



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE

جامعة الاخوة منتوري قسنطينة 1

Université des Frères Mentouri Constantine 1

كلية علوم الطبيعة والحياة

Faculté des sciences de la nature et de la vie

Département : Biochimie/ Biologie Cellulaire et Moléculaire Mémoire

Présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master

Filière : sciences biologiques

Spécialité : *Biochimie*

Thème :

***Etude de la production d' α -amylase levurienne avec des
nouvelles propriétés à intérêt industriel.***

✚ Présenté et soutenu par :

Le : 22 / 09 / 2021.

Ghomrani Said Djamel-Eddine.

Boukerrou Fatima Zohra Sara.

✚ Jury d'évaluation :

Présidente de jury : Bennamoun L. M.C.B, Université Frères Mentouri Constantine 1.

Encadreur : Dakhmouche S. M.C.A, ENS, Assia Djebar, Constantine.

Examinatrice : Labbani F-Z. k. M.C.B, ENS, Assia Djebar, Constantine.

Année universitaire : 2020/2021.

Remerciement

Tout d'abord je tiens à remercier *ALLAH* le tout puissant de m'avoir donné la santé, la volonté, le courage et la patience pour mener à terme ma formation et pourvoir réaliser ce travail de recherche.

Mes remerciements s'adressent particulièrement au Docteur *DAKHMOUCHE/DJEKRIF* Shahrzade, pour son encadrement de qualité, sa motivation professionnelle, ses conseils et critiques constructives, ses corrections, sa gentillesse et sa patience ainsi pour le temps qu'il a consacré à la réalisation de ce travail.

En guise de reconnaissance, je tiens à remercier, très sincèrement, le docteur *BENNAMOUNE* Leila, responsable de la formation Master biochimie, j'ai eu l'honneur et la chance de bénéficier de ses connaissances et compétences, de ses précieux conseils et de son suivi tout au long de notre parcours académique. Son sens élevé du devoir, le fait d'être toujours montré à l'écoute ainsi que sa rigueur scientifique impose l'estime et le respect. Je vous remercie infiniment.

Mes remerciements vont également à toute l'équipe du laboratoire *GEA* (génie enzymatique et application –Constantine), qui m'ont ouvert les portes des structures dont ils avaient la responsabilité et qui ont tout mis à ma disposition pour me permettre de travailler dans les meilleures conditions.

Je tiens à remercier les membres du jury pour leur présence, pour leur lecture attentive de ce mémoire, ainsi que pour les remarques qu'ils m'adresseront lors de cette soutenance afin d'améliorer mon travail. Ainsi mes enseignants, espérant que vous allez voir, dans ce manuscrit, les fruits du dévouement avec lequel vous avez fait preuve durant les enseignements que vous nous avez prodigué.

J'adresse également des remerciements à tous les enseignants de la faculté des sciences de la nature et de la vie – université des frères Mentouri Constantine 1 en général, et aux membres de l'équipe de formation master *BIOCHIMIE* en particulier, et qui ont déployé leurs efforts pour assurer une formation aussi complète, pour aider et soutenir toute la promotion de *BIOCHIMIE* le long du cycle.

De peur d'en avoir oublié, je souhaite remercier tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à l'élaboration de ce mémoire ainsi qu'à la réussite de ce parcours universitaire.

Dédicace

Je dédie entièrement ce travail à ma mère et mon père, mes piliers, mes exemples, mes premiers supporteurs et ma plus grande force. Merci pour votre présence, votre soutien, votre aide financière, et surtout votre amour, merci de n'avoir jamais douté de moi. Tout ce que j'espère, c'est que vous soyez fiers de moi aujourd'hui.

À mes chers frères MIDOU et KHALIL, qui font de mon univers une merveille, je leurs souhaite beaucoup de bonheur et de réussite.

À mes oncles SALAH, SAMIR, MOURAD, FARES, MOUHAMED et AHMED mes tantes YASMINA, FOUZIA et DALILA pour leur soutien et leur tendresse.

À toute la famille de mon père surtout ma chère tante FATIMA.

À mes grandes mères SERHOUDA et ZOHRA mes grands-pères BOUJAMAA et BOUKHMIS.

À tous ceux qui m'aiment... je les remercie tous.

BOUKERROU FATIMA ZOHRA SARA

Dédicace

Au meilleur des pères Abdelkrim

A ma très chère maman Samia

Qu'ils trouvent en moi la source de leur fierté A qui je dois tout

*A mes sœurs Maroua, Lamis et Nibras Que j'espère réussir au
baccalauréat.*

Ma nièce Norssine

A mes Amis

A tous ceux qui me sont chers

GHOMRANI SAID DJAMEL EDDINE.

Résumé :

Le présent travail s'inscrit dans le cadre de la production d'une α -amylase levurienne avec des nouvelles propriétés. 24 souches isolées préalablement ont été utilisées pour l'étude de la production α -amylasique. La mise en évidence de l'activité de l'amylase a montré que 15 de ces souches sont des levures amylolytiques. Le screening par la mesure de la zone d'hydrolyse formée sur la surface du milieu de culture YPSA a permis la sélection de la souche la plus performante P3 car elle est hautement productrice de l' α -amylase. L'étude des caractères morphologiques et physiologiques indiquent que la souche P3, appartient au genre *Candida*. La production d' α -amylase a été réalisée en présence de différents résidus agroalimentaires tels que les pelures de pomme de terre (PPT) et les déchets de peau de banane (DPB) en fermentation liquide et solide. Les résultats indiquent que la meilleure production α -amylasique de 1522.46 ± 359.12 U/g est obtenue par fermentation en milieu solide à base de DBP. Afin d'améliorer la production enzymatique, la méthode d'OFAT a permis d'optimiser les conditions de la fermentation à savoir : température 37°C, pH 0.7, temps d'incubation 48h, glucose 1%, peptone 0.5%, humidité 60%, densité d'inoculum 4.10^5 cellules/ml. Dans ces conditions optimales, nous avons constaté que la production enzymatique a pratiquement doublé (3963.96 U/g) par rapport à la production non optimisée (1522.46 ± 359.12 U/g). L'extrait enzymatique est purifié partiellement par le sulfate d'ammonium puis par dialyse, et par acétone. Il s'est avéré que l'acétone est meilleure pour la précipitation de l'enzyme avec un taux de purification de 3.04 et un rendement de 13.09%. L'immobilisation de l' α -amylase sur billes d'alginate de calcium est effectuée à 3% de d'alginate de calcium avec un rendement acceptable de 55.37%. L' α -amylase immobilisée dans les billes d'alginate peut être réutilisée jusqu'à 03 cycles, elle maintient presque la totalité (99.63 %) de son activité initiale. L' α -amylase libre et immobilisée sont fortement dépendantes de la température, la température optimale de l'enzyme libre est de 80°C et celle de l'enzyme immobilisée est de 95°C. L' α -amylase de *Candida sp* P3 est thermostable car elle conserve 99.8% et 99.65% de son activité initiale après 180min d'incubation 80°C et à 100°C respectivement. L'application de l'enzyme dans la fabrication de tissus a également montré des résultats très positifs en analysant la couche d'amidon présente dans le tissu.

Mots clé : levure, *candida sp*, α -amylase, optimisation, purification et immobilisation.

Abstract:

The present work is part of the production of a yeast α -amylase with novel properties. 24 previously isolated strains were used to study α -amylase production. Screening for amylase activity showed that 15 of these strains are amylolytic yeasts. Screening by measuring the hydrolysis zone formed on the surface of the YPSA culture medium allowed the selection of the best performing strain P3 because it is highly productive of α -amylase. The study of morphological and physiological characters indicated that the strain P3, belongs to the genus *Candida*. The production of α -amylase was carried out in the presence of different agri-food residues such as potato peels (PPT) and banana peel waste (DPB) in liquid and solid fermentation. The results indicate that the best α -amylase production of 1522.46 ± 359.12 U/g is obtained by solid medium fermentation with DBP. In order to improve the enzyme production, OFAT method optimized the fermentation conditions namely: temperature 37°C , pH 0.7, incubation time 48h, glucose 1%, peptone 0.5%, humidity 60%, inoculum density 4.105 cells/ml. Under these optimal conditions, we found that the enzyme production almost doubled (3963.96 U/g) compared to the non-optimized production (1522.46 ± 359.12 U/g). The enzyme extract was partially purified by ammonium sulfate and then by dialysis, and by acetone. Acetone was found to be better for enzyme precipitation with a purification rate of 3.04 and a yield of 13.09%. Immobilization of α -amylase on calcium alginate beads is performed at 3% d' calcium alginate with an acceptable yield of 55.37%. The α -amylase immobilized in alginate beads can be reused up to 03 cycles, it maintains almost all (99.63%) of its initial activity. Both free and immobilized α -amylase are highly temperature dependent, the optimum temperature of the free enzyme is 80°C and that of the immobilized enzyme is 95°C . The α -amylase from *Candida sp* P3 is thermostable as it retains 99.8% and 99.65% of its initial activity after 180min of incubation 80°C and at 100°C respectively. The application of the enzyme in the manufacture of fabrics has also shown very positive results by analyzing the starch layer present in the fabric.

Keywords: yeast, *Candida sp*, α -amylase, optimization, purification, immobilization.

الملخص:

العمل الحالي هو جزء من إنتاج انزيم ألفا أميلاز من سلالات الخميرة بخصائص جديدة. تم استخدام 24 سلالة معزولة مسبقاً لدراسة إنتاج α -amylase. أظهر فحص نشاط الأميلاز أن 15 من هذه السلالات عبارة عن خمائر الحالة للأميلوليز. سمح الفحص عن طريق قياس منطقة التحلل المائي المتكونة على سطح وسط استزراع YPSA باختيار السلالة الأفضل أداءً P3 لأنها عالية الإنتاجية. أشارت دراسة الخصائص المورفولوجية والفسولوجية إلى أن السلالة P3 تنتمي إلى جنس المبيضات. تم إنتاج α -amylase في وجود مخلفات غذائية زراعية مختلفة مثل قشور البطاطس (PPT) ومخلفات قشر الموز (DPB) في التخمير السائل والصلب. تشير النتائج إلى أن أفضل إنتاج لـ α -amylase هو $1522.46 \pm$ U / g359.12 يتم الحصول عليه عن طريق التخمير الصلب باستخدام DBP. من أجل تحسين إنتاج الإنزيم، عملت طريقة OFAT على تحسين ظروف التخمير وهي: درجة الحرارة 37 درجة مئوية، ودرجة الحموضة 0.7، ووقت الحضنة 48 ساعة، والجلوكوز 1٪، والبيبتون 0.5٪، والرطوبة 60٪، وكثافة اللقاح 4.10^5 خلية / مل. في ظل هذه الظروف المثالية، وجدنا أن إنتاج الإنزيم تضاعف تقريباً (3963.96 U / g) مقارنة بالإنتاج غير المحسّن (1522.46 ± 359.12 U / g). تمت تنقية مستخلص الإنزيم جزئياً بواسطة كيرينات الأمونيوم ثم بغسيل الكلى والأسيتون. وجد أن الأسيتون أفضل في ترسيب الإنزيم بمعدل تنقية 3.04 وعائد 13.09٪. يتم إجراء تثبيت α -amylase على حبيبات ألجينات الكالسيوم عند 3٪ ألجينات الكالسيوم مع عائد مقبول 55.37٪. يمكن إعادة استخدام α -amylase المثبت في حبيبات الألجينات حتى 03 دورات، وهو يحافظ تقريباً على (99.63٪) من نشاطه الأولي. يعتمد كل من α -amylase الحر والمثبت بشكل كبير على درجة الحرارة، ودرجة الحرارة المثلى للإنزيم الحر هي 80 درجة مئوية ودرجة حرارة الإنزيم الثابت 95 درجة مئوية. إن α -amylase من *Candida sp* P3 قابل للحرارة حيث يحتفظ بنسبة 99.8٪ و99.65٪ من نشاطه الأولي بعد 180 دقيقة من الحضنة 80 درجة مئوية وعند 100 درجة مئوية على التوالي. كما أظهر تطبيق الإنزيم في صناعة الاقمشة نتائج إيجابية جدا عن طريق تحليل طبقة النشاء الموجودة في القماش.

الكلمات المفتاحية: الخميرة ، *Candida sp* ، α -amylase ، التحسين ، التنقية ، التثبيت.

Table des matières

Introduction

Etudes bibliographiques

Chapitre 1 Les levures

I	Levures	2
II	Habitat	2
III	Reproduction	2
III.1.	Reproduction sexuée :	3
III.2.	Reproduction asexuée :	3
IV	Nutrition et besoins physico-chimiques	4
IV.1.	Besoins nutritifs.....	4
IV.2.	Besoins physico-chimiques	5
V	Levures du genre Candida.....	5
V.1.	Importance de la levure Candida.....	6
VI	Levures et biotechnologies	7
VI.1.	Levures productrices d'enzymes	7
VI.2.	Levures amylolytiques :	9

Chapitre 2 L' α -amylase

I	Généralité sur les enzymes	10
II	Enzymes amylolytiques.....	10
II.1.	Substrat des enzymes amylolytiques	11
III	α -amylase.....	12
III.1.	Définition et nomenclature	12
III.2.	Classification	12
III.3.	Caractéristiques et structure	13
III.4.	Mécanisme d'action	14
III.5.	Source d' α -amylase	14
III.6.	Production de l' α -amylase.....	16
III.7.	Purification d' α -amylase	17
III.8.	Immobilisation d' α -amylase.....	18
III.9.	Applications industrielles d' α -amylase	19
IV	Déchets de peau de banane comme milieu de base	22
IV.1.	Composition nutritionnelle de peau de banane	22
IV.2.	Utilisation de peau de banane dans la production des enzymes.....	23

Etude expérimentale

Matériel et méthodes

I	Matériels biologiques	24
I.1.	Milieus de réactivation	24
I.2.	Réactivation des souches	24
I.3.	Conservation des souches	24
I.4.	Sélection des souches.....	24
I.5.	Identification de la souche sélectionnée	26
II	Production de l' α -amylase.....	27
II.1.	Milieus de base pour la production.....	27
II.2.	Amélioration du milieu de la production	30
II.3.	Purification partielle de l' α -amylase	31
II.4.	Dosage des protéines	31
III	Immobilisation d' α -amylase	33
III.1.	Préparation du gel.....	33
III.2.	Inclusion de l'enzyme	33
III.3.	Polymérisation.....	33
III.4.	Détermination du rendement d'immobilisation d'enzyme.....	34
III.5.	Réutilisation d' α -amylase immobilisée.....	34
III.6.	Etude des propriétés de l'enzyme libre	34
III.7.	Etude des propriétés de l'enzyme immobilisée.....	35
IV	Essai d'application de l' α -amylase comme un agent de désencollage	35
Résultats et discussions		
I	Réactivation des souches.....	36
II	Sélections des souches	42
II.1.	Mise en évidence des activités enzymatiques	42
III	Identification de la souche P3.....	44
III.1.	Caractères morphologiques	44
III.2.	Caractères physiologiques.....	46
IV	Milieu de base et type de fermentation.....	47
IV.1.	Amélioration du milieu de production	48
V	Purification partielle de l' α -amylase	54
V.1.	Précipitation par sulfate d'ammonium	54
V.2.	Précipitation par acétone	55
VI	Immobilisation de l' α -amylase	55

VI.1.	Efficacité de la réutilisation de l'enzyme	56
VI.2.	Etude des paramètres physicochimiques des enzymes libres et immobilisées ..	57
VII	Application de l' α -amylase dans les industries de textile	60
Conclusion générale		
Références bibliographiques		
Annexes		

Liste des figures

Figure 1 : Schéma de la reproduction sexuée d'une levure avec la formation d'asques à 2 et 4 spores.....	3
Figure 2 : Schéma de la reproduction asexuée : par (A) bourgeonnement et (B) par fusion... 3	3
Figure 3 : Observation microscopique de levure du genre <i>Candida</i>	6
Figure 4 : Structure chimique des chaines d'amylopectine et d'amylose et sites d'hydrolyse par les différents types d'amylases	11
Figure 5 : Structure de l'alpha amylase	14
Figure 6 : Production de l' α -amylase par FMS : (a) DPB, (b) PPT.....	28
Figure 7 : Production d' α -amylase par FML : (a) DPB, (b) PPT.	28
Figure 8 : Courbe d'étalonnage du maltose.	29
Figure 9 : Courbe d'étalonnage des protéines.	32
Figure 10 : (a) : formation des billes contenant l'enzyme immobilisé dans la solution de CaCl_2 , (b) : billes d'alginate de calcium solidifiées.	33
Figure 11 : Réutilisation d'enzymes immobilisées.....	34
Figure 12 : Mise en évidence de la souche P3 pour la production d' α -amylase.....	43
Figure 13 : Observation macroscopique de la souche P3 : (A) sur milieu YPGA, (B) sur milieu Sabouraud.....	44
Figure 14 : Observation microscopique de P3 : forma et taille de cellule.	45
Figure 15 : Reproduction asexuée chez la souche P3 par bourgeonnement.	45
Figure 16 : Reproduction sexuée par formation d'asques à 2 spores.	46
Figure 17 : Choix du substrat et de type de fermentation.	47
Figure 18 : Effet du PH sur la production de l' α -amylase de <i>Candida sp.</i>	48
Figure 19 : Effet du temps d'incubation sur la production de l' α -amylase.	49
Figure 20 : Effet de différent source de carbone influencent la production d' α -amylase par <i>Candida sp.</i>	50
Figure 21 : Effet de diverse sources d'azote organique et inorganique sur la production d' α -amylase de <i>Candida sp.</i>	51
Figure 22 : Effet d'inoculum sur la production par FMS de l'alpha amylase.....	52
Figure 23 : Effet de l'humidité sur la production enzymatique.....	53
Figure 24 : Effet de la température sur la production l' α -amylase par <i>Candida sp.</i>	54
Figure 25 : α -amylase immobilisée.....	57
Figure 26 : Effet du température sur l' α -amylase : (A) libre et (B) immobilisée.	58
Figure 27 : Etude de la testabilité thermique de l' α -amylase : (A) libre et (B) immobilisée. .	59
Figure 28 : Application de l' α -amylase de <i>Candida sp</i> dans le désencollage : (A) témoin , (B): témoin traité avec l'eau de robinet, (C) traité avec l' α -amylase commerciale de <i>A.oryzae</i> , (D) traité avec l' α -amylase de <i>Candida sp.</i>	60

Liste des tableaux

Tableau 1 : Besoins physicochimiques pour la croissance des levures.	5
Tableau 2 : Quelques levures productrice d'enzymes.	7
Tableau 3 : Quelques micro-organismes producteurs d' α -amylase.	15
Tableau 4 : Principales méthodes d'immobilisation d'enzymes.....	18
Tableau 5 : mise en évidence des différentes activités enzymatiques : (GB)Grain de blé, (Pm)Pelures de pomme de terre.	42
Tableau 6 : Identification à partir de caractères biochimiques (ID 32C) et microscopiques..	46
Tableau 7 : Précipitation de l' α -amylase par 40% de $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$	55
Tableau 8 : Purification partielle de l' α -amylase de <i>Candida sp</i> par acétone.	55
Tableau 9 : Activité de l' α -amylase dans les différents fraction durant l'immobilisation.....	56

Introduction

L' α -amylase (EC.3.2.1.1), l'une des endoamylases industrielles les plus importantes, est capable d'hydrolyser les liaisons glycosidiques α -1,4 internes au glucose, au maltose et à la dextrine tout en conservant la configuration α -anomérique dans les produits. En tant qu'enzyme omniprésente, l' α -amylase est produite par de nombreuses espèces, y compris les animaux, les plantes et les micro-organismes. Parmi celles-ci, les -amylases de micro-organismes sont préférées en raison de leur plasticité pour la manipulation génétique et de leur potentiel de production en vrac économique (**Zhang *et al.*, 2017**).

En Algérie, les amylases utilisées dans diverses industries (panification, biscuiterie, amidonnerie...etc) sont importées en totalité, ce qui nécessite la création des ateliers locaux pour la production de ces enzymes (**Toumi, 2018**).

Les levures ont reçu une attention particulière ces dernières années en tant que source majeures des métabolites à valeur ajoutée tels que les enzymes, les biosurfactants, les molécules antimicrobiennes, les lipides, les pigments, les exopolysaccharides et les acides organiques dotés de diverses activités biologiques naturelles (**Guerfali *et al.*, 2019**), ces microorganismes sont économiquement adaptés, car leurs processus de fermentation nécessitent moins de main-d'œuvre, moins de ressources en terre et moins affectés par le lieu, la saison ou le climat et étant plus facile à mettre à l'échelle (**Bharathiraja *et al.*, 2017**).

Dans ce contexte, les levures occupent une place primordiale dans l'industrie agroalimentaire. Ces microorganismes eucaryotes et unicellulaires ont la capacité de se multiplier rapidement car elles sont moins exigeantes en nutriments. Elles possèdent la capacité de produire des métabolites fonctionnels, mis à contribution dans l'élaboration de biomédicaments. Ils constituent ainsi un vaste réservoir de catalyseurs biologiques (**Laiche, 2019**).

L'objectif principale de cette étude est :

- La sélection d'une levure productrice d' α -amylase.
- Amélioration de la production sur un milieu de base de déchets de peau de banane (réalisée par la méthode de OFAT).
- Etude des caractéristiques physico-chimiques d' α -amylase sous forme libre et immobilisée.
- Essai d'application d' α -amylase dans l'industrie de textiles.

Etudes bibliographiques



Chapitre 1 Les levures

I Levures

Les levures désignent originellement des champignons eucaryotes, unicellulaires capables de provoquer la fermentation des matières animales ou végétales (**Karim et al., 2020a**). Ce nom provient de l'aptitude de la levure de boulanger *Saccharomyces cerevisiae* à faire lever la pâte à pain. Leurs cellules sont isolées de forme ovale ou ronde de 3 à 10 µm de diamètre, elles se produisent essentiellement par bourgeonnement (**Boutrif, 2007**), peuvent exister soit comme haploïdes soit comme diploïdes (**Petreaca, 2013**).

Les levures ont eu des applications diversifiées et un impact spectaculaire sur l'arène industrielle, biotechnologique, médicale et environnementale depuis l'essor des civilisations anciennes jusqu'à aujourd'hui.

Elles semblent avoir de nombreux phénotypes avantageux, tels qu'une capacité de sécrétion élevée, un taux de croissance élevé sur une grande variété de sources de carbone, un potentiel de compartimentation des réactions dans les organites, une capacité à effectuer de nombreuses modifications post-traductionnelles, une culture facile dans de petits vaisseaux ou de grands bioréacteurs, une purification facile du produit et une absence de sensibilité aux agents infectieux comme les bactériophages. Ces caractéristiques attrayantes les rendent particulièrement adaptées à des applications étendues dans différents secteurs (**Karim et al., 2020b**).

II Habitat

Peuplement de nombreuses habitats différents sur notre planète, elles se produisent dans l'environnement aquatique, terrestre et aussi dans l'atmosphère (**Péter et al., 2017**).

D'après **Walker, (2009)**, les levures sont des espèces ubiquitaires. Elles peuvent être isolées à partir de différents environnements comme les tissus végétaux (feuilles, fleurs et fruits), les milieux extrêmes (concentration élevées de sucre ou du sel), comme la levure *Aureobasidium melanogenum* qui a été isolée à partir du miel par (**Jiang et al., 2018**), et ceux à basse températures comme la région polaires, où certaines levures psychrophiles ont été isolées (**Baeza et al., 2019**).

III Reproduction

D'après Bennamoun Leila, (2017) et Kurtzman *et al.* (2011), les levures sont caractérisées par deux modes de reproduction connue :

III.1. Reproduction sexuée :

Certaines levures présentent une reproduction sexuée ou téléomorphe qui correspond à une phase de leur cycle biologique, ou on remarque une alternance des phase haploïdes et diploïdes.

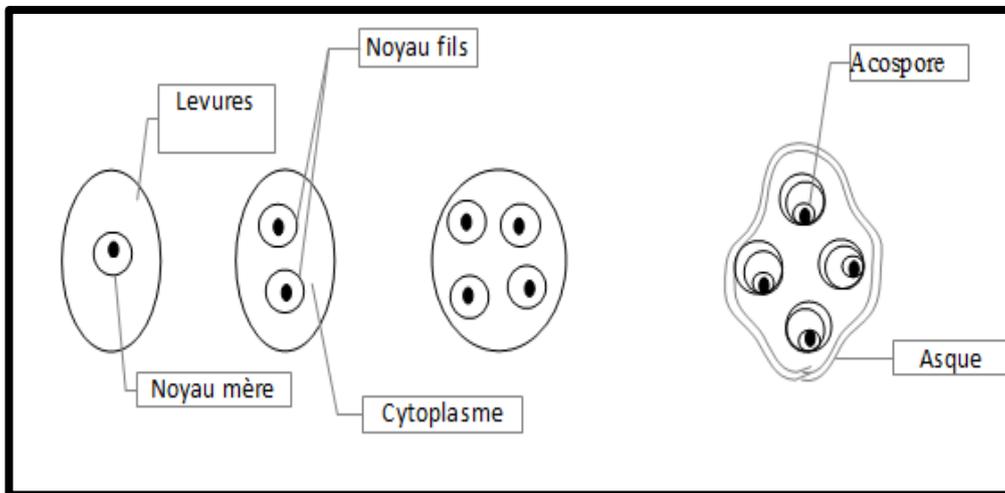


Figure 1 : Schéma de la reproduction sexuée d'une levure avec la formation d'asques à 2 et 4 spores (Thuriaux & Goffeau, 2004).

III.2. Reproduction asexuée :

Ou l'anamorphe, se fait essentiellement par bourgeonnement ou par fusion, ce qui se traduit par une croissance composée principalement de cellule unique c'est-à-dire aux extrémités des grands axes des cellules si elles sont ovotides ou allongées.

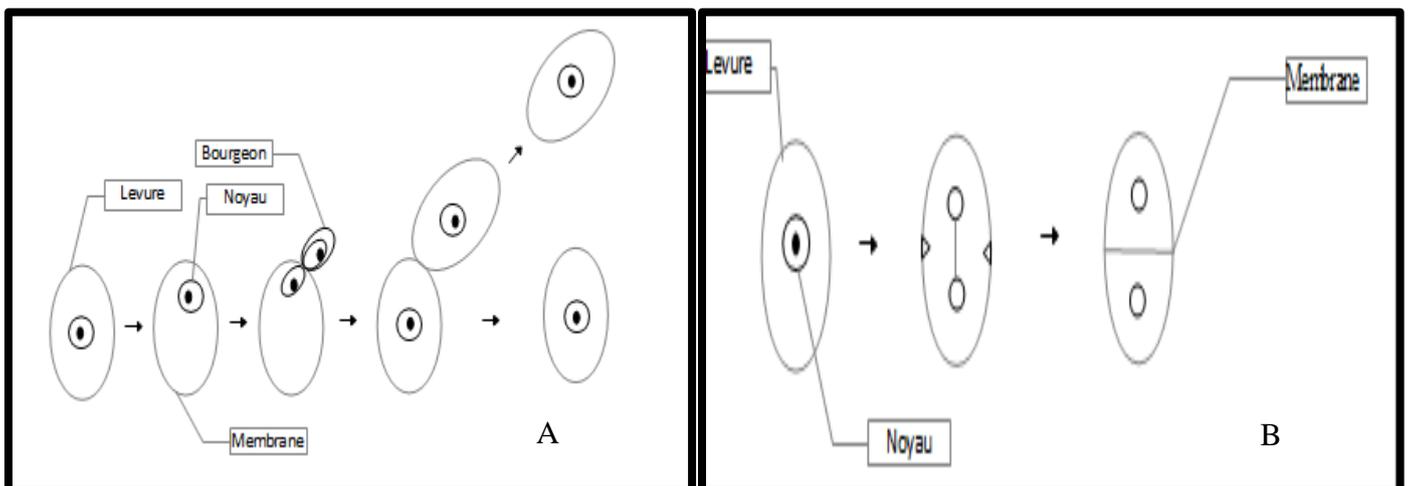


Figure 2 : Schéma de la reproduction asexuée : par (A) bourgeonnement et (B) par fusion (Thuriaux & Goffeau, 2004).

IV Nutrition et besoins physico-chimiques

IV.1. Besoins nutritifs

Les levures sont des microorganismes hétérotrophes, c'est pour ça leurs cellules de la levure ont besoins des macronutriments (source de carbone, d'azote, d'oxygène...etc.). Et elles nécessitent aussi des oligo-éléments par exemple Ca^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} ...etc. (Walker, 2009).

IV.1.1. Source de carbone et d'énergie

Le carbone constitue le composé majoritaire du poids sec de la cellule de levure, il représente 50% du poids de cellule (Toumi, 2018).

Les composés carbonés sont à la fois une source d'énergie, de carbone et d'hydrogène (Laiche, 2019), les sources de carbone les plus fréquemment utilisés par les levures sont les sucres simple (glucose, galactose), les disaccharides (saccharose, maltose, lactose) et les trisaccharides comme le Raffinose, aussi le Fructose comme un pentose peut être consommé par les levures (Hencke, 2000). Quelques levures amylolytiques par exemple *Saccharomyces diastaticus* et *Schwanniomyces occidentalis*, qui peuvent utiliser des polysaccharides comme l'amidon (Walker, 2009). Généralement les levures sont capables de dégrader les sources carbonées complexes comme les pelures de pomme de terre (Ben Atitallah *et al.*, 2019), son de blé (Haghighatpanah *et al.*, 2021), les déchets de banane (Han *et al.*, 2019)...etc.

IV.1.2. Source d'azote

La structure cellulaire et la synthèse de composés azotés fonctionnels, dépend de l'assimilation de la forme réduite et oxydée, parce que les levures sont incapables de fixer l'azote libre. De plus l'azote provenant de différentes sources, telles que l'ammonium ou les nitrate, les acides aminés, le tourteau de soja, les extraits de levures sont assimilées chez la plupart des levures, permettant la synthèse des protéines, acides nucléiques et des vitamines (Bourgeois *et al.*, 1991 & Toumi, 2018). Peptone (Chapman *et al.*, 2015), farine de soja (Novotný *et al.*, 1988), Corn steep liquor (Lima *et al.*, 2009)...etc.

IV.1.3. Oligo-éléments et facteurs de croissance

Pour leur croissance, la levure a besoin de nutriments nécessaires riche à des sels minéraux et de très faibles concentrations en oligo-éléments. Les oligoéléments comme Mg^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} et Mn^{2+} et les vitamines telles que la biotine, la thiamine et l'acide pantothénique, agit sur la prolifération et l'activité cellulaire à de faibles concentrations (Berber, 2017).

IV.2. Besoins physico-chimiques

Comme tous les microorganismes, la croissance des levures exige certaines conditions physico-chimiques tels que la température, le pH, le CO₂, l'O₂, l'aw.

Tableau 1 : Besoins physicochimiques pour la croissance des levures (Walker, 2009).

Paramètre	Conditions
La température	<ul style="list-style-type: none"> ❖ La température optimale des levures se situe entre 25 et 30°C. ❖ Les levures peuvent être classées en levures psychrophiles, mésophile et thermophile. ❖ La destruction cellulaire commence, généralement, dès 52°C. ❖ Les levures sont aussi sensibles à la congélation.
L'activité de l'eau	<ul style="list-style-type: none"> ❖ La plupart des souches ne peuvent se développer pour une activité de l'eau inférieure à 0.90.
L'oxygène	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Toutes les levures sont capables de se développer en présence d'oxygène : il n'y a pas de levures anaérobies strictes. ❖ Certaines levures sont aérobies strictes. ❖ Les autres sont aéro-anaérobies facultatives.
pH	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Les levures tolèrent à des gammes de PH très larges, théoriquement de 2.4 à 8.6.

V Levures du genre *Candida*

Le genre de levure connu sous le nom de *Candida* a été séparé en 1923 par la microbiologiste danoise Christine Berkhout, qui a assigné neuf espèces précédemment incluses dans le genre *Monilia* à la nouvelle unité taxonomique (Barnett, 2004). Le nom de genre de ces micro-organismes provient du mot latin *candidus* (blanc), lié à l'absence de colorants caroténoïdes dans les cellules de ces champignons (Barnett *et al.*, 1990). Le genre *Candida* a été séparé à l'époque sur la base de la détermination de certaines caractéristiques morphologiques (figure 3), biochimiques et physiologiques.

Au cours des dernières décennies, le développement des technologies avancées les méthodes de biologie moléculaire ont entraîné des changements importants la nomenclature de *Candida*. Actuellement, le genre comprend environ 200 espèces, qui sont membres du règne fongique, famille des Saccharomycetaceae, ordre des Saccharomycetales, classe des Hemiascomycètes, Embranchement des ascomycotes (champignons) (Kieliszek *et al.*, 2017).

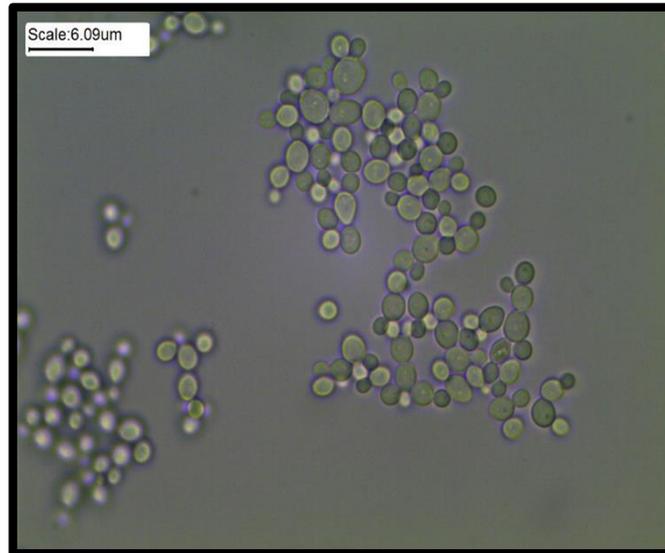


Figure 3 : Observation microscopique de levure du genre Candida (Kieliszek et al., 2017).

V.1. Importance de la levure *Candida*

Les levures *Candida* présentent un potentiel élevé d'utilisation dans divers secteurs de l'industrie, grâce à la composition favorable de leur biomasse cellulaire des levures et à la variété des métabolites synthétisés. La culture de ces microbes ne dépend pas du climat et de la saison, et le cycle de production de biomasse est court. Grâce à leur riche système enzymatique, les levures *Candida* sont capables d'assimiler de nombreuses substances constituant une source de carbone et d'azote, dont diverses matières premières dérivées de déchets. Grâce à cette option, l'utilisation de levures en biotechnologie ouvre la possibilité de biodégradation des déchets industriels, obtenant ainsi des produits à valeur ajoutée. Biomasse de levures *Candida* sélectionnées peut fournir une source illimitée de protéine microbiologique, riche en acides aminés exogènes, elle peut également être utilisée comme source de polysaccharides fonctionnels biologiquement actifs, par exemple le β -glucane, le glucomannane et les mannoprotéines. D'autre part, la biomasse de ces levures peut être enrichie en micro-éléments nécessaires tels que le sélénium, le magnésium, obtenant ainsi des préparations riches non seulement une source de protéines, de polysaccharides prébiotiques, mais également d'éléments nécessaires à la vie. Les levures *Candida* synthétisent également une gamme de métabolites,

largement utilisés principalement dans l'industrie alimentaire, l'industrie pharmaceutique et l'industrie cosmétique. De tels composés comprennent le xylitol et l'érythritol, qui sont de plus en plus souvent utilisés comme substituts du sucre. Ces levures peuvent également être utilisées pour obtenir de l'éthanol, de l'acide citrique, des enzymes, des polysaccharides extracellulaires et des bio-tensioactifs, qui ont été utilisés depuis de nombreuses années dans la production d'aliments, de cosmétiques et de produits chimiques ménagers (**Kieliszek *et al.*, 2017**).

VI Levures et biotechnologies

Les levures sont des micro-organismes eucaryotes qui comprennent un groupe hétérogène de microbes représentant les phylums Ascomycètes et Basidiomycètes qui ont un potentiel biotechnologique dans l'industrie alimentaire. Les levures sont responsables de la production d'une large gamme de produits fermentés allant des boissons alcoolisées préparées à l'aide de différents types de substrats, aux produits laitiers fermentés, y compris le fromage, aux produits au levain à base de céréales et aux condiments. Au cours du processus de fermentation naturelle. La levure joue plusieurs rôles importants pendant la fermentation des aliments, notamment la production d'alcool, la production et l'utilisation d'acides organiques, l'amélioration des propriétés organoleptiques à savoir la saveur, l'arôme et la texture, et des propriétés nutritionnelles et la réduction des facteurs antinutritionnels et des toxines (**Rai *et al.*, 2019**).

Ces dernières années, l'utilisation des levures comme source biotechnologique d'enzymes industrielles est devenue le nouveau potentiel d'utilisation de ces microorganismes (**Buzzini & Martini, 2002**).

VI.1. Levures productrices d'enzymes

Les levures constituent une des importantes sources d'enzymes commerciales (Tableau 2) en raison de leurs capacités polyvalentes et de la frugalité de leurs exigences permettant, d'obtenir une biomasse importante à bas prix (**Dali & Hamame, 2016**).

Tableau 2 : Quelques levures productrices d'enzymes.

Levures	Enzymes	Références
<i>Metschnikowia persici</i> .	Protéase.	Knob <i>et al.</i>, 2020.
<i>Cystofilobasidium</i> .		Daskaya Dikmen <i>et al.</i>, 2018.
<i>Pichia farinose</i> .		Kim, 2010.

<i>Rhodotorula oryzzicola.</i>		Chi et al., 2009a.
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>		Lario et al., 2020.
<i>Sporidiobolus ruineniae.</i>		Kim, 2010.
<i>Rhodotorula mucilaginosa.</i>		Lario et al., 2020.
<i>Geotrichum candidum.</i>	Pectinase.	Ejaz et al., 2018.
<i>Saccharomyces cerevisiae.</i>		Qadir et al., 2020.
<i>Saccharomyces bayanus.</i>		Naumova et al., 2019.
<i>Rhodotorula glutinis.</i>		Taskin, 2012.
<i>Meyerozyma guilliermondii.</i>	Lipase.	Knob et al., 2020.
<i>Leucosporidium scottii.</i>		Duarte et al., 2021.
<i>Dipodascus capitalus.</i>		Baloch et al., 2019.
<i>Rhizomucor miehei.</i>		Duarte et al., 2021.
<i>Cryptococcus flavus.</i>	Alpha-amylase	Wanderley et al., 2004.
<i>Cystofilobasidium.</i>		Daskaya Dikmen et al., 2018.
<i>Wickerhamomyces anomalus.</i>		Yan et al., 2019.
<i>Pichia pastoris.</i>		Mizutani et al., 2012.
<i>Meyerozyma guilliermondii.</i>		Martínez et al., 2016.
<i>Saccharomyces cerevisiae.</i>		
<i>Trichoderma harzianum.</i>	Cellulase.	Saravanakumar et al., 2018.
<i>Cryptococcus sp.</i>		Thongekkaew et al., 2008.
<i>Rhodosporidium toruloides.</i>	Laccase.	Qadir et al., 2018.
<i>Candida sp.</i>		
<i>Clavisporae lusitaniae.</i>	Amylopullulanase	Dakhmouche-Djekrif, 2016.

Nous sommes intéressés par la production des enzymes amylolytiques par ces micro-organismes.

VI.2. Levures amylolytiques :

A ce jour, il a été remarqué que les levures capables de produire des enzymes amylolytiques extracellulaires (**Chi *et al.*, 2009b**).

L'amidon, en tant que ressource biologique renouvelable importante, se compose de polymères de glucose linéaires et ramifiés. Afin d'utiliser l'amidon, les levures ont développé des enzymes avec des spécificités différentes. Par exemple, l' α -amylase et la glucoamylase ont été caractérisées chez *Schwanniomyces occidentalis*. Bien que plusieurs levures de genres autres que *Saccharomyces* assimilent l'amidon (**Lin *et al.*, 1998**).

Parmi ces enzymes amylolytiques, On a choisi d'étudier l' α -amylase car c'est l'une des enzymes industrielles les plus importantes, différentes amylases contribuent à 25 % du marché des enzymes industrielles.

Chapitre 2 L' α -amylase

I Généralité sur les enzymes

Les enzymes sont des macromolécules biologiques à activités catalytiques, qui sont essentiellement des protéines à l'exception des quelques ribosomes.

Les enzymes sont des protéines qui catalysent une réaction chimique ou biologique. Elles sont classées, selon les réactions de catalyse en oxydoréductases (oxydo-réduction), transférases (transfert de groupes de molécules), hydrolases (hydrolyse), lyases (rupture de liaisons), isomérases (modification intramoléculaire), ligases (formant une liaison covalente entre deux molécules à forte consommation énergétique) et translocases (catalysent le transfert d'ions ou de molécules depuis la face "1" vers la face "2" d'une membrane (Cai & Chou, 2005; Concu *et al.*, 2019), certaines enzymes nécessitent des cofacteurs organiques ou inorganiques supplémentaires pour réaliser une activité complète, tels que l'uréase, l'amylase, laccase... etc.

Toutefois, l'ingénierie enzymatique a été développée pour la production d'enzymes ainsi que leur utilisation dans les procédés industriels. Le premier domaine était l'industrie alimentaire où les enzymes ont un grand impact comme la bière, le lait, le fromage, le pain, l'industrie des jus et plus tard le processus a été développé pour d'autres secteurs tels que les détergents, l'industrie pharmaceutique (Nandy, 2016).

En effet, le marché mondial des enzymes est divisé en trois segments principaux : les enzymes techniques (détergents, papier et cellulose, cuir et produits pharmaceutiques), les enzymes utilisées dans l'industrie alimentaire et les enzymes utilisées pour la production de rations animales. On estime que les applications industrielles utilisant des enzymes généreront plus de 6 milliards de dollars en 2021. Cela étant dit, il existe un besoin urgent de découvrir et de tester des espèces microbiennes, y compris celles des environnements naturels, qui peuvent avoir une grande capacité de production et de sécrétion d'enzymes avec de nouvelles propriétés.

Parmi celles-ci, on peut souligner que les hydrolases sont largement utilisées dans le domaine industriel (Carvalho *et al.*, 2021).

II Enzymes amylolytiques

Les enzymes amylolytiques sont un groupe de protéines qui dégradent de l'amidon en unités constitutionnelles biochimiquement par ces enzymes telles que l' α et β -amylases ainsi que les amyloglucosidases, amylopullulanase (Dakhmouche-Djekrif, 2016a; Gaenssle *et al.*, 2020).

II.1. Substrat des enzymes amylolytiques

L'amidon est un polymère de glucose, se compose généralement d'un mélange de molécule d'amylose et d'amylopectine. L'amylose est une molécule principalement linéaire composé d'unités de glucose liées par des liaisons glycosidiques α -1,4 et présente généralement 20 à 30% du polysaccharides, tandis que l'amylopectine est hautement ramifiée constituée de nombreuses chaine courte de α -(1,4)-D-glucanes interconnectés par une liaison α -1,6, correspondant typiquement à 70-80% de la structure de l'amidon (**Ferreira *et al.*, 2021**). Il est métabolisé par photorespiration, ce qui nécessite des amylases pour le décomposer en fragment de glucose.

Les amylases sont des glycosides hydrolases (EC 3.2.1) qui hydrolysant les composés O-glycosyles de l'amidon (figure 4), et se retrouvent chez les animaux, les plantes et les microbes. La source industrielle préférée étant les micro-organismes (**Cripwell *et al.*, 2020**).

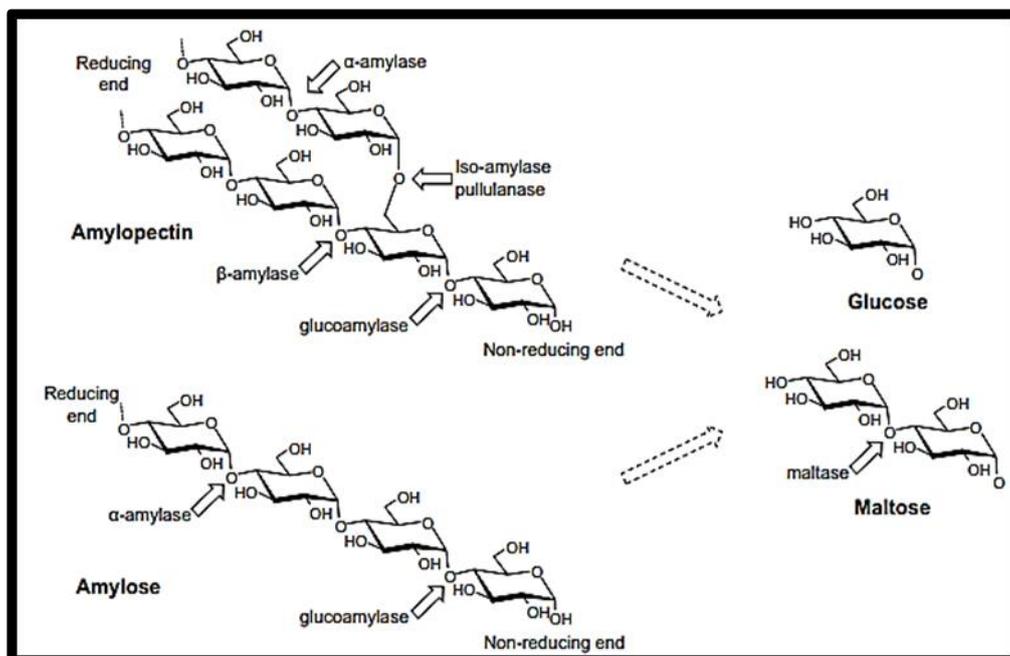


Figure 4: Structure chimique des chaines d'amylopectine et d'amylose et sites d'hydrolyse par les différents types d'amylases (**Cripwell *et al.*, 2020**)

Les α -amylases sont utilisées dans de nombreux domaines industriels, tels que la bioraffinerie, l'alimentation, la médecine, le textile et le papier. Par conséquent, le développement de nouvelles α -amylases est toujours en cours pour répondre aux exigences d'applications spécifiques (Wang *et al.*, 2020).

III α -amylase

III.1. Définition et nomenclature

C'est une enzyme amylolytique importante participant à l'hydrolyse de l'amidon la plus courante glucide dans la nature (Zhang *et al.*, 2017).

L' α -amylase (EC 3.2.1.1) est une endo-1,4- α -D-glucane glucohydrolase. Elles se retrouve chez les animaux, les végétaux et les microorganismes et catalyse l'hydrolyse des liaisons glycosidiques α -1,4 des polysaccharides, tels que l'amidon, le glycogène et aussi certains oligosaccharides (Pinto *et al.*, 2020).

L' α -amylase, l'une des enzymes industrielles les plus importantes, a une large gamme d'application dans les industries. Ces enzymes représentent environ 30% de la production d'enzyme dans le monde (Fincan *et al.*, 2021). C'est une enzyme, généralement inductible, qui est généralement induite en présence d'amidon ou de son produit hydrolytiques (Prajapati *et al.*, 2015).

- ❖ **Nom systématique** : α -(1,4) D-glucane glucohydrolase.
- ❖ **Nom codifié** : EC 3.2.1.1.
- ❖ **Nom recommandé** : alpha-amylase.
- ❖ **Synonymes** : Glucogenase, Endoamylase, Maxilase, Taka amylase A, Ta-katherm, Termolase, Amylotherm, Clarase, Amylospin, Spitase CP1, G995, Kleistase L1, THC250, Maxamy, Ptyalin (Nouadri, 2011).

III.2. Classification

D'après Dakhmouche-Djekrif, (2016) & Zhang *et al.*, (2017) et l'Union Internationale de Biochimie et de Biologie Moléculaire (UIBMB), les amylases sont classées en trois groupes selon leur mécanisme d'action (Figure 2).

Les endoamylases : Elles hydrolysent les liaisons α -1,4 dans l'amidon et libèrent des oligosaccharides et des dextrans, on a principalement l' α -amylase (EC 3.2.1.1) dans cette classe.

Les exoamylases : Elles renferment la β -amylase (EC 3.2.1.3), l' α -glucosidase (EC 3.2.1.20) et la glucomylase (EC 3.2.1.3). Et en résumé leur mécanisme d'action par la libération des sucres simples à poids moléculaires faibles comme le glucose...etc.

Les enzymes débranchantes : α -1,6 de l'amylopectine. Parmi ces enzymes on a la pullulanase (EC 3.2.1.41), et l'isoamylase (EC 3.2.1.68).

III.3. Caractéristiques et structure

La plupart des α -amylases sont des métallo-enzymes calciques. Ces ions sont nécessaires pour l'activité enzymatique et maintien de la stabilité de la structure des acides aminés des enzymes qui varient en fonction de la souche (**Janičková & Janeček, 2020**).

Les α -amylases fongiques sont des glycoprotéines, ont conservé une architecture à trois domaines (figure 5) constituée des domaines A, B, C (**Rane et al., 2020**).

Le domaine A : est le plus conservé et le plus long, il renferme le site catalytique qui contient deux molécules aspartates (ASP) et une molécule de glutamate (GLU).

Le domaine B : a une structure irrégulière et topologique en raison des différences de longueurs et d'acides aminés, qui peuvent régir la fonctionnalité et la stabilité variable. Bien que le domaine B varie avec la spécificité de l'enzyme. Il a une courte séquence conservée à son C-terminus, et impliqué dans la liaison des ions de calcium Ca^{2+} qui ont un rôle structural et cette liaison au domaine B facilite son interaction avec le domaine A.

Le domaine C : est constitué de feuillets β formant un motif clé (β -sandwich). Les deux domaines B et C sont situés sur les côtés inverse du $(\beta/\alpha)_8$ (**Dakhmouche-Djekrif, 2016a; Nielsen et al., 2004; Rane et al., 2020; Roth et al., 2019**).

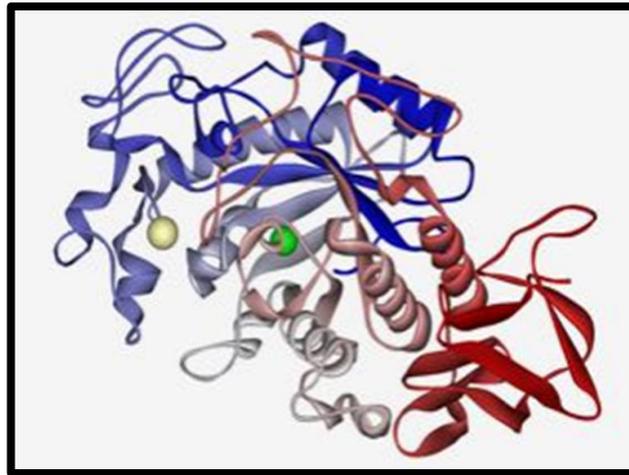


Figure 5 : Structure de l'alpha amylase (Afzaljavan & Mobini-Dehkordi, 2013).

III.4. Mécanisme d'action

Les α -amylases sont des métallo-enzymes à calcium. Ces ions sont nécessaires à l'activité enzymatique et au maintien de la stabilité de la structure en acides aminés des enzymes qui varie d'une souche à une autre (Toumi, 2018).

Le mécanisme d'action de l' α -amylase nécessite la participation de trois fonctions du site actif impliquant un attaquant nucléophile, un stabilisateur de la charge positive de l'atome attaqué et un donneur de proton au groupe déplacé; ceci signifie que la rupture de la liaison osidique fait intervenir une série d'échanges d'électrons et de protons entre certains résidus de l'enzyme et du substrat. Ce mécanisme est une caractéristique de l'enzyme selon des conditions expérimentales telles que la température, le pH, la taille et la structure du substrat (Park *et al.*, 1997 & Toumi, 2018).

III.5. Source d' α -amylase

Elle est largement présente dans la nature, elle provient des plantes, d'animaux, des champignons, des bactéries et des archées (Kerényiová & Janeček, 2020).

III.5.1. Source animale

L' α -amylase d'origine animale est généralement trouvée chez les humaines dans la salive et dans le pancréas des mammifères (Li *et al.*, 2020).

III.5.2. Source végétale

L' α -amylase joue un rôle important dans le métabolisme glucidique chez les plantes. Elles sont impliquées dans l'hydrolyse de l'amidon en sucres réducteurs (glucose, maltose) ; l'énergie nécessaire à la germination peut être directement absorbée. Ceux-ci les enzymes

végétales sont généralement obtenues par extraction à partir des céréales, elles sont souvent formées lors de la germination des graines et nécessite une activité enzymatique très importante pour la dégradation des réserves et le développement embryonnaire (Laiche, 2019).

III.5.3. Source microbienne

Industriellement, les α-amylases sont isolée principalement à partir de sources bactériennes et fongiques (Ferreira *et al.*, 2021), car les microorganismes produisent des α-amylases en quantités abondantes (Wang *et al.*, 2020).

Tableau 3 : Quelques micro-organismes producteurs d'α-amylase.

Micro-organisme	Espèces	Références
Levures	<i>Pichia pastoris.</i>	Wang <i>et al.</i>, 2019.
	<i>Saccharomyces cerevisiae.</i>	Martínez <i>et al.</i>, 2016.
	<i>Aureobasidium pullulans.</i>	Ademakinwa <i>et al.</i>, 2019.
	<i>Cryptococcus flavus.</i>	Barros <i>et al.</i>, 2009.
	<i>Clavispora lusitaniae.</i>	Dakhmouche-Djekrif, 2016.
Bactéries	<i>Bacillus subtilis.</i>	Zheng <i>et al.</i>, 2021.
	<i>Pseudoalteromonas sp.</i>	Sanchez <i>et al.</i>, 2019.
	<i>Pseudomonas.</i>	Kizhakedathil & C, 2021.
	<i>Bacillus licheniformis.</i>	Fincan <i>et al.</i>, 2021.
	<i>Bacillus megaterium.</i>	Shofiyah <i>et al.</i>, 2020.
Moisissures	<i>Trichoderma harizianum.</i>	Kalia <i>et al.</i>, 2021.
	<i>Phohiota microspora.</i>	Janičková & Janeček, 2020.
	<i>Serendipita indica.</i>	Janičková & Janeček, 2020.
	<i>Aspergillus niger.</i>	Avwioroko <i>et al.</i>, 2018.
	<i>Aspergillus oryzae.</i>	Melnichuk <i>et al.</i>, 2020.

III.6. Production de l' α -amylase

Une enzyme de source microbienne est sacro-sainte du point de vue industriel en raison de son faible cout, sa productivité prodigieuse, sa grande stabilité, sa sécurité environnementale et sa disponibilité. Les α -amylases font partie des enzymes nécessaire et sont importantes pour la biotechnologie (**Priyadarshini et al., 2020**).

De nombreuses études ont rapporté l'identification, la caractérisation et l'application d' α -amylases d'origines diverses (plantes, animaux et micro-organismes). En termes de faibles niveaux de productivité, les α -amylases végétales et animales sont plutôt limitées pour les industries de transformation de l'amidon (**Wang et al., 2020**). Et ces dernières années, le nouveau potentiel d'utilisation de micro-organismes comme sources biotechnologiques d'enzymes d'intérêt industriel a stimulé un regain d'intérêt pour l'exploration de l'activité enzymatique extracellulaire (AEE). Les levures les plus étudiées sont celles appartenant à des espèces d'importance œnologique, alors que seules quelques levures d'origine environnementale ont été étudiées jusqu'à présent pour leur valeur biotechnologique en tant que productrices d'enzymes. Bien que des études récentes aient souligné le potentiel des environnements non conventionnels et extrêmes comme source de biodiversité naturelle pour l'isolement et la sélection de micro-organismes utiles (**Buzzini & Martini, 2002**).

La production des enzymes par les micro-organismes comprend à la fois la fermentation submergée (FML) et la fermentation à l'état solide (FMS) (**Melnichuk et al., 2020**).

La fermentation à l'état solide (FMS) a un potentiel énorme pour la production d'enzyme non seulement pour le laboratoire mais aussi pour la production commerciale (**Kannan & Kanagaraj, 2019**). Elle présente également les avantages suivants par rapport à la fermentation liquide (FML) : l'environnement solide est plus similaire à l'habitat naturel des champignons, elle est moins couteuse car les substrats sont généralement des déchets agroalimentaires ou déchets industriels, production faible d'eaux usées, et un rendement plus élevé de produit et un apport d'oxygène considérablement plus élevé. Cependant, la FMS n'est pas largement utilisée comme procédé dans l'industrie en raison du manque de conditions bien établies pour la croissance des champignons et la production et la récupération des biomolécules. Par conséquent, les connaissances doivent être construites dans cette direction, y compris la mise à l'échelle des tests (**Melnichuk et al., 2020**).

Parmi les substrats utilisés, les déchets agricoles tels que le son de blé, pelure de pomme de terre séchée, déchets de fruits séchés, tourteau des huiles de pongamie (**Kalia et al., 2021**).

La croissance de la production d'enzymes par les organismes est fortement influencée par la composition du milieu, et par conséquent l'optimisation des composants du milieu peut conduire à une productivité enzymatique améliorée (**Prajapati et al., 2015**). Par exemple :

Dakhmouche-Djekrif, (2016) a étudiée la production d' α -amylase par FML à partir de la levure *Clavispora lusitaniae*. Le milieu de production à base de lactosérum a été amélioré par les plans statistiques de Plackett et Burmann et les plans de Box et Wilson Les conditions optimales de la production sont : agitation à 136,56 rpm, température de 54,14°C, concentration d'amidon de 2,66g/l, quantité d'extrait de levure de 0,365 g/l, solution de sels 8,75ml/l et solution d'oligo-éléments 4,3ml/l. L'activité α -amylasique obtenue dans les conditions optimales d'est de 13456,36±300 UI.

Laiche, (2019) a aussi étudié la production d' α -amylase par SSF à partir de deux espèces de levures ; *Candida glabrata* et *Schwanniomyces occidentalis* ; cultivées sur différents types de lactosérum comme milieux de base. L'optimisation des conditions de production enzymatique montre que le lactosérum caprin semble être le substrat le plus convenable pour la production, le pH optimal est de 4 à 5 et la croissance maximale est obtenue à 40 C°. La concentration du substrat affecte l'activité enzymatique (meilleur rendement à 3,4 et 5%), aussi, l'extrait de levure à 1% a amélioré le rendement de biomasse et de l'activité enzymatique alors que la concentration de l'inoculum influence seulement la quantité de biomasse (meilleure production à 3 et 4% de l'inoculum).

Xie et al., (2014), ont étudié la production d' α -amylase bactérienne de *Bacillus methylotrophicus* par FML. Ils sont utilisés l'amidon comme source de carbone, la peptone comme source d'azote, et l'extrait de levures comme source de vitamines. La fermentation est réalisée à 37°C, à pH 7.2 et sous agitation de 200 rpm.

La production a été initiée pendant la phase de croissance, et a atteint son maximum de 144 U/ml après trois jours de culture.

Malgré qu'il y a plusieurs recherche sur la production de l' α -amylase, la demande de nouvelles α -amylases est en continue pour répondre aux exigences d'applications industrielles spécifiques (**Wang et al., 2020**).

III.7. Purification d' α -amylase

Les enzymes industrielles produites en vrac nécessitent généralement peu de traitement en aval et sont donc des préparations relativement brutes. L'utilisation commerciale de l'a-

amylase ne nécessite généralement pas de purification de l'enzyme, mais les applications enzymatiques dans les secteurs pharmaceutiques et cliniques nécessitent des amylases de haute pureté. L'enzyme sous forme purifiée est également une condition préalable aux études des relations structure-fonction et des propriétés biochimiques (**de Souza & de Oliveira Magalhães, 2010**). L' α -amylase brute peut être précipitée et concentrée en utilisant le sulfate d'ammonium ou des solvants organiques. L'échantillon précipité peut être soumis à une dialyse contre l'eau ou le tampon pour une concentration supplémentaire. Ceci peut être suivi par l'une des techniques chromatographiques telles que l'échangeuse d'ions, la gel filtration et la chromatographie d'affinité pour une séparation et une purification supplémentaires de l'enzyme (**Ajita & P T Krishna, 2014**).

III.8. Immobilisation d' α -amylase

L'immobilisation enzymatique est une technique réussie et éprouvée. Elle est établie pour la réutilisation des enzymes et rendant aussi le processus d'hydrolyse abordable à l'échelle industrielle (**Gali et al., 2021**).

Par rapport aux enzymes natives, les enzymes immobilisées agissent dans une plage de pH et de température plus large et présentent une stabilité thermique plus élevée (**Bindu & Mohanan, 2020**), l'immobilisation permet aussi de minimiser les temps de diffusion du substrat dans la cascade multienzymatique. Les enzymes peuvent être fixées aux matériaux de support par adsorption physique réversible, liaison ionique, liaison covalente stable et encapsulation. Récemment les méthodes d'immobilisation (tableau 4), sont devenues une question de conception rationnelle en raison de la nature de l'enzyme et de la fonctionnalité du support (**El-Shishtawy et al., 2020**).

Par conséquent, l'utilisation de l' α -amylase immobilisée est très importante par rapport à l' α -amylase libre. Ce qui simplifie la conception du réacteur, réduit la contamination du produit et permet la réutilisation de l'enzymes (**Bindu & Mohanan, 2020**).

Tableau 4 : Principales méthodes d'immobilisation d'enzymes (Ashkan et al., 2021).

Les méthodes physiques	Adsorption	Dans une matrice constituée par un gel ou un polymère
	Piégeage ou encapsulation	Dans une microcapsule

	Réticulation	Etablissement d'un réseau par liaison Co-intermoléculaire
Les méthodes chimiques	Fixation sur un support	Liaisons covalentes

Dans notre étude on a choisi la méthode de piégeage ou l'encapsulation par le gel d'alginate.

Le piégeage ou l'encapsulation est une méthode d'immobilisation qui consiste à la restreindre physiquement une enzyme au sein d'une matrice polymère structurée. Parmi les nombreuses matrices disponibles, la matrice poreuse comme les alginates sont les plus fréquemment utilisées souvent sous forme de bille. L'alginate est un polysaccharide anionique naturel dérivé d'algues marines, qui peut former un hydrogel thermiquement stable et biocompatible en présence de cation de calcium. Le principal avantage de cette technique est la simplicité grâce à laquelle des particules sphériques mécaniquement stable, non toxiques et bon marché peuvent être obtenues (**de Oliveira *et al.*, 2018**).

III.9. Applications industrielles d' α -amylase

La demande d'enzymes dans différentes activités industrielles a favorisé le développement de technologie de purification surtout si elles sont simples, peu coûteuses, rapides et propres. L' α -amylase est l'une des enzymes les plus demandées pour les applications industrielles. La dépolymérisation de l'amidon par les amylases est à la base de plusieurs procédés tels que la production de sirops de glucose, la fabrication du pain et le brassage. Elles sont également utilisées comme additif dans les savons, les détergents et les aliments pour animaux, ainsi que dans le traitement du papier, des textiles (**Nair & Bhat, 2020; Porfirif *et al.*, 2016**).

III.9.1. Détergents

Les amylases sont le deuxième type d'enzymes utilisé dans la formation des détergents enzymatiques, et environ de 90% de tous les détergents liquides contiennent ces enzymes. Les α -amylases sont utilisées dans les détergents pour dégrader les résidus de féculent tels que les pommes de terre, les sauces, le chocolat...etc. En fait l'élimination de l'amidon des surfaces des tissus est également importante pour procurer un avantage de blancheur (**Roy *et al.*, 2012**).

III.9.2. Liquéfaction et saccharification d'amidon

L'amidon est converti en sirop de maïs à haute teneur en fructose (HFCS). L'utilisation d'enzymes dans la liquéfaction d'amidon est bien établie et a été largement revue (**Gupta *et al.*, 2003**).

III.9.3. Industrie des textiles

La résistance de textile est améliorée en déformant la pâte d'amidon en tissage textile. Il empêche également la perte de corde par frottement, coupure et génération d'électricité statique sur la corde en donnant de la douceur à la surface de la corde en raison de la chaîne posée. Après avoir tissé le tissu, l'amidon est enlevé et le tissu passe au décapage et à la teinture. L'amidon sur le tissu est généralement éliminé par l'application d' α -amylase (**Afzaljavan & Mobini-Dehkordi, 2013**).

III.9.4. Panifications

Les α -amylases ont des caractéristiques fonctionnelles de qualité de pain, l'utilisation de l' α -amylase améliore les paramètres de texture du pain de blé et améliore les propriétés rhéologiques de la pâte. La réduction de la qualité du pain par le rassissement met en évidence le rôle enzymatique anti-rassissement. Il est rapporté que l'ajout d' α -amylase réduisait ce processus dans le pain (**Sadeghian Motahar *et al.*, 2021**).

III.9.5. Industries des boissons

L' α -amylase d'origine microbienne (fongique), intervient dans la fabrication des boissons sucrées non alcoolisées et des jus de fruits (**Laiche, 2019**).

III.9.6. Domaine pharmaceutique

Dans le domaine pharmaceutique les amylases sont utilisées comme agent anti-inflammatoire et contre les dyspepsies et les inflammations intestinales (**Toumi, 2018**).

III.9.7. Industrie du papier

L'utilisation d' α -amylases dans l'industrie des pâtes et papiers est destinée à la modification de l'amidon du papier couché, c'est-à-dire à la production d'amidon à faible viscosité et à haut poids moléculaire. Le traitement de revêtement sert à rendre la surface du papier suffisamment lisse et résistante, pour améliorer la qualité d'écriture du papier. Dans cette application, la viscosité de l'amidon naturel est trop élevée pour l'encollage du papier et cela peut être modifié en dégradant partiellement le polymère avec des α -amylases dans des procédés discontinus ou continus. L'amidon est un bon agent d'encollage pour la finition du papier, améliorant la qualité et l'effaçabilité, en plus d'être un bon revêtement pour le papier. La

taille améliore la rigidité et la résistance du papier. Des exemples d'amylases obtenues à partir de micro-organismes utilisés dans l'industrie du papier comprennent Amizyme® (PMP Fermentation Products, Peoria, USA), Termamyl®, Fungamyl, BAN® (Novozymes, Danemark) et α-amylase G9995® (Enzyme Biosystems, USA) **(de Souza & de Oliveira Magalhães, 2010)**.

III.9.8. Production d'alcool carburant

L'éthanol est le biocarburant liquide le plus utilisé. Pour la production d'éthanol, l'amidon est le substrat le plus utilisé en raison de son prix bas et de sa matière première facilement disponible dans la plupart des régions du monde. Dans cette production, l'amidon doit être solubilisé puis soumis à deux étapes enzymatiques afin d'obtenir des sucres fermentescibles. La bioconversion de l'amidon en éthanol implique la liquéfaction et la saccharification, où l'amidon est converti en sucre à l'aide d'un micro-organisme amylolytique ou d'enzymes telles que l'α-amylase, suivie d'une fermentation, où le sucre est converti en éthanol à l'aide d'un micro-organisme fermentant l'éthanol tel que la levure *Saccharomyces cerevisiae*. La production d'éthanol par fermentation de levure joue un rôle important dans l'économie du Brésil. Afin d'obtenir une nouvelle souche de levure capable de produire directement de l'éthanol à partir d'amidon sans avoir besoin d'un processus de saccharification séparé, une fusion de protoplastes a été réalisée entre la levure amylolytique *Saccharomyces fibuligera* et *S. cerevisiae*. Parmi les bactéries, l'α-amylase obtenue à partir de bactéries thermorésistantes comme *Bacillus licheniformis* ou de souches modifiées d'*Escherichia coli* ou de *Bacillus subtilis* est utilisée lors de la première étape d'hydrolyse des suspensions d'amidon **(de Souza & de Oliveira Magalhães, 2010)**.

IV Déchets de peau de banane comme milieu de base

La banane est l'un des fruits les plus populaires, et a un contenu nutritionnel élevé. Les fruits sont généralement consommés frais ou transformés en différents produits à petite échelle et à échelle industrielle, tels que des fruits secs, des chips, des smoothies, des glaces, du pain, de la farine, du vin et des ingrédients pour aliments fonctionnels. Récemment, l'utilisation de la banane comme ingrédient pour les aliments fonctionnels a suscité un vif intérêt. Cela est notamment dû au fait que les glucides de la banane (amidon et non amidon) ont une faible digestibilité, ce qui en fait un excellent ingrédient à ajouter aux aliments.

Une grande quantité de banane (102 millions de tonnes de fruits frais) est produite chaque année. La peau représente environ 35% du poids total du fruit, c'est pourquoi environ 36 millions de tonnes de peau de banane sont produites chaque année et c'est un matériau potentiel pour une utilisation ultérieure. Cependant, la majeure partie de la peau de banane est généralement jetée dans une décharge ou avec les déchets généraux (Vu *et al.*, 2018).

Par conséquent, ces déchets devraient être utilisés dans divers domaines bénéfiques pour l'homme.

La peau de fruit de banane (*Musa sapientum*) est un déchet organique très riche en glucides et en autres nutriments de base qui pourraient favoriser la croissance microbienne. Les avantages économiques potentiels qui peuvent découler de l'utilisation de ce matériau nutritif bon marché comme source de milieu de recherche mycologique et comme substrats pour la production de biomasse micro-fongique (Essien *et al.*, 2005).

IV.1. Composition nutritionnelle de peau de banane

Les principaux constituants de la peau sont en pourcentage du poids frais : l'eau (89,45), les glucides totaux (2,29), les sucres totaux (2,06), le saccharose (1,55), les pectines (0,58), les sucres réducteurs (0,51), les lipides (0,50), l'amidon (0,23).

La peau est plus riche en eau que la pulpe, elle a la même faible proportion de matières grasses mais elle est beaucoup plus pauvre en pectines et glucides.

Les analyses de cendres de pulpe et de peau montrent que la proportion de tous les constituants minéraux, notamment celle de la potasse est plus élevée dans la peau que dans la pulpe (Bonnet, 2012).

IV.2. Utilisation de peau de banane dans la production des enzymes

De nombreux articles de recherche scientifique se sont concentrés par la recherche de nouveaux processus et substrats pour la production d'enzymes. Récemment, l'utilisation de bio-ressources, telles que les déchets agroalimentaires pour la production d'enzymes, sont devenue un enjeu majeur. Grâce à ces caractéristiques physico-chimiques BPW qui a été utilisées comme substrats pour la production de diverses enzymes, comme la production d'amylase à partir de BPW par *Aspergillus niger* et *Bacillus subtilis*, et la production d'enzymes dégradant la lignocellulose (endoglucanase et xylanase) par fermentation submergée de BPW par *Pycnoporus coccineus* (El Barnossi *et al.*, 2021).

Etude expérimentale



Matériel et méthodes

I Matériels biologiques

Les microorganismes (les levures) utilisés dans notre étude sont des souches levuriennes isolées par Dr. Dakhmouche-djekrif Scheherazad à partir des différents biotopes (Miel, Yaourt, Pelures de pomme de terre, Grains de blé dure) et conservés dans la mycothèque de laboratoire de GEA à UFMC1.

I.1. Milieux de réactivation

Les milieux utilisés pour la réactivation de ces souches sont : (voir l'annexe)

- YPGA ou YPDA : Yeast extract, Peptone, Glucose ou Dextrose, Agar.
- PDA : Potatoes, Dextrose, Agar.
- YMA: Yeast extract, Malt extract, Agar.

Après la préparation des milieux, nous les stérilisons à 120°C pendant 20min.

I.2. Réactivation des souches

Couler les boîtes pétries avec un milieu de culture stérile

Après la solidification, ensemencer les avec une goutte de suspensions, une bille ou par une colonie d'une culture passée, par étalement en stries.

Incuber dans une étuve à 28°C pendant 24 à 48h.

I.3. Conservation des souches

Les souches levuriennes sont conservées sur milieu incliné (sabouraud commerciale) à 4°C.

Un autre lot de souches est conservé à -20° C en milieu YM avec glycérol comme

Cryo-protecteur à -20 dans des eppendorfs.

I.4. Sélection des souches

La première sélection est basée sur la croissance rapide dans un milieu solide YPGA à 28°C.

I.4.1. Mise en évidence des activités enzymatiques

La mise en évidence des différentes activités enzymatiques : amylolytique, pectinolytique, protéolytique, lipolytique, cellulolytique.

On a préparé 5 milieux de cultures (annexe) :

YPCA (Yeast extract, Peptone, Cellulose, Agar).

YPPA (Yeast extract, Peptone, Pectine, Agar).

TPA (Tween 80, Peptone, Agar).

YPSA (Yeast extract, Peptone, Strach, Agar).

Et milieux pour l'activité protéolytique : gélose caséiné.

I.4.1.1. Ensemencement des souches

Préparation des suspensions par à port à MacFarlon 4 (voir l'annexe) à partir d'une culture jeune des levures.

Ensemencer par dépôt de 62µl de suspension dans des puits qui ont été fabriqués par le bout le pipette pasteur sur les milieux solides.

Incubation à 28°C pendant 72 à 120h.

I.4.2. Révélation des activités enzymatiques

L'activité est révélée par l'apparition d'une zone claire de forme anneau autour de la croissance de levure.

Activité α -amylasique : est révélée par l'inondation des boîtes pétrie par la solution Lugol 1 (annexe), laisser agir pendant 15min, la solution Lugol 1 fonctionne sur la coloration de l'amidon non dégradé par la levure.

Activité cellulasique : est révélée par l'inondation des boîtes pétrie par la solution de Rouge Congo 1% (annexe), laisser agir pendant 15min, puis rincer par la solution de NaCl (annexe) et laisser agir pendant 20min.

Activité pectinolytique : est révélée par l'inondation des boîtes par solution Lugol 2 (annexe), laisser agir pendant 20min. L'activité pectinolytique est mise en évidence par l'apparition de zones claires autour des colonies.

Activité protéolytique : L'activité protéasique est estimée par la mesure des diamètres des zones de lyse de la caséine autour des zones de croissance sur gélose additionnée de lait UHT.

Activité lipolytique : La présence d'enzymes lipolytiques se distingue par précipitation des cristaux autour des colonies en raison de la dégradation des sels de l'acide gras qui constitue le Tween 80.

I.4.3. La sélection de la souche

Nous avons étudié la production de l' α -amylase levurienne, donc à partir des résultats de mise en évidence d'activité α -amylasique, on a sélectionné la souche qui représente une grande capacité de produire notre enzyme d'intérêt.

I.5. Identification de la souche sélectionnée

L'identification de la souche sélectionnée est basée sur la détermination de caractères culturels, morphologiques et physiologiques.

I.5.1. Caractères morphologiques

I.5.1.1. Caractéristiques macroscopiques

On a ensemencé la souche sélectionnée sur milieu YPGA par étalement en strie, elle est incubée 48h à 28°C puis laissée à la lumière et température ambiante pour favoriser l'apparition éventuelle de pigment.

L'observation des colonies est réalisée afin de décrire leur forme, leur aspect et leur couleur...etc.

I.5.1.2. Caractéristiques microscopiques

Afin de déterminer l'aspect macroscopique des colonies de la levure, l'examen microscopique est effectué par culture jeune de 24 à 48h à 28°C en milieux solides YPGA et PDA pour déterminer la forme, la taille des cellules et le mode de reproduction (sexuée, asexuée).

I.5.2. Caractères physiologiques

I.5.2.1. Galerie API ID32C

La galerie ID 32C est un système standardisé pour l'identification des levures, contenant 32 tests d'assimilation miniaturisés. Cette manipulation a été effectuée au sein du Laboratoire de Génie Enzymatique et Application université de Mentouri Constantine 1.

I.5.2.2. Principe de la galerie API ID32C

La galerie 32C comporte 32 cupules contenant chacune un substrat carboné sous forme déshydraté, remplies d'un milieu semi-solide (API C Medium) préalablement inoculé.

Quelques colonies sont transférées dans de l'eau distillée stérile jusqu'à une opacité Mac Farland 2. 250 μ l de cette suspension sont transférés dans une ampoule de milieu semi-solide API C fournie par le fabricant.

Après homogénéisation, chaque cupule de la galerie est inoculée par 135 μ l de milieu ensemençé. La galerie recouverte d'un couvercle est mise à incuber à 30°C pendant 48h.

Des lectures visuelles sont réalisées après 24 h et 48 h d'incubation. La présence éventuelle d'un trouble est notée après comparaison au contrôle (O) (position 1 F sur la galerie). Une cupule plus trouble que le témoin indique une réaction positive et la fermentation du composé.

La composition de la galerie et le mode opératoire sont présentés en annexe. Les résultats obtenus de l'API 32C ont été interprétés en utilisant le téléchargement d'APIWEB fourni par le fabricant.

II Production de l' α -amylase

II.1. Milieux de base pour la production

On a choisi deux déchets comme milieux de production de l' α -amylase : les pelures des pommes de terre et déchets de peau de banane dans le but de valoriser ces déchets de l'industrie agroalimentaire.

La production a été effectuée initialement par les deux types de fermentation solide (FMS) et liquide ou submergé (FML).

II.1.1. Dénombrement des cellules de levure

Le dénombrement se fait par comptage des cellules de levures sur la cellule Thoma (0.100mm/0.0025mm²) par observation par microscope optique G40x après une dilution de 10² de la solution mère de façon obtenir une densité optique mesurable par spectrophotomètre, La densité optique de la suspension est déterminée à 600nm (Abs < 3.000).

II.1.2. Fermentation à l'état solide

Pour FMS : a été effectuée dans des erlenmeyers de 500ml, dans chaque erlenmeyer nous mettons 10g de poudre des déchets de pomme de terre et de peu de banane, 60% d'humidité par une solution tampon phosphate (0.1N) à pH 7.0, stérilisation dans un autoclave à 120°C pendant 20min après sont inoculés par 4.10⁶cellule/ml de suspension de levure, incubation à 28°C pendant 48h.

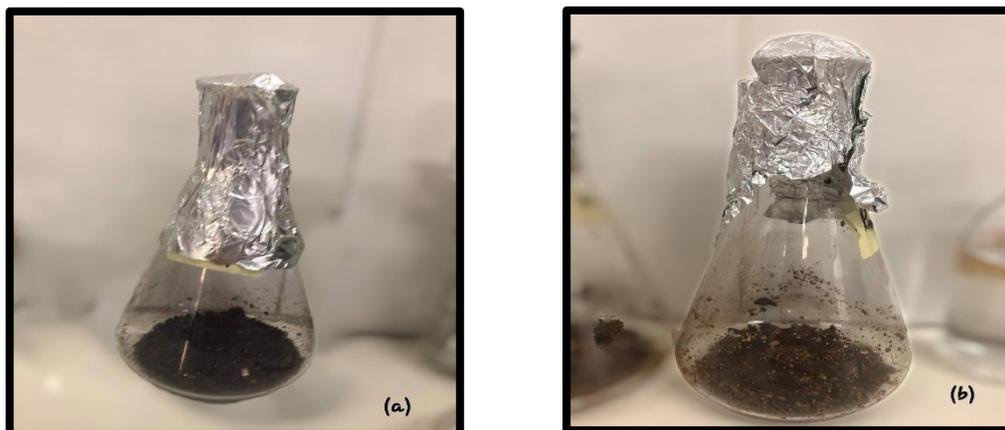


Figure 6 : Production de l' α -amylase par FMS : (a) DPB, (b) PPT.

II.1.2.1. Extraction de l'extrait enzymatique

Une partie du substrat fermenté servira pour la mesure de la matière sèche, donc de chaque erlenmeyer tu prends 5g du substrat dans un mixeur et tu rajoute un volume de 25ml de solution de tween80 0.02%(annexe), mélanger pendant 1 à 3min. Après centrifuger à 4°C,10.000rpm pendant 10min et garder les extraits à 4°C jusqu'au dosage d'activité enzymatique.

II.1.3. Fermentation submergé ou liquide

La FML a été effectuée aussi dans des erlenmeyers de 500ml qui contient 100ml de substrat, stérilisation à 120°C pendant 20min, inoculation par 4.10^6 cellule/ml de suspension de levure, qui a été incubée à 28°C pendant 48h, sous agitation 200rpm.

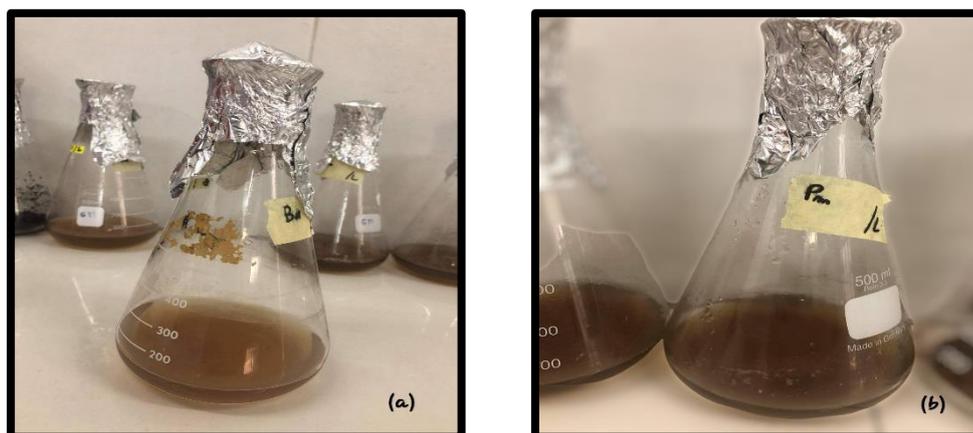


Figure 7 : Production d' α -amylase par FML : (a) DPB, (b) PPT.

II.1.3.1. Extraction de l'extrait enzymatique

Après la fermentation, centrifuger le substrat fermenté à 4°C vitesse de 10.000rpm pendant 10min. garder les extraits sous température de 4°C jusqu'au dosage de l'activité enzymatique.

II.1.4. Dosage de l'activité enzymatique

L'activité α -amylasique est évaluée par la capacité de l'extrait enzymatique brut à hydrolyser l'amidon.

Le dosage de l'activité α -amylasique est déterminé selon les étapes suivantes :

- ❖ Ajouter 0.5ml de l'extrait enzymatique brut avec 0.5ml d'amidon à 1% dans du tampon phosphate 0.1N pH 7.0(selon l'étude).
- ❖ Incuber le mélange réactionnel à 40°C pendant 30min, après refroidir immédiatement.
- ❖ Stopper la réaction par addition de 1ml du DNSA (annexe) et incuber à 100°C pendant 10min
- ❖ Refroidir dans un bain de glace pendant 5min. après lire l'absorbance à 540nm.

La réaction est colorimétrique et l'intensité de la coloration est proportionnelle à la quantité de sucre réducteur libéré par la réaction d'hydrolyse. Les activités α -amylasique est définie comme la quantité d'extrait enzymatique nécessaire pour produire 1 μ mole de sucre réducteur (équivalent au maltose) / min par rapport à la courbe d'étalonnage (figure 8).

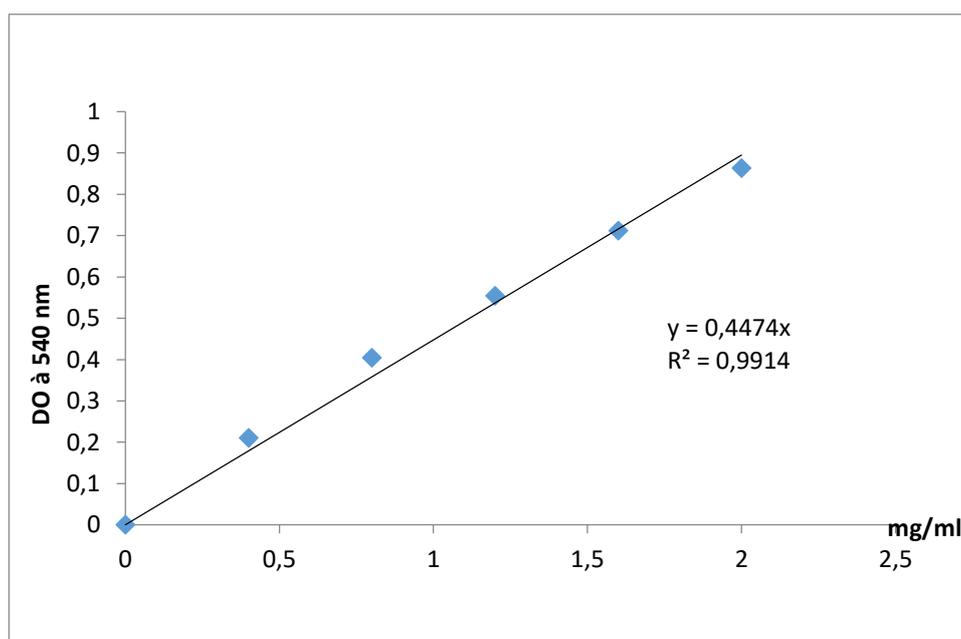


Figure 8 : Courbe d'étalonnage du maltose.

II.2. Amélioration du milieu de la production

Les déchets de peau de banane ont été choisis comme substrat pour la production de l' α -amylase.

L'amélioration du milieu de base pour la production de l' α -amylase a été réalisée selon une approche un facteur à la fois (OFAT : One Factor At Time). La méthode OFAT a été réalisée en modifiant les paramètres des facteurs de manière séquentielle.

Les facteurs pris en compte pour l'optimisation étaient le pH du milieu, la température d'incubation, les sources de carbone et d'azote, taux d'inoculum, temps d'incubations, humidité.

II.2.1. pH

Pour déterminer le pH optimum de la production de l' α -amylase, on a été préparer une série de 6 erlenmeyers de 500ml dans les mêmes conditions de production précédentes et la seule variable c'est la valeur du pH, on a été utilisé une solution tampon phosphate-citrate (0.1N) à différent pH 4,5,6,7,8. Après l'incubation on a été récupérer l'extrait enzymatique et dosés l'activité.

II.2.2. Temps d'incubation

La température optimale pour la production d' α -amylase a été vérifiée dans la plage de 25 °C à 50 °C pendant 48 h.

II.2.3. Sources de carbone

La production d' α -amylase a été réalisée en cultivant les cellules levuriennes dans un milieu de base DPB contenant diverses sources de carbone (sources C) telles que l'amidon, le glucose, le lactose, maltose, fructose, galactose à concentration de 1%.

II.2.4. Source d'azote

Différentes sources d'azote organiques et inorganiques telles que la peptone, l'extrait de levure, corn steep liquor, l'urée, chlorure d'ammonium et le sulfate d'ammonium ont été ajoutées individuellement à une concentration de 0.5 % (p/v). Les erlenmeyers contenant les milieux de fermentation ont été incubées à 28°C pendant 48h et le dosage enzymatique a été étudié.

II.2.5. Taux d'inoculum de la levure

Pour une bonne productivité d'enzyme par cet levures if faut déterminer le taux d'inoculum de la levure optimale pour la fermentation. C'est pour ça on a étéensemencé les

erlenmeyers par différents densité de cellule levuriennes : 4.10^4 , 4.10^5 , 4.10^6 , 4.10^7 cellules/ml. Puis incubées et étudiés le dosage enzymatique.

II.2.6. Humidité

La fermentation à l'état solide besoin d'humidification du milieu pour la croissance des cellules levuriennes, on a été humidifiés le milieu par différents pourcentage d'agent humidifiant qui a été une solution tampon phosphate-citrate (0.1N) de : 30, 40, 50, 60, 70%.

II.2.7. Temps d'incubation

Les levures nécessitent un temps d'incubation optimale pour leurs croissances et leurs productivités des métabolites tels que les enzymes. Dans ce teste on a été étudier spécifiquement le temps nécessaire de fermentation par cette souche pour donne une production optimale d'enzyme, on a été incubés chaque erlenmeyer pendant 24, 28, 30, 37, 40, 48, 72, 96h.

Après la détermination des valeurs optimales de ces différents facteurs influencent la production d' α -amylase, on a été réalisées une production par ces conditions.

II.3.Purification partielle de l' α -amylase

Dans notre étude on a été utilisés deux méthodes de précipitation des enzymes.

II.3.1. Précipitation par Sulfate d'ammonium

Tout le processus de purification a été réalisé à 4 °C. L'enzyme brute dérivée après centrifugation du milieu de culture a été autorisée pour une saturation en sulfate d'ammonium de 20 à 50 % et de 70 à 80%. Le précipité recueilli par centrifugation à 10 000 rpm pendant 20 min a été dissous dans du tampon phosphate-citrate 0,1N (pH 7.0) et dialysé pendant une nuit contre le même tampon avec des changements occasionnels de tampon.

II.3.2. Précipitation par acétone

Le protocole consiste à mettre sous agitation un volume de l'extrait brute de l'enzyme et quatre volumes d'acétone. Le mélange est mis à 4°C pendant 1h avant d'être centrifugé à 12000 g pendant 30 min.

II.4.Dosage des protéines

II.4.1. Principe

Les protéines sont quantifiées en utilisant la méthode du Folin Ciocalteu.

L'addition successive à une solution protéique diluée d'un sel de cuivre en milieu alcalin et du réactif des phénols de Folin Ciocalteu donne une coloration bleue foncée. Celle-ci résulte de la réaction du cuivre sur les liaisons peptidiques.

II.4.2. Réactifs

- **Solution A** : Carbonate de sodium (Na_2CO_3) à 2% dans NaOH (0.1N)
- **Solution B** : Tartrate double de sodium et potassium à 2%.
- **Solution C** : Sulfate de cuivre (CuSO_4) 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.

II.4.3. Mode opératoire

- Ajouter à 0,5 ml de l'extrait enzymatique dilué 2,5ml de la solution M.
- Agiter et laisser reposer 10 min à température ambiante
- Ajouter 0,25 ml de réactif de Folin
- Agiter et laisser la coloration se développer 30 min à l'obscurité.
- Lire l'absorbance contre le blanc à 650 nm.

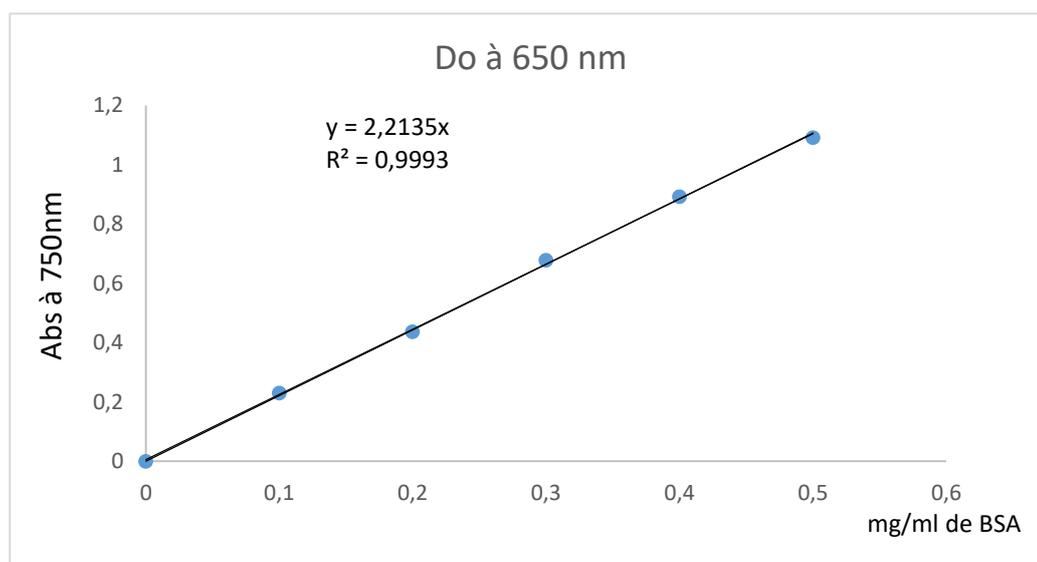


Figure 9 : Courbe d'étalonnage des protéines.

III Immobilisation d' α -amylase

(Dakhmouche-Djekrif, 2016a) a été étudiée l'optimisation de l'immobilisation d' α -amylase de la souche *Clavispora lusitaniae*, et les résultats sont les suivants :

III.1. Préparation du gel

Trois g d'alginate de sodium (pour le plan statistique, cette valeur varie de 2 à 4%) sont dissous dans 100 ml dans le tampon pH 7 à 50-60°C. La solution est dégazée toute une nuit à 4°C (ou 20 min en cuve à ultrasons).

III.2. Inclusion de l'enzyme

Dix ml de l'enzyme purifiée sont mélangés, sous agitation, avec 90 ml de la solution d'alginate de sodium.

III.3. Polymérisation

Le mélange homogène (gel d'alginate-enzyme) est introduit dans une burette à ouverture assez large (Figure10). Les billes sont obtenues par goutte à goutte dans une solution de CaCl_2 1,5 M en agitation modérée à 4°C.

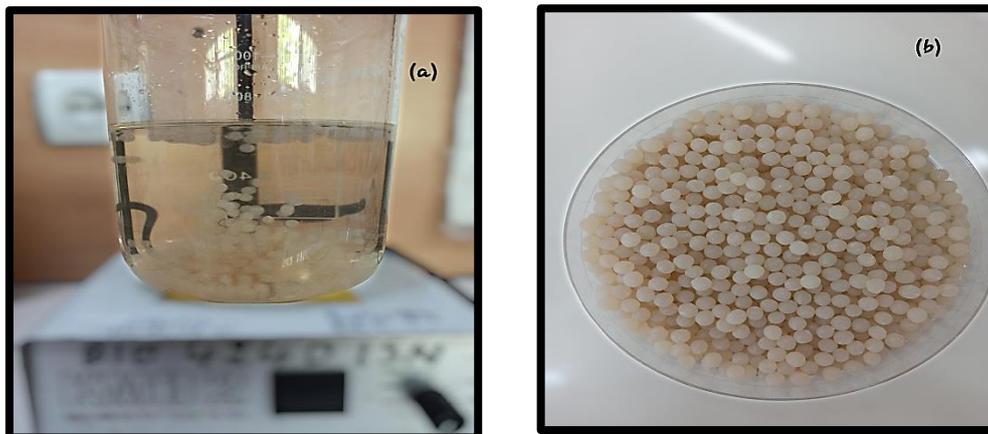


Figure 10 : (a) : formation des billes contenant l'enzyme immobilisé dans la solution de CaCl_2 , (b) : billes d'alginate de calcium solidifiées.

Les billes sont conservées dans cette solution, pendant 2h, pour poursuivre la gélification. Les billes formées sont récupérées par filtration et lavées à fond avec le tampon à pH 7 pour être séchées sur papier filtre (Whatman n°1) avant d'être utilisées. La solution de chlorure de calcium filtrée et l'eau de lavage (tampon) sont recueillies pour la détermination de l'activité enzymatique.

III.4. Détermination du rendement d'immobilisation d'enzyme

Le rendement d'immobilisation est défini comme la rentabilité de l'enzyme immobilisée dans les billes d'alginate de calcium et exprimé par l'équation suivante :

Rendement d'immobilisation (en%) = (Activité de l'enzyme immobilisée /Activité d'enzyme libre) x 100

III.5. Réutilisation d' α -amylase immobilisée

L'avantage d'utiliser un enzyme immobilisée est la possibilité de les utiliser plusieurs fois sans perte la sensibilité de l'activité. Chaque cycle dure 30 min à 60°C. Les billes obtenues sont lavées avec de l'eau distillée pour l'utilisation suivante et le processus est répété pour plusieurs cycles jusqu'à ce que l'activité enzymatique diminue.



Figure 11 : Réutilisation d'enzymes immobilisées.

III.6. Etude des propriétés de l'enzyme libre

III.6.1. Effet de la température

L'effet de la température d'incubation est étudié dans l'intervalle de 30 à 80°C, en mesurant l'activité enzymatique de l'extrait brut incubé pendant 30 min au pH optimal.

III.6.2. Effet de la thermo-stabilité

La stabilité thermique de l'enzyme α -amylase libre de *Candida sp* est étudiée après son incubation à 80 et à 100°C pour une durée de 30 à 180min.

III.7. Etude des propriétés de l'enzyme immobilisée

III.7.1. Effet de la température

L'effet de la température d'incubation est étudié dans l'intervalle de 30 à 100°C, en mesurant l'activité enzymatique immobilisé incubé pendant 30min au PH optimale.

III.7.2. Effet de la thermo-stabilité

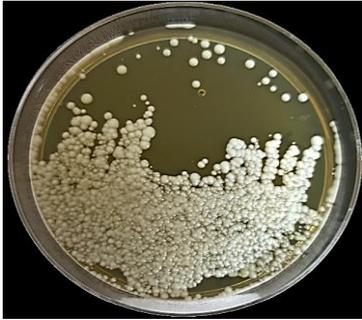
La stabilité thermique de l' α -amylase immobilisé de la souche *Candida sp* est étudiée après son incubation à 95 et 100°C pour une durée de 30 à 180min.

IV Essai d'application de l' α -amylase comme un agent de désencollage

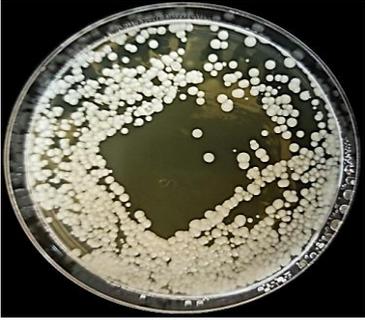
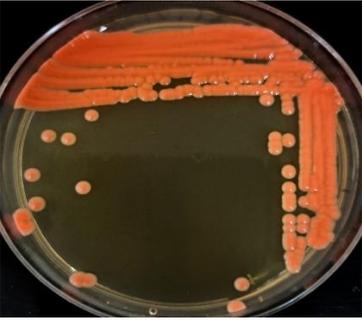
On a été étudiés L'efficacité de désencollage de l' α -amylase de la P3 *Candida sp*. Des morceaux de tissu de coton blanc de taille égale (5 cm \times 5 cm) ont été amidonnés en utilisant une solution d'amidon à 5 % et séchés. Les bandes de tissu amidonné ont ensuite été plongées dans un flacon contenant une solution d'iodo-ioduré de potassium (0,1 ;1%) puis ajouter les tissus dans des erlenmeyers qui contient (a) 25 ml d'eau du robinet (témoin) et (b) 24 ml d'eau du robinet et 1 ml d'amylase partiellement purifiée (c) 24 ml d'eau de robinet et 1 ml de l'amylase commerciale de *Aspergillus oryzae*. Les erlenmeyers ont ensuite été incubés pendant 1 h à température ambiante avec une agitation de 200 tr/min.

Résultats et discussions

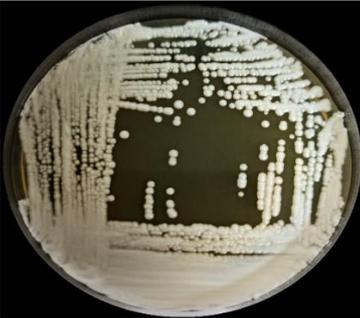
I Réactivation des souches

Souche	origine	Caractéristiques morphologiques	Photos de réactivation
P1	Pelures de pomme de terre	Des colonies, blanches, crémeuses, lisses, d'aspect brillants.	
P2	Pelures de pomme de terre	Crémeuses, petites colonies, bombée, brillante.	
P3	Pelures de pomme de terre	Blanches, grande colonies, bombées, brillantes.	
P4	Pelures de pomme de terre	Blanches, bombées, grande colonies, brillantes.	

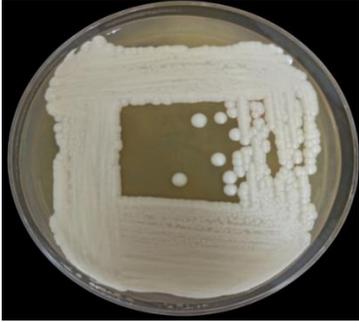
Résultats et discussions

P5	Pelures de pomme de terre	Grandes colonies, crémeuses, brillantes, bombées.	
P6	Pelures de pomme de terre	Petites colonies, crémeuses, mates, lisses.	
P7	Pelures de pomme de terre	Petites colonies, blanches, bombées, brillantes.	
P8	Pelures de pomme de terre	Grande colonies, coraies, bombées, brillantes.	

Résultats et discussions

P9	Pelures de pomme de terre	Petites colonies, bombées, crémeuses, brillantes.	
P10	Pelures de pomme de terre	Petites comonies, blanches, bombées, mates	
M1	Miel	Petites colonies, blanches, crémeuses, bombées, mates.	
M2	Miel	Grandes colonies, blanches, bombées, mates.	

Résultats et discussions

M3	Miel	Grandes colonies, blanches, crémeuses, bombées, mates.	
Y1	Yaourt	Petites colonies, blanches, bombées, brillantes.	
Y2	Yaourt	Petites colonies, blanches, bombées, brillantes.	
Y3	Yaourt	Grandes colonies, crémeuses, bombées, mates.	

Résultats et discussions

Y4	Yaourt	Petites colonies, blanches, bombées, brollantes.	
L4	Grain du blé dur	Petites colonies, crémeuse, bombées, brillantes.	
L5	Grain du blé dur	Grande colonies, blanches, bombées, mates.	
L6	Grain du blé dur	Petite colonies, blanches, bombées, mates.	

Résultats et discussions

L7	Grain du blé dur	Petites colonies, blanches, bombées, brillantes.	
38'	Yaourt	Petites colonies, blanches, bombées, brillantes.	
L10	Grain du blé dur	Grande colonies, blanches, bombées, mate.	
T	Grain du blé dur	Grandes colonies, blanches, bombées, mate.	

II Sélections des souches

II.1. Mise en évidence des activités enzymatiques

Les résultats de la mise en évidence des différentes activités enzymatiques sont révélés dans le tableau 5.

Tableau 5 : mise en évidence des différentes activités enzymatiques : (GB) Grain de blé, (Pm) Pelures de pomme de terre.

Code	Origine	Alpha amylase (Cm)	Protéase (Cm)	Péctinase (Cm)	Cellulase (Cm)	Lipase (Cm)
P1	Pm	+/-0.5	+0.9	+0.5	+++2	+
P2	Pm	-	-	+0.8	++1.4	++2.4
P3	Pm	++++3.6	++++3.9	+	+++2.9	+++2.4
P4	Pm	+0.7	+0.6	+0.7	+	+0.7
P5	Pm	+++2.8	++2.4	++1.2	++1.7	+
P6	Pm	+0.5	++2.3	+1.2	++1.7	++1.3
P7	Pm	+1.2	+0.4	++1.3	+++2.1	+
P8	Pm	+2.2	+/-	++1	+++2.2	+
P9	Pm	-	+/-	-	++1.3	+1
P10	Pm	+2.5	+/-	+0.9	++1.6	+1
M1	Miel	+2.9	+1	++1	++1.9	+
M2	Miel	+1.9	+/-	+0.8	++1.9	+0.5
M3	Miel	+2.1	+0.5	+0.7	++1.4	+
38'	Yaourt	-	-	+0.8	+0.9	-
Y1	Yaourt	++1.4	+++2.8	-	+/-	++1.3
Y3	Yaourt	++1.6	++++4.2	+	+	+++2.1
Y4	Yaourt	+0.8	+++1.9	++1.2	+++1.8	-
L5	GB	++1.2	++1.3	++1.5	++2	+
L6	GB	++2.5	+++3.1	++1.1	+/-	++1.2
L7	GB	+2.8	-	+0.8	+/-	-
L10	GB	++3	++++3.8	++1.5	+0.8	++1.2
T	GB	++2.5	++2.7	++1	++1	++1.9

+ : teste positive, - : teste négative, +/- : il y'a une croissance.

II.1.1. Sélection de la souche la plus performante pour la production d' α -amylase

D'après notre étude, les souches ont montré une grande capacité d'activité enzymatique (tableau 5), mais nous sommes intéressés par la souche qui a une grande capacité de produire de l' α -amylase.

L'étude a montré que les souche P3, P5, M1, L6, L7, T sont capable de produire de cette enzyme (tableau 5), et d'après les résultats de révélation la meilleure levure productrice de l' α -amylase est la souche P3 car elle montre la meilleure zone de lyse 3.6cm (tableau 5).



Figure 12 : Mise en évidence de la souche P3 pour la production d' α -amylase.

La formation d'une zone claire autour de la suspension de levure montre la capacité de la levure à produire des enzymes amylases, car ils peuvent hydrolyser l'amidon en un composé plus simple. L'hydrolyse de l'amidon par l'amylase, entrainera l'amidon hydrolysé qui ne formera pas de couleur bleu autour de la suspension de levure et formera une zone claire, l'absence de zone claire autour des colonies indique une réaction entre les réactifs iodés et les amidons non hydrolysés dans le milieu Strach-Agar (**Risandi et al., 2019**).

Wulandari et al., (2017), ont été réalisés une sélection des levures amylolytiques à partir de 76 souche isolées, ont été obtenu que 8 souches qui avaient le potentiel de produire l'enzyme amylase et 67 souches n'ont pas produit de zone claire sur le milieu YPSA donc absence de l'enzyme amylase.

Sukmawati et al., (2019), ont été isolés 50 souches de levures en raison d'obtenir des souches amylolytiques, Les résultats des tests qualitatifs ont montré que 16 isolats avaient une

activité amylolytique qui sont les codes d'isolat IB4, IB15, IB20, IB21, IB26, IB36, IL78, IL80, IL81, IL86, IL88, IL97, IL113, IL136, IL146 et IL150. La zone claire formée autour des colonies de levure montre que l'isolat est capable d'hydrolyser l'amidon et a le potentiel de produire des enzymes amylases. Et les autres 34 isolats de levure ne forment pas de zones claires car ils ne peuvent pas dégrader l'amidon. La présence de zones claires dans la levure a le potentiel de produire des enzymes amylases car l'amidon hydrolysé est un composé plus simple tel que les disaccharides et les monosaccharides. L'absence de zones claires autour des colonies indique une réaction entre les réactifs iodés et les amidons non hydrolysés dans le milieu YPSA.

III Identification de la souche P3

III.1. Caractères morphologiques

III.1.1. Caractères macroscopiques

Après une culture de 48h à 28°C sur milieux solide YPGA et Sabouraud, les résultats sont représentés dans la figure 13, il ressort que la souche P3 possède des colonies de forme ronde, surface lisse, bombée, crémeuse, brillante et couleur blanche.

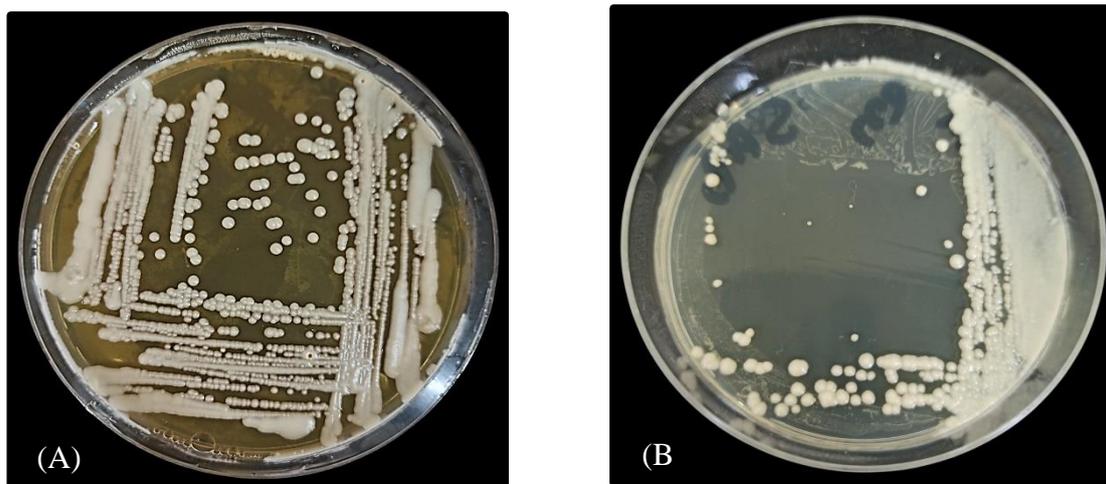


Figure 13 : Observation macroscopique de la souche P3 : (A) sur milieu YPGA, (B) sur milieu Sabouraud.

III.1.2. Caractères microscopique

L'observation microscopique permet de déterminer la forme et la tailles des cellules de la levure, la forme des cellules est ovoïde ou ovoïde allongée, leur taille entre 4 à 10um (figure 14).

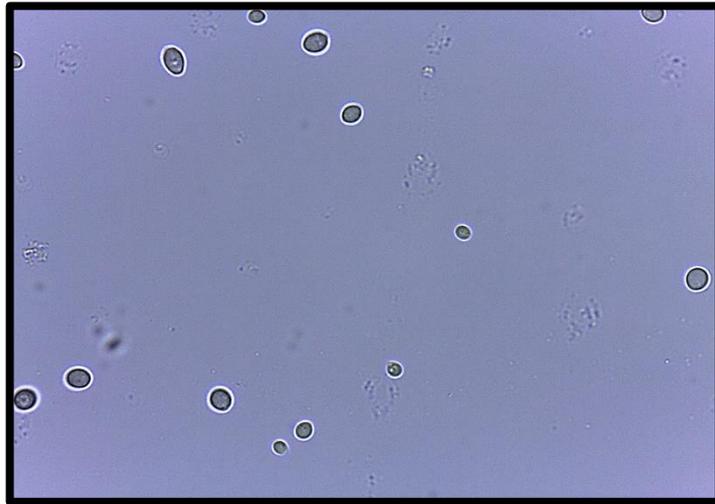


Figure 14 : Observation microscopique de P3 : forma et taille de cellule.

III.1.3. Reproduction

III.1.3.1. Reproduction asexuée

La souche a un mode de reproduction asexuée par bourgeