R. and Larroche C. (Eds). (2006). *Enzyme Technology*. Springer. Asiatech Publishers. New Delhi.
- Pandey Ajay Kumar**, Gnansounou Edgard, Sangeeta Negi. (2016). Optimization of concomitant production of cellulase and xylanase from *Rhizopus oryzae* SN5 through EVOP-factorial design technique and application in Sorghum Stover based bioethanol production.
- Parada J**, Aguilera J M. (2012). Effect of native crystalline structure of isolated potato starch on gelatinization behavior and consequently on glycemic response. *Food Research International*. 45: 238-243
- Pařenicová**, Lucie, Harry Kester, Jacques AE Benen, Jaap Visser. (2000). Characterization of a novel endopolygalacturonase from *Aspergillus niger* with unique kinetic properties. *FEBS letters*. 467(23) : 333–336.
- Park C.S.**, Chang C.C., Kim J.Y., Ogrydziak D.M., Ryui D.D.Y. (1997). Expression, secretion, and processing of rice Alpha-amylase in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *J. Biol.Chem.* 272 (11): 6876-6881.
- Parra-Ortega**, B., H. Cruz-Torres, L. Villa-Tanaca, C. Hernández-Rodríguez. (2009). Phylogeny and evolution of the aspartyl protease family from clinically relevant *Candida* species. *Memórias do instituto oswaldo cruz*. 104(3) : 505-12.
- Pascal B.** et Thomas-Jeffries W. (1990). Selective Production of Extracellular Peroxidases from *chryso sporium* in an Airlift Bioreactor, *Journal of fermentation and Bioengineering*. 70(3): 158-163.
- Patel**, Anil Kumar, K. Madhavan Nampoothiri, Sumitra Ramachandran, George Szakacs, Ashok Pandey. (2005). Partial purification and characterization of alpha-amylase produced by *Aspergillus oryzae* using spent-brewing grains. *Indian journal of biotechnology*. 4(4) : 336–341.
- Patyshakuliyeva A.**, Mark Arentshorst, Iris E. Allijn, Arthur F. J. Ram, Ronald P. de Vries, Isabel Benoit Gelber. (2016). Improving cellulase production by *Aspergillus niger* using adaptive evolution. *Biotechnology Letters*. 38(6) : 969–974.
- Paul**, Catherine J., Hans Leemhuis, Justyna M. Dobruchowska, Carl Grey, Linda Önnby, Sander S. van Leeuwen, Lubbert Dijkhuizen, Eva Nordberg Karlsson. (2015). A GH57 4- α -Glucanotransferase of hyperthermophilic origin with potential for alkyl glycoside production. *Applied microbiology and biotechnology*. 99(17) : 7101-13.
- Pedro Garcia-Martos**, Jose Mira-Gutierrez. (2005). Contribution to the knowledge of the enzymatic activity of yeasts of clinical interest. *Mycopathologia*. 132(1) : 9-13.
- Peixoto-nogueira S.C.**, Sandrim V.C., Guimarães L.H.S., Jorge J.A., Terenzi H.F. et Polizeli M.L.T.M. (2008). Evidence of thermostable amylolytic activity from *Rhizopus microsporus* and *Rhizopodiformis* using wheat bran and corncob as alternative carbon source, *Bioprocess and Biosystem Engineering*. 31: 329-334.
- Pérez-Brito D.**, Magaña-Alvarez A., Lappe-Oliveras P., Cortes-Velazquez A., Torres-Calzada C., Herrera-Suarez T., Larqué-Saavedra A. and Tapia-Tussell R. (2015). Genetic diversity of *Clavispora lusitaniae* isolated from *Agave fourcroydes* Lem, as revealed by DNA fingerprinting. *J Microbiol*. 53(1): 14-20.
- Peumans**, Willy J., Mirjam Czjzek, Annick Barre, Alain Roussel, Véronique Receveur-Bréchet, Els JM Van Damme, Pierre Rougé. (2006). Crystal structure at 1.45-Å resolution of the major allergen endo- β -1, 3-glucanase of banana as a molecular basis for the latex-fruit syndrome. *Proteins: structure, function, and bioinformatics*. 63(1) : 235–242.
- Pfaller**, Michael A. (2015). Application of Culture-Independent Rapid Diagnostic Tests in the Management of Invasive *Candidiasis* and *Cryptococcosis*. *Journal of Fungi* 1(2): 217–251.
- Pol D.** (1996). *Travaux pratiques de biologie des levures*. Guide de laboratoire. ellipses edition marketing S.A, Paris. 15 : 20-38, 42-57, 141-151.
- Powers**, David B., Peter Amersdorfer, Marie-Alix Poul, Ulrik B. Nielsen, M. Refaat Shalaby, Gregory P. Adams, Louis M. Weiner, James D. Marks. (1 mai 2001). Expression of single-chain Fv-Fc fusions in *Pichia pastoris*. *Journal of immunological methods*. 251(2) : 123-35.

- Prajapati, R. A.**, et B. V. Raol. (2014). Characterization of microbial flora isolated from human teeth carious lesions. *life sciences leaflets* 47.
- Prakash O.** and Jaiswal N. (2010). alpha-Amylase: an ideal representative of thermostable enzymes. *Appl Biochem Biotechnol.* 160(8): 2401-14.
- Prescott., Hartley., Klein. (1995).** Microbiologie 2ème édition Ed. De Boeck-Wesmael SA.P. 1014.
- Prieto José Antonio,** Bort Bernardo Roque, Martinez Javier, Randez-Gil Francisca, Sanz Pascual, and Buesa Carlos. (1995). Purification and characterization of a new α -amylase of intermediate thermal stability from the yeast *Lipomyces kononenkoae*. *Biochemistry and Cell Biology.*(1-2): 41-49.
- Prillinger Hansjorg,** Molnar Orsolya, Frieda Eliskases- Lechner and Ksenga Lapandic.(1999). Phenotypic and genotypic identification of yeast from cheese. *Antonie Van Leewenhock.* 75: 267-283.
- Priyanka Singh,** Venugopal, Talluri Venkateswara Rao, Allu Prasada Rao. (2016). Potential mosquito repellent compounds of *Ocimum species* against 3N7H and 3Q8I of *Anopheles gambiae*. *Biotech.* 6(1) : 1–8.
- Pytelkova,** Mizutani Kimihiko, Mayuko Toyoda, Yuichiro Otake, Soshi Yoshioka, Nobuyuki Takahashi, Bunzo Mikami. (2012). Structural and functional characterization of recombinant medaka fish alpha-amylase expressed in yeast *Pichia Pastoris*. *Biochimica et biophysica acta.* 1824(8) : 954-62.
- Qiaojuan Yan,** Chengwei, Qiaojuan Hua, Zhengqiang Jiang, Yinan Li, Priti Katrolia. (2006). High-level expression of a specific β -1, 3-1,4-glucanase from the thermophilic fungus *Paecilomyces thermophila* in *Pichia pastoris*. *Applied microbiology and biotechnology.* 88(2) : 509–518.
- Quezada-Calvillo,** Roberto, Meric Simsek, Jacquelin Juarez, Buford Nichols. (2015). Protein synthesis controls the activity of maltase-glucoamylase and sucrase-isomaltase in non-intestinal tissues. *The faseb Journal.* 29(1) : 596-18.
- R.Long,** Mingna Li, Tiejun Zhang, Junmei Kang, Yan Sun, Lili Cong, Yanli Gao, Fengqi Liu, Qingchuan Yang. (2016). Comparative proteomic analysis reveals differential root proteins in medicago sativa and medicago truncatula in response to salt stress. *Frontiers in plant science.* 7(5) : 25-96.
- Rababah,** Taha, Muhammad H. Alu'datt, Mohammad N. Alhamad, Sana Gammoh, Khalil Ereifej, Ayman Johargy, Stan Kubow, Ali M. Almajwal, Mervat Rawashdeh. (2015). Optimization of phenolic content, anti-oxidant and inhibitory activities of alpha-glucosidase and angiotensin converting (AC) enzymes from zingiber officinale Z. *International journal of food properties.* 7(8) : 54-66.
- Raimbault M.** (1981). Fermentation en milieu solide : Croissance de champignons filamenteux sur substrat amylicé. *Travaux et documents de L'O.R.ST.O.M. N°127, 273p.*
- Rajagopalan G,** Krishnan C. (2008). Alpha-amylase production from catabolite derepressed *Bacillus subtilis* KCC103 utilizing sugarcane bagasse hydrolysate. *Bioresour Technol.* 99 : 3044-3050.
- Ramesh,** Chandra, Rashmi Mishra. (2016). Purification and characterization of a-glucosidase from moss hyophilla nymmaniana (fleish.) menzel. *Asian journal of pharmaceutical and clinical research.* 9(1) : 179-82.
- Ranjan K.** and Sahay S. (2015). *Clavispora lusitaniae* produce pH and temperature tolerant extracellular amylase. *Point J. Bot. Microbiol. Res.* 1(1): 007-014.
- Ranjan,** Kamleh, Mansoor Ahmad Lone, Sanjay Sahay. (2016). Detergent compatible cold-active alkaline amylases from *Clavispora lusitaniae* CB13. *The journal of microbiology, biotechnology and food sciences.* 5(4) : 306-523
- Ranwala,** Anil P., William B. Miller. (2000). Purification and characterization of an endoamylase from tulip (*Tulipa gesneriana*) bulbs. *Physiologia plantarum.* 109(4) : 388–395.
- Rao R. S.,** Bhadra B. and Shivaji S. (2008). Isolation and characterization of ethanol-producing yeasts from fruits and tree barks . *Letters in Applied Microbiology.* 47(1): 19-24.
- Receveur,** Véronique, Mirjam Czjzek, Martin Schülein, Pierre Panine, Bernard Henrissat. (2002). Dimension, shape, and conformational flexibility of a two domain fungal cellulase in solution probed by small angle X-ray scattering. *Journal of biological chemistry.* 277(43) : 40887–40892.
- Reddy NS,** Nimmagadda A, Sambasiva Rao KRS. (2008). An overview of the microbial alpha-amylase family. *Afr. J. Biotechnol.* 2: 645-648.
- Regenboog,** Martine, André BP van Kuilenburg, Joanne Verheij, Dorine W. Swinkels, et Carla EM Hollak.(2016). Hyperferritinemia and iron metabolism in Gaucher Disease: potential pathophysiological implications. *Blood Reviews.*
- Regenboog,** Martine, André BP van Kuilenburg, Joanne Verheij, Dorine W. Swinkels, Carla EM Hollak. (2016). Hyperferritinemia and iron metabolism in Gaucher disease: potential pathophysiological implications. *Blood reviews.*
- Reiser, V.,** J. Gasperik. (1995). Purification and characterization of the cell-wall-associated and extracellular alpha-glucosidases from *Saccharomycopsis Fibuligera*. *The biochemical journal.* 308(3) : 753-60.
- Relan Anurag,** Hofman, Zonne LM, Sacha Zeerleeder, Christian Drouet, Bruce Zuraw, C. Erik Hack. (2016). Angioedema attacks in patients with hereditary angioedema: local manifestations of a systemic activation process. *Journal of allergy and clinical immunology.* 25(5) : 256-634.

