



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

**MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE**



Université des Frères Mentouri Constantine
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

جامعة الإخوة منتوري قسنطينة
كلية علوم الطبيعة و الحياة

Département : Biochimie / Biologie Cellulaire et Moléculaire

قسم : التثبيات الحيوية..

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 de la nutrition et santé.*

Thème

**Production et caractérisation d' α -amylase de
Clavispora lusitaniae et *Pichia guilliermondii* isolés
de blé cultivé et stocké en zones arides**

Présenté et soutenu par : AOUGEUB Soundes

Le : 04/07/2018

LAHRECHE Farida

Jury d'évaluation

Présidente du jury : BENNAMOUN L.

M.C.B., Université Frères MENTOURI Constantine.

Encadreur : DAKHMOUCHE S.

M.C.A., ENS Assia DJEBAR, Constantine

Examineur LABBANI F-Z K.

M.C.B., ENS Assia DJEBAR, Constantine

Année universitaire 2017 - 2018



****Remerciement****

En préambule à ce mémoire nous remerciant ALLAH qui nous aide et nous donne la patience et le courage durant ces longues années d'étude.

Nous souhaitant adresser nos remerciements les plus sincères aux personnes qui nous ont apporté leur aide et qui ont contribué à l'élaboration de ce mémoire ainsi qu'à la réussite de cette formidable année universitaire.

Ces remerciements vont tout d'abord au corps professoral et administratif de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, pour la richesse et la qualité de leur enseignement et qui déploient de grands efforts pour assurer à leurs étudiants une formation actualisée.

Nous tenant à remercier sincèrement notre encadreur Madame Djekrif-Dakhimouche S. Docteur à l'université de Constantine, qui en tant que Directeurs de mémoire, qui a toujours été à l'écoute et très disponible tout au long de la réalisation de ce mémoire, ainsi pour l'inspiration, l'aide et le temps qu'elle a bien voulu nous consacrer et sans qui ce mémoire n'aurait jamais vu le jour.

Grand et respectueux remerciement va au Dr Bennamoun L. d'avoir accepté de présider le jury de notre mémoire

A l'examinatrice Labbani Fatima-Zohra-Kenza, nous somme fière que vous avez accepté d'examiner et de juger notre travail

Enfin, que tous ceux qui nous ont accordé un soutien, une aide technique ou un conseil, tous ceux qui étaient à nos côtés au cœur de cette expérience trouvent ici l'expression de notre profonde reconnaissance.

****Merci****

***** Dédicaces *****

C'est avec profonde gratitude et sincères expressions que je dédie cet humble et modeste travail de fin d'études à : Ma très chère maman «Zina» source de tendresse, de joie et d'affection, celle qui a toujours été là pour moi. Ainsi que mon cher père «Salim» qui a toujours été à mes côtés et m'a épaulé dans les moments difficiles.

Merci pour ce que vous m'avez inculqué, pour tous les sacrifices que vous avez convertis pour moi.

A mes Précieuse sœur et frères «Aymen, Kalipsou et Kawtar» qui mes toujours donné le sourire malgré les moments difficiles ,ainsi que « Latifa et Amira, Fatima , Amel ,Aya » .Mes chères cousines.

.A mes adorables amies que j'aime tellement fort « Mima ,Imenou ,Zanouba, Zahra, Hakima », qui ont toujours étaient là pour moi, que serait ma vie sans vous..

A ma collègue «Fifita » qui a partagé ce travail avec moi et qui a été devenu ma meilleurs amie.

A toutes ma famille.

A toutes la promotion de biochimie de la nutrition de l'année 2017-2018.

*****Soundous*****

**** Dédicace ****

Avec tout mon amour éternel et avec l'intensité de mes émotions.

Je dédie ce modeste travail :

A l'âme de mon cher père Ismail, source de mon inspiration dans la vie, j'espère que tu habites les paradis

A ma chère mère Yamina pour son soutien incroyable durant la période de rédaction, je n'oublie pas ses sacrifices, l'amour qui m'a donné, pour leur encouragement : je vous souhaite la joie et de bonne santé.

A mes chères sœurs Nassima et Mira et à mon cher frère Salah

Vous vous êtes dépensés pour moi sans compter. Je vous souhaite une bonne santé et vie pleine de plaisir et de réussite

A tous les oncles et tantes et toute la famille

A mes chères cousines Houda, Imen, Sihem, Ahlem, Nawal, Thoraya, Wafa, Rahma et la petite Nour et à mes chers cousins

pour leurs soutien morale

A mes chères amies Imene, Oumaima, Zayneb, Kenza, safa, ma moitié Chouchou

A mon amie proche et ma chère sœur « Sondousa », je suis heureuse d'avoir complété la dernière lettre de mon étude avec vous.

A tous la promotion 2018 De la 2ème master biochimie de la nutrition et santé

A tous ceux m'ont aidé de prêt ou de loin.

**** Farida ****

Liste des abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Introduction.....	1

Chapitre 1 : Les levures

1-Généralité.....	3
2-Taxonomie du modèle biologique.....	4
2.1- <i>Clavispora lusitaniae</i>	4
2.2- <i>Pichia guilliermondii</i>	5
3-Caractéristiques des levures.....	5
3.1- Caractéristique écologiques.....	5
3.2- Caractéristique biologiques	6
3.3- Caractéristique nutritionnelles.....	8
3.4- Caractéristique physiologiques	10
4-Classification biologique.....	12
5-Biotechnologie et levures	12

Chapitre 2 : α -amylase

1-Introduction.....	16
2-Définition.....	16
3-Structure de l' α -amylase.....	16
4- production d'enzyme amylolitique levurienne.....	17
5-Origine de l' α -amylase.....	18
5.1-Origine animale.....	18
5.2-Origine végétale.....	18
5.3-Origine microbienne.....	18
6.Carctérisation de l' α -amylase.....	19
7.Production de l' α -amylase.....	20
7.1-Composition du milieu de culture.....	20
7.2-Température.....	21
7.3-pH.....	21

7.4-Temps de l'incubation.....	21
8-Mode d'action.....	21
9-Intérêt et utilisation industrielle.....	22

Chapitre 3 : Matériel et méthodes

1-Matériel.....	24
2-Matériel biologique.....	25
3-Mise en culture.....	25
3.1-Réactivation des souches.....	27
3.2-Repiquage des souches.....	27
3.3-Identification des souches.....	27
3.3.1-Identification phénotypique des souches.....	27
3.3.2-Identification génotypique des souches.....	28
3.4-Dénombrement des cellules.....	28
4-Milieu de production.....	28
4.1-Lactosérum.....	28
4.2-Origine de lactosérum.....	28
4.3-Traitement de lactosérum.....	29
5-Fermentation.....	29
6-Méthodes de dosage.....	29
6.1-Dosage de l'activité α -amylasique.....	29
6.2-Dosage des protéines (méthode de Lowry 1951).....	31
7-Purification de l' α -amylase.....	32
7.1-Précipitation des protéines.....	32
7.2-Chromatographie gel filtration.....	33
8-Détermination des propriétés physico-chimiques de l' α -amylase.....	34
8.1-Détermination du pH optimum.....	34
8.2-Détermination de la température optimale.....	34
8.3-Etude de la thermostabilité enzymatique.....	34
8.4-Effet de différents sels sur l'activité enzymatique.....	34

Chapitre 4 : Résultats et discussion

1-Etude des souches levuriennes	35
1.1-Caractères morphologique.....	35
1.2-Caractères microscopique.....	36
2-Identification des souches levuriennes	36
3-Production de l' α -amylase par <i>Pichia guilliermondii</i> et <i>Clavispora lusitaniae</i>	37
3.1-Détermination de la composition biochimique du lactosérum.....	37
3.2-Production de l' α -amylase après fermentation à 30°C pendant 48 ^h	39
4-Purification des enzymes.....	40
5-Détermination des caractères physico-chimiques des enzymes.....	43
5.1-Détermination du pH optimum.....	43
5.2-Détermination de la température optimale.....	44
5.3-Thermostabilité enzymatique.....	46
6-Effet des sels sur l'activité enzymatique de l' α -amylase de <i>Clavispora lusitaniae</i> , <i>Pichia guilliermondii</i> et l' α -amylase commercial.....	50
Conclusion et perspective.....	53
Abstract	
ملخص	
Références	

ABBREVIATIONS

Sp : Species (espèce).

pH : Potentiel hydrogène.

CO₂ : Dioxyde de carbone.

YPGA: Yeast Extract Peptone Glucose Agar.

Abs : Absorbance .

Min : Minute .

ml : Millilitre .

DNSA : 3,5- dinitrosalicilique acide.

Nm : Nano mètre .

Mg : Milligramme.

Rpm : Revolutions per minute (tours par minute).

UI : Unité interationale.

H : Heure .

G : Gramme .

Liste des figures

Figure 1 :	Filamentisation des levures.	6
Figure 2 :	Bourgeonnement de levure.	7
Figure 3 :	Reproduction sexuée des levures.	7
Figure 4 :	Schéma représentant l'utilisation des levures dans l'industrie.	13
Figure 5 :	Structure d' α -amylase.	16
Figure 6 :	L'action de l' α -amylase sur l'amidon en rouge.	22
Figure 7 :	Etapes de la préparation de la suspension des cellules de levures pour la fermentation.	26
Figure 8 :	Courbe étalon du maltose.	30
Figure 9 :	Courbe étalon des protéine.	32
Figure 10 :	Dispositif de chromatographie sur gel filtration .	33
Figure 11 :	Caractères morphologiques de <i>Clavispora lusitaniae</i> ABS7 et <i>Pichia guilliermondii</i> sur YPGA.	35
Figure 12 :	Caractères microscopiques de <i>Clavispora lusitaniae</i> ABS7 et <i>Pichia guilliermondii</i> .	36
Figure 13 :	Production de l' α -amylase chez <i>Clavispora lusitaniae</i> et <i>Pichia guilliermondii</i> .	39
Figure 14 :	Profil chromatographique de l' α -amylase de <i>Clavispora lusitaniae</i> sur Séphadex G75	42
Figure 15 :	Profil chromatographique de l' α -amylase de <i>Pichia guilliermondii</i> sur Séphadex G75.	42
Figure 16 :	Etude du pH sur l'activité de l' α -amylase de <i>Clavispora lusitaniae</i> , <i>Pichia guilliermondii</i> et l' α -amylase commerciale.	43
Figure 17 :	Etude de la température sur l'activité de l' α -amylase de <i>Clavispora lusitaniae</i> ; <i>Pichia guilliermondii</i> et l' α -amylase commerciale .	45
Figure 18 :	Etude de la thermostabilité sur l' α -amylase de <i>Clavispora lusitaniae</i> (a), <i>Pichia guilliermondii</i> (b) et l'enzyme commercial(c).	46
Figure 19 :	Effet de quelques sels sur l'activité α -amylasique produit par <i>Clavispora lusitaniae</i> (a) , <i>Pichia guilliermondii</i> (b)et l'enzyme commercial(c).	50

Listes des tableaux

Tableau 1 :	Sources de carbones pouvant être utilisées par les levures.	8
Tableau 2 :	Importance de certains oligoéléments et vitamines pour la croissance des levures.	10
Tableau 3 :	Quelques enzymes et protéines recombinantes synthétisées par des levures utilisées en thérapie.	15
Tableau 4 :	Production d'enzyme amylolytiques par des levures.	17
Tableau 5 :	Caractéristiques physico-chimiques de quelques espèces productrices d' α -amylase.	19
Tableau 6 :	Utilisation de l' α -amylase.	23
Tableau 7 :	Matériel et Réactifs.	24
Tableau 8 :	Dosage de l'activité enzymatique du maltose.	30
Tableau 9 :	Caractères morphologiques macroscopiques et microscopiques de <i>Cl. lusitaniae</i> et <i>P. guilliermondii</i> .	35
Tableau 10 :	Etude physico-chimique du lactosérum doux et acide.	38
Tableau 11 :	Différents milieux de fermentation pour la production de l' α -amylase.	40
Tableau 12 :	Purification de l' α -amylase produite par <i>Clavispora lusitaniae</i> et <i>Pichiaguilliermondii</i>	41

Au cours des dernières années, on s'est intéressé de plus en plus à la revalorisation et la conversion de déchets et de sous produits, issus de la transformation alimentaire, en produits utiles tels que les protéines de levure et les enzymes. Différentes études se sont intéressées à la production d'enzymes industrielles en utilisant les déchets agroalimentaires comme la production de l' α -amylase en utilisant le lactosérum (Djekrif et al., 2016 et 2014), les déchets de dattes (Ait Kaki et al., 2016) et les déchets d'oranges (Nouadri, 2012 ; Dakhmouche et al., 2006, Bennamoune et al., 2004), la production de la pullulanase sur un milieu à base de lactosérum (Djekrif et al., 2016 et 2014), et la production de la polygalacturonase en valorisant les déchets de tomate (Bennamoune, 2017 et 2016). La récupération de tels sous-produits ou déchets peut réduire considérablement le coût de la production d'enzymes et contribuer à l'assainissement de l'environnement.

Les α -amylases sont parmi les enzymes les plus importantes et représentent environ 30% de la production mondiale d'enzymes (Kandra, 2003 ; Ekka et al., 2018) et 56% du marché des enzymes dans le monde (Van der Maarel et al., 2002). Ces enzymes se trouvent dans les animaux, les plantes, les bactéries et les champignons. Les amylases provenant de plantes et de sources microbiennes ont été utilisées pendant des siècles dans l'industrie brassicole. Les amylases fongiques sont largement utilisées pour la préparation d'aliments orientaux (Mabel et al 2006). Et bien que :- La première enzyme produite industriellement était une α -amylase de source fongique utilisée, en 1894, comme auxiliaire pharmaceutique pour le traitement des troubles digestifs (Pandey et al., 2000).

-différents types de micro-organismes comme les bactéries, les champignons et les levures ont été rapportés comme source d' α -amylase et leurs propriétés sont décrites (Gupta et al., 2008).

-Il existe de nombreuses sources microbiennes disponibles pour la production d' α -amylase : les souches du genre *Bacillus*, les plus couramment utilisées *B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens* et *A. niger* ont la capacité de produire de grandes quantités d' α -amylase. Elles produisent environ 60% des enzymes disponibles sur le marché. Et l'amylase thermostable la plus largement utilisée dans les industries de l'amidon est produite par *Bacillus subtilis* et *Bacillus mesentericus*.

Cependant, les α -amylases microbiennes (bactériennes et fongiques) sont de plus en plus étudiées en raison de la facilité relative de production à grande échelle (faible coût car elles sont de nature extracellulaire) par rapport aux amylases des plantes et des animaux, et la demande de l'augmentation de leur production est en continue. Aussi ces enzymes répondent aux demandes industrielles; un grand nombre d'entre eux sont disponibles dans le commerce; et ils ont presque complètement remplacé l'hydrolyse chimique de l'amidon dans l'industrie de transformation de

l'amidon et de leur grande importance dans les applications biotechnologiques industrielles (industries alimentaires, de brassage, textiles, détergents et pharmaceutiques (**Ashis et al., 2009**)). En plus, en industrie, la diversité des applications crée la nécessité de chercher de nouvelles α -amylases avec de nouvelles et meilleures propriétés. Et pour toutes ces raisons et pour améliorer l'économie (diminution du coût de l'importation des enzymes), il serait intéressant de produire les enzymes à partir des microorganismes (levures) locaux. Pour cela, nous avons choisis l'étude de l' α -amylase, en utilisant le lactosérum. Ce déchet agroalimentaire constitue 90% du volume du lait (**Linden et Lorient, 1994**), il est riche en glucides et en protéines donc il constitue un milieu favorable pour la croissance des micro-organismes et la production enzymatique. Sa valorisation permet de réduire le coût de la production d'enzymes et aide à résoudre le problème de son élimination. Cette production est réalisée par des levures car peu d'études ont été réalisées sur la production d'enzymes amylolytiques par les levures.

Notre étude consiste, premièrement, à la production, en batch, de l' α -amylase par deux levures ; *Clavispora lusitniae* et *Pichia guilliermondii* isolées à partir du blé de zone aride et deuxièmement, à l'étude et à la comparaison des caractères physico-chimiques des deux enzymes levuriennes ainsi qu'une α -amylase commerciale.

Préambule

Depuis longtemps, la production industrielle des métabolites (enzymes) s'effectuait par des souches bactériennes telles que l'espèce : *Bacillus sp*, par des souches fongiques, l'espèce *Aspergillus sp* largement utilisé.

Par ailleurs, peu d'études ont été réalisées pour la production des métabolites particulièrement les enzymes (α -amylase) par des levures malgré leurs nombreux avantages . Les levures présentent des éléments plus favorable quant à leur utilisation en biotechnologie, elles offrent une meilleure résistance que les bactéries à ces conditions de stress, en particulier la possibilité à des pH acides.

En plus, l'état unicellulaire, la capacité à se multiplier rapidement et la rusticité des exigences nutritionnelles à ces eucaryotes permettent des les cultiver, de les étudier et de les utiliser aussi facilement que des micro-organismes procaryotes. Elles produisent des protéines glycolyses qui vont servir à des fins industriels et pharmaceutiques : insuline par *Saccharomyces cerevisiae* (Mercier., 1997) et le vaccin de l'hépatite B (Blin., 2002).

Leurs utilisation dans l'alimentation a fait de sorte que les levures soient globalement plus connues pour leur efficacité en fermentation industrielle que d'autres micro-organismes. Elles ne sont pas attaquées par des virus (phages), elles sont facilement récupérables grâce à leur grosseur. La stabilité génétique des levures permet aussi une très bonne fidélité du procédé et la croissance de leur physiologie cellulaire facilite leur utilisation (Labrecque., 2003).

Certains études ont révélé la capacité des levures pour la production des enzymes amylolytiques (Bouatenin Koffi.M et al,...2016). Dans notre travail, nous nous sommes intéressés aux deux souches levurienne *Clavispora lusitaniae* et *Pichia guilliermondii* isolées à partir du blé cultivé et stocké dans une zone aride (Sahara algérienne).

1-Généralité

Le mot levure, selon (Phaff et al., 1968), provient du mot latin « levare » qui se traduit par lever. Ce mot a été appliqué aux levures en raison de l'aptitude de ces microorganismes à produire de CO₂ pendant la fermentation et à lever la surface mousseuse d'un milieu liquide de fermentation (Oteng-Gyang. 1984 ; Kurtzman et al., 2011). Les levures sont des eucaryotes microscopiques, et hétérotrophes. Elles appartenant du groupe des champignons dont on les distingue par leur caractère unicellulaire. Néanmoins, de nombreuses espèces sont capables de former un pseudo mycélium comme l'espèce *Candida albicans*, et parfois un véritable mycélium

comme l'espèce *Candida ontarioensis* (Nadeem, 2013 ; Kurtzman, 2011). Le bourgeonnement, le mode de reproduction végétative le plus fréquent, est représenté par une évagination qui apparaît à un point de la cellule mère . Un autre mode de reproduction végétative peut être rencontré : la fission, caractéristique du genre *Schizosaccharomyces*, qui se manifeste par la formation d'une paroi transversale au grand axe de la levure (Rezki-bekki, 2014).

Les levures sont utilisées comme systèmes Modèles en Biochimie, en Génétique et en Biologie Moléculaire. Elles sont les premiers microorganismes à être domestiqué pour la production de la bière, du pain ou du vin et continuent d'être utilisées pour le bénéfice de l'humanité dans la production de protéines recombinantes et d'autres substances (Lachance, 2011a). Cependant, certaines espèces sont pathogènes comme *Candida albicans* (Kurtzman, 2011a).

2- Taxonomie du modèle biologique

2.1-Clavispora lusitaniae

Selon Kurtzman (2011) la classification de *Clavispora lusitaniae* est la suivante :

Règne : Champignon

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*.

2.2-Pichia guilliermondii

Pichia guilliermondii est une espèce de levure du genre *Pichia* dont la forme asexuée ou anamorphique est connue sous le nom de *Candida guilliermondii* (https://en.wikipedia.org/wiki/Pichia_guilliermondii) : 24 /05 /2018 ; (Kurtzman 2011) .

Règne:Champignons

phylum:Ascomycot

Subphylum:Saccharomycotina

Classe:Saccharomycètes

Ordre:Saccharomycétales

Famille:Saccharomycetaceae

Genre:Pichia

Espèces:guilliermondii

Synonymes : *Candida guilliermondii* ,*Meyerozyma guilliermondii*.

3- Caractéristiques des levures

3.1- Caractéristiques écologiques

Les levures sont des espèces ubiquitaires. Dans la nature, elles se trouvent principalement sur les végétaux riches en sucres directement assimilables. 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, se développent au niveau des eaux douces et profondes. Par ailleurs, une large variété de levures vit dans le sol, plus ou moins représentative de la flore levuriennes associée aux plantes, champignons et animaux vivants à la surface. Néanmoins, pour d'autres espèces, le sol demeure leur seul habitat (Merabti., 2006, Bennamoun, 2017, Labbani, 2016).

La levure *Candida lusitaniae* est une espèce cosmopolite ubiquiste dont la niche écologique est mal connue (Lachance, 2011b). C'est un organisme saprophyte du tube digestif de l'homme et de nombreux animaux (mammifères, oiseaux)

(<http://coproweb.free.fr/mycoweb/texte/153.htm>). Dans l'environnement, *Clavispora lusitaniae* est isolée à partir d'une large gamme de substrats : végétaux, animaux, déchets industriels et spécimens cliniques.

Quant à *Candida Guilliermondii* « *Pichia guilliermondii* » a été isolée à partir d'un grand nombre de sources environnementales, par exemple de l'eau douce et salée, du sol, du sable, des amphibiens, des oiseaux et des humains. C'est aussi une source notoire d'infections nosocomiales. Dans l'ensemble, l'incidence des infections dues à *Candida guilliermondii* est faible, mais des cas de candidémie, d'endocardite et de maladie invasive ont été signalés (Girmenia et al., 2006).

3.2-Caractéristiques Biologiques

Une levure est un mycète unicellulaire avec un cycle biologique comportant une phase unicellulaire prépondérante. Généralement, les cellules des levures sont plus grandes que celles des bactéries ;

La morphologie des levures est d'une grande importance taxonomique Elle est sphérique, ovoïde, globuleuse, cylindrique, ellipsoïde, allongée, apiculée, ogivale, triangulaire ou en forme de bouteille (Walker, 2009 ; Kurtzman et al., 2011). Leurs dimensions très variables de 1 à 5 microns et de diamètre jusqu'à 5 à 30 μ de longueur les dimensions et aspects varient selon l'âge, l'environnement et le milieu de culture (Ait Abdelouahab, 2008). A certains stades de leur vie, elles peuvent parfois former des filaments et constituer un pseudo-mycélium ou un vrai mycélium (Barnett et al., 2000). Les souches de *Candida lusitaniae* produisent les pseudo hyphes avec des chaînes de blastoconidies développées (Lachance, 2011b) (figure1).

Les vraies hyphes ne sont cependant pas produites par *Pichia guilliermondii*, Les blastoconidies de cette espèce peuvent être trouvées dans des chaînes courtes ou des amas

(Kurtzman et Suzuki, 2010)

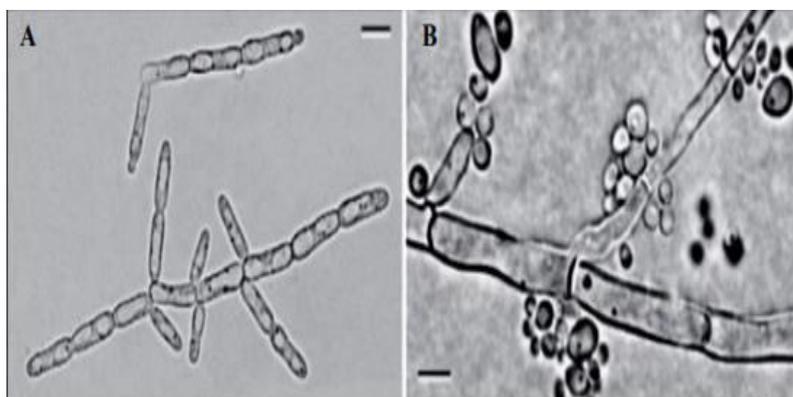


Figure 1 : Filamentation des levures. (A) : Pseudomycélium. (B) : Vrai mycélium. Barre = 10 μ m (Kurtzman et al., 2011a).

Quant à la reproduction, elle se fait selon deux modes :

- Certaines levures adoptent une reproduction asexuée, par bourgeonnement (figure2) multilatéral et division transversale, qui aboutit à la forme anamorphe ou forme imparfaite (hétérothallique téléomorphe). Les cellules sont ovoïdes, allongées ou ellipsoïdales *Clavispora lusitaniae* est le représentant de ce groupe. *Pichia guilliermondii* est un genre de levure ascomycète caractérisé par le bourgeonnement multilatéral, la capacité d'utiliser des nitrates, et la production d'ascoconidia en forme de chapeau (**Kurtzman et Suzuki, 2010**).

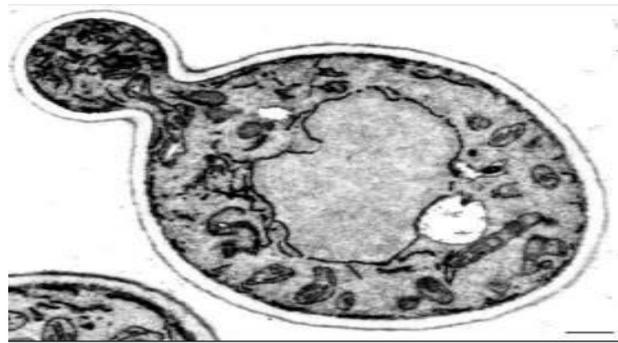


Figure 2 : Bourgeonnement d'une cellule de levure (**Klei et al., 2011**).

- D'autres se reproduisent de façon sexuée : certaines arrivent à faire la méiose comme *Candida lusitaniae*. Après la méiose, les asques s'ouvrent par déliquescence pour libérer 1 à 4 ascospores de forme conique (**François et al., 2001**) (figure3)

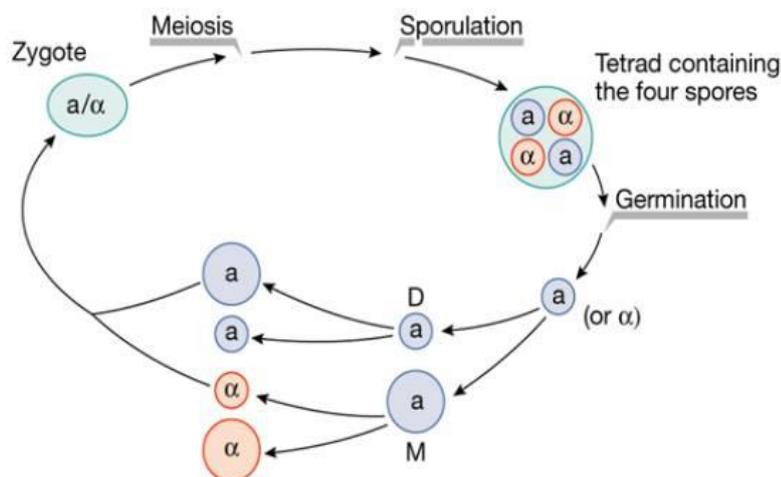


Figure 3 : Reproduction sexuée des levures (**Cosma, 2004**).

3.3- Caractéristiques nutritionnelles

✓ Sources de Carbone

Elles sont d'une grande importance pour les levures puisqu'elles fournissent, le carbone nécessaire pour la biosynthèse de constituants cellulaires et l'énergie nécessaire à son fonctionnement (**Waldron, 2010**) (tableau 1). Toutes les levures sont capables de métaboliser le glucose, le fructose, le mannose (Tableau1) (**Walker, 2009**). Les levures *Candida sp* et *Clavispora lusitaniae* sont capables de fermenter le D-xylose alors que pour les souches industrielles, D'autres saccharides, des polyols, des alcools (éthanol, méthanol, glycérol), des polysaccharides (amidon soluble, pectine), l'acide lactique et l'acide citrique peuvent être utilisés par les levures grâce aux enzymes de leur capital génétique (**Kurtzman et Suzuki, 2010**). *Pichia guilliermondii* est l'organisme modèle d'un groupe ainsi nommé «levures flavinogènes» capables de sursynthèse de riboflavine pendant la privation de fer. En outre, certaines souches de *Pichia guilliermondii* transforment efficacement le xylose en xylitol (**Kurtzman et Suzuki, 2010**). Les sources de carbone pouvant être utilisés par les levures sont résumées dans le tableau suivant :

Tableau 1: Les sources de carbones pouvant être utilisées par les levures (**Modifié de : Walker et White, 2005 ; Bennamoun, 2017 ; Djekrif, 2016**)

Sources de carbone :	Exemples :
Hexoses	D-glucose ,D-galactose,D-fructose, D-mannose .
Disaccharides	Maltose , saccharose,lactose,tréhalose,mélibiose, cellobiose , mélézitose .
Trisaccharides	Raffinose,maltotriose.
Polysaccharides	Inuline, cellulose, hemicellulose,chitine.
Oligosaccharides	Maltotetraose, maltodextrines.
Hydrocarbones	Alcanes .
Pentoses	L-arabiose,D-xylose,D-xylulose,L-rhamnose.
Alcools	Méthanol,éthanol,glycérol.
Acides organiques	Acétate, citrate, lactate,malate,pyruvate,succinate .
Acides gras	Oléate,palmitate .
Composés aromatiques	Phénol,cresol,quinol,ressourcinol,catechol,benzoate.
Déchets agroalimentaires et industriels	Déchet de tomate, d'orange, rebut de datte, lactosérum...

Le lactosérum par sa composition biochimique possède d'intéressantes propriétés comme milieu de fermentation pour plusieurs microorganismes assimilant le lactose comme source de carbone et d'énergie, la teneur élevée en lactose est comprise entre 40-57g/l pour le lactosérum doux et entre 40-50g/l dans lactosérum acide (**Saulnier et al., 1996**)

✓ 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, 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, 2000 ; Djekrif, 2016**). 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 ; Djekrif, 2016**).

✓ Minéraux, oligoéléments et vitamines

Nécessaires à l'état de trace, ils sont indispensables pour la croissance et la multiplication des levures, aussi ils jouent un rôle dans l'activation de certaines réactions enzymatiques (tableau 2) ainsi que dans la construction de certaines vitamines et coenzymes (**Bourgeois et Larpen, 1996**). Et en conséquence ces minéraux sont essentiels tant sur le plan structural que catalytique (**Marlene, 2006**). Il a été trouvé que le développement de la levure boulangère nécessite la présence de certaines vitamines, en particulier, la biotine, l'inositol, le pantothénate de Calcium, la thiamine. Elles sont nécessaires à l'état de traces de l'ordre de milligramme par litre du milieu de culture.

Tableau 2 : Importance de certains oligoéléments et vitamines pour la croissance des levures (Walker, 2000 et Lourens et Reid, 2002).

Oligoéléments et facteurs de croissance :	Rôle joué :
Magnésium	- Stabilité et perméabilité des membranes. - Protection de la cellule contre les facteurs négatifs, tels que le choc thermique et la toxicité de l'éthanol.
Manganèse	- Il appuie la synthèse de la thiamine et des protéines, ce qui contribue à l'augmentation de la biomasse.
Biotine	- Essentielle dans la réaction de carboxylation et de décarboxylation. - Production des alcools et des esters.
Thiamine	- Synthèse de l'isoleucine et de la valine.
Acide pantothénique	- Synthèse de l'Acétyl –COA. - Production des acides gras et des acides aminés.
Riboflavine (B2)	Déshydrogénation et transport d'électrons.
Acide pantothénique	Oxydation des acides cétoniques, métabolisme des acides gras.

La matière minérale du lactosérum comme milieu de culture s'avère riche en chlore et calcium, facteurs activateurs pour la production des métabolites par des microorganismes. Cette concentration selon **Alais (1981)** est entre 4-6 g/l.

3.4- Caractéristiques physiologiques

✓ Température

Généralement, les levures poussent dans une gamme de température optimale située entre 25°C et 30°C. Dans la majorité des cas, la température ne reste pas constante pendant la croissance (**Rezki-Bekki, 2014**). Plus la température de la fermentation augmente plus l'effet toxique d'alcool est important sur les membranes de la cellule de levure.

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, croit à 51°C (**Shin et al., 2001**), certaines se développent à plus de 50°C : *Candida Slooffii*, *Saccharomyces telluris* et *Torulopsis bovina* (**Bourgeois et al., 1988 et Leveau et Bouix, 1993 ; Djekrif, 2016**), *Clavispora lusitaniae ABS7* à 64,14°C (**Djekrif, 2016**). 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**).

✓ pH

Le pH a une influence sur le développement des levures qui ont généralement 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 pH 2 à pH 6 mais peuvent survivre à pH 9. Les levures sont fortement inhibées par les acides acétique, lactique citrique, l'acide ascorbique et propionique (**Bouix et Leveau, 1991**).

✓ 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**).

✓ Pression osmotique et activité de l'eau

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

4-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 sont pris en considération pour permettre des études plus rigoureuses.

La classification actuelle répertorie 60 genres et 500 espèces (**Benaouida, 2008**). 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 (**Benaouida, 2008**).

5-Biotechnologie et levures

Les levures possédant une grande activité métabolique et sont donc très utilisées dans les domaines agricoles et alimentaires,...etc (figure 4).

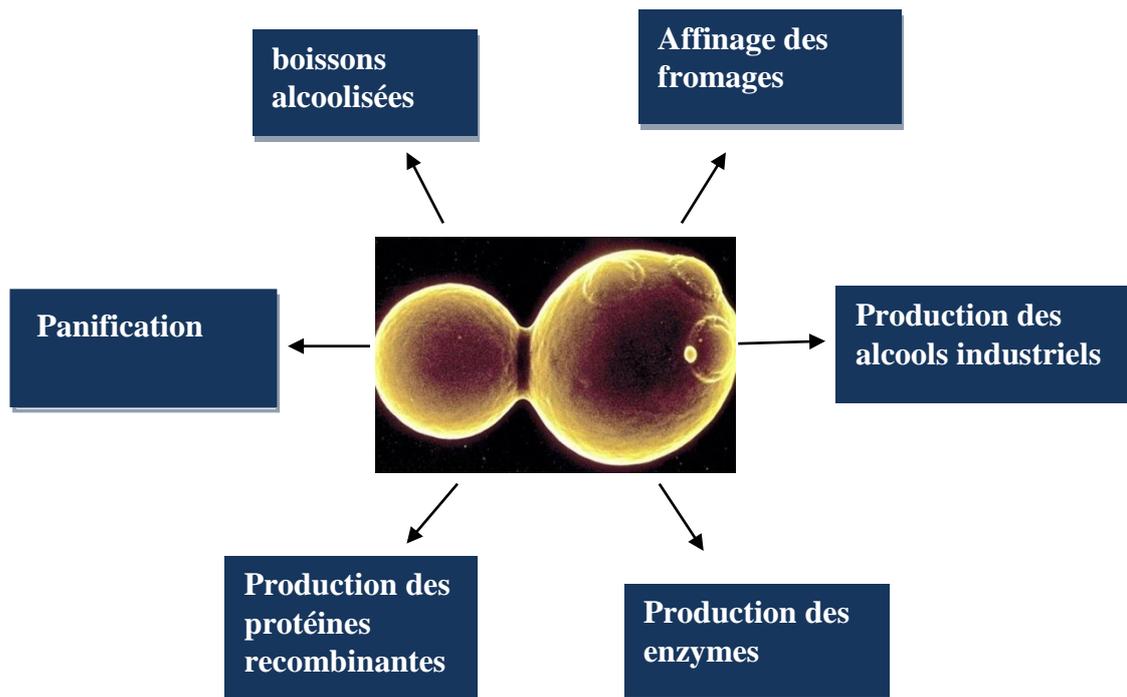


Figure 4 : Schéma représentant l'utilisation des levures dans l'industrie.

Par leur métabolisme diversifié, les levures occupent une place essentielle dans l'industrie alimentaire. Elles participent à l'élaboration de nombreux produits alimentaires (panification, fromagerie, brasserie,...) et dans la production des enzymes (l'invertase ; lactase, lipase et les amylases...), du glycérol ainsi que certaines vitamines et solvants, mais aussi à la revalorisation de déchets agricoles, industriels (**Rezki-Bekki, 2014**).

- **Les boissons alcoolisées**

La fabrication de boissons alcoolisées se fait grâce à la fermentation alcoolique, qui consiste à la transformation du sucre simple en alcool pour la production de biocarburant à partir de plantes cultivées riches en sucre ou en amidon comme la canne à sucre, la betterave sucrière, le maïs ou le blé. L'espèce la plus utilisée par l'homme est *Saccharomyces cerevisiae*. (**Coulibaly et al., 2014 ; Anonyme, 2007**).

- **Panification**

Depuis l'antiquité, les levures ont été largement utilisées dans la fabrication du pain, elles sont développées en aérobiose. Ce type de développement, augmente la production de gaz carbonique CO₂ et diminue l'accumulation d'alcool ; ce qui donne la texture légère de nombreux pains et les traces de fermentation contribuent au goût final (**Prescott et al., 2007**).

- **Affinage des fromages**

Les levures ont la capacité d'utiliser les acides organiques comme source d'énergie et de carbone (**Larpent, 1991**), elles 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.cerevisae*, de nombreuses espèces ont été introduites comme les genres *Kluyveromyces*, *Debaryomyces*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Torulopsis*, *Candida* et *Rhodotorula* (**Larpent, 1991**).

- **Production des alcools industriels**

Grâce à leur haute capacité fermentaire, Les levures et essentiellement des souches du genre *Saccharomyces*, peuvent assurer la bioconversion de nombreux substrats saccharoses (jus de betteraves, sirop, mélasse de sucrerie) en bioéthanol (**Leveau et Bouix, 1993 et Tibor, 2007**).

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

Les bonnes connaissances de la biologie moléculaire des levures et la mise au point de techniques de génie génétique, permettant de programmer les levures de façon qu'elles expriment des protéines humaines et animales recombinantes ; constituent une grande réussite des biotechnologies surtout d'intérêt médical (par les productions d'enzymes, d'hormones peptidiques, de facteurs de croissance, d'hémoglobine, de ferritine, l'érythropoïétine, etc.) (**Lammi, 2011**).

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 (tableau3).

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 et al., 2002
Beta-glucosidase	EC 3.2.1.21	<i>Clavispora lusitaniae</i>	Maladie de Gaucher	Lamers et al., 2016 ; Regenboog et al., 2016
Glucose-6phosphate déshydrogénase (G6PD) Hémoglobine	EC 1.1.1.49 –	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Pichia pastoris</i>	Le favisme Anémie Thalassémie	(Loiudice et al., 2001) Huaxin et al., 2007
Lipases	EC 3.1.1.3	<i>Candida lipolytica</i> <i>Kluyveromyces marxianus</i>	Aide digestive	Sikandar et al., 2010 et Deiv et al., 2003
Protéines vaccins	–	<i>Sporidiobolus sp</i>	Prévention des infections.	Bitter et al., 1984 Blin., 2002

1.Introduction

L' α -amylase comme toutes enzymes, est une macromolécule qui fait partie de la classe des protéines globulaires, dont le rôle biologique est de catalyser l'hydrolyse de l'amidon. L' α -amylase et les protéases sont les plus utilisés en bio-industrie (Saci,2012). Par ailleurs, la part du marché mondial prise par les enzymes est de 56% pour les amylases. (Van der Maarel et al., 2002). Elle a été découverte en 1833 par Anselme Payen et Jean-François Persoz.

2.Définition

L' α -amylase [α -(1,4)-D-glucane glucanohydrolase] (EC 3.2.1.1) est une enzyme extracellulaire (Chery et al.,2004).cette endoamylase clive les liaisons α -(1,4)-glycosidiques de l'amidon et des substrats apparentés et produit le maltose et les oligo saccharides (Zubeyde et al.,2008 et 2013 ;Sami et al., 2017).

3. Structure de α -amylase

Les α -amylases sont également considérées comme des glycoprotéines renfermant 478 acides aminés répartis en 2 domaines globulaires appelés A (1-380 résidus) et B (381-478 résidus) (Nouadri, 2011), Ces domaines sont associés par une chaîne polypeptidique constituée principalement de résidus hydrophobes. L' α -amylase comporte trois domaines globulaires (A, B, et C) (figure5).

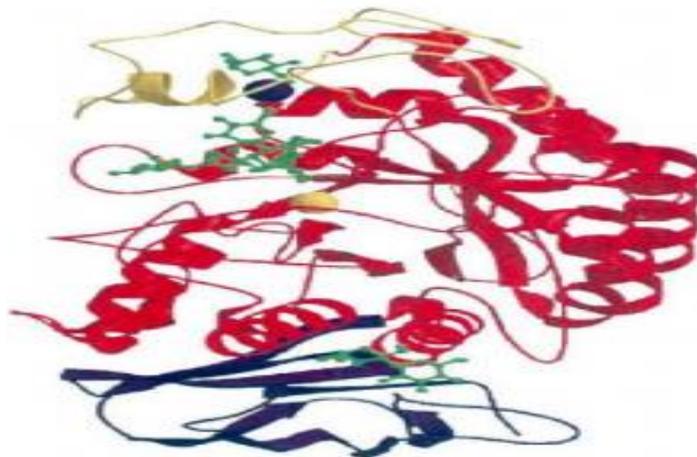


Figure 5 : Structure d' α -amylase : Le domaine A est présenté en rouge, domaine B en jaune et domaine C en violet. Dans le centre catalytique, l'ion de calcium est présenté par la sphère bleue et l'ion chlorure par la sphère jaune. Les structures vertes sont lié au site actif et aux sites de liaison de surface.

Le domaine A, forme un tonneau (β / α) 8 et porte le site actif à la partie C-terminale des feuillets β . Le domaine B, forme une boucle à partir du milieu du domaine A et constitue une sorte de « couvercle » au-dessus du site actif (fig.5) Quand au domaine C, il constitue un tonneau de 8 feuillets β antiparallèles (Benaouida,2008;Nouadri ,2011) .

4.production d'enzyme amylolytique levurienne

Les amylases levuriennes ont été largement utilisées pour la préparation des aliments orientaux. En dépit de la large distribution des amylases, de source microbienne, à savoir les amylases levuriennes, Plusieurs études ont montré la production d'enzymes amylolytiques (tableau 4).

Tableau 4 : Production d'enzymes amylolytiques par des levures :

Levures	Enzymes amylolytique	Référence
<i>Filobasidium capsuligenum</i>	α -amylase Glucoamylase	De Molet et Varacgtert 1985
<i>Schwanniomyces castelli</i>	α -amylase Glucoamylase	Sills et <i>al.</i> , 1984,Clementi et Rossi,1986
<i>Candida utilis</i> <i>Candida guilliermondii</i> <i>Candida famata</i> <i>Trichosporon mucoides</i>	α -amylase	Ouédraogo et <i>al.</i> , 2012
<i>Schwanniomyces alluvius</i>	α -amylase	Moranelli et <i>al.</i> ,1987
<i>Pichia burtonii</i>	α -amylase	Takeuchi et <i>al.</i> , 2006
<i>Candida guilliermondii</i>	α -amylase Inulinase Esterase	Acourene etAmmouche,2012 Gao et <i>al.</i> ,2007, Basaran et b Hang, 2000.
<i>Clavispora lusitaniae</i>	α -amylase , β -glucosidase , Phytase , Naringinase (α - Lrhamnosidase et β -D- glucosidase	Ouédraogo et <i>al.</i> , 2012, Freer et Greene, 1990 Greppi et <i>al.</i> , 2015 ;Sahota et Kaur ,2015 et Djekrif, 2016
<i>Pichia burtonii 15-1</i>	α -amylase	Kato et <i>al.</i> , 2007

5. Origine de l' α -amylase

Les α -amylases sont abondantes dans tous les règnes, elles ont été isolées par extraction à partir des tissus végétaux et animaux ou par fermentation par des cellules microbiennes (**Haq et al., 2003** et **Srinivasa et al., 2004**). L' α amylase d'origine végétale, animale ou microbien agit sur les polysaccharides (amidon, glycogène).

5.1. Origine animale

Généralement extraite de la salive humaine et du pancréas des mammifères, tels que les porcs et les veaux . (**Marbati , 2006**)

5.2. Origine végétale

chez les plantes l' α -amylase joue 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 (**Charles et al., 2003**).

5.3. Origine microbienne

Chez les microorganismes, on distingue deux types d' α -amylases : α -amylases bactériennes , α -amylases fongiques.

- **α -amylases bactériennes**

Ce type d'enzymes est obtenu principalement par fermentation de *Bacillacées* Il s'agit de *Bacillus subtilis* et *Bacillus damyloliquefacien* sont les plus utilisés pour la production de l' α -amylase (**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 , alcalophiles et thermophiles 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 en clivant les liaisons α (1 \rightarrow 4) (**Nadirman et al., 2006**).

- **α -amylases fongiques**

Les amylases fongiques surtout celles d'*Aspergillus* (*oryzae* et *niger*) et de *Rhizopus oryzae* ont été largement utilisées pour la préparation des aliments orientaux : La sauce de Soja, la pate de soja (miso) , et la boissons « Koji » utilisée comme aide digestif .Aussi, la production industrielle des enzymes à partir des microorganismes fongique existe depuis longtemps du fait que la première production d' α -amylase était d'origine fongique.(Tekamine,1994).

Différentes études ont démontré la capacité des souches levuriennes de produire l' α -amylase : *Aureobesidum pullulaus* N13 (Li et al.,2007), *Clavispora lusitaniae* (Djekrif 2014 et 2016), *Pichia burtonii* (Akiko,2014). *Schwennionyces elluvius allavias* (Moranelli , 2003).

6.Caractérisation de l'amylase

Les caractéristiques physico-chimiques de quelques α - amylases ont été étudiées et les résultats sont récapitulés dans le tableau 5.

Tableau 5: Caractéristiques physico-chimiques de quelques α - amylases .

Source	Poids moléculaire	pH optimum	Température optimale(°C)	Km	Vmax	Références
<i>Candida Antractica</i> CBS 6678	50000	4.2	62	-	-	De Mot and Varachtert,1987
<i>Aureobasidim pullulans</i>	486 KDa	4.5	60	-	-	Li et al., 2007
<i>Schwnniomyces alluvius</i>	520000	3.75-5.5 6	45-50	-	-	Moranelli Wilson et al., 1982
<i>Wickerhamia Sp</i>	54 kDa	5-6	50	-	-	Hernande , Montane et al.,2012
<i>Candida parapsilosis</i> CBS 10947	-	7	60	-	-	(Aguero et al., 2015).
<i>Rhodotorula</i>	-	7	60	-	-	(Aguero et al.,

<i>mucilaginosae</i> <i>PYCC 5995</i>						2015).
<i>Candida</i> <i>parapsilosis</i> <i>PYCC</i> <i>2545</i>	-	7	60	-	-	(Aguero et al., 2015).
<i>Candida geabrata</i> <i>CBS858</i>	-	7	60	-	-	(Aguero et al., 2015).
<i>Pichia burtonii</i>	51kDa	5	40-50	-	-	Akiko T et al., may 2014.
<i>Clavispora</i> <i>lusitaniae</i>	75 kDa	9	75	1.39 mg/ ml	6.25 µmole /min	Djekrif,2016
<i>Amphibacillus</i> <i>Sp.</i> <i>NM-RA2</i>	-	8	54	-	-	Mesbah et Wiegel, 2014
<i>B.</i> <i>amylolyticus</i>	43	7	70	-	-	Kikani et Singh, 2011
<i>B.</i> <i>Licheniformis</i>	31	6.5	90	-	-	Bozic et al., 2011

7. Production de l'alpha amylase

Le choix du milieu approprié à la fermentation est essentiel pour les microorganismes, aussi bien pour la croissance que pour la production d'enzymes. Cette dernière est aussi influencée par différents paramètres à savoir : température, pH et temps d'incubation.

7.1 .Composition du milieu de culture

Le milieu de fermentation pour la production de l'enzyme alpha amylase doit présenter une composition permettant de maximiser le rendement et cela en tenant compte du système de régulation de la synthèse de l'enzyme. La production d'enzymes amylolytiques par les levures a été considérablement améliorée par l'addition de différentes sources de carbone et d'azote :

- Les sources de carbone ont affecté non seulement la croissance mais aussi l'apparition des amylases, ainsi que la vitesse avec laquelle les hydrates de carbone sont métabolisés. (Kristue et al., 2012 et Zoubirie, 2012).

- La source d'azote organique ou inorganique est essentielle pour la formation de biomasse cellulaire et d'enzymes. (Dubey et al., 2000)

7.2. Température

Une large gamme de température (35 – 80 °C) a été rapportée pour une croissance optimale et la production d' α -amylase à partir des bactéries. (Burhan et al., 2003). La production d' α -amylase était maximale à la température de 37 °C par *Bacillus amyloliquefaciens* (Haq et al., 2010).

7.3. pH

Nustrat et Rahman (2007) ont rapporté que chez les levures le pH optimum de la production d' α -amylase est de 6, alors que chez les bactéries le pH de la production α -amylasique est plus élevé, chez *Bacillus amyloliquefaciens*, il est de 7 (El tayeb ; 2007) .

7.4. Temps d'incubation

Burhan et al., 2003, ont rapporté que la production d' α -amylase par des levures commence au début de la phase de croissance exponentielle pour atteindre le niveau maximum après 24 heures et après cela, le niveau de l'enzyme diminue de façon drastique ; probablement en raison de l'accumulation d'un niveau élevé de protéase à la fin de la phase de croissance exponentielle.

8. Mode d'action

Les α -amylases présentent la possibilité d'attaquer les chaînes d'amylopectine de deux façons différentes (figure 6) :

- soit en se fixant sur une chaîne et y effectuer plusieurs cycles de coupures (attaque multienzymatique) c'est le cas de l'amylase pancréatique.
- soit en se fixant sur une chaîne pour y effectuer une coupure puis après libération des produits, se détacher de la chaîne pour attaquer une autre chaîne (attaque préférentielle).

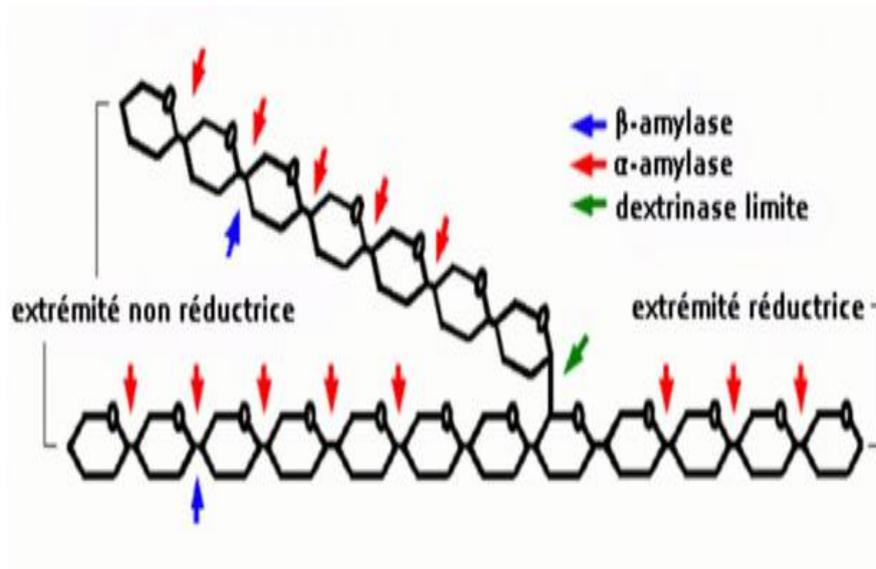


Figure 6 : l'Action de l' α -amylase sur l'amidon en rouge

9.Intérêt et utilisation industrielle

L'amylase, une enzyme dégradant l'amidon, a pris de l'importance dans divers procédés industriels tels que les produits pharmaceutiques, les aliments, le brassage, le papier, le textile et les produits chimiques. Cette enzyme est largement utilisée dans les industries pharmaceutiques dans les toniques digestives, pour l'hydrolyse de l'amidon pour produire différents sucres comme le glucose et le maltose qui ont plusieurs applications. Les applications les plus répandues des α -amylases sont l'amidonnerie, qui est utilisée pour l'hydrolyse de l'amidon dans le processus de liquéfaction de l'amidon qui convertit l'amidon en sirops de fructose et de glucose (Saini et al., 2017 ; Nielsen et Borchert, 2000) (Tableau 6).

Tableau 6 : Utilisation de l' α -amylase

Industries	Applications	Références
Biocarburants	Développement des biocarburants de première génération a production de bioéthanol	Oner, 2006
Biscuiterie et panification	-Régulation des activités diastasiques des farines. -Formation de la mie souple en boulangerie. -Amélioration de la texture des gâteaux pâtisseries et des biscuits.	Pandey et al., 2000 Malhotra et al., 2002 et Azizi et al., 2003.
Boissons	-Fabrication d'alcool éthylique, de boissons sucrées non alcoolisées et de jus de fruits. -Obtention des bières sans dextrans, dites bières à basses colories.	Mamo et al., 1999
Détergents	-Augmentation du pouvoir blanchissant. -Dégradation des résidus de féculents tels que les pommes de terre, les sauces, crème, chocolat.	Gupta et al., 2003
Environnement	-Traitement des eaux résiduaires pour l'élimination de l'amidon.	Malhotra et al., 2002
Industrie pharmaceutique	Aide digestive. Anti-inflammatoire et anti-œdémateuse	Yolande Gauthier et al., 2014
Textile, la tannerie, de la Papeterie	Désencollage des tissus ainsi que dans les domaines de papeterie et tannerie	Teodoro et al., 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. -parfois les sirop de canne peuvent se trouver perturbés par la présence de contamination amylicés augmentant aussi leur viscosité et nuire ensuite au processus de cristallisation .	Roa et Satyanarayana, 2003

1. Matériel

Notre travail expérimental a été réalisé au laboratoire de Génie Microbiologique et Applications (GMA) du Département de Biochimie et de Biologie Cellulaire et Moléculaire (DBBCM), Faculté de Sciences de la Nature et de la Vie (FSNV), Université les frères Mentouri, Constantine 1.

- **Appareillage et Réactifs**

Le matériel et les réactifs utilisés pour la réalisation des différentes manipulations effectuées dans ce travail sont récapitulés dans le tableau 7.

Tableau 7: Matériel et Réactifs

Verrerie	Réactifs et produits	Appareillage
-Erlens Meyers - Béchers - Entonnoirs - Tubes à essai - Pipettes graduées - Fioles jaugées - Éprouvettes - Tube à vis stériles. -pipettes pesteurs. boites de pétri. -Flacons stériles.	-Eau distillée - Sulfate d'ammonium (NH ₄) ₂ SO ₄ . - Hydroxyde de sodium (NaOH) . - Milieux de culture Sabouraud. - Amidon soluble. - Tartrate double de sodium et de calcium . - DNSA (acide dinitro 3.5 salicylique). -Sulfate de cuivre (CuSO ₄ - 5H ₂ O). -Maltose. -Acétone. -Folin Ciocalteurs. -Na ₂ HPO ₄ . - Carbonate de sodium (Na ₂ CO ₃) . - Acide citrique (C ₆ H ₇ O ₈).	-Bain Marie. -Autoclave . - Agitateur magnétique (plaque chauffante) - Centrifugeuse Segma. - Vortex. - Balance analytique . -Étuve d'incubation. -Bec bunsen . - pH-mètre . - Spectrophotomètre . -Colonne de Chromatographie d'exclusion moléculaire . - Four pasteur -Microscope. -Pompe. -Colonne de chromatographie. -Collecteur.

	<ul style="list-style-type: none"> - Acide chlorhydrique HCl . - Phosphate de potassium (KH₂ PO₄) -Glycocolle. -CaCl₂. -MgCl₂. -ZnSo₄. .Extrait de levure . -Peptone. -Glucose. - Agar. 	
--	--	--

2-Matériel biologique

Les microorganismes utilisés dans notre étude sont deux souches levuriennes *Clavispora lusitaniae* BZ et *Pichia guilliermondii* BW, isolées par Dr Dakhmouche-Djekrif Scheherazad à partir des grains de blé provenant d'une zone aride « Biskra » Sahara Algérien 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.

3-Mise en culture

Notre travail expérimental consiste à la production d'une enzyme amylolytique à partir des souches levuriennes selon les étapes suivantes (figure 7):

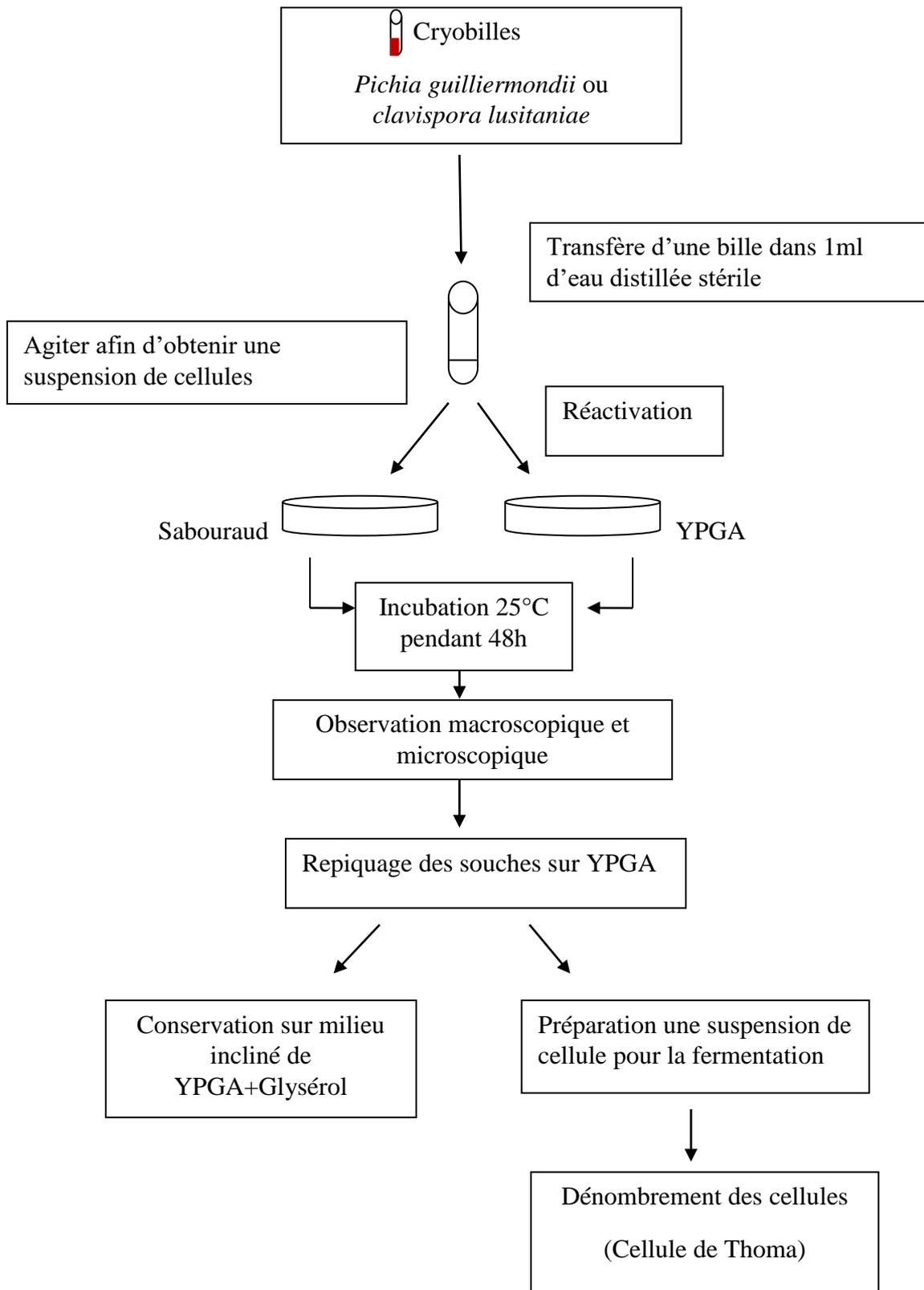


Figure 7: Etapes de la préparation de la suspension des cellules de levures pour la fermentation.

3.1- Réactivation des souches

- **Milieux de réactivation**

Les milieux utilisés pour la réactivation des souches sont les suivants :

- **YPGA:**
 - Extrait de levure : 5 g
 - Peptone : 10 g
 - Glucose: 20 g

Le milieu est réparti dans des flacons de 250 ml est stérilisé à 120°C pendant 20 min.

- **Sabouraud commercial.**

3.2.Repiquage des souches

- Transférer une bille de chaque souche dans 1 ml d'eau distillée stérile.
- Agiter afin d'obtenir des suspensions cellulaires.
- Ensemencer chaque souche (L6 ; L7) par la méthode des stries sur YPGA et Sabouraud .
- Incuber pendant 48h à 25°C.

3.3. Identification des souches

Elle comprend l'identification phénotypique (morphologiques) et génotypique des souches levuriennes sélectionnées (**Kurtzman et al., 2011b**)

3.3.1.Identification phénotypique des souches

L'identification phénotypique des isolats est basée sur les critères morphologiques, culturels (observations macroscopiques et microscopiques). Les souches pures sont repiquées sur YPG gélosé par la méthode des stries par épuisement. Les boîtes sont incubées 2-3 jours à 30°C puis laissées à la lumière et à la température ambiante pour favoriser l'apparition éventuelle de pigment.

Les observations macroscopiques sont réalisées afin de déterminer la forme (contour régulier ou irrégulier, convexes ou concaves), la couleur et l'aspect des colonies des levures (brillant ou mat).

L'examen microscopique à l'état frais (grossissement x40 et x100) a permis de vérifier la pureté des souches et d'étudier la forme des cellules et leur taille,...etc.

3.3.2. Identification génotypique des souches

- **Séquencage du gène de l'ARNr 26S**

L'identification des levures est réalisée par le Centre International de Ressources Microbiennes (CIRM, Thiverval Grignon, Paris). L'amplification et le séquençage du domaine D1/D2 de la région 26S de l'ADN ribosomique sont réalisés en utilisant la procédure mise au point par Kurtzman et Robnett (1998). Les amorces utilisées sont : NL1 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3') et NL4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3').

- **Analyse des données**

Les séquences obtenues sont comparées aux séquences des bases de données du NCBI. Les comparaisons de séquences sont effectuées en utilisant l'outil de recherche d'alignement local de base de programmation (BLAST) dans la base de données GenBank. Un isolât est attribué à l'espèce présentant une identité de séquence la plus haute identifiée.

3.4. Dénombrement des cellules

Le dénombrement des cellules se fait par comptage sur la cellule de Thoma (0.1mm, 1/400mm²) en observation optique. La densité optique des suspensions de cellules est déterminée à 600 nm (Abs < 0.500).

4. Milieu de production

4.1. Lactosérum

Le milieu utilisé pour la production de l' α -amylase de *Clavispora lusitaniae* et *Pichia guilliermondii* est le lactosérum. Il est issu de l'industrie fromagère. Ce déchet renferme les composants solubles du lait : lactose, protéines, sels minéraux et des traces de matière grasse (Larpen et Sanglier, 1992).

4.2. Origine de lactosérum

Le lactosérum est fourni par la laiterie de Milalait à Oued-Athemanian –Mila-. Son pH est de 4.76 donc c'est un lactosérum acide. Il est conservé à 4°C pour une courte durée de 24-48h ou à 20°C pour une durée plus longue.

4.3. Traitement de lactosérum

Le lactosérum est filtré à travers la gaze afin d'éliminer les impuretés. Avant son utilisation, le lactosérum subit un traitement de thermo coagulation sous l'action combinée du pH (ajusté à 4,6) et de la température à 100°C pendant 30 min afin de précipiter les caséines qui seront ensuite éliminées par filtration. Le filtrat constitue le milieu de base et sert à préparer le milieu de culture.

5. Fermentation

Préparer des Erlenmeyers de 500 ml contenant 100 ml de milieu de fermentation ; lactosérum traité. Boucher avec du coton cardé couvert avec du papier aluminium. Incuber à 30°C pendant 28 heures sous une agitation de 150 rpm.

A la fin de la fermentation, le jus de la fermentation est centrifugé à 4000 tours pendant 20 min afin de séparer la biomasse. Le surnageant est récupéré et utilisé comme extrait brut pour la détermination des activités enzymatiques.

6. Méthodes de dosage

6.1. Dosage de l'activité α -amylasique

Le dosage de l'activité amylasique a été réalisé par la méthode Bernfeld 1955.

▪ Principe

L'activité de l' α -amylase est évaluée par l'hydrolyse de l'amidon ou les extraits enzymatiques. L'amidon hydrolysé libère du maltose dosé par la méthode de Bernfeld (1955) qui utilise l'acide 3,5-dinitrosalicylique (DNSA) comme inhibiteur de l'amylase. La réaction est colorimétrique et l'intensité de la coloration est proportionnelle à la quantité du maltose libérée.

▪ Préparation des réactifs

• Substrat

Dissoudre 1 g d'amidon ou de 100 ml de tampon phosphate pH 6.

• Préparation du réactif DNSA

Dissoudre 1g de l'acide 3,5-dinitrosalicylique dans 20 ml de NaOH 2N et 50 ml d'eau distillée. Ajouter 30g de tartrate double de sodium et potassium, compléter à 100 ml avec de l'eau distillée, filtrer.

- **Courbe étalon** : La réalisation de la courbe d'étalon du maltose (figure 8)

Préparation de la solution mère du maltose 2 mg par 1 ml, Réalisation de différentes concentrations (tableau 8).

Tableau 8: Réalisation de la courbe étalon du maltose

Concentration [mg/ml] Solutions	0	0.4	0.8	1.2	1.6	2
Solution mère (maltose 2 mg/ml)	0 ml	0.2 ml	0.4 ml	0.6 ml	0.8 ml	1 ml
Eau distillée	1 ml	0.8 ml	0.6 ml	0.4 ml	0.2 ml	0 ml
DNSA (ml)	1	1	1	1	1	1
Incubation à 100° C de 10 min après refroidissement dans un bain de glace						
Eau distiller (ml)	10	10	10	10	10	10
Lire l'absorbance à 540 nm						

La courbe étalon du maltose est présentée dans la figure suivante :

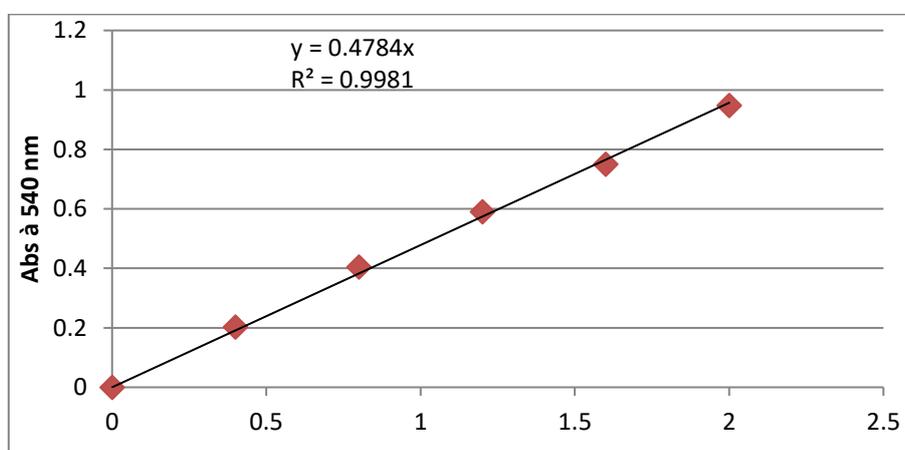


Figure 8 : la courbe étalon du maltose

▪ Dosage de l'activité enzymatique

-Ajouter 0.5 ml de l'extrait enzymatique dilué 1/10 à 0,5 ml d'amidon 1% dans du tampon phosphate pH 6.

-Incuber le mélange réactionnel à 40°C pendant 30 min.

-Stopper la réaction par addition de 1 ml de solution DNSA et incuber à 100°C pendant 10 minutes. Mettre dans un bain de glace et ajouter 10ml d'eau distillée, bien agiter.

-Lire l'absorbance à 540 nm.

6.2.Dosage des protéines (méthode de Lowry 1951)

• Principe

Le principe de la méthode consiste à réduire le réactif de Folin-Ciocalteu (acides phosphomolybdique et phosphotungstique) en présence de protéines en un complexe bleu de molybdène. La réaction est précédée d'un prétraitement par un réactif de cuivre en milieu basique, ce qui permet d'en augmenter la sensibilité. Deux colorations sont mises en jeu :

- celle donnée par le réactif Folin-Ciocalteu (réactif des phénols)
- celle donnée par le sulfate de cuivre (Cu SO₄).

-La lecture de la coloration s'effectue à 650 nm.

• Préparation des réactifs

- Solution A : Carbonate de sodium (Na₂CO₃) à 2% dans NaOH (0.1N)
- Solution B : Tartrate double de sodium et potassium à 2% .
- Solution C : Sulfate de cuivre (CuSO₄) à 1% .

Préparer extemporanément la solution réactive M en respectant l'ordre d'addition des réactifs et en agitant bien après chaque addition :

- Solution C : 0,5 ml

- Solution B : 0,5 ml

- Solution A : 50 ml

- Réactif de Folin : Le Folin Ciocalteu commercial à dilué 3 fois dans l'eau distillée au moment de l'emploi.

- La courbe étalon de BSA est présentée dans la figure 9

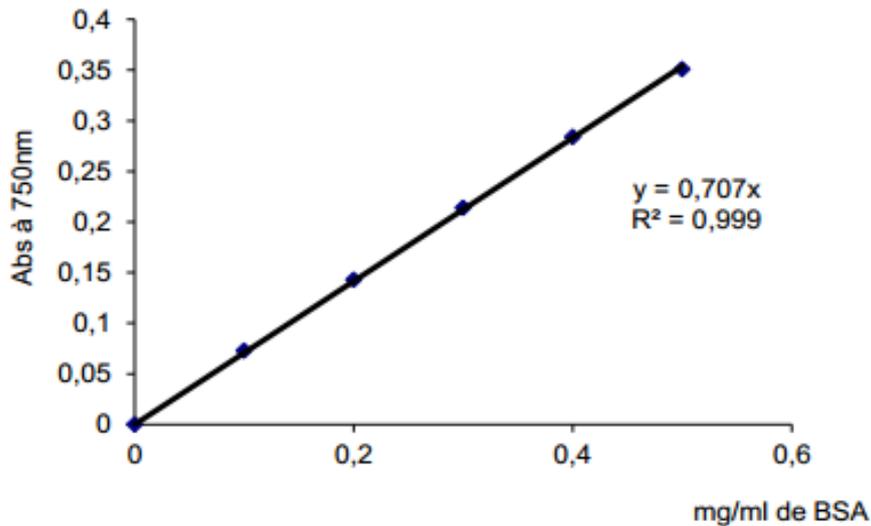


Figure 9 : Courbe étalon des protéines .

- **Dosage des protéines :**

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

7-Purification de l'alpha-amylase :

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

7.1.Précipitation des protéine

L'extrait enzymatique est précipité par l'acétone. Dans un bain de glace ,on met le mélange d'extrait brut-acétone (1V : 4V) sous agitation pendant 1 heure .Centrifuger à 10000 tours pendant 10 min. Récuper le culot dans un volume minimale de tampon.

7.2. Chromatographie gel filtration

- **Principe**

Les gels sont formés de dextrans modifiés et se présentent sous forme de perles qui gonflent considérablement dans l'eau, les plus utilisés sont les séphadex et le sephacryl ; dans notre travail, nous avons utilisé le séphadex G75. Les molécules dont la taille est supérieure à celle des pores du gel c'est-à-dire supérieure à la limite d'exclusion de ce gel ne peuvent y pénétrer, migrent dans la phase aqueuse qui entourent les grains du gel et quittent les premières le lit du gel placé préalablement dans une colonne à chromatographie. (Mouas Kamelia 2016).

Par contre les plus petites molécules pénètrent dans le gel et leur migration est ainsi retardée les molécules quittent donc le gel séphadex placé dans une colonne de verre dans l'ordre de masse moléculaire décroissante, la colonne peut être réutilisée lorsque les molécules de petites taille quittent le gel.

- **Dépôt de l'échantillon**

Après l'équilibrage de la colonne avec le tampon phosphate pH 6 , 1ml de l'échantillon concentré est injecté doucement à la surface du gel à l'aide d'une seringue .

- **Elution**

Le dispositif de chromatographie sur gel filtration utilisé dans notre travail est présenté dans la figure 10. Le débit d'élution est réglé à 0.5 ml/mn. L'éluat est collecté par fraction de 2 ml. Pour chaque fraction collectée, la densité optique à 280 nm et l'activité α -amylasique sont mesurées. Les fractions ayant des activités enzymatiques élevées sont rassemblées.



Figure 10 : Dispositif de chromatographie sur gel filtration

- **Dosage des protéines et de l'activité enzymatique des fractions rassemblées**

Après rassemblement des fractions ayant des activités enzymatiques élevées, le dosage des protéines ainsi de l'activité enzymatique sont effectuées .

8. Détermination des propriétés physico-chimiques de l' α -amylase

8.1. Détermination du pH optimum

L'influence du pH sur les activités α -amylasiques est déterminée par la mesure de l'activité enzymatique à différents pH, variant de 3 à 10.

Le tampon citrate phosphate 0,5 M est utilisé pour le pH 3 , 4 et 5. Le tampon phosphate 0,5M est utilisé pour le pH 6 , 7 et 8. Le tampon glycocholate 0,1 M est utilisé pour le pH 9 et 10.

8.2. Détermination de la température optimale

Pour chaque fractions l'effet de la température sur l'activité enzymatique a été étudié au pH optimum et à différentes températures variant de 20°C à 80°C .

8.3. Etude de la thermostabilité enzymatique

La thermostabilité des enzymes est étudiée à 30 et à 80 °C pour l'enzyme purifiée de *Clavispora lusitaniae* , à 60 et 80°C pour l'enzyme de *Pichia guilliermondii*. Ainsi pour l'enzyme commerciale à 40 et à 100°C. La mesure de l'activité enzymatique résiduelle est effectuée après incubation de l'extrait enzymatique brut pendant une durée variable, allant de 0 à 120 min.

L'extrait enzymatique est réparti en volumes de 2ml dans des tubes placés au bain marie. Les différents échantillons des enzymes sont retirés les uns après les autres séparément à des temps déterminés et refroidis instantanément dans un bain de glace. Le protocole de dosage de l'activité amylasique est appliqué à chaque échantillon.

8.4- Effet de différents sels sur l'activité enzymatique

Pour l'étude de l'effet des ions sur l'activité α -amylasique, différents sels tels que le $ZnCl_2$, le $MgCl_2$ et le $CaCl_2$, ont été utilisés. Les échantillons d' α -amylase purifiée de chaque souches et commerciale sont incubés avec chaque ion métallique (0,5) séparément, à 60°C pour l'enzyme de *C.lusitaniae* et *P.guilliermondii*, et l'enzyme commerciale pendant 30 min à pH optimum pour chaque enzyme. Les activités α -amylasiques sont mesurées à 540 nm.

1. Etude des souches levuriennes

1.1. Caractères morphologique

Les deux souches *Pichia guilliermondii* et *Clavispora lusitaniae* sont cultivées à 30°C pendant 48- 72 h sur YPG, YPGA et Sabouraut.

- **Caractères macroscopiques**

Les deux souches *Clavispora lusitaniae* et *Pichia guilliermondii* ont bien poussé sur les différents milieux : YPGA et Sabouraut (figure 11) et les caractères morphologiques sont rassemblés dans le tableau 9.



Pichia guilliermondii sur YPGA

Clavispora lusitaniae sur YPGA

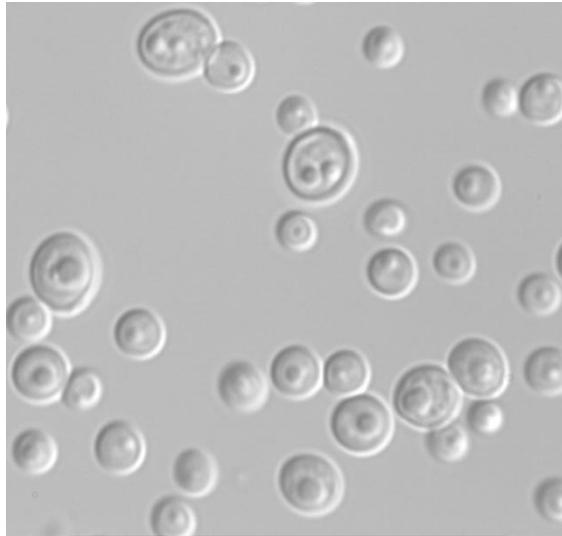
Figure 11: Caractères morphologiques de *Clavispora lusitaniae* et *Pichia guilliermondii* sur YPGA

Tableau 9: Caractères morphologiques macroscopiques et microscopiques de *Cl. lusitaniae* et *P. guilliermondii*

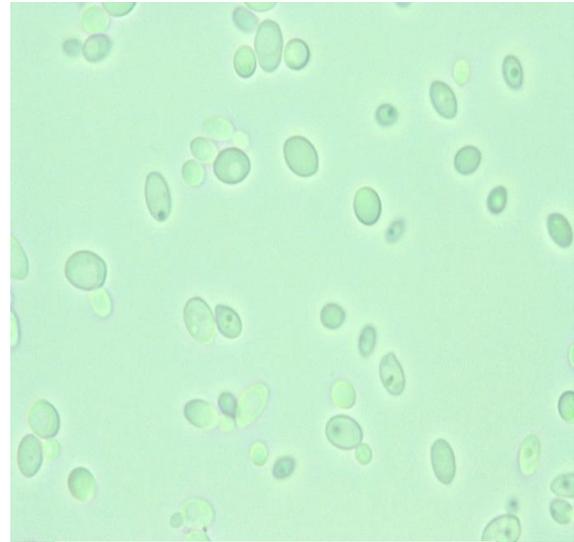
Caractères Souches	Caractères Morphologiques		Caractères Microscopiques	
	Forme des colonies	Couleur des colonies	Forme des cellules	Bourgeonnement
<i>Clavispora lusitaniae</i>	Grandes, blanches, crémeuses, bombée, lisses, d'aspect brillant	Crème	Ronde Taille varie de 4 à 10 µm.	Multilatéral reproduction sexuée avec formation des ascospores
<i>Pichia guilliermondii</i>	Petites plates,, lisses et brillante	Blanche	Forme variable rondes à allongées	Axial et multilatéral

1-2-Caractères microscopiques

La forme des cellules ainsi que le mode de reproduction de *Cl. lusitaniae* et *P. guilliermondii* sont montrés dans la figure 12 et récapitulés dans le tableau 9



Clavispora lusitaniae



Pichia guilliermondii

Figure 12: Caractères microscopiques de *Clavispora lusitaniae* ABS7 et *Pichia guilliermondii*

(Forme des cellules)

2. Identification génotypique des souches levuriennes

L'identification des deux souches BW et BZ par l'amplification de la région D1/D2 a été réalisée. L'amplification et le séquençage de la région D1/D2 de l'ADN ribosomique 26S et la comparaison avec les bases de données du NCBI ont confirmé l'identification de la souche **BW** à *Pichia guilliermondii* et la souche **BZ** à *Clavispora lusitaniae*.

Les séquences des deux souches étudiées sont les suivantes :

- **Souche BW : *Pichia guilliermondii***

```

TTTGCATATCAATAAGCGGAGGAAAAGAAACCAACAGGGATTGCCTTAGT
AGCGGCGAGTGAAGCGGCAAAAGCTCAAATTTGAAATCTGGCGCCTTCGG
TGTCCGAGTTGTAATTTGAAGATTGTAACCTTGGGGTTGGCTCTTGTCTA
TGTTTCTTGGAACAGGACGTCACAGAGGGTGAGAATCCCGTGCGATGAGA
TGCCCAATTCTATGTAAGGTGCTTTCGAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAATG
CAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATTCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAG
ACCGATAGCGAACAAGTACAGTGATGGAAAGATGAAAAGAACTTTGAAAA
GAGAGTGAAAAAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGGGTTTGAGATCAG
ACTCGATATTTTGTGAGCCTTGCCTTCGTGGCGGGGTGACCCGCAGCTTA

```

TCGGGCCAGCATCGGTTTGGGCGGTAGGATAATGGCGTAGGAATGTGACT
 TTACTTCGGTGAAGTGTTATAGCCTGCGTTGATGCTGCCTGCCTAGACCG
 AGGACTGCGATTTTATCAAGGATGCTGGCATAATGATCCCAAACCGCCCG
 TCTTGAACACACGGACCAA

- **Souches BZ : *Clavispora lusitaniae***

TTTGCATATCAATAAGCGGAGGAAAAGAAACCAACAGGGATTGCCCCAGT
 AACGGCGAGTGAAGCGGCAAAGCTCAAATTTGAAATCCTGCGGGAATTG
 TAATTTGAAGGTTTCGTGGTCTGAGTCGGCCGCGCCAAGTCCATTGGAA
 CATGGCGCCTGGGAGGGTGAGAGCCCCGTATGGCGCACGCCGACTCTTTG
 CACCGCGGCTCCGACGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGG
 TGGTAAATTCCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACA
 AGTACAGTGATGGAAAGATGAAAAGCACTTTGAAAAGAGAGTGAAACAGC
 ACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGGGCTTGCAAGCAGACACGGTTTTACCG
 GGCCAGCGTCGAAAAGGGGGGAGGAACAAGAAGTTCGAGAATGTGGCGCGC
 ACCTTCGGGCGCGCGTGTATAGCTCGTGTGACGCCTCCATCCCTTTTC
 GAGGCCTGCGATTCTAGGACGCTGGCGTAATGGTTGCAAGCCGCCCGTCT
 TGACCCACGGACCAA

3. Production de l' α -amylase par *Pichia guilliermondii* et *Clavispora lusitaniae*

3.1- Détermination de la composition biochimique du lactosérum

Pour l'utilisation du lactosérum comme milieu de production d' α -amylase, il serait intéressant de déterminer sa composition chimique. Les résultats de l'analyse physico-chimique du lactosérum traité (décaféiné) sont présentés dans le tableau suivant :

Tableau 10 : Etude physico-chimique du lactosérum doux et acide

Paramètres mesurés	Nos résultats	Lactosérum doux (Fao, 2002)	Lactosérum acide (Fao, 2002).	Résultats Alais 1981
pH	4.76	6, 3	4.5	-
Matière sèche	9.82%	6,4	6,1 g	55 à 65
Matière minérale	12.25 g/l	93	-	6 à 8
Calcium	835 mg/l	0,05	0.5-1 g/l	1.2 à 1.4
Phosphate	132mg/l	0,06	0.5 g	-
Sodium	294mg/ml	0,07	0.45g	-
Potassium	1214mg/ml	0,13	1.4 g/l	1.4 à 1.6
Magnésium	72mg/ml	-	-	-
Azote total	1.12 g/l	-	-	4.8 à 10.5
Protéines	1.12×6 .25=9 g/l	0,82	8 g/l	-
Matière grasse	0.5 g/l	0,05-0,07	2 g/l	-
Chlore	2.457 g/l	-	-	2.0 à 2.2
Sucre(lactose)	55.23 g/l	4,77-4,8	48-42 g/l	40 à 50
Acidité	68°D= 6.8g d'acide lactique	0,05-0,15	-	7 à 8

D'après ce tableau, il ressort que le lactosérum décaséiné (utilisé pour notre étude) est composé de 55,23 g/l de sucres, 1,12g/l d'azote total, 9 g/l de protéines, 835mg/l de calcium

Alais 1981a montré que le lactosérum acide contient 40-50 g/l de lactose une teneur plus élevée par rapport au lactosérum acide (38-55 g/l).

La teneur protéique de 9g/l concorde avec les résultats d'**Alais 1981** qui varie de 7-11 g/l).

La matière azotée total de (1,12 g/l) est homologue de celle annoncée par Alais 1981 (1,2-1,8 g/l).

La concentration en matières minérales (12,25 g/l) du lactosérum utilisé dans notre étude plus élevée que celle décrit par **Alais 1981** (4-6 g/l). La matière minérale s'avère riche en facteurs activateurs de l' α -amylase : chlore (2,457 g/l) et calcium (835 mg/l = 0,835 g/l).

On conclut que, la composition chimique du lactosérum révèle sa richesse en source carbonée et azotées ainsi qu'en sels minéraux et par conséquent, il constitue un milieu favorable pour la croissance des microorganismes et aussi pour la production des enzymes.

3.2- Production de l' α -amylase par fermentation liquide

Dans notre étude, le lactosérum décaséiné est utilisé comme milieu de fermentation pour *Clavispora lusitaniae* et *Pichia guilliermondii* pour la production d' α -amylase.

Après 28h d'incubation à 30°C sous une agitation de 150 rpm, la biomasse est séparée par centrifugation à 4000 tours pendant 20 min. Le surnageant est utilisé pour le dosage de l'activité α -amylasique et les résultats sont présentés dans la figure 13.

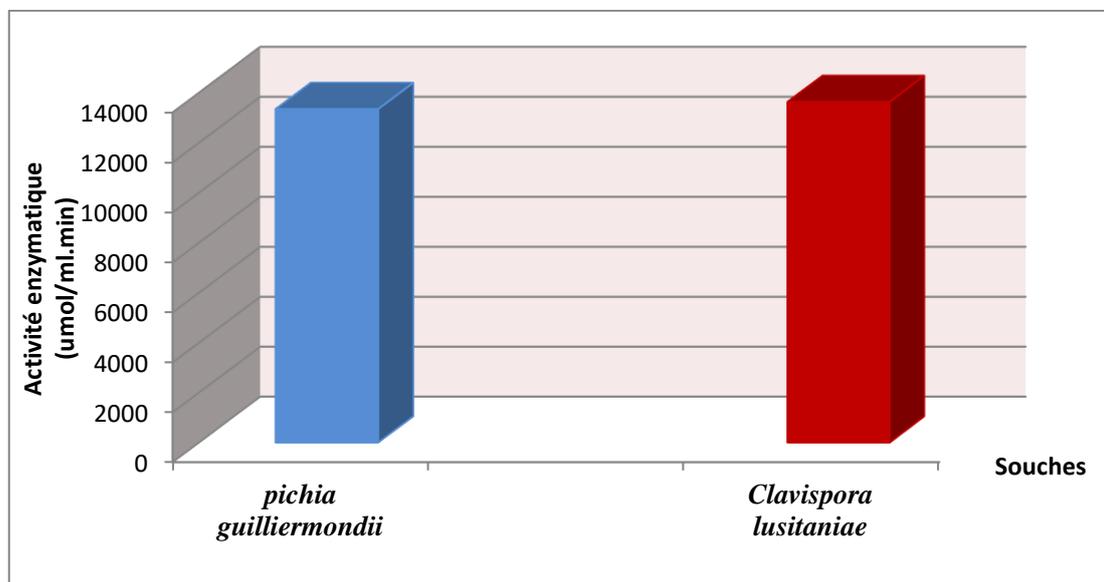


Figure 13: Production de l' α -amylase chez *Clavispora lusitaniae* et *Pichia guilliermondii*

D'après la figure 13, on remarque une bonne production d' α -amylase par les deux souches *Clavispora lusitaniae* et *Pichia guilliermondii* après 28h d'incubation à 30°C (13630 UI et de 13344,5 UI respectivement). On constate que le lactosérum est favorable pour la croissance des microorganismes et la production d'enzymes. Selon Montanez-Hernandez *et al*, 2010, la production maximale d' α -amylase chez *Candida ontarionensis* cultivé en batch sur un milieu contenant de l'amidon comme seule sources atteint son maximum après 25 h d'incubation.

Et différentes études ont utilisé les déchets agroalimentaires comme source de carbone et d'énergie pour la production de différentes enzymes (tableau 1).

Tableau11: différents milieux de fermentation pour la production de l' α -amylase.

L'enzyme amylolytique	Milieux de fermentations	Souches	Références
α -amylase	Déchets d'orange	<i>Streptomyces sp</i> <i>Aspergillus niger</i> <i>Aspergillus oryzae</i> <i>Penicillium camemberti</i> PL21	(Saci, 2012) (Dakhmouche, 2001) (Bennamoun, 2001) (Nouadri, 2011)
	Déchets des dattes	<i>Rhizopus sp</i> <i>Triticum durum</i> <i>Rhizopus oryzae</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Candida guilliermondii</i> et <i>Aspergillus niger</i>	(Zoubiri, 2011) (Ferhat et Laklouka, 2015) (Ait kaki, 2017) (Acourèn et Ammouche, 2012)
	Lactosérum	<i>Clavispora lusitaniae</i> <i>Schwanniomyces sp</i> <i>Rhizopus oryzae</i>	(Dakhmouche-Djekrif, 2016) (Benaouida, 2008) (Ait kaki, 2002)
	Déchet de pomme de terre	<i>Alternaria sp</i>	(Kolli et Zatout, 2015)

La production de l' α -amylase par une souche de la même espèce *Clavispora lusitaniae* est réalisée en erlenmeyer à 54°C avec une agitation de 135 rpm pour une durée de 40h (**Dakhmouche-Djekrif, 2016**). Cette différence de résultats peut être expliquée par la variation de la composition du lactosérum selon la saison et l'alimentation de l'animale et des conditions de la fermentation

Par ailleurs, chez *Penicillium camemberti* PL21, la production de l' α -amylase se déroule pendant 160 heures à 22°C sous une agitation de 100 rpm sur un milieu à base de déchets d'orange (**Nouadri, 2011**).

4- Purification des enzymes

Clavispora lusitaniae et *Pichia guilliermondii* ont produit des activités α -amylasique, respectivement, de 13630 UI et de 13344.5 UI. L'utilisation de l'acétone a conduit à la concentration de protéines et une augmentation de l'activité spécifique de l' α -amylase de 215.6 à 691,28 U/mg pour l'enzyme de *Clavispora lusitaniae* avec une récupération de 61%.

Ainsi que pour l'enzyme de *Pichia guilliermondii* on remarque une augmentation de l'activité spécifique de l' α -amylase de 271,90 à 677,39 U/mg de protéines avec une récupération de 74% (Tableau12)

Tableau 12 : Purification de l' α -amylase produite par *Clavispora lusitaniae* et *Pichia guilliermondii*

Etape	souche	Activité totale (UI)	Protéines totaux (mg/ml)	Activité spécifique UI/mg	Taux de purification	Rendement (%)
Extrait brut	<i>Clavispora lusitaniae</i>	13630	63,22	215.6	1	100
	<i>Pichia guilliermondii</i>	13344.5	49,08	271.90	1	100
Précipitation par l'acétone	<i>Clavispora lusitaniae</i>	4094.56	5,80	691,28	1.30	61
	<i>Pichia guilliermondii</i>	3757.5	5,54	677,39	1.25	74
Chromatographie Gel filtration sephadex G75	<i>Clavispora lusitaniae</i>	2500.57	1,08	898,32	3.20	30.04
	<i>Pichia guilliermondii</i>	2780.706	1.38	851,92	2.50	28.15

D'après le tableau 12 le gel de filtration augmente le taux de purification de *Clavispora lusitaniae* et de *Pichia guilliermondii* avec des rendements respectifs de 30.04% et 28.15% .

Le profil d'éluion de l'enzyme sur colonne de Séphadex G75 pour les deux souches est représenté sur les figures (13 et 14).

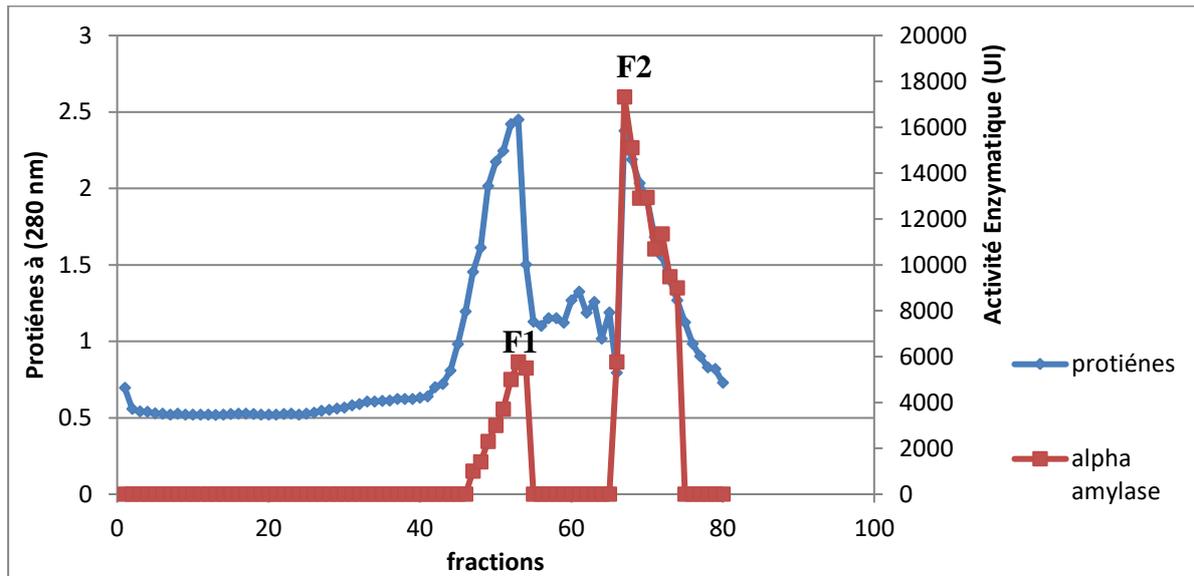


Figure 14: Profil chromatographique de l'α-amylase de *Clavispora lusitaniae* sur Séphadex G75.

L'élution sur une colonne de Séphadex G75 (figure 14) montre l'existence de deux fractions protéiques contenant des activités α-amylasiques.

Nous nous sommes intéressés au 2^{ème} pic car il contient la fraction protéique et l'activité enzymatique la plus élevée. Quant à *Pichia guilliermondii*, le profil d'élution de l'enzyme sur colonne de Séphadex G75 est représenté par la figure 15.

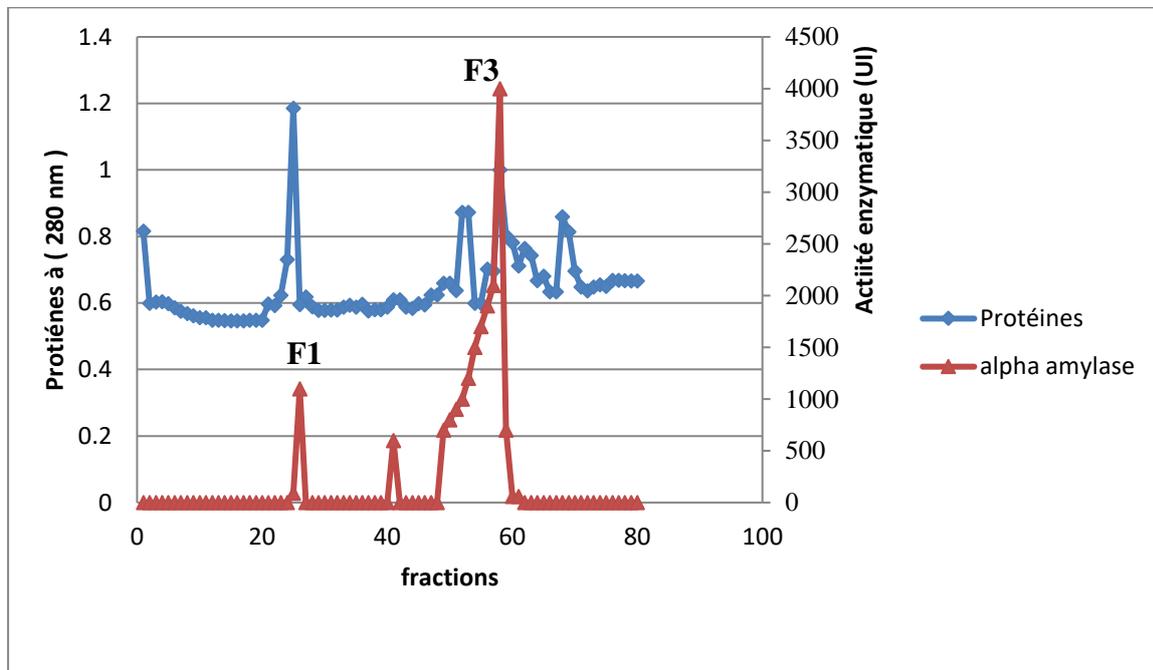


Figure 15 : Profil chromatographique de l'α-amylase de *Pichia guilliermondii* sur Séphadex G75.

Cette Figure montre l'existence de trois fractions protéiques contenant des activités α-Amylasiques. L'activité la plus importante est celle de fraction 3 (F3)

5. Détermination des caractéristiques physico-chimiques des enzymes

5.1. Détermination du pH optimum

L'étude de l'effet du pH sur les activités α -amylasiques est effectuée dans l'intervalle de pH 3 à 10 (Figure 16).

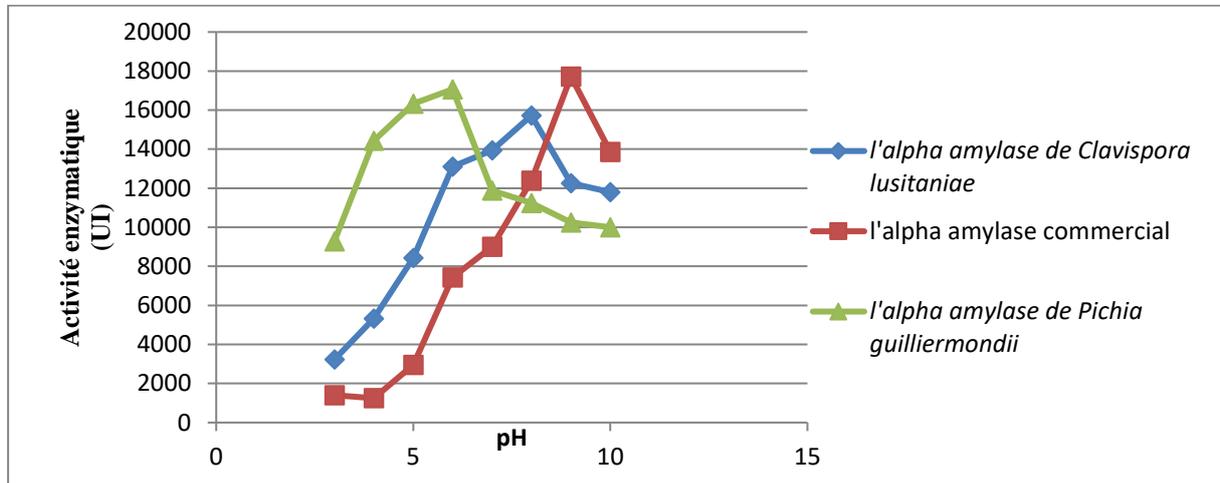


Figure 16: Etude du pH sur l'activité de l' α -amylase de *Clavispora lusitaniae*, *Pichia guilliermondii* et l' α -amylase commerciale

D'après la figure 16, l'activité amylasique commence à évoluer à pH 3 jusqu'à atteindre l'activité maximale de 15723.72 UI à pH 8 et de 17064,64 UI à pH 6 de l'enzyme de *Clavispora lusitaniae* et *Pichia guilliermondii*, respectivement et de 17724,71 UI à pH 9 pour l'enzyme commerciale.

Au delà de ces valeurs, on remarque une nette réduction respective de l'activité. 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 (Soro, 2007). Le pH optimum de 8 de l' α -amylase produite par *Clavispora lusitaniae* est légèrement supérieur du pH 6.8 constaté par Ranjan et Sahay (2015) et inférieur à celui rapporté par Dakhmouche-Djekrif (2016) pour une souche de la même espèce.

Nous pouvons conclure que la niche écologique des micro-organismes a vraisemblablement une influence sur la production d'enzymes (pH, température, quantité d'enzyme).

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 inférieur a pH 9 trouvé chez : *Schwanniomyces alluvirus* (Moranelli et al., 1987) et *candida sp* (Boukhennane et Boudebza, 2014). l' α -amylase de *Clavispora lusitaniae* a un pH optimum de 7 semblable a celui des α -amylases bactériennes telle que *Bacillus sp* (Carlos Alberto et al; 2002) avec pH 7,5 et *Bacillus subtilis* (MTCC 121) (Dibyangana Raul et al., 2014) pH de 7,1.

La figure 16, montre également que le pH optimum de 6 de l' α -amylase produite par *Pichia guilliermondii* est identique à celui obtenu par Benaouida (2008), pour la levure *Schwanniomyces sp* et à ceux de Merabti (2006) pour le genre *Lipomyces sp*. Cependant, il est différent de celui des De Mot et Verachlert (1985) rapportent un pH optimum de 5,6 *Filobasidium capsuligenum*. D'autre part l' α -amylase de *Pichia guilliermondii* a un pH proche a celui des α -amylase fongiques telle que *Aspergillus niger* (Khan et al., 2011 et Djekrif et al., 2016) avec pH 6,5. Ces différences sont probablement dues à la variation de la composition en acides aminés, où chaque α -amylase développe un état de protonation spécifique et à la composition du milieu de culture (Vijai K. Gupta et al., 2016).

En conclusion, le pH optimum de l' α -amylase est alcalin respectivement de 8 et de 9 pour *Clavispora lusitaniae* et l'enzyme commerciale, aussi l' α -amylase de *Pichia guilliermondii* est acide de 6.

5.2.Détermination de la température optimale

L'influence de la température sur les activités α -amylasiques est testée sur une gamme de température de 20 à 100°C à pH optimum (figure 17).

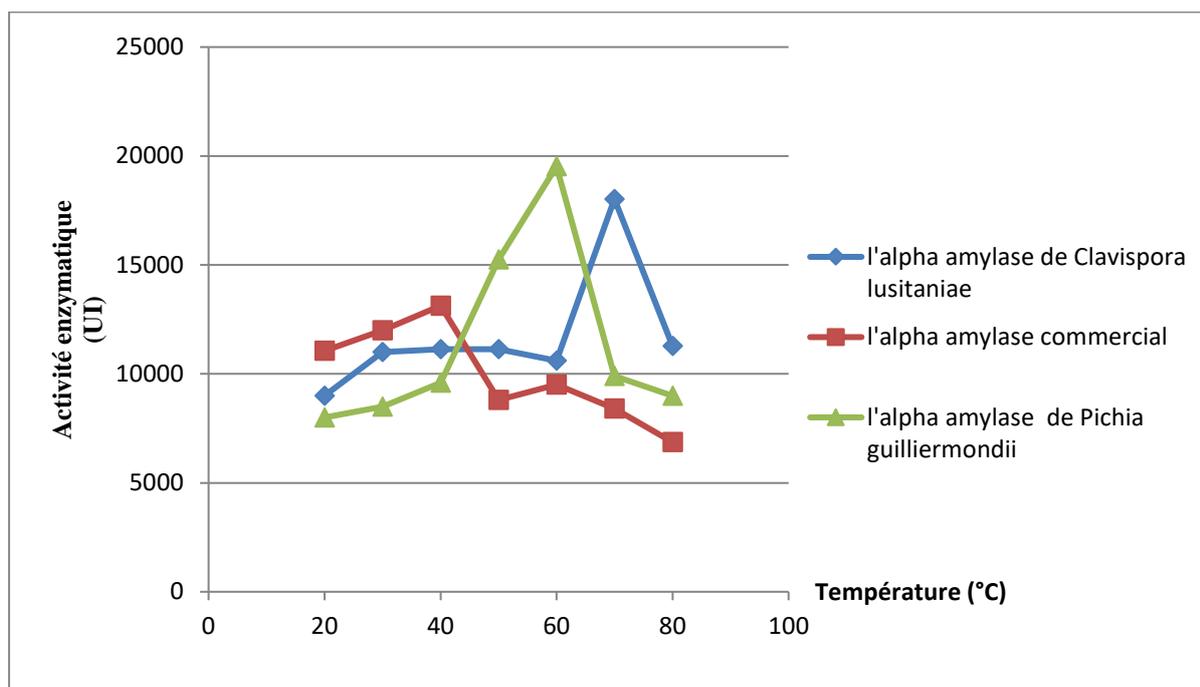


Figure 17 : Etude de la température sur l'activité de l' α -amylase de *Clavispora lusitaniae* ; *Pichia guilliermondii* et l' α -amylase commerciale .

Ces résultats montrent que la température exerce un effet significatif sur l'activité des enzymes. L'activité α -amylasique maximale de *Clavispora lusitaniae* est obtenue à 70°C (18026,42 UI) tandis que pour l' α -amylase commerciale, l'activité enzymatique atteint son maximum de 13128,53 UI à 40°C. Par ailleurs l'activité amylasique de *Pichia guilliermondii* est maximale à 60°C (19523UI),

Au delà de ces valeurs, elle commence à diminuer. 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).

En effet, la température optimale des amylases levuriennes varie entre 40°C et 60 °C et peut atteindre 70°C pour certaines espèces. Des études menées sur l' α -amylase de *Clavispora lusitaniae* montrent que notre résultat est proche de celui obtenu par Ranjan et Sahay, (2015), rapporte une température optimale de 37°C pour la même souche. Tandis que une autre étude montre une variation de la température optimale : 54° C (Djekrif et al., 2014) de la même souche. Malgré cette température est optimale pour notre souche (30°C), mais elle demeure inférieure à celle d'autres espèces de levure : 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), 55°C pour *Lipomyces sp* (Merabti, 2006).

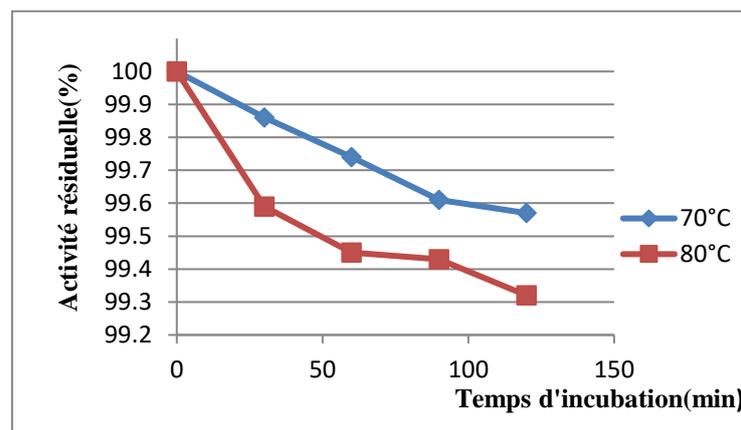
En Outre, nos résultats sont très proches à des α -amylases d'origine bactérienne comme la bactérie *Cronobacter sakazakii* entre 30°C à 40°C (Amalesh Samanta et al.2013).

De plus, l'optimum de la température de l' α - amylase de *Pichia guilliermondii* est semblable à celui d'autres levures : *Lipomyces kononenkoae* (Kelly et al., 1985, Prieto et al., 1995 et Eksteen et al., 2003)et *Schwanniomyces sp* (Benaouida ,K .2008) de 60°C et inférieure à celle de *Pichia polymorpha* et *Lipomyces starkeyi* de 70°C (Kelly et al., 1985, Panchal, 1990, Kang et al., 2004). Comparés à l'enzyme des moisissures et de bactéries productrices d' α -amylases, nos résultats sont inférieure des α -amylases d' *Aspergillus oryzae* (Bennamoun, 2001), et de *Bacillus sp* (Dibyangana Raul et al.,2014).

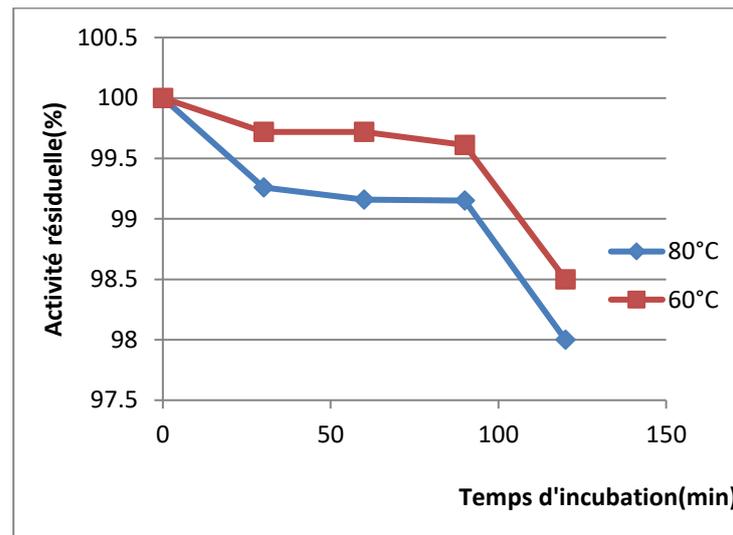
Nous pouvons conclure que la température optimale de l' α -amylase de *Clavispora lusitaniae* est légèrement élevée que celle de l' α -amylase de *Pichia guilliermondii* et plus élevée que celle de l' α -amylase commerciale. Ces différences sont probablement dues au comportement thermique de l' α -amylase de notre souches. Ce dernier peut être expliqué par la caractéristique du climat aride de la niche écologique (Sahara Algérien :Biskra) (Djekrif-Dakhmouch , 2016)

5.3.Thermostabilité enzymatique

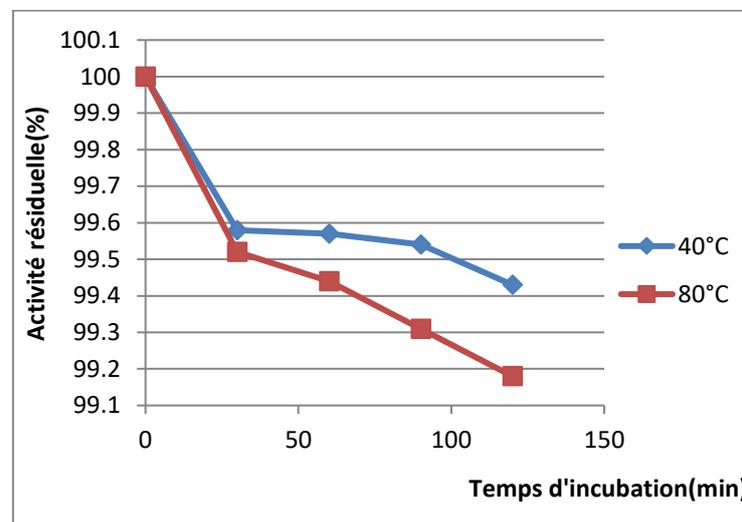
L'étude de la stabilité thermique pendant 2 heures est réalisé sur l' α -amylase de *Clavispora lusitaniae* à 70°C et 80°C et sur celle de *Pichia guilliermondii* à 60°C et 80°C et à 40°C et 80°C pour l' α -amylase commerciale. Les résultats de cette étude sont montrés dans la figure 18.



(a) *Clavispora lusitaniae*



(b) *Pichia guilliermondii*



(c) l'enzyme commercial

Figure 18 : Etude de la thermostabilité sur l' α -amylase de *Clavispora lusitaniae*(a) ,*Pichia guilliermondii*(b) et l'enzyme commercial(c)

L'examen de ces figures montre que :

- A 70°C, l' α -amylase de *Clavispora lusitaniae* conserve 99,86% de son activité initiale pour un traitement thermique de 60 min. Après 120 min d'incubation, l'enzyme maintient 99,57% de son activité.
- A 60°C, l'enzyme de *Pichia guilliermondii* fait perdre à l'enzyme 6% de son activité initiale (99.26-93.94%). La demi-vie de l'enzyme est de 90 min (99.15%).
- A 40°C, l' α -amylase commerciale conserve après 30min de traitement thermique 99,58 % de son activité initiale. Après 120 min d'incubation l'enzyme garde 99,43% de son activité.

- A 80°C, l'enzyme de *Clavispora lusitaniae* garde 99,58% de son activité après 60 min d'incubation, et après 120 min, elle garde 99,43% de son activité. Pour *Pichia guilliermondii*, l'enzyme garde 99,72% de son activité après 60 min d'incubation, et après 120 min, elle garde 99,21% de son activité.

Cette étude montre que l' α -amylase de les souches levuriennes : *Clavispora lusitaniae* et *Pichia guilliermondii* sont très thermostables.

- l' α -amylase commerciale conserve après 30min de traitement thermique 99,52% de son activité initiale et après 120 min d'incubation l'enzyme garde 99,18% de son activité.

En effet un profil comparable avec des valeurs un peu différentes pour l' α -amylase de plusieurs souches isolées du blé de la même région que *Clavispora lusitaniae*, montre 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, avec une demie vie de 180 min à 90°C (Benaouida, 2008).

Nos résultats se rapprochent également de ceux obtenus à partir des levures : (Moranelli et al.,1987) ont étudié l' α -amylase chez *Schwanniomyces sp* est également stable à 70°C puisqu'elle conserve 85% de son activité initiale pendant 3 heures d'incubation (Benaouida 2008).

La thermostabilité de l' α -amylase de *Lipomyces kononenkoae* est due à la nature glycoprotéique de l'enzyme (la partie glucidique augmente la thermostabilité de l'enzyme) et certaines bactéries telle que *Bacillus sp* (Cordeiro et al., 2002) qui produit une α -amylase possédant une température optimale de 70°C et qui perd 38% de son activité initiale après une incubation à 90°C pendant 2h, Par ailleurs certaines levures et moisissures comme : *Paecilomyces sp* (Zenin et al., 1993), produisent des α -amylases qui 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.

Le profil de thermostabilité de l' α -amylase obtenu par *Pichia guilliermondii* se rapproche de ceux à celui de *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 min (**Chen et al., 2007**). et est comparable avec la levure *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 thermo stabilités inférieures à celle de notre souche. Et différent a celui la *Lipomyces kononenkoae* et de certaines bactéries telle que *Bacillus sp* (**Prieto et al., 1995 et Cordeiro et al., 2002**), et des levures non productrices d' α -amylases thermostables (**Barbier, 1997**), exceptées celles qui sont génétiquement modifiées.

En effet, **Moranelli et ses collaborateurs (1987)**, rapportent que l' α -amylase de *Schwanniomyces alluvius* est très thermostable.

Ces différences, s'expliquent probablement par l'origine des espèces et par les conditions environnementales, qui font que les souches développent des mécanismes de lutte et d'adaptation, spécifiques à leur niche écologique.

En effet, l' α -amylase de la moisissure *Rhizopus oryzae*, isolée du blé de la même région, montre une stabilité relativement semblable à la notre : des demi- vies de 150 min à 80°C et de 90 min à 90°C (**Ait kaki, 2004**).

Différents 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 explique probablement par l'un ou l'ensemble des facteurs évoqués..

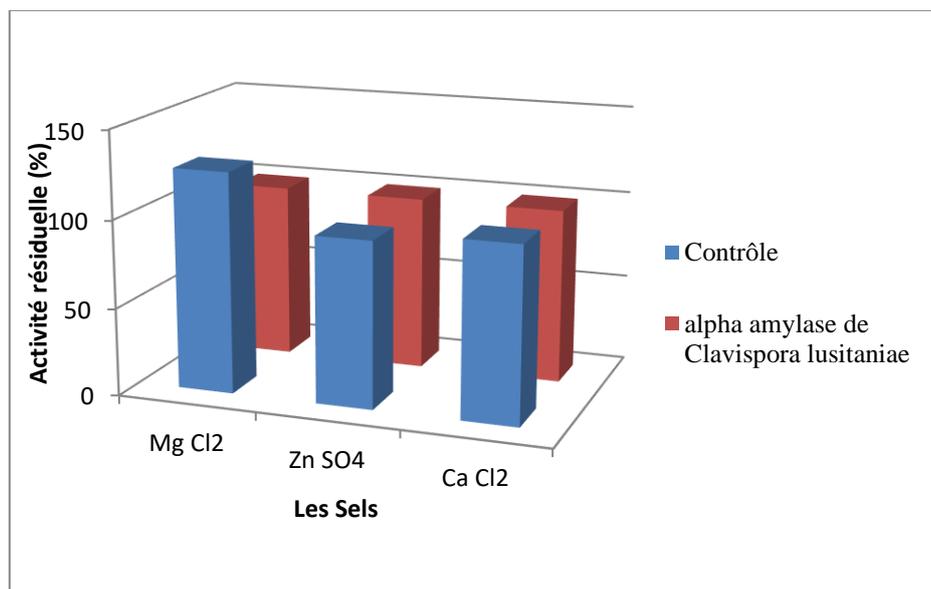
En conclusion, les taux particulièrement élevés de conservation de l'activité enzymatique à 80°C : 99.72% pour l'enzyme de *Pichia guilliermondii* , 99.59% pour *Clavispora lusitaniae* et 99.52 % pour l'enzyme commerciale, et dépassant largement les valeurs rapportées par la littérature permettent de qualifier l' α -amylase produite par la levure *Clavispora lusitaniae* et *Pichia guilliermondii* isolées du blé d'une région aride (Sahara Algérien) parmi les enzymes thermostables.

L' α -amylase produite par les levures (*Clavispora lusitaniae*, *Pichia guilliermondii*) sont plus stable que la l' α -amylase commerciale. Cette propriété thermique, confère aux enzymes une grande stabilité, une activité élevée et donc un meilleur rendement pendant des durées prolongées d'hydrolyse.

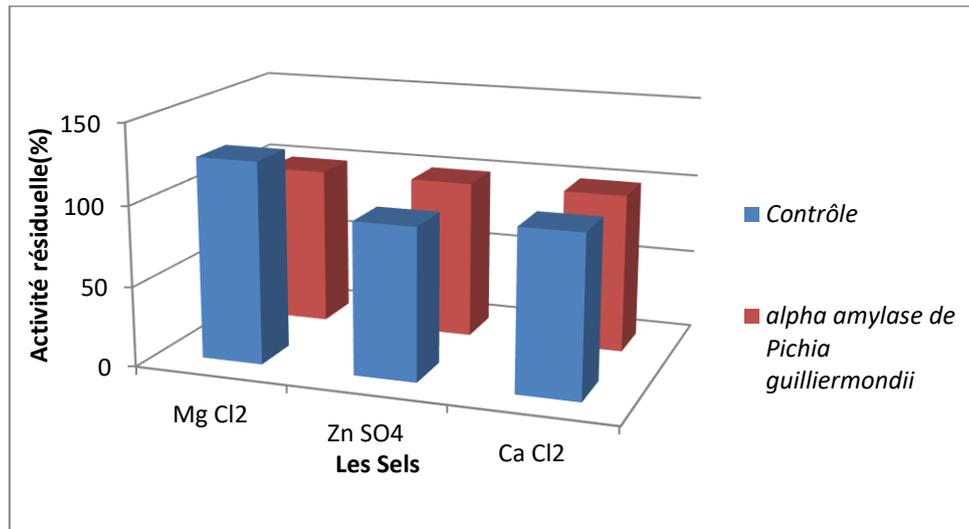
De plus, le risque de contamination par des bactéries mésophiles communes diminue ; un avantage important du point de la production enzymatique ainsi que la purification (Vieille et Zeikus, 2001) ce qui offrent des aptitudes industrielles.

6.Effet des sels sur l'activité enzymatique de l' α -amylase de *Clavispora lusitaniae*, *Pichia guilliermondii* et l' α -amylase commercial

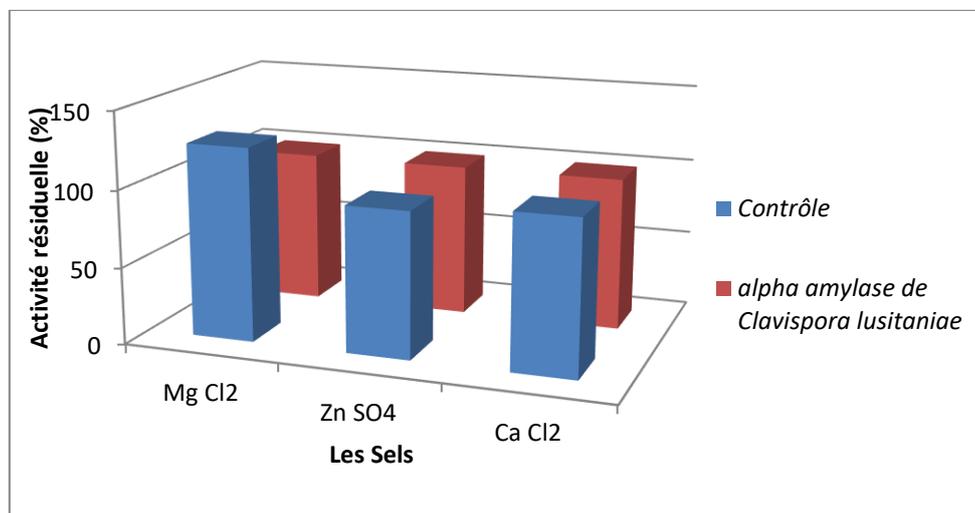
Les ions métalliques sont connus pour stabiliser et activer les enzymes (Vieille et Zeikus, 2011). D'après les figures 19a et 19c, l'activité de l' α -amylase de *Clavispora lusitaniae* et commercial sont inhibées par les cations $MgCl_2$ (99.74% et 99.92% respectivement) et activées par les cations $ZnSO_4$ (99.45% et 99.86% respectivement), Pour le $CaCl_2$, les résultats de la figure 19a montrent une augmentation de l'activité de l' α -amylase commercial (113.86%) et une légère diminution de celle de *Clavispora lusitaniae* (99,4%). Ceci indique que l' α -amylase *Clavispora lusitaniae* n'est pas une metalloenzyme à calcium. Néanmoins, cet ion est important pour l'activité de l'enzyme (Vieille et Zeikus, 2011).



(a) *Clavispora lusitaniae*



(b) *Pichia guilliermondii*



(c) l'enzyme commercial

Figure 19 : Effet de quelques sels sur l'activité α -amylasique produit par *Clavispora lusitaniae* (a) , *Pichia guilliermondii* (b) et l'enzyme commercial(c).

L'enzyme produit par *Pichia guilliermondii* (figure 19b) est inhibée par $MgCl_2$ (99.27%), par contre les autres cations agir comme des activateurs ($ZnSO_4$ 120.05%) et $CaCl_2$ (115%)). L' α -amylase recombinante de la levure *Cryptococcus flavus* maintien son activité initiale, après l'ajout de $CaCl_2$ (Galdino et al., 2011).

Le calcium augmente l'activité amylasique (Leveque et Hii et al., 2009). L'effet stabilisateur de calcium sur la thermostabilité de l'enzyme peut être expliqué par le relargage des résidus hydrophobes par les ions de Ca^{+2} engendrant une structure compacte (Al Quadan et al., 2009) les ions de calcium rendent la molécule de la protéine plus rigide, ce qui conduit à une augmentation de la stabilité thermique de l' α -amylase de *Streptomyces avermitilis* (Hwang et

al., 2013). Mais certaines amylases sont indépendantes de calcium: comme l' α -amylase de notre souche, l'amylase de *Bacillus thermoleavorans* NP 54 (Malhota et al., 2000) n'exige pas le calcium pour son activité ou sa production. Vishnu et al., 2006 ont montré que le CaCl_2 à 2,5mM augmente l'activité α -amylasique de *Lactobacillus amylophilus* GV6 mais à 5mM, il devient inhibiteur de l'enzyme.

L'effet inhibiteur provoqué par Mg^{2+} sur l'activité de l' α -amylase de notre souche *Pichia guilliermondii*, peut être dû à la compétition entre les cations exogènes et les cations associés à la protéine, conduisant à une diminution de l'activité.

Les ions Zn^{2+} , Ca stimulent l'activité de l' α - amylasique commercial, alors que l'activité α -amylasique de notre souche *Clavispora lusitaniae* (a) est inhibé uniquement par les ions Mg^{2+}

Les ions qui stimulent l'activité enzymatique de l' α -amylase comme Mg^{2+} peuvent agir comme cofacteurs nécessaires pour augmenter l'activité enzymatique.

Cette étude a permis d'apprendre que les deux souches BW et BZ (isolées d'écosystèmes arides, région de Biskra, Sud Algérien) ont la capacité de produire de l' α -amylase thermostable. L'identification des deux souches BW et BZ par l'amplification de la région D1/D2 a été réalisée par le Centre International de Ressources Microbiennes (CIRM, Thiverval Grignon, Paris). L'amplification et le séquençage de la région D1/D2 de l'ADN ribosomique 26S et la comparaison avec les bases de données du NCBI ont confirmé l'identification de la souche **BW** à *Pichia guilliermondii* et la souche **BZ** à *Clavispora lusitaniae*.

En effet, la production de l'enzyme est effectuée en erlens meyer de 500 ml contenant le lactosérum décaseiné comme milieu de production. Après 28 h d'incubation à 30° C et sous une agitation de 150 rpm, les deux souches ont montré une bonne croissance et une bonne production enzymatique : 13630 UI pour *Clavispora lusitaniae* et 13344,5 UI pour *Pichia guilliermondii*.

L'extrait enzymatique est concentré par l'acétone (1v:4v). Cette étape a permis l'augmentation de l'activité spécifique de l' α -amylase de 215,6 à 691,28UI/mg de protéines avec une récupération de 61% pour l'enzyme de *Clavispora lusitaniae* et de 271,90 à 677,39 UI/mg de protéines avec une récupération de 74 % pour l'enzyme de *Pichia guilliermondii*, pour le degré de purification, il est de 1,30 et 1,25 respectivement. L' α -amylase est purifiée par la méthode classique de purification. Le profil chromatographique sur Séphadex G75 révèle, chez *Clavispora lusitaniae*, l'existence de deux fractions protéiques contenant des activités α -amylasiques. Le 2^{ème} pic est le plus intéressant car il représente la fraction (F2) protéique et l'activité enzymatique la plus élevée. Pour *Pichia guilliermondii*, le profil d'élution de l'enzyme montre l'existence de trois fractions protéiques contenant des activités α -amylasiques. L'activité la plus importante est celle de la fraction 3 (F3)

L'étude des paramètres physico-chimiques de l' α -amylase de *Clavispora lusitaniae*, *Pichia guilliermondii* et leur comparaison avec une α -amylase commerciale a été réalisée. Les résultats de l'effet du pH (pH 3 à 10) sur l'activité enzymatique montrent des valeurs maximales de 14723,72UI à pH 8 pour l' α -amylase de *Clavispora lusitaniae*., de 17064,64 UI à pH 6 pour l' α -amylase de *Pichia guilliermondii* et de 17724,71UI à pH 9 pour l'enzyme commercial. L'influence de la température sur l'activités α -amylasique est testée sur une gamme de température de 20 à 100°C. l'activité enzymatique de l' α -amylase de *Clavispora lusitaniae* et *Pichia guilliermondii* atteint son maximum respectivement à 70°C (17026,42UI) et à 60°C (19523UI) tandis que pour l' α -amylase commerciale, l'activité enzymatique croit dans la température de 40 °C (13128,53UI). Au delà de ces valeurs, elle commence à diminuer. On

conclue que la température optimale de l' α -amylase de *Clavispora lusitaniae* est la plus élevée suivie de celle de l'enzyme de *Pichia guilliermondii* puis celle de l' α -amylase commerciale.

Nous avons suivi la stabilité des trois enzymes à leurs températures optimales et aussi à 80°C pour une durée d'incubation qui varie de 30min à 120min. Les résultats montrent qu' à 70°C l' α -amylase de *Clavispora lusitaniae* conserve 99,86% de son activité initiale pour un traitement thermique de 60 min. après 120 min d'incubation, l'enzyme maintient 99,57% de son activité. A 80°C et après 120min d'incubation, elle maintien 99,43 % de son activité initiale. Tandis que l' α -amylase de *Pichia guilliermondii* est pratiquement stable. Après une exposition à 60°C pendant 120 min, elle pert seulement 6% de son activité initiale A 80°C, l'enzyme garde 99,72% de son activité après 60min d'incubation, et 99,21% après 120 min. Pour l'enzyme commerciale, elle conserve après 30min de traitement thermique 99,58% et 99,52% de son activité initiale à 40 et 80C° respectivement. Après 120 min d'incubation l'enzyme garde 96,43% de son activité à 40°C et 99,18% à 80°C.

Ces résultats révèlent l' α -amylase des deux levures *Clavispora lusitaniae* et *Pichia guilliermondii* sont très thermostables.

Les sels ($MgCl_2$, $ZnSO_4$ et $CaCl_2$) ont des effets variables sur l'activité enzymatique. L'activité de l' α -amylase de *Clavispora lusitaniae*, *Pichia guilliermondii* et l'enzyme commerciale sont inhibées par le $MgCl_2$ (99,74%, 99,27% et 99,92% respectivement) et sont activées par le $ZnSO_4$ (120,45%, 120,05% et 118,86% respectivement). Quant à $CaCl_2$, il augmente l'activité enzymatique de l'amylase de *Pichia guilliermondii* (115%) et commerciale (113,86%) et il diminue légèrement celle de *Clavispora lustaniae* (99,4%). Les performances des enzymes amylolytiques de ces deux souches de levure (isolées d'un environnement saharien aride) les qualifient de souche d'utilité industrielle en particulier dans les industries de l'amidon, du textile et des détergents pour l'amylase de *Clavispora lusitaniae* puisque c'est une enzyme alcalothermostable et dans les industries agroalimentaire et pharmaceutiques pour l'enzyme de *Pichia guilliermondii* car c'est une enzyme acidothermostable.

En conclusion, une température optimale de 70°C et une thermorésistance à 70°C et 80°C pendant un traitement thermique de 2 heures, et une température de 60°C et une thermorésistance à 60°C et 80°C permet donc de qualifier l' α -amylase produite par *Clavispora lusitaniae* ABS7 et *Pichia guilliermondii* respectivement comme des enzymes thermostables pouvant éventuellement êtres utilisées en industries.

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

- ✚ Une optimisation du milieu de production, pour un meilleur rendement.
- ✚ 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.
- ✚ Rechercher chez *Clavispora lusitaniae* et *Pichia guiliermondii* d'autres enzymes d'intérêt, pouvant ouvrir à d'autres applications industrielles.

Abstract:

Abstract: This work aims to study yeasts's hydrolases and to produce an amylolytic enzyme of yeast origin. Amylases are among the most widely used enzymes in the industry. These enzymes hydrolyze the starch molecules to give glucose unit compounds. The present work concerns the production, characterization and purification of thermostable extracellular α -amylase by yeasts (*Clavispora lusitaniae* and *Pichia guilliermondii*) contaminating wheat grown and harvested in an arid zone (Biskra, Sahara, South Algeria). Production of α -amylase was performed by batch fermentation in 500 ml Erlenmeyer flasks containing whey as the production medium. After 28 hours of incubation with a stirring of 150 rpm, the results showed that the two strains grew well and produced α -amylase: 13630 IU for *Clavispora lusitaniae* and 13344.5 IU for *Pichia guilliermondii*. The purification of alpha-amylase consists in the use of acetone, which allowed the increase of the specific activity of α -amylase from 215.60 to 691.28 IU / mg for *Clavispora lusitaniae* and from 271.90 to 677.39 IU. / mg for *Pichia guilliermondii*. The Sephadex G 75 gel chromatographic profile shows, for the two yeast enzymes, the existence of three protein fractions containing α -amylase activities, the second peak for the enzyme *Clavispora lusitaniae* and the third peak for that of *Pichia guilliermondii* contain the highest protein fractions and enzymatic activities. The study of the physicochemical characteristics of the purified α -amylases showed that the optimum pH, the optimal temperature of the enzyme *Clavispora lusitaniae* are 8 and 70 ° C, those of the α -amylase of *Pichia guilliermondii* are of 6 and 60 ° C and those of the commercial enzyme are 9, 40 ° C. The study of the thermostability of the three enzymes revealed an excellent stability because after incubation for 120 min at 80 ° C, the enzyme *Clavispora lusitaniae* retains 99.43% of its initial activity. For *Pichia guilliermondii*, the enzyme maintains 99.21% of its activity. As for the commercial enzyme, it retains 99.18 of its activity. The effect of metal ions on the α -amylase activity of *Clavispora lusitaniae*, *Pichia guilliermondii*, and the commercial enzyme shows that MgCl₂ is an inhibitor for the three enzymes (99.74%, 99.27% and 99.92% respectively). For ZnSO₄, it increases the activity of 120.45%, 120.05% and 118.86% respectively). As for CaCl₂, it increases the enzymatic activity of *Pichia guilliermondii* amylase (115%) and commercial amylase (113.86%) and slightly decreases that of *Clavispora lusitaniae* (99.4%). The performances of the amylolytic enzymes of these two yeast strains (isolated from an arid Saharan environment) qualify them as a strain of industrial utility, particularly in the starch, textile and detergent industries for *Clavispora lusitaniae* amylase. since it is an alkalothermostable enzyme and in the food and pharmaceutical industries for the *Pichia guilliermondii* enzyme as it is an acidothermostable enzyme.

Key words: α -amylase, *Clavispora lusitaniae*, *Pichia guilliermondii*, thermostability, purification.

ملخص :

يهدف هذا البحث إلى دراسة وإنتاج إنزيم α -اميلاز بواسطة الخمائر حيث تعتبر الإنزيمات الاميلازية (Amylases) من أكثر الأنزيمات المستخدمة على نطاق واسع في الصناعة مع العلم أن هذه الأنزيمات تحلل جزيئات النشاء لإعطاء مركبات من وحدة الجلوكوز بهدف العمل الحالي إلى إنتاج، تنقية ودراسة خصائص α -اميلاز من الخمائر *Pichia guilliermondii* و *Clavispora lusitaniae* الملوثة لقمح المنطقة الجافة (بسكرة، الصحراء-جنوب الجزائر). تمت عملية إنتاج α -اميلاز عن طريق التخمير في قارورة Erlen-Meyers ذات حجم 500 مل تحتوي على مصل اللبن كبيئة لنمو الخمائر وإنتاج الإنزيمي. بعد 28 ساعة من الحضانة مع التحريك 150 دورة في الدقيقة، تبين أن السلالتين نمت جيدا و أنتجت أنزيم α -اميلاز بمقدار 13630 وحدة دولية لكل *Clavispora lusitaniae* و IU 13344.5 و *Pichia guilliermondii*. سمحت عملية تركيز ألفا الأميليز باستخدام ال acetone بزيادة النشاط المحدد ل α الأميلاز من 215,60 إلى 691,28 وحدة دولية لكل مغ ل *Clavispora lusitaniae* ومن 271,90 إلى 677,39 وحدة دولية لكل مغ ل *Pichia guilliermondii*. أظهر الفصل الكروماتوغرافي لإنزيم السلالتين باستخدام هلام Sephadex 75 وجود جزئين من البروتين يحتويان على نشاط α -اميلاز حيث الذروة الثانية لإنزيم *Clavispora lusitaniae* والذروة الثانية ل *Pichia guilliermondii* تحتوي على أعلى كمية من البروتين والنشاط الأنزيمي. دراسة الخصائص الفيزيائية والكيميائية ل α -amylases النقي اظهرت النتائج ان درجة الحموضة المثلى، ودرجة الحرارة المثلى لإنزيم *Clavispora lusitaniae* هي 8 و 70 درجة وبالنسبة لإنزيم *Pichia guilliermondii* هي 6 و 60 درجة مئوية، و الإنزيم التجاري ما بين 9 و 40 درجة مئوية. وتبين من دراسة مقاومة الإنزيمات الثلاثة للحرارة تبين أن لديها مقاومة جيدة لانه بعد الحضانة لمدة 120 دقيقة في 80 °م تحتفظ إنزيم *Clavispora lusitaniae* على 99.43% من نشاطها الأولي بالنسبة ل *Pichia guilliermondii* ، يحافظ الإنزيم على 99.21% من نشاطه. أما بالنسبة للإنزيم التجاري ، فإنه يحتفظ ب 99.18 من نشاطه. أما تأثير ايونات المعادن على نشاط α الأميلاز *Clavispora lusitaniae* ، *Pichia guilliermondii* ، والإنزيم التجاري يظهر التأثير المثبط ل $MgCl_2$ على الأنزيمات الثلاثة 99.74%، 99.27% و 99.92% بالترتيب بالنسبة إلى $ZnSO_4$ ، فإنه يزيد من نشاطها 120.45% ، 120.05% و 118.86% على التوالي. أما بالنسبة ل $CaCl_2$ ، فإنه يزيد من النشاط الأنزيمي لإنزيم *Pichia guilliermondii* (115%) و الاميلاز التجاري (113.86%)، في حين يخفض قليلا من نشاط إنزيم *Clavispora lusitaniae* (99.4%). خصائص الإنزيمات المحللة للنشاء لسلالتي الخميرة (المعزولة عن البيئة الصحراوية الجافة) المستخدمة في دراستنا هذه، تسمح بتأهيل الخميرتين كسلالتين ذات فائدة في الإستعمالات الصناعية، وخاصة في صناعات النشاء والنسيج والمنظفات لاميلاز *Clavispora lusitaniae* لأنه إنزيم قلوي مقاوم للحرارة العالية ، وفي الصناعات الغذائية والصيدلانية لإنزيم *Pichia guilliermondii* بما أنه إنزيم حامضي مقاوم للحرارة العالية.

الكلمات المفتاحية: ألفا اميلاز، *Clavispora lusitaniae*، *Pichia guilliermondii*، مقاومة حرارية، تنقية.

A

- 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.
- Ait Kaki A. (2004).** Isolement de la moisissure *Rhizopus oryzae* et optimisation d’un milieu à base de lactosérum pour la production de l’ α -amylase. Thèse de magistère. Université Mentouri Constantine.
- Alais C. (1981).** La valorisation du lactosérum « les bases et les problèmes ». Technique laitière N°952, p : 7-10.
- Al-Quadani F., Akel H. and Natshi R. (2009).** Characteristics of a novel highly thermostable and extremely thermophilic alkalitolerant amylase from hyperthermophilic *Bacillus* Strain HUTBS71. J. Biol. Sci.,(3): 67-74.
- Amalesh Samanta, Debmalya Mitra, Sudipendra Nath Roy, Chandrima Sinha, Pinaki Pal .** Characterization and Optimization of Amylase Producing Bacteria Isolated from Solid Waste , Division of Microbiology, Department of Pharmaceutical Technology, Jadavpur University, Kolkata, India. Journal of Environmental Protection, 2013, 4, 647-652.
- Anonyme. (2007).**Développement des biocarburants et formulation des politiques agricoles futures en Afrique de l’Ouest et du Centre. Lettre de politique agricole de la CMA/AOC (LEPAC) - N°4.
- Ait Abdel Ouahab N., 2008.** microbiologie alimentaire. 4362. Ed 3. Office des publications universitaires Constantine. Alger. 147p.

B

- 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,p :7-12.
- Barnett J. A., Payne R. W. and Yarrow D. 2000.** Yeast: Characteristics and identification. Third edition 2000, reprinted 2007. Cambridge University Press.

Références bibliographiques

- Bechal A., Singh J., Sharama M.K., Pur P. and Batra N. (2006).** Characterisation of Alkaline α -Amylase from *Bacillus* sp AB 04. *International Journal of agriculture & Biology*, 08(1), p : 80-83.
- 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.
- 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.
- Bennamoun leila, 2017.** Isolement, sélection de souches levuriennes de sols arides sahariens (El-M'gheir) production de polygalacturonasz : purification et caractérisation enzymatique. Université Mentouri de Constantine.
- Bertoldo, Costanzo, et Garabed Antranikian. (2002).** Starch-hydrolyzing enzymes from thermophilic archaea and bacteria. *Current opinion in chemical biology*. 6(2) : 151–160.
- 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 béta-oxydase impliquer. Thèse de doctorat. Ecole Nationale Supérieur de Biologie Appliquée à la Nutrition et à l'Alimentation. Université de Bourgogne, France.
- Bouatenin Koffi Maïzan , Jean-Paul, Djéni N'dédé Théodore, Kakou Abodjo Célah, Menan Eby Hervé, DjeKoffi Marcellin ; 2016.** Optimisation De La Production De L' α -Amylase Par Les Microorganismes Isolés Des Ferments Traditionnels De Manioc Provenant De Trois Zones De Production De L'attiéké En Côte d'Ivoire. Département des sciences et technologies des aliments, Université de Nangui Abrogoua, Abidjan, Côte d'Ivoire.
- Bouix M., Leveau J.Y. (1991).** Les levures Ds : Bourgeois C.M., Leveau J.Y. Techniques d'analyse et de contrôle dans les industries agroalimentaires, édition 21 Lavoisier-Tec & Doc : 206-229.

Références bibliographiques

- 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 ;** Mesclé J.F. et Zucca J. (1988). Microbiologie alimentaire, Tome 1. Aspect microbiologique de la sécurité et de la qualité alimentaires, Technique et Documentation-Lavoisier, Paris. 8,p : 161-171.
- 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.
- Bourgeois C.M,** (1996) ; Mesclé J-F, Zucca J Microbiologie alimentaire Tome 1 : Aspect microbiologique de la sécurité et de la qualité des aliments-2^{ème} édition Ed. Tec & Doc,p- 672.
- Bozic N., Ruiz J.,** Lopez-Santin J., V. Vujcic (2011). Production et propriétés de l' α -amylase digérant l'amidon brut hautement efficace à partir d'un *Bacillus licheniformis* ATCC 9945a.
- Burhan A.,** Nisa U., Gokhan C., Omer C., Ashabil A. and Osmane G (2003). Enzymatic properties of novel thermostable ,thermophilic, alkaline and chelator resistant amylase from an alkaliphilic *Bacillus* sp. Isolate ANT -6. process Biochem.,38,p :1397-1403.
- C**
- Carlos Alberto Martins** Cordeiro; Meire Lelis Leal Martins; Angélica Bárbara Luciano. Production and Properties of α -amylase from Thermophilic *Bacillus* sp. Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes, RJ, Brasil, Brazilian Journal of Microbiology (2002) 33:57-61.
- Charles A,** Guy L et Laurent M. (2003) .Biochimie alimentaire, 5^{ème} édition de l'abrégé. Dunod, Paris.
- Cordeiro C.A ;** Leal M.L. and Luciano A.B. (2002). Production and properties of α -amylase from thermophilic *Bacillus* sp. Braz. J. Microbiol.,33(1), Sao Paulo.

Cosma MP. (2004). Daughter-specific repression of *Saccharomyces cerevisiae* HO: Ash1 is the commander. *EMBO reports*, 5: 953-957.

Coulibaly W.H., N'guessan K.F., Coulibaly I. et al. (2014). *Biotechnol. Agron. Soc.* 18(2) :209-219.

D

D. S. Djekrif L. Gillmann, N. Cochet, L. Bennamoun, A. Ait-Kaki, K. Labbani, T. Nouadri and Z. Meraihi. Optimization of thermophilic pullulanase and α -amylase production by amyolytic yeast. *International Journal of Microbiology research*, 2014, 6 (2), :559-569.

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 amyolytic enzymes from the yeast *Filobasidium capsuligenum*. (1985). *Applied and Environmental microbiology.*50 (6) : 1474-1482.

De Mot René and Verachlert Hubert. (1987). Purification and characterization of extracellular α -amylase and glucoamylase from the yeast *Candida Antarctica* CBS6678. *Eur. J. Biochem.* 164:643 654. 149.

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.

Dibyangana Raul,Tania Biswas,Suchita Mukhopadhyay,Shrayan Kumar Das,and Suvroa Gupta. Production and Partial Purification of Alpha Amylase from *Bacillus subtilis* (MTCC 121) Using Solid State Fermentation, Department of Biotechnology, Haldia Institute of Technology, ICARE Complex,Purba Medinipur 721657, India. Hindawi Publishing Corporation *Biochemistry Research International* Volume 2014, Article ID 568141, 5 pages.

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 amyolytic yeast. *International journal of microbiology research.* 6 (2) : 559-569.

Références bibliographiques

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.

E

Eksteen J.M., Steyn A.J., van Rensburg P., Cordero R. R and Pretorius I .S. (2003). Cloning and characterization of a second alpha-amylase gene (LKA2) from *Lipomyces kononenkoae* IGC4052B and its expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *InterScience* .1, p:6978.

F

Ferhat Hamid.S et Laklouka. N,(2015). Contribution à l'étude de l'alpha amylase levurienne : optimisation des conditions de production. Université d'El Oued.

Fogarty W.M. and Kelly A. (1980). Amylases amyloglycosidases and related glucanases in Ecanon. microbiology. Acad press, New York and London. : 17-24.

François F., Noël T., Pépin R., A Brulfert., Chastin C., Favel A. and Villard J. Alternative identification test relying on sexual reproductive abilities of *Candida lusitaniae* strains isolated from hospitalized patients. *J. Clin. Microbiol.*, 2001, 39: 3906-14.

G

Gaëlle Fleitour. (2012). Les génériques des biotechs débarquent. L'Usine Nouvelle 3277. <http://www.usinenouvelle.com/>.

Girmenia, 2006 ; Chester R. Cooper J, 2011. The yeasts (Fifth Edition), pages 621-624. Chapitr 47 : *Meyerozyma Kurtman & M. Suzuki* (2010).

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.

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

Gupta R., Gigras P., Mohapatra H., Goswami I V.K., Chauhan B. 2003. Microbial α -amylases: a biotechnological perspective, *Process Biochemistry*.

H

Références bibliographiques

Haq I., Ahsraf H.,Iabal J. and Qadeer M.A. (**2003**). Production of α -amylase by *Bacillus licheniformis* using an economical medium, In : Behal A.,Singh J.,Shrama M.K., Pur P and Btra N., Characterisation of Alkaline α -Amylase from *Bacillus* sp AB04.International Journal of Agriculture & Biology.,08(1) ,p : 80-83.

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.

Hwang S. Y., Nakashima K., Okai N., Okazaki F., Miyake M., Harazono K., Ogino C. and Kondo A. (**2013**) Thermal stability and starch degradation profile of α -amylase from *Streptomyces avermitilis*. Biosci Biotechnol Biochem., 77(12):2449-53.

J

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.

K

K. Benaouida, Meraihi Z., Labbani F., Dakhmouche S. Et Bennamoun L. Production d'une alpha amylase thermostable par *Schwanniomyces* sp. Séminaire International de Biochimie et de Biotechnologie moléculaire, 13 -14 Octobre 2009, Constantine.

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.

Kato S., Shimizu Ibuka A., Mura K., Takeuchi A., Tokue C. and Arai S. Molecular cloning and characterization of an alpha amylase from *Pichia burtonii* 15-1. Biosci. Biotechnol. Biochem., 2007, 71 (12): 3007-3013.

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.

Références bibliographiques

- 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 : 100108.
- Kikani BA,** Singh SP (2011). Purification en une seule étape et caractérisation d'une α -amylase thermostable et indépendante du calcium de *Bacillus amyloliquifaciens* TSWK1-1 isolée du réservoir de source chaude de Tulsi Shyam, Gujarat (Inde) . Int. J. Biol. Macromol. 48 , 676-681. 10.1016 /
- 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*.
- Klei I.V.,** Veenhuis M., Brul S., Klis F.M., De Groot P.W.J., Wally H. Müller W.H., van Driel K.G.A., Boekhout T. (2011). Cytology, Cell Walls and Septa: A Summary of Yeast Cell Biology from a Phylogenetic Perspective. In: C.P. Kurtzman., J.W. Fell., T. Boekhout (Eds), The Yeasts, a Taxonomic Study. Elsevier, London, pp. 115.
- Kolli.N et Zatout.R,** (2015). Production de l'alpha amylase par certaines souches fongiques sur différents substrats. Université Mentouri, Constantine.
- Kreger-Van- N.J.** (1984). The yeasts, a taxonomic study. Elsevier Science publishing, Amsterdam.
- Kurtzman C. P(2011a),** Part Iva. Classification of the Ascomycetous Taxa Chapitre 13. Discussion of Teleomorphic and Anamorphic Ascomycetous and Yeasts-Like-Taxa. In Kurtzman C. P., Fell J. W. and Boekhout T (Eds). The yeasts, a taxonomic study. Volume 2. Fifth edition. Elsevier, p. 293-311.
- Kurtzman C.P. (2011a).** Discussion of Teleomorphic and Anamorphic Ascomycetous Yeasts and Yeast-like Taxa. In: C.P. Kurtzman., J.W. Fell., T. Boekhout (Eds), The Yeasts, a Taxonomic Study. Elsevier, London, pp. 304.
- Kurtzman C.P.,** Fell J.W., Boekhout T., Robert V. (2011a). Methods for isolation, phenotypic characterization and maintenance of Yeasts. In: C.P. Kurtzman., J.W. Fell., T. Boekhout (Eds), The Yeasts, a Taxonomic Study. Elsevier, London, pp. 87–110.
- Kurtzman et M. Suzuki ; 2010.** The yeasts (Fifth Edition),pages 9-19.

Références bibliographiques

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.

L

Labrecque M.H. (2003). Etude de la capacité de deux souches de levures à dégrader le xylène. Mémoire, Faculté des science de l'agriculture et de l'alimentation, Université LAVAL, p : 19-24.

Lachance Marc-André (2011a). Yeast. Encyclopaedia of Life Sciences, Wiley John Wiley and sons, p.12-56.

Lachance Marc-André(2011b). Chapitre 21: Clavispora Rodrigues de Miranda (1979) in Kurtzman C; P., Fzll J. W. and Boekhout T. The yeast. A taxonomic study. Volume 2. Fifth edition 2011b. Elsevier.

Lammi S., 2011. Recherche de substances à activités antimicrobiennes (antibactériennes et anticandidoses) produites par des souches levuriennes isolées des sols sahariens. Département de Biochimie et de Microbiologie. Université Mentouri. Thèse de Magistère, Constantine. 91p.

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.

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.

LLodder J., 1971. The yeast, a taxonomic study, 2ème edition. North Holland, Amsterdam, Londres. p: 1385.

Lourens K and Reid G. (2002). Yeast nutrient management in winemaking. The Australian & New Zealand Grapegrower & Winemaker. Annual Technical Issue. p: 50- 54.

M

Références bibliographiques

- Madigan M. T., Martino J. M. (2006).** Brock biology of microorganisms. pearson education. Upper Saddle River, NJ, USA.
- Malhotra R., Noorwez SM, Satyanarayana T. (2000).** Production and partial characterization of thermostable and calcium independent α - amylase of extreme thermophile *Bacillus thermooleovorans* NP54. Lett. Appl. Microbiol., 31: 378-384.
- Mamo G., Gessesse A. (1999).** Purification and characterization of two raw-starch-digesting thermostable α -amylase from a thermophilic *Bacillus*. Enzyme and microbial technology. (25) : 433-438
- Marlene C., 2006.** Etudes physiologiques de l'adaptation et de la résistance de la levure *Saccharomyces cerevisiae* au cours de la production intensive d'éthanol. Thèse doctorat Microbiologie et Biocatalyse industrielles. Toulouse. INSA.265P.
- Merabti R.,2006.** Isolement et caractérisation de souches levuriennes amylolytiques à partir de sol saharien algérien. Diplôme de magistère. Université Mentouri, Constantine. 139p..
- Mercier C. (1997).** Transgènes et modification quantitative et/ou de la composition de lait à de fin nutritionnels. *In* : Frened G. (Ed), intérêt nutritionnels et diététique du lait de chèvre. Nord-France. P : 169-177.
- Mesbah NM, Wiegel J. (2014).** L'amylase halophile alcaline et thermostable d'un nouveau *Amphibacillus* sp. NM-Ra2 . Int. J. Biol. Macromol. 70 , 222-229. 10.1016 / j.enzmictec.2013.03.009
- Moranelli F., Yaguchi M., Calleja G.B. and Nasim A. (1987).** Purification and characterisation of the extracellular alpha-amylase activity of the yeast *Schwanniomyces alluvius*. Biochem Cell BIO.,65(10), p :899-908.

N

- Nadeem S.G., Shafiq A., Hakim S.T., Anjum Y., Kazm S.U. (2013).** Effect of Growth Media, pH and Temperature on Yeast to Hyphal Transition in *Candida albicans*. OJMM, 3: 185192.

Références bibliographiques

Nouadri Al-Taher, Meraihi Z And Djekrif Dakhmouche S. Optimization of medium components for the production of alpha-amylase by *Penicillium camemberti* PL21. The Arab Journal Of Laboratory Medicine, 2005, 31 (3) : 441-449.

O

Oteng-Gyang K, 1984. Introduction à la microbiologie alimentaire dans les pays chauds. Technique & Documentation Lavoisier, Paris. 8, p : 43-51.

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.

P

Panchal C.J, (1990). Yeats strain selection. Marcel Dekker (ed) USA, : 189.

Perscott L.M., Harley J.P et Kelein D.A. (2007). Microbiologie. 2^{ème} édition. De boeck:554,984.

Phaff H.G., Miller M.W and Mark E.K. (1968). The life of yeasts. In : Oteng-Gyang K. Introduction à la microbiologie alimentaire dans les pays chauds. Technique & Documentation Lavoisier, Paris. 8, p :43.

Prescott., Hartley., Klein. (1995). Microbiologie 2^{ème} édition Ed. De Boeck-Wesmael SA.P. 1014.

Prieto J.A., Bort B. R., Martinez J., Randez G. F., Buessa C and Sanz P. (1995). Purification and Characterisation of new alpha-amylase of intermediate thermal stability from the yeast *Lipomyces kononenkoae*. Biochem Cell Biol.,73 (1-2), p : 41-9.

R

Ranjan K., and Sahay S. (2015). *Clavispora lusitaniae* produce pH and temperature tolerant extracellular amylase. Point J. Bot. Microbiol. Res. 1(1): 007-014.

Reski-Bekki M.A, (2014). Production de metabolites par les levures: caractérisation et identification des arômes et des alcools. Thèse de doctorat, Université d'Oran. Algérie.

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

- Saci Amina, (2012).** Production d'alpha-amylase par *Streptomyces* sp. Optimisation d'un milieu de production à base de déchets d'orange.thèse de magister. Université Mentouri, Constantine.
- 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.
- 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.
- 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
- 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.

T

- Takeuchi, 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
- 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.
- Tibor Deak., 2007.** Handbook of food spoilage yeasts. 2end Ed. DNLM. New York. 350P.

V

- Vieille C and Zeikus J.G. (2001).** Hyperthermophilic Enzymes :Sources Uses, and Molecular Mechanisms for Thermostability . *Microbiology and Molucular Biology Reviews.*,65(1), p :1-43
- 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).**

Références bibliographiques

A novel triculture system (CC3) for simultaneous enzyme production and hydrolysis of common grasses through submerged fermentation. *Frontiers in microbiology*. 5(26) : 140-250.

W

Waldron K, (2010). bioalcohol production: biochemical conversion of lignocellulosic biomass. woodhead publishing limited and CRC press LLC, cornwall, 467p.

Walker G, (2000). The role of metal ions in optimising yeast fermentation performance. In: Nutritional aspects II. Synergy between yeasts and bacteria. Lallemand Technical Meeting . p: 27-30.

Walker G. M., & White N. A. (2005). Introduction to Fungal Physiology. In « Kavanagh K ; FUNGI/ biology and applications, John Wiley & Sons Ltd ; Chichester, 267p. »

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*. *Applid and environmenta microbiology*. 55(12) : 3167-3172.

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.

X

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.

Z

Zhang Hao, Yuping Ran Dongming Li, Yongfang Liu, Yun Xiang, Ruifeng Zhang and Yaling Dai. (2010) . *Clavispora lusitaniae* and *Chaetomium atrobrunneum* as Rare Agents of Cutaneous Infection. *Mycopathologia*, 169 (5): 373-380.

Zoubiri Lamia, (2011). Production d'alpha amylase par des moisissures cultivées sur milieu à base de rebuts de dattes. Université Mentouri, Constantine.

(<http://coproweb.free.fr/mycoweb/texte/153.htm>) : 06/03/2009.

(https://en.wikipedia.org/wiki/Pichia_guilliermondii) : 24 /05 /2018. 38(1):599-616.

Résumé : Notre travail consiste à produire une enzyme amylolytique d'origine levurienne. Les amylases sont parmi les enzymes les plus utilisées dans l'industrie. Ces enzymes hydrolysent les molécules d'amidon pour donner des composés d'unités de glucose. Le présent travail porte sur la production, caractérisation et purification de l' α -amylase extracellulaire thermostable par des levures (*Clavispora lusitaniae* et *Pichia guilliermondii*) contaminant le blé cultivé et récolté dans une zone aride (Biskra, Sahara, Sud Algérie). La production de l' α -amylase a été réalisée par fermentation en batch dans des erlenmeyers de 500 ml contenant du lactosérum comme milieu de production. Après 28 heures d'incubation sous une agitation de 150 rpm, les résultats ont montré que les deux souches ont bien poussé et ont produit de l' α -amylase : 13630 UI pour *Clavispora lusitaniae* et 13344,5 UI pour *Pichia guilliermondii*. La purification de l' α -amylase consiste à l'utilisation de l'acétone qui a permis l'augmentation de l'activité spécifique de l' α -amylase de 215.60 à 691.28 UI/mg pour *Clavispora lusitaniae* et de 271.90 à 677.39 UI/mg pour *Pichia guilliermondii*. Le profil chromatographique de gel filtration sur sephadex G 75 montre, pour les deux enzymes levuriennes, l'existence de deux fractions protéiques contenant des activités α -amylasiques dont le 2^{ème} pic pour l'enzyme de *Clavispora lusitaniae* et le 2^{ème} pic pour celle de *Pichia guilliermondii* renferment les fractions protéiques et les activités enzymatiques les plus élevées. L'étude des caractéristiques physico-chimiques des α -amylases purifiés a montré que le pH optimum, la température optimale de l'enzyme de *Clavispora lusitaniae* sont de 8 et 70 °C, ceux de l' α -amylase de *Pichia guilliermondii* sont de 6 et 60°C et ceux de l'enzyme commerciale sont de 9,40°C. L'étude de la thermostabilité des trois enzymes a révélé une excellente stabilité car après incubation de 120 min à 80°C, l'enzyme de *Clavispora lusitaniae* garde 99,43% de son activité initiale. Pour *Pichia guilliermondii*, l'enzyme maintient 99,21% de son activité. Quant à l'enzyme commerciale, elle conserve 99,18 de son activité. L'effet des ions métalliques sur l'activité α -amylasique de *Clavispora lusitaniae*, *Pichia guilliermondii*, et l'enzyme commerciale montre que le MgCl₂ est un inhibiteur pour les trois enzymes (99,74%, 99,27% et 99,92% respectivement). Pour le ZnSO₄, il augmente l'activité de 120,45%, 120,05% et 118,86% respectivement). Quant à CaCl₂, il augmente l'activité enzymatique de l'amylase de *Pichia guilliermondii* (115%) et commerciale (113,86%) et il diminue légèrement celle de *Clavispora lusitaniae* (99,4%). Les performances des enzymes amylolytiques de ces deux souches de levure (isolées d'un environnement saharien aride) les qualifient de souche d'utilité industrielle en particulier dans les industries de l'amidon, du textile et des détergents pour l'amylase de *Clavispora lusitaniae* puisque c'est une enzyme alcalothermostable et dans les industries agroalimentaire et pharmaceutiques pour l'enzyme de *Pichia guilliermondii* car c'est une enzyme acidothermostable.

Mots clés : α -amylase, *Clavispora lusitaniae*, *Pichia guilliermondii*, thermostabilité, purification

Jury

Présidente : Mme BENNAMOUN L.
Constantine 1.

M.C.B, Université Frères Mentouri

Encadreur : Mme DAKHMOUCHE S.

M.C.A, ENS, ASSIA DJEBAR, Constantine.

Examinatrice: Mme LABBANI F.Z.-K.

M.C.B, ENS, ASSIA DJEBAR, Constantine.