- Restuccia**, Cristina, Serena Muccilli, Rosa Palmeri, Cinzia L. Randazzo, Cinzia Caggia, Giovanni Spagna. (2011). An alkaline alpha glucosidase isolated from an olive brine strain of *Wickerhamomyces anomalus*. FEMS yeast research. 11(6): 487-93.
- Rezki-Bekki Meriem Amina**, Laurent Benbadis, Gustavo DeBillierbeck, Zoubida Benbayer and Jean Marie François. (2013). Isolation and physiological characterization of indigenous yeasts from some Algerian agricultural and dairy products. Journal of Yeast and Fungal Research. 4(6): 75-83.
- Riken Yokohama**, Stephen A., Joseph J. Docola, Brian L. Strom, Sheri L. Smith, Douglas W. McPherson, Srdan G. Acimovic, Kier D. Klepzig. (2016). Effects of *grosmannia clavigera* and *leptographium longiclavatum* on western white pine seedlings and the fungicidal activity of alamo, arbotect, and tree-age. 25(2) : 256-652.
- Riviere J.** (1975). Les applications industrielles de la microbiologie. Collection Sciences agronomiques. Masson et Cie (ed.). 31-195.
- Ronald K.S.**, Harold S.L. (1970). Methods for the isolation of proteolytic marine bacteria. Appl. Microbiol. 20: 991–992. In: Shivanand P., Jayaraman G. (2009). Production of extracellular protease from halotolerant bacterium *Bacillus aquimaris* VITP4 isolated from Kumta coast. Process Biochem. 44: 1088–1094.
- Roovers Martine**, Wouters Johan, Bujnicki Janusz M. , Tricot Catherine, Stalon Victor, Grosjean Henri and Droogmans Louis. (2014). A primordial RNA modification enzyme: the case of tRNA (m1A) methyltransferase. Nucleic Acids Res. 32 (2): 465-476.
- Rudick M. J.**, Michael J., Alan D. Elbein. (2004). Glycoprotein enzymes secreted by *Aspergillus fumigatus*: purification and properties of α -glucosidase. Archives of Biochemistry and Biophysics. 161(1) : 281–290.
- Rudiger A.**, P. L. Jorgensen, and G. Antranikian. (1995). Isolation and characterization of a heat-stable pullulanase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus woesei* after cloning and expression of its gene in *Escherichia coli*. Applied and Environmental Microbiology. 61(2): 567-575.
- S. Aoufi** ; A. Agoumi ; R. Moutaj ; L. Balouch ; A. Bella ; B. Hassam. (2001). *candida lusitaniae* : un champignon opportuniste. maroc médical. 23(2) : 123-125.
- S. Blesa**, H. Chautard, M. Delcourt, L. Mesta. (2015). Brevet US9109210 - enhanced phytase variants - google brevets. *Candida Lusitaniae Enhanced Phytase Variants*.
- S. Garcia-Vallvé**, A. Romeu, J. Palau. (2000). Horizontal gene transfer of glycosyl hydrolases of the rumen fungi. Molecular biology and evolution. 17(3) : 352-61.
- S. Maicas**, José P. Guirao-Abad, Juan-Carlos Argüelles. (2016). Yeast trehalases: two enzymes, one catalytic mission. *Biochimica et biophysica acta (bba)-general subjects*. 25(5) : 325-523.
- S. Umamaheswari** et al. (2010) ,J. Chem. Pharm. Res. 2(4): 442-448.
- Sadettin**, Sevgil, Gönül Dönmez. Simultaneous bioaccumulation of reactive dye and chromium (VI) by using thermophil *Phormidium sp.* (2007). Enzyme and microbial technology. 41(1) : 175–180.
- Saha B. C.** and Bothast R. J. (1996). Production, purification, and characterization of a highly glucose-tolerant novel beta-glucosidase from *Candida peltata*. Appl. Environ. Microbiol. 62: 93165-3170.
- Saha**, Badal C., Shelby N. Freer, Rodney J. Bothast. (2013) Production, purification, and properties of a thermostable glucosidase from a color variant strain of *Aureobasidium pullulans*. Applied and environmental microbiology. 60(10) : 3774–3780.
- Saint-Paul F.**, Humbert G., Paquet D. & Linden G. (1984). Hydrolyse enzymatique de protéines laitières industriellement : incidences sur leur solubilité. Sci. Aliment. 4 : 259-264.
- Sainz, J.**, F. Pizarro, J. R. Pérez-Correa et E. Agosin. (2003). Modeling of yeast metabolism and process dynamics in batch fermentation. Wiley periodicals Inc. 818.
- Salafsky**, Ira S., Henry L. Nadler. (1971). Alpha-1,4 glucosidase activity in Pompe's disease. *The Journal of pediatrics*. 79(5) : 794-98.
- Saleem A.** et Mohsen K.H. Ebrahim. (2013). Production of amylase by fungi isolated from legume seeds collected in Almadinah Almunawwarah, Saudi Arabia. Journal of Taibah University for Science. 8(2) : 90–97.
- Sanchez OJ**, Cardona CA. (2008). Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. Bioresour Technol. 99: 5270-5295.
- Sandler**, Tamara, Orly Devary. (2016). Shortened secreted polypeptides. 4(52) : 252-356.
- Sanglard**, Dominique. (2016). Emerging threats in antifungal-resistant fungal pathogens. *Frontiers in medicine*. 3(52) : 253-365.
- Sanja**, Grbavčić, Darka Marković, Mirjana Rajilić-Stojanović, Mirjana Antov, Marina Šćiban, Ivanka Karadžić, Zorica Knežević-Jugović. (2015). Development of an environmentally acceptable detergent formulation for fatty soils based on the lipase from the indigenous extremophile *Pseudomonas Aeruginosa* Strain. Journal of Surfactants and Detergents. 18(3) : 383-95.
- Santos**, Renata O., Raquel M. Cadete, Fernanda Badotti, Adriane Mouro, Daniela O. Wallheim, Fátima C. O. Gomes, Boris U. Stambuk, Marc-André Lachance, et Carlos A. Rosa. (2010). *Candida Queiroziae* Sp. Nov. a Cellobiose-Fermenting Yeast Species Isolated from Rotting Wood in Atlantic Rain Forest . *Antonie van Leeuwenhoek*. 99 (3): 635-42.

- Santra**, Saikat, Jessie M. Cameron, Casper Shyr, Linhua Zhang, Britt Drögemöller, Colin J. Ross, Wyeth W. Wasserman. (2016). Cytosolic phosphoenolpyruvate carboxykinase deficiency presenting with acute liver failure following gastroenteritis. *Molecular genetics and metabolism*. 118(1) : 21–27.
- Sarawan**, Somporn, Polson Mahakhan, Sasitorn Jindamorakot, Kanit Vichitphan, Sukanda Vichitphan. (2013). Jutaporn Sawaengkaew *Candida konsanensis sp.*, a new yeast species isolated from *Jasminum adenophyllum* in Thailand with potentially carboxymethyl cellulase-producing capability. *World journal of microbiology and biotechnology*. 29(8) : 1481–1486.
- Sarikaya E.** and Gurgun V. (2000). Increase of the α -amylase yield by some *Bacillus* strains. *Turk J. Biol.*24: 299-308.
- Sasaki**, Fumito, Toshizumi Miyamoto, Yutaka Tamai, Takashi Yajima. (octobre 2015). Note on cordyceps brongniartii Shimazu collected from the wild in Japan. *Mycoscience*. 48(5) : 312-15.
- Satoshi**, Kitao, Toshiaki Ariga, Takanao Matsudo, Hiroshi Sekine. (1 janvier 1993). The Syntheses of Catechin-glucosides by transglycosylation with leuconostoc mesenteroides sucrose phosphorylase. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 57(12) : 20-15.
- Savcheko A.**, Vieille C., Kang S. et Zeikus J-C. (2002). Pyrococcus -amylase is stabilised by calcium and zinc .Department of biochemistry and molecular biology. University east Lausing. : 111-123.
- Saxena R. K.**, Dutt K., Agarwal L. and Nayyar P. (2007). A highly thermostable and alkaline amylase from a *Bacillus sp.* PN5. *Bioresource Technol.* 98: 260-265.
- Scheen**, André, Nicolas Paquot, Van Gaal, Luc F. (2008). Inhibition des recepteurs CB1 et metabolisme du glucose : rimonabant dans le diabete de type 2. *Revue médicale suisse*. 4(5) : 168-632.
- Schomburg D and Salzmann M.** (1991). *Enzyme Hand book 4. Classe3:Hydrolases*. Springer –Verlag (ed.). Berlin Heidelberg .Germany.: 1- 12.
- SchulzLiane**, Bernd Seger and Walther Burchard. (2000). Structures of cellulose in solution. *Macromolecular Chemistry and Physics*. 201(15):2008–2022.
- Scriban R.** (1984). *Biotechnologies. 2^{ème} édition. Techniques et Documentation-Lavoisier*.Paris. :531.
- Scriban R.** (1999). *Biotechnologie. 5eme édition. Technique et Documentation. Lavoisier*. Paris. :149-159.
- Seker S.**, Beyenal H. & Tanyolac A. (1999). Modeling milk-clotting activity in the continuous production of microbial rennet from *Mucor miehei*. *J. food sci.* 64 (3): 525-529.
- Senthilkumar. (2016). Production and kinetics of amylase from starch using mutant strain of *Bacillus sp* MTCC 1434.
- Serrat**, Manuel, Rosa C. Bermúdez, Tomás G. Villa. (2004). Polygalacturonase and ethanol production in *Kluyveromyces marxianus*. *Applied biochemistry and biotechnology*. 117(1) : 49–64.
- Shanmugam**, V., S. Sriram, S. Babu, R. Nandakumar, T. Raguchander, P. Balasubramanian, R. Samiyappan. (2001). Purification and characterization of an extracellular alpha-glucosidase protein from *Trichoderma Viride* which degrades a phytotoxin associated with sheath blight disease in rice. *Journal of applied microbiology*. 90(3) : 320-29.
- Shin K. S.**, Shin Y. K., Yoon J. H. and Park Y. H. (2001). *Candida thermophila sp. nov.*, a novel thermophilic yeast isolated from soil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51: 2167-2170.
- Shirai, Tsuyoshi**, Vo Si Hung, Katsuhito Morinaka, Tohru Kobayashi, Susumu Ito. (2008). Crystal structure of GH13 α -glucosidase GSJ from one of the deepest sea bacteria. *Proteins: structure, function, and bioinformatics*. 73(1) : 126–133.
- Shiraishi**, Keizo Yuasa. (2016). Comprehensive enzymatic analysis of the amylolytic system in yeast. *Scientific journal*. 58 (5) : 253-325.
- Shokhen**, Michael, Netaly Khazanov, Amnon Albeck. (2011). The mechanism of papain inhibition by peptidyl aldehydes. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*. 79(3) : 975–985.
- Siadat**, Seyed Omid Ranaei, Hamidreza Mollasalehi, Narjes Heydarzadeh. (2016). Substrate affinity and catalytic efficiency are improved by decreasing glycosylation sites in *Trichoderma reesei* cellobiohydrolase I expressed in *Pichia pastoris*. *Biotechnology letters*. 38(3) : 483–488.
- Sicard P.** (1982). Applications industrielles des enzymes. In : Les enzymes production et utilisation industrielles Durand G, Monson P. (Ed):. Ed. Gauthier-Villars. 121-164.
- Sieczko**, Karin Meisterl, Peter Peduzzi. (2016). Variable enzymatic activity . *Biochemis*. 5(2) : 25-36.
- Sikander Ali.**, Hameedullah Rafi., Ikram-Al-Haq . (2010). Production of an extracellular lipase from *Candida lipolytica* and Parameter significance analysis by plackett-burman design. *Engineering in Life Sciences*.10: 465–473.
- Sills A. M.**, Zygora P. S. J. and Stewart G. G. Characterization of *Schwanniomyces castellii* mutants with increased productivity of amylases. (1984). *Applied Microbiology and Biotechnology*. 20: 124-128.
- Silvana M.**, Mónaco, María E. Rodríguez, et Christian A. Lopes. (2016). *Pichia kudriavzevii* as a representative yeast of North Patagonian winemaking terroir. *International journal of food microbiology*. 230 : 31–39.
- Sim L.**, Roberto Quezada-Calvillo, Erwin E. Sterchi, Buford L. Nichols, David R. Rose. (2008). Human intestinal maltase–glucoamylase : crystal structure of the N-terminal catalytic subunit and basis of inhibition and substrate specificity. *Journal of molecular biology*. 375(3) : 782–792.
- Simitsopoulou**, Maria, Athanasios Chatzimoschou, et Emmanuel Roilides. (2016). Biofilms and Antifungal Susceptibility Testing. *Candida Species: Methods and Protocols*. : 183–197.

- Simon P. et Meunier R.** (1970). Microbiologie industrielle et génie biochimique. Masson ET Cie, Editeurs. Paris VIe. p : 31-47, 385-411.
- Singh Bahaderjeet, A. Kaur.** (2016). Antidiabetic potential of a peptide isolated from an endophytic *Aspergillus awamori*. Journal of applied microbiology. 120(2) : 301–311.
- Singh, B., et T. Satyanarayana.** (2015). Fungal phytases: characteristics and amelioration of nutritional quality and growth of non-ruminants. Journal of animal physiology and animal nutrition. 99(4) : 646-60.
- Singh, Poonam, Burhan Hamid, Mansoor Ahmad Lone, Kamlesh Ranjan, Asfaq Khan, Vinod K. Chaurse, Sanjay Sahay.** (2012). Evaluation of pectinase activity from the psychrophilic fungal strain *Truncatella angustata*-BPF5 for use in wine industry. Journal of endocytobiosis and cell research. 22 : 57–61.
- Singh, Priyanka, Ramesha H. Jayaramaiah, Sachin B. Agawane, Garikapati Vannuruswamy, Arvind M. Korwar, Atul Anand, Vitthal S. Dhaygude.** (2016). Potential dual role of eugenol in inhibiting advanced glycation end products in diabetes: proteomic and mechanistic insights. Scientific reports 6. 12(2) : 123-252.
- Singhania RR, Patel AK, Sukumaran RK, Larroche C, Pandey A** (2013) Role and significance of beta-glucosidases in the hydrolysis of cellulose for bioethanol production. Bioresour Technol 127:500–507.
- Sinnott, Michael L.** (1990). Catalytic mechanism of enzymic glycosyl transfer. Chemical Reviews. 90(7) : 1171–1202.
- Slimane C., Omar K. and BenAmar C.** Bacillus sp. (2015). R2 α -amylase production optimization: Pasta cooking water as medium of amylase production. 14(47): 3184-3189.
- Smitha Robinson Babysarojam, Sreedharan Sajith, Prakasan Priji, Kizhakepowathial Nair Unni, Trikaryoor Asokan Nidheesh Roy and Sailas Benjamin.** (2015). Purification and characterization of amylase from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*, Bt Research.6(3): 1-8.
- Song, Kyung-Mo, Masayuki Okuyama, Mariko Nishimura, Takayoshi Tagami, haruhide mori, Atsuo Kimura.** (2013). Aromatic Residue on $\beta \rightarrow \alpha$ Loop 1 in the Catalytic Domain Is Important to the Transglycosylation Specificity of Glycoside Hydrolase Family 31 α -Glucosidase. Bioscience, biotechnology, and biochemistry. 77(8): 1759-65.
- Soni S. K., Sandhu I. K., Bath K. S., Banerjee U. C. and Patnaik P. R.** (1996). Extracellular amylase production by *Saccharomycopsis capsularis* and its evaluation for starch saccharification. Folia Microbiol.41(3): 243-248.
- Soro Yade Rene** (2007). Purification et caractérisation de l'alpha-glucosidase du Suc Digestif de *Archachatina ventricosa* (*Achatinidae*). Application à la synthèse de polyglucosyl fructosides. L'institut National Des Sciences Appliquées de Toulouse. Thèse de Doctorat. N° d'ordre 890. 84.
- Sorokin Konstantin.** (2016). Leucocytospermie diagnostiquer les infections bactériennes. Médecine, santé le matériel de formation, leucocytospermie diagnostiquer les infections bactériennes. 8(5) : 203-301.
- Souza, Paula Monteiro de, Mona Lisa de Assis Bittencourt, Carolina Canelles Caprara, Marcela de Freitas, Renata Paula Coppini de Almeida, Dâmaris Silveira, Yris Maria Fonseca, Edivaldo Ximenes Ferreira Filho, Adalberto Pessoa Junior, Pérola Oliveira Magalhães.** (2015). A biotechnology perspective of fungal proteases. Brazilian journal of microbiology. 46(2) : 337–346.
- Spencer-Martins I. and Van Uden N.** (1979). Extracellular amyolytic system of the yeast *Lypomyces kononenkoae*. European Journal Applied Microbiology and Biotechnology, 1979, 6: 241-250.
- Srinivasa Rao M. Reddy G. Venkateswara Rao G and Sambasiva Rao K. R.S.**(2004). Studies on the extraction and characterisation of thermostable -amylase from pericarp of *Borassus indica*. African Journal of Biotechnology. 4 : 289-291.
- StamMark R., Danchin E. G. J., RancurelC., CoutinhoP. M. and HenrissatB.** (2006). Dividing the large glycoside hydrolase family 13 into subfamilies: towards improved functional annotations of α -amylase-related proteins. Oxford Journals. 19(12): 555-562.
- Stefanova M. and Emanulilova E.** (1992). Characterization of a thermostable α -amylase from *Bacillus brevis* Eu. J. Biochem.207(1): 345-349.
- Swentha S. K., Dhanya G., Kesavan M. N., Carlos R. S. et Ashak P.** (2007). Alpha amylase production by aspergillus oryzae employing sold-state fermentation. Journal of scientific and industrial research. vol.66: 621-626.
- Swetha Sivaramakrishnan, Dhanya Gangadharan, Kesavan Madhavan Nampoothiri, Carlos Ricardo Soccol and Ashok Pandey.** (2006). α -Amylases from Microbial Sources - An Overview on Recent Developments. Food Technol. Biotechnol. 44 (2): 173–184.
- Syed, Dastager G., Dayanand Agasar, et Ashok Pandey.** (2009). Production and partial purification of alpha-amylase from a novel isolate *Streptomyces Gulbargensis*. Journal of industrial microbiology & biotechnology. 36(2) : 189-94.
- Tadera, Kenjiro, Yuji Minami, Kouta Takamatsu, et Tomoko Matsuoka.** (2006). Inhibition of ALPHA.-Glucosidase and. α -Amylase by Flavonoids. Journal of nutritional science and vitaminology. 52(2) : 149–153.
- Takeuchi, Akiko, Akiko Shimizu-Ibuka, Yoshitaka Nishiyama, Kiyoshi Mura, Sanae Okada, Chiyoko Tokue, et Soichi Arai.** (2006). Purification and Characterization of an alpha-amylase of *Pichia Burtonii* isolated from the traditional starter “murcha” in Nepal. Bioscience biotechnology and biochemistry. 70(12) : 3019-24.
- Talamond P., Desseaux V., Moreau Y., Santimone M. et Marseillemouren G.** (2002). Isolation, characterization and inhibition by acarbose of the alpha-amylase from *Lactobacillus* fermentation: comparison with *Lb. Manihotivorans* and *Lb. Plantarum* amylases. CompBiochem. Physiology. Biochem. Mol Biol. 133(3): 351-60.

- Talantikite**, Kellil, Souad. (2015). Purification et caractérisation d'une enzyme coagulante d'origine microbienne pour application en fromagerie. 5(2) : 120-230.
- Tanaka A.**, and Ueda. M. (1993). Assimilation of alkanes by yeasts - functions and biogenesis of peroxisomes. Mycol. Res. 97: 10-44.
- Tanaka**, Yoshio, Tsunehiro Aki, Yuki Hidaka, Yûji Furuya, Seiji Kawamoto, Seiko Shigeta, Kazuhisa O. N. O., Osamu Suzuki. (2002). Purification and characterization of a novel fungal α -glucosidase from *Mortierella alliaeceae* with high starch-hydrolytic activity. Bioscience, biotechnology, and biochemistry. 66(11) : 2415–2423.
- Tapdiqov**, Shamo Zokhrab, Nizami Allahverdi Zeynalov, Dilgam Babir Taghiyev, Saadat Faik Humbatova, Samira Mirali Mammedova, Elnara Fakhraddin Nasiyyati, Dilshad Talib Babayeva. (2015). Hydrogels for immobilization of trypsin based on poly-n-vinylpyrrolidone and arabinogalactan graft copolymers. *J. Chem. Soc. Pak.* 37(6) : 1112.
- Tatsinkou F. B.**, Taveai F., Ndjouenkeui R. (2005). Production And Partial Characterisation Of A Thermostable Amylase From Ascomycetes Yeast Strain Isolated From Starchy Soils. African Journal Of Biotechnology. 4(1): 14-18.
- Tauzin**, Hélène, Gwena el Rolin, C eline Viennet, Philippe Saas, Philippe Humbert, Patrice Muret. (2014). A skin substitute based on human amniotic membrane. Cell and tissue banking. 15(2) : 257–265.
- Tchakam**, Patricia D., Paul K. Lunga, Th eodora K. Kowa, Antoine Honor e N. Lonfouo, Hippolyte K. Wabo, Léon A. Tapondjou, Pierre Tane, Jules-Roger Kuate. (2012). Antimicrobial and antioxidant activities of the extracts and compounds from the leaves of *Psorospermum aurantiacum*Engl and *Hypericum lanceolatum* Lam *Candida lusitaniae*. BMC complementary and alternative medicine. 12(1) : 1-23.
- Teodoro C.E.D.**, Martins M.L.L. (2000). Culture conditions for the production of thermostable amylase by *Bacillus* sp. Brazilian Journal of Microbiology. (31):28-302.
- Tetsuya Hiramoto**, Tetsuya, Mizuki Tanaka, Takanori Ichikawa, Yuka Matsuura, Sachiko Hasegawa-Shiro, Takahiro Shintani, Katsuya Gomi. (2014). Endocytosis of a maltose permease is induced when amylolytic enzyme production is repressed in *Aspergillus oryzae*. Fungal Genetics and Biology, the digestive fluid of the sea hare, aplusia kurodai : unique properties of two α -amylases and two α -glucosidases. FEBS Open Bio. 4 (2) : 560-70.
- Thakur**, Akhilesh, Roma Pahwa, Smarika Singh, Reena Gupta. (2010). Production, purification, and characterization of polygalacturonase from *Mucor circinelloides* ITCC 6025. Enzyme research. 25 (5) : 256-638.
- Thanh Vu Nguyen**. (2006). *Lipomyces orientalis* sp. Nov., a yeast species isolated from soil in Vietnam. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 56: 2009-2013.
- Theron**, Louwrens W., Benoit Divol. (2014). Microbial aspartic proteases: current and potential applications in industry. Applied microbiology and biotechnology. 98(21) : 8853–8868.
- Thongekkaew**, Jantaporn, Wanlee Patangtasa, et Apichat Jansri. (2014). Cellulase and xylanase production from *Candida easanensis* using agricultural wastes as a substrat. *Songklanakarin Journal of Science & Technology* 36, n o 6.
- Tibbot**, Brian K., Ronald W. Skadsen. (1996). Molecular cloning and characterization of a gibberellin-inducible, putative α -Glucosidase Gene from Barley. Plant molecular biology. 30(2) : 229-41.
- Tin C. S. F.**, Mawson A. J. (1993). Ethanol production from whey in a membrane recycle bioreactor. Process biochem. (28): 217-221.
- Tingting Tan**, Jue, Tingting Tan, Xiaodan Li, Licong Zhang, Xingjun Feng, Anshan Shan, Baojing Cheng. (2015). Recombinant secretory expression, purification and antimicrobial activity of PR39 in *Bacillus subtilis* using a maltose-inducible vector. Process biochemistry. 50(11) : 1767–1773.
- Torres**, Ernesto, Tania Volke-Sepúlveda, Gustavo Viniegra-González. (2013). Production of hydrolytic depolymerising pectinases. Food technology and biotechnology 44(2) : 221-320.
- Tran Phuong Lan**, Hyun-Ju Cha, Jin-Sil Lee, Sung-Hoon Park, Eui-Jeon Woo, Kwan-Hwa Park. (2014). Introducing transglycosylation activity in *Bacillus licheniformis*-amylase by replacement of His235 with Glu. Biochemical and Biophysical Research Communications. 45(4) : 541–547.
- Treesukon**, Treebupachatsakul, Hikaru Nakazawa, Hideaki Shinbo, Hiroki Fujikawa, Asami Nagaiwa, Nobuhiro Ochiai, Takashi Kawaguchi. (2016). Heterologously expressed *Aspergillus aculeatus* α -glucosidase in *Saccharomyces cerevisiae* is a cost-effective alternative to commercial supplementation of α -glucosidase in industrial ethanol production using *Trichoderma reesei* cellulases. Journal of bioscience and bioengineering. 12(1) : 27–35.
- Trystram G.**, Guenneugues P., Pigache S., Brenon M. & Bimbenet J.J. (1991). Optimisation du procédé industrielle de fermentation continue de levures sur lactos erums. E.N.S.I.A.- BEL Industrie-Biology.108.
- Tsuyoshi Shirai**, Vo Si Hung, Vo Si Hung, and Susumu Ito. (2008). Crystal structure of GH13 α -glucosidase GSJ from one of the deepest sea bacteria. Microbiology. 2(2) : 25-36.
-  U ceyler**, Nurcan, Lydia Biko, Dorothea Hose, Lukas Hofmann, Claudia Sommer. (2016). Comprehensive and differential long term characterization of the alpha-galactosidase a deficient mouse model of fabry disease focusing on the sensory system and pain development. Molecular pain. 12(2) : 250-630.

- Uitdehaag J.C.**, Mosi R., Kalk K.H., van der Veen B.A., Dijkhuizen L., Withers S.G and Dijkstra B.W. (1999). X-ray structures along the reaction pathway of cyclodextrin glycosyltransferase elucidate catalysis in the amylase family. *Nature Struct. Biol.* 6: 432–436.
- Van den Brink J**, de Vries RP (2011). Fungal enzyme sets for plant polysaccharide degradation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 91 :1477–1492.
- Van der Kaaij**, R. M., S. Janecek, M. J. E. C. van der Maarel, et L. Dijkhuizen. (2007). Phylogenetic and biochemical characterization of a novel cluster of intracellular fungal alpha-amylase enzymes. *Microbiology (reading, England)* 153(12) : 4003-15.
- Van Der Maarel MJ**, Van der Veen B., Uitdehaag J.C.M., Leemhuis H. et Dijkhuizen L. (2002). Properties and applications of starch converting enzymes of alpha amylase family. *Biotechnol.* 94 : 137-55.
- Van Zyl**, John Henry D., Riaan Den Haan, Willem H. Van Zyl. (2016). Overexpression of native *Saccharomyces cerevisiae* ER-to-Golgi SNARE genes increased heterologous cellulase secretion. *Applied microbiology and biotechnology.* 100 (1) : 505–518.
- Vasilios M. E.**, Andriotis, Gerhard Saalbach, Robbie Waugh, Robert A. Field, et Alison M. Smith. (2016). The Maltase involved in starch metabolism in barley endosperm is encoded by a single gene. *Plos one.* 11(3) : 151-642.
- Vassilios**, Ganatsios, Athanasios A. Koutinas, Argyro Bekatorou, Maria Kanellaki, Poonam Nigam. (2014). Promotion of maltose fermentation at extremely low temperatures using a cryotolerant *Saccharomyces cerevisiae* strain immobilized on porous cellulosic material. *Enzyme and microbial technology.* 66(3) : 56-59.
- Verdugo Valdez A.**, Segura Garcia L., Kirchmayr M., Ramírez Rodríguez P., González Esquinca A., Coria R. and Gschaedler Mathis A. (2011). Yeast communities associated with artisanal mezcal fermentations from Agave salmiana. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 100 (4) :497-506.
- Vertiani C.**, Maeder D-I., Yip K-S, Stilman T-J., Britten K-L., Rice D-H, Klump H. et Robb F-T. (1998). Protein thermostability above 100 °C a key role for ionic interaction. *Proc. Nat. Sci. USA.* 95 : 12300-12305.
- Veyradier**, Agnès, Paul Coppo. (2011). ADAMTS13, la protéase spécifique du clivage du facteur von Willebrand. *M/S-medicine sciences.* 27(12) : 1097.
- Vieille C and Zeikus J.G.** (2001). Hyperthermophilic enzymes: Sources, uses, and molecular mechanisms for thermostability. *Microbiology and molecular biology reviews.* 65(1) : 1-43.
- Viigand**, Katrin, Triinu Visnapuu, Karin Mardo, Anneli Aasamets, et Tiina Alamäe. (2016). Maltase protein of *Ogataea (Hansenula)* polymorpha is a counterpart to resurrected ancestor protein ancMALS of yeast maltases and isomaltases. *Yeast (Chichester, England).* 20(3) : 120-306.
- Viikari**, Liisa, Marika Alapuranen, Terhi Puranen, Jari Vehmaanperä, Matti Siika-Aho. (2007). Thermostable enzymes in lignocellulose hydrolysis. In *biofuels* springer. 121–145.
- Vijai K.**, Gupta, Ajit K. Passari, J. Beslin Joshi, Vineet K. Mishra, Sivakumar Uthandi, N. Ramesh, Vincent V. Leo, Ratul Saikia, Vijay C. Sonawane, et Bhim P. Singh. (2016). A novel triculture system (CC3) for simultaneous enzyme production and hydrolysis of common grasses through submerged fermentation. *Frontiers in microbiology.* 5(26) : 140-250.
- Vincent T.** Calabrese, Jason W. Minns, Arshad Khan. (2016). Suppression of α -Amylase inactivation in the presence of ethanol : Application of a two-step model. *Formulation and engineering of biomaterials.*
- Vinterová**, Zuzana, Miloslav Šanda, Jiří Dostál, Olga Hrušková-Heidingsfeldová, et Iva Pichová. (2011). Evidence for the presence of proteolytically active secreted aspartic proteinase 1 of *Candida parapsilosis* in the cell wall. *Protein Science.* 20(12) : 2004–2012.
- Voragen**, Fons, Henk Schols, Richard GF Visser. (2013). *Advances in pectin and pectinase research.* Springer.
- Waldor**, Matthew K., Laura Alvarez, Fernanda Delgado, Brigid M. Davis, Felipe Cava. (2016). A cell wall damage response mediated by a sensor kinase response regulator pair enables beta lactam tolerance. *Proceedings of the national academy of sciences.* 113(2) : 404–409.
- Walker G. M.** (2009). Yeast. In M. Schaechter, ed. *Desk Encyclopedia of microbiology.* 2nd ed. London : Elsevier/ Academic Press. : 1174-1187.
- Walker G.M.**, Wiley J and Chihhster S. (1997). *Yeast physiology and biotechnology.*
- Walker G.M.** (1998). *Yeast. Physiology and Biotechnology* John Wiley and Sons, Chichester.
- Wanderley K. J.**, Torres F. A. G., Moraes L. M. P., Ulhoa C. G. (2004). Biochemical characterization of α -amylase from the yeast *Cryptococcus flavus*. *Fems microbiology letters.* 231(2) : 165-169.
- Wang T.T., Lin L.L. and Hsu W.H. (1989).** Cloning and expression of *Schwanniomyces occidentalis* -amylase gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. and environmental microbiology.* 55(12) : 3167-3172.
- Wang**, Xu, Z. Lewis Liu, Scott A. Weber, et Xiaoping Zhang. (2016). Two new native β -glucosidases from *Clavispora nrrl y-50464* confer its dual function as cellobiose fermenting ethanologenic yeast. *Plos one.* 11(3) : 151-293.
- Wawron**, W., M. Bochniarz, M. Szczubiał. (2011). Enzymatic activity of yeasts isolated from the inflamed mammary secretion in dairy cows. *Polish journal of veterinary sciences.* 14(1) : 65–68.

- Werner**, Nicole, Thomas Hirth, Steffen Rupp, Susanne Zibek. (2015). Expression of a codon-optimized *carica papaya* papain sequence in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. Journal of microbial & biochemical technology. 6(21) : 236-632.
- Wolberg**, Alisa S., Zhi Hong Meng, Dougald M. Monroe III, Maureane Hoffman. (2004). A systematic evaluation of the effect of temperature on coagulation enzyme activity and platelet function. Journal of trauma and acute care surgery. 56(6) : 1221–1228.
- Wolf Klaus**. (1996). Nonconventional yeasts in biotechnology. A Handbook, springer, Berlin.
- Wong D.W.**, Batt S. B., Lee C. C., Robertson G. H. (2002). Increased expression and secretion of recombinant alpha-amylase in *Saccharomyces cerevisiae* by using glycerol as the carbon source. Journal of protein chemistry. 21 : 25-419.
- Wu Xue-Qiang**, Jun Wang, Zhi-Rong Lü, Hong-Min Tang, Daeui Park, Sang-Ho Oh, Jong Bhak, Long Shi, Yong-Doo Park, Fei Zou. (2010). Alpha-glucosidase folding during urea denaturation: enzyme kinetics and computational prediction. Applied biochemistry and biotechnology. 160(5) : 1341-55.
- Xiaowei**, Peng, Weibo Qiao, Shuofu Mi, Xiaojing Jia, Hong Su, Yejun Han. (2015). Characterization of hemicellulase and cellulase from the extremely thermophilic bacterium *Caldicellulosiruptor owensensis* and their potential application for bioconversion of lignocellulosic biomass without pretreatment. Biotechnology for biofuels. 8(1) : 1.
- Xie F.**, Shujing Q., Dehai L., Huan M., Feng L., Fuzhong Z., Guocan C. (2014). Purification and characterization of a novel α -amylase from a newly isolated *Bacillus methylotrophicus* strain P11-2. Process Biochemistry. 49 (1) : 47–53.
- Xu B.**, Hellman U., Ersson B., Janson J. C. (2000). Purification characterisation and aminoacid sequence analysis of a thermostable, low molecular mass endo- β -1,4-glucanase from blue mussel, *Mytilus edulis*. Euro. J. Biochem. 267 : 4970-4977.
- Xu Wang**, Z. Lewis Liu, Scott A. Weber, Xiaoping Zhang. (2016). Two new native β -glucosidases from *Clavispora* NRRL Y-50464 confer its dual function as cellobiose fermenting ethanologenic yeast. Plos one. 11(3) : 151-293.
- Xu, Hai-Wei**, Gui-Fu Dai, Gai-Zhi Liu, Jun-Feng Wang, Hong-Min Liu. (2007). Synthesis of andrographolide derivatives : a new family of alpha-glucosidase inhibitors. Bioorganic & medicinal chemistry. 15(12) : 4247-55.
- Xue Pei**, Junqi Zhao, Pengli Cai, Wenliang Sun, Jie Ren, Qiaqing Wu, Shihong Zhang, Chaoguang Tian. (2016). Heterologous expression of a GH3 α -glucosidase from *Neurospora crassa* in *Pichia pastoris* with high purity and its application in the hydrolysis of soybean isoflavone glycosides. Protein expression and purification. 119 : 75–84.
- Xue, Lin**, Cui-Ying Zhang, Xiao-Wen Bai, Dong-Guang Xiao. (2015). Effects of GLC7 and REG1 deletion on maltose metabolism and leavening ability of baker's yeast in lean dough. Journal of biotechnology. 20(9) : 1-6.
- Xuesong**, L. I. (2016). Proteines structure et fonctions. Université de Liège. 123-356.
- Yagar**, Hulya, Figen Ertan, Bilal Balkan. (2008). Comparison of some properties of free and immobilized alpha-amylase by *Aspergillus Sclerotiorum* in calcium alginate gel beads. Preparative biochemistry & biotechnology. 38(1) : 13-23.
- Yamaguchi**, Barry G., Andreas Pikiş, John Thompson. (2008). Evolution and biochemistry of family 4 glycosidases : implications for assigning enzyme function in sequence annotations. Molecular biology and evolution. 26(11) : 2487–2497.
- Yamamoto**, Natsuo, Steven M. Kerfoot, Andrew T. Hutchinson, Charles S. Dela Cruz, Naomi Nakazawa, Marian Szczepanik, Monika Majewska Szczepanik. (2016). Expression of activation-induced cytidine deaminase enhances the clearance of pneumococcal pneumonia : evidence of a subpopulation of protective anti-pneumococcal B1a cells. Immunology. 9(2) : 97–113.
- Yamasaki**, Yoshiki, Y Suzuki, Junji Ozawa, et Agric. (2007). Three forms of alpha-glucosidase and α glucoamylase from *Aspergillus awamori*. Phytochemistry. 66(8) : 851-57.
- Yanez E .**, Ballester N., Fernandez V and Monckeberg F. (1972). Chemical Composition of *C.utilis* and the Biological quality of the yeast protein, J. Sci. Food Agric. (23) : 581-586.
- Yang**, Chao-Hsun, Yu-Chun Huang, Cheng-Yu Chen, et Chia-Ying Wen. (2010). Heterologous expression of *Thermobifida Fusca* thermostable alpha-amylase in *Yarrowia Lipolytica* and its application in boiling stable resistant sago starch preparation. Journal of industrial microbiology & biotechnology. 37(9) : 953-60.
- Yasser R. Abdel-Fattah**, Nadia A. Soliman, Nabil M. El-Toukhy, Hamada El-Gendi, and Rania S. Ahmed. (2013). Production, purification, and characterisation of thermostable α -amylase produced by *Bacillus licheniformis*. Isolate AI20. Journal of chemistry. Article ID 673173 : 1-11.
- Yecheng, Sun**, Xuguo Duan, Lei Wang, et Jing Wu. (2016). Enhanced maltose production through mutagenesis of acceptor binding subsite in *Bacillus stearothermophilus* maltogenic amylase. Journal of biotechnology 217(4) : 53-61.
- Yihan L.**, Fuping L., Guanqun C., Crystal L., Snyder J., Sun YU L., Jianling W., Jing X. (2010). High-level expression, purification and characterization of a recombinant medium temperature a amylase from *Bacillus subtilis*. Biotechnology lett. 32 : 119–124

- Yo-Chia Chen**, Wan-Ting Chen, Jeng-Chen Liu, Li-Chu Tsai, Hsueh-Ling Cheng. (2014). A highly active beta-glucanase from a new strain of rumen fungus *Orpinomyces sp.* Y102 exhibits cellobiohydrolase and cellotriohydrolase activities. *Bioresource technology*. 170(4) : 513–521.
- Yoon**, Seung-Heon, et John F. Robyt. (2005). Activation and stabilization of 10 starch-degrading enzymes by triton X-100, polyethylene glycols, and polyvinyl alcohols. *Enzyme and microbial technology*. 37(5) : 556–562.
- Yoshikawa**, Kenji, Kazuya Yamamoto, et Shigetaka Okada. (1994). Classification of some α -glucosidases and α -xylosidases on the basis of substrate specificity. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*. 58(8) : 1392-98.
- Young**, L. Y., M. C. Lorenz, et J. Heitman. (2000). A STE12 homolog is required for mating but dispensable for filamentation in *Candida lusitanae*. *Genetics*. 155 (1) : 17-29.
- Young**, Laura Y., Christina M. Hull, et Joseph Heitman. (2013). Disruption of ergosterol biosynthesis confers resistance to amphotericin B in *Candida lusitanae*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 47(9) : 2717-24.
- Z. Gong**, Qian Wang, Hongwei Shen, Cuimin Hu, Guojie Jin, Zongbao K. Zhao. (2012). Co-fermentation of cellobiose and xylose by *Lipomycesstarkeyi* for lipid production. *Bioresource technology* 117 : (3) 20–24.
- Z. Lewis**, Bradley J., Russell E. Atkinson, et Dimitrios P. Kontoyiannis. (2012). *ClavisporaLusitanae* Fungemia in cancer patients: risk factors for amphotericin B failure and outcome. *Medical mycology*. 46(6) : 541-46.
- Z. Lewis**, et Michael A. Cotta. (2015). Technical assessment of cellulosic ethanol production using α -glucosidase producing yeast *Clavispora* NRRL Y-50464. *Bioenergy research*. 8(3) : 1203-11.
- Z. Lewis**, Liu Scott A. Weber, et Michael A. Cotta. (2013). Isolation and characterization of a α -glucosidase from a *Clavispora* Strain with potential applications in bioethanol production from cellulosic materials. *Bioenergy research*. 6(1) : 65-74.
- Zareian. S.**, Khairah, K., Ranjbar, B., Dabirmanesh, B., hollasi, M. and Mollania, N. (2010). Purification and characterization of a novel amylopullulanase that converts pullulan to glucose, maltose and maltotriose and starch to glucose and maltose. *Enzyme and microbial technology*. (46) : 57-63.
- Zeng**, Qingmei, Chunyan Wei, Jing Jin, Cong Wu, Boying Huang. (2011). Cloning of the gene encoding acid-stable alpha-amylase from *Aspergillus niger* and its expression in *Pichia pastoris*. *African journal of food science*. 5(12) : 668–675.
- Zenin**, Celia t., et Yong k. Park. (1993). Purification and characterization of acid α -amylase from *Paecilomyces sp.* *Journal of fermentation technology*. 61(1) : 109–112.
- Zhang D.**, Yanqing Luo, Shaohua Chu, Yuee Zhi, Bin Wang, Pei Zhou. (2016). Enhancement of cellulase and xylanase production using pH-shift and dissolved oxygen control strategy with *Streptomyces griseorubens*. *JSD-1*. 178(2) : 338-352.
- Zhang Hao**, Yuping Ran Dongming Li, Yongfang Liu, Yun Xiang, Ruifeng Zhang and Yaling Dai. (2010). *Clavispora lusitanae* and *Chaetomium atrobrunneum* as rare agents of cutaneous infection. *Mycopathologia*. 169(5) : 373-380.
- Zhang Juan**, Jun-Hui Cui, Tingting Yin, Lizhou Sun, Genxi Li. (2013). Activated effect of lignin on α -amylase. *Food chemistry*. 141(3) : 2229–2237.
- Zhang**, Cui-Ying, Hai-Yan Song, Xue Lin, Xiao-Wen Bai, Dong-Guang Xiao. (2015). Expression, purification and characterization of maltase from “quick” baker’s yeast. In *advances in applied biotechnology*. 33(3) : 265-75.
- Zhang**, Wenting, Huaning Yuan, Hui Tang, Li Wang, Haifeng Qian, et Xiguang Qi. (2015). An antimicrobial peptide screened from casein hydrolyzate by *Saccharomycescerevisiae* cell membrane affinity method. *Food control*. 50(3) : 413–422.
- Zheng-xin, He**, Jing Chen, Wei Li, Yan Cheng, Hai-pu Zhang, Li-na Zhang, et Tian-wen Hou. (2015). Serological response and diagnostic value of recombinant *candida* cell wall protein enolase, phosphoglycerate kinase, and β -glucosidase. *Frontiers in microbiology*. 12(4) : 125-358.
- Zhiwei**, Gong, Hongwei Shen, Wengting Zhou, Yandan Wang, Xiaobing Yang, Zongbao K. Zhao. (2015). Efficient conversion of acetate into lipids by the oleaginous yeast *Cryptococcuscurvatus*. *Biotechnology for biofuels*. 8(1) : 25-1.
- Zhou**, Hao, Cheng-Zhang Wang, Jian-Zhong Ye, Hong-Xia Chen, Ran Tao, et Yu-Si Zhang. (2015). Solid-state fermentation of Ginkgo biloba L. Residue for optimal production of cellulase, protease and the simultaneous detoxification of Ginkgo biloba L. residue using *Candida tropicalis* and *Aspergillus oryzae*. *European food research and technology*. 240(2) : 379–388.
- ZL, Liu**, Weber SA, Cotta Michael A, Zhong Li Shi. (2012). A new α -glucosidase producing yeast for lower-cost cellulosic ethanol production from xylose-extracted corncob residues by simultaneous saccharification and fermentation. 5(45) : 254-965.
- Zlir’a**. Fil.A.(2012). 1-6glucosidase reaction svg. Own work. 8(1) : 32-63.
- Zuzana Vinterová**, Miloslav Šanda, Jiří Dostál, Olga Hrušková-Heidingsfeldová, Iva Pichová. (2011). Evidence for the presence of proteolytically active secreted aspartic proteinase 1 of *Candidaparapsilosis* in the cell wall. *Protein science*. 20(12) : 2004–2012.

Annexes

Annexe 1 : Milieux de repiquage et de conservation des souches

○ *YPGA (Yeast Extract Peptone Glucose Agar)*

Utilisé pour la conservation de la souche. Il contient le glucose comme source de carbone.

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

○ *PDA (Potato Dextrose Agar)*

Utilisé pour l'adaptation de la souche à l'amidon.

- Extrait de pomme de terre : 1000ml
- Glucose : 20g
- Agar : 20g

Préparation de l'extrait de pomme de terre :

200g de pomme de terre non pelés, lavés et découpés en petits dès sont portés à ébullition dans un litre d'eau distillée pendant 1 heure. Ils sont ensuite écrasés, filtrés et l'extrait récupéré est complété à un litre d'eau distillée.

○ *Sabouraud*

Un flacon de 200ml du milieu Sabouraud a été fourni par le laboratoire Pasteur d'Alger.

- Eau distillée : 1000ml
- Glucose : 20g
- Agar : 15g
- Peptone : 10g

Annexe 2 : Milieux de la mise en évidence des activités enzymatiques

- ***YPMA (Yeast Peptone Maltose Agar)***
 - Extrait de levure : 15g
 - Peptone : 20g
 - Maltose : 20g
 - Agar : 20g
 - Eau distillée : 1000ml

- ***YPSA (Yeast Peptone Starch Agar)***
 - Extrait de levure : 15g
 - Peptone : 20g
 - Amidon : 20g
 - Agar : 20g
 - Eau distillée : 1000ml

- ***YPPA (Yeast Peptone Pectin Agar)***
 - Extrait de levure : 15g
 - Peptone : 20g
 - Pectine : 20g
 - Agar : 20g
 - Eau distillée : 1000ml

- ***YPCA (Yeast Peptone Cellulose Agar)***
 - Extrait de levure : 15g
 - Peptone : 20g
 - Cellulose : 20g
 - Agar : 20g
 - Eau distillée : 1000ml

- ***Gélose Caséinée***
 - Caséine : 100 g
 - Agar : 20 g
 - Eau distillée : 1000 ml. Stériliser par autoclavage à 115° C/ 10 min.

Annexe 3 : Préparation des réactifs révélateurs

- **Rouge Congo pour les milieux YPMA et YPCA**
 - 1% de poudre de Rouge Congo dans 100ml d'eau distillée.

- **Lugol pour le milieu YPSA**
 - Eau distillée : 100 ml
 - Iodure de potassium : 2 g
 - Iode métalloïde I₂ : 1 g

- **Lugol pour le milieu YPPA**
 - 1g de diode (I₂)
 - 5g d'iodure de potassium (KI)
 - Eau distillée : 330ml

Annexe 4 : Le dénombrement cellulaire par comptage sur la cellule de Thomas

Carré 3

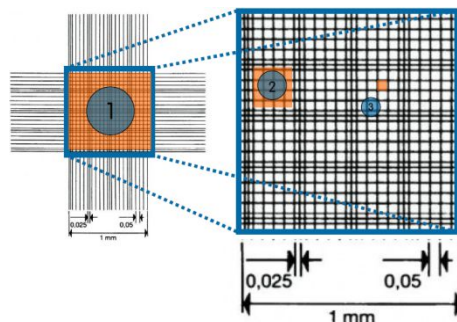
$$\text{Aire} = 0,05 \text{ mm} \times 0,05 \text{ mm} = 0,0025 \text{ mm}^2$$

$$\text{Volume} = 0,0025 \text{ mm}^2 \times 0,1 \text{ mm} = 2,5 \times 10^{-4} \text{ mm}^3 = 2,5 \times 10^{-7} \text{ ml}$$

$$[\text{Concentration cellulaire}] = \frac{\text{nombre de cellules comptées} \times \text{le facteur de dilution} \times \text{le facteur de conversion}}{\text{nombre de carrés} \times \text{le volume d'un carré}}$$

$$[\text{Concentration cellulaire}] = \frac{136 \times 10 \times 10^6}{128 \times 0.00025} = 42.5 \times 10^6 \text{ cellules/ml}$$

Pour une concentration cellulaire de $2 \cdot 10^6$ et par application numérique, nous aurons besoin de : 59 μl .



Annexe 5 : Milieux de production des enzymes dans les Erlen-Mayers

○ **Milieu de production complexe de l'alpha amylase**

Dans 500 ml de lactosérum (LAUNALAIT) traité, ajouter :

- Extrait de levure : 2.66 g/L
- Amidon : 2.66 g/L
- Solution de sels : 8.75 ml/L
 - ✓ KH_2PO_4 : 8.5g/100ml
 - ✓ K_2HPO_4 : 1.5 g/100ml
 - ✓ $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 5g/100ml
 - ✓ $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$: 1g/100ml
- Solution d'oligo elements : 4.3 ml/L
 - ✓ $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$: 0.0004g/100ml
 - ✓ $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$: 0.004g/100ml
 - ✓ KI : 0.001g/100ml
 - ✓ $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$: 0.002g/100ml
- Traitement de lactosérum :
 - ✓ Ajuster le pH du lactosérum à 4.6 avec l'ajout de NaOH 2N
 - ✓ Chauffer à 100°C pendant 45 minutes
 - ✓ Filtrer à l'aide du papier filtre whatman

Compléter le volume à 1000ml.

Annexe 6 : Méthodes de dosage

1. Dosage de l'activité amylasique

Les réactifs

✓ DNSA

- Dissoudre 1g d'acide 3,5-dinitrosalicylique dans 20ml de NaOH 2N et 50ml d'eau distillée.
- Ajouter 30g de tartrate double de sodium et de potassium.
- Compléter à 100ml avec de l'eau distillée.
- Filtrer et conserver à l'abri de la lumière dans un flacon fumé.

✓ **Substrat** : Dissoudre 1g d'amidon soluble dans 100ml de tampon phosphate pH5.

Protocole courbe étalonnage :

| | | | | | | |
|---|----|-----|-----|-----|-----|----|
| Concentration mg/ml | 0 | 0.4 | 0.8 | 1.2 | 1.6 | 2 |
| Solution mère maltose (2mg/ml) | 0 | 0.2 | 0.4 | 0.6 | 0.8 | 1 |
| Eau distillée (ml) | 1 | 0.8 | 0.6 | 0.4 | 0.2 | 0 |
| DNSA (ml) | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Incuber pendant 10 minutes à 100°C | | | | | | |
| Refroidir dans un bain de glace | | | | | | |
| Eau distillée (ml) | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 |
| Lire l'absorbance à 540nm | | | | | | |

Protocole expérimental

0.5 ml de l'extrait enzymatique dilué dans le tampon phosphate à pH5 est ajouté à 0.5 ml de la solution du substrat, après agitation le mélange est incubé à 40°C pendant 30 minutes avec un tube témoin représenté par le blanc. La réaction est arrêtée par l'addition de 1 ml d'acide 3,5 dinitrosalicylique (DNSA), suivie d'un chauffage à 100°C pendant 10 minutes. Après refroidissement dans un bain de glace, 10 ml d'eau distillée sont ajoutés. L'absorbance est déterminé à 540 nm contre le blanc.

2. Dosage de l'activité maltasique

Les réactifs

Réactif 1 : Tampon Tris pH= 7 100 mmol/l Solution tampon Phénol 0,3 mmol/l

Réactif 2 : Glucose oxydase 10 000 U/l - Enzymes Péroxydase 1000 U/l - Amino 4 - Antipyrine 2,6 mmol/l

Substrat : Dissoudre 1g de maltose soluble dans 100ml de tampon phosphate pH5.

Le protocole

- Dissoudre le lyophilisat R2 dans le tampon R1. Protéger de la lumière.
- Préparer la solution mère : 0,5ml extrait enzymatique + 0,5ml du substrat.
- Incubation 40°C pendant 30 min.
- 500 micros litre de la solution mère + 1 ml réactif
- Incubation 37°C pendant 10 min.
- Lire l'absorbance à 505 nm.

Protocole courbe étalonnage du glucose

- Ajouter 0.5 ml de l'extrait enzymatique dilué dans le tampon phosphate à pH5 à 0.5 ml de la solution du substrat.
- Agiter le mélange et incuber à 40°C pendant 30 minutes avec un tube témoin représenté par le blanc.
- Arrêter la réaction par l'addition de 1 ml d'acide 3,5 dinitrosalicylique (DNSA).
- Incuber au bain marie à 100°C pendant 10 minutes.
- Refroidir dans un bain de glace.
- Ajouter 10 ml d'eau distillée.
- Lire l'absorbance à 540 nm contre le blanc.

3. Dosage des protéines

Les réactifs

Réactif de Folin-ciocalteu commercial à diluer 3 fois dans l'eau distillée au moment de l'emploi.

Solution réactive

- Solution A : Na₂CO₃ à 2% dans NaOH 0.1 mol/dm³.
- Solution B : Tartrate double de Na et K à 20g/dm³.
- Solution C : Sulfate de cuivre CuSO₄, 5H₂O à 1%.

Préparation extemporanée de la solution réactive (M) en respectant l'ordre d'addition des réactifs et en agitant après chaque addition :

- Solution C : 0.5 cm³.
- Solution B : 0.5 cm³.
- Solution A : 50 cm³.

Le protocole

- Ajouter à 1ml d'échantillon, 5 ml de la solution M.
- Agiter et laisser reposer 10min à température ambiante.
- Ajouter 0,5 ml de réactif de Folin et agiter, laisser la réaction colorée se développer 30 min à l'obscurité.
- Lire l'absorbance à 650 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.

Protocole courbe étalon du BSA

| | | | | | | |
|--|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Solution étalon (ml) | 0 | 0.2 | 0.4 | 0.6 | 0.8 | 1 |
| Eau distillée (ml) | 1 | 0.8 | 0.6 | 0.4 | 0.2 | 0 |
| Agiter et attendre 10min à température ambiante | | | | | | |
| Réactif de Folin à 1/3 (ml) | 0.5 | 0.5 | 0.5 | 0.5 | 0.5 | 0.5 |

- Agiter immédiatement chaque tube.
- Lire l'absorbance contre le blanc de gamme à 650 nm.

Intitulé : Recherche de levures productrices d'enzymes glycolytiques exocellulaires et thermostables : Production (milieu solide et en batch) et caractérisation des enzymes produites.

L'objectif principal de cette étude est la sélection de levures productrices de deux enzymes thermostables. Un screening portant sur 02 souches de levures est réalisé sur milieu solide (Boîte de Pétri) pour la mise en évidence de 05 enzymes : α -amylase, maltase, pectinase, cellulase et protéase. Les deux souches testées : L5 et L10 (isolées d'écosystèmes arides, région de Biskra, Sud Algérien) sont cultivées sur un milieu à base de substrat inductible pour chaque enzyme. Ces milieux solides sont incubés dans une gamme de température allant de 40°C à 50°C. Après plusieurs jours de culture, les levures ont montré une bonne croissance et ont produit 02 enzymes amylolytiques (α -amylase et maltase dans l'intervalle de température 40 – 45°C) et la pectinase à 47 °C pour la L5. Cependant, la souche L5 s'avère plus performante. D'après l'identification faite par le laboratoire, la souche L5 s'apparente à la levure *Clavispora lusitaniae*. La souche est ensuite cultivée en batch sur un milieu à base de lactosérum acide à 100% (déprotéiné, enrichi et supplémenté de substrats inducteur pour l' α -amylase et la maltase) pour suivre la cinétique d'excrétion des deux enzymes dans les conditions suivantes : 50 ml de milieu de lactosérum déprotéiné, ajusté à pH 5, mis en Erlen-Meyers de 250 ml et incubé à 40° C et sous une agitation 100 rpm. Les résultats montrent que les deux enzymes ne sont pas synthétisées en même temps : **24 heures** pour l' α -amylase à **1545.85 U** et **60 heures** pour la **maltase** à **144.8 U**. Ce résultat indique que les deux enzymes ne sont pas associées en un complexe binaire. Cette hypothèse doit être vérifiée par l'électrophorèse PAGE et SDS PAGE. L'étude des effets du pH et de la température sur les deux enzymes révèle que l' α -amylase produite par *Clavispora lusitaniae* est active dans un intervalle de pH de 5 - 6.5 et dans un intervalle de température de 65 - 80°C, avec des optimums respectifs à **pH 6** et à **70° C**. Quand à la **maltase**, elle est active dans une plage de pH de 4.5 - 6 et de température de 75 - 90°C, avec des optimums respectifs à **pH 5** et à **80°C**. Les deux enzymes amylolytiques ont subi un traitement thermique pendant 120min à différentes températures : 70, 80,90 et 100°C. A 80°C, les demi-vies sont supérieures à 120min pour les deux enzymes. A 100°C, l' α -amylase a une **demi-vie de 120min** et la **maltase** possède une stabilité moindre, avec une **demi-vie de 90min**. L' α -amylase de *Clavispora lusitaniae* semble donc être plus stable que la maltase produite par la même souche. Avec ces quantités appréciables d'enzymes et ces propriétés physico-chimiques exceptionnelles, l' α -amylase et la maltase de la levure *Clavispora lusitaniae* peuvent être utilisés en industries pharmaceutique ou autres après leur purification et leur immobilisation pour les rendre encore plus stables et les recycler en fin de processus.

Mots clés : levure, *Clavispora lusitaniae*, α -amylase, maltase, thermostabilité, écosystèmes arides

Laboratoire de recherche : Laboratoire de Génie Microbiologie et Applications (GMA)

Devant le Jury :

Président : BENHAMDI A.

Encadreur : MERAIHI Z.

Co-encadreur : DAKHMOUCHE S.

Examinatrice : BENNAMOUN L.

MC.B, Université Frères MENTOURI Constantine

Professeur, Université Frères MENTOURI Constantine

M.A.A., ENS, Université Constantine 3

M.A.A.Université Frères MENTOURI Constantine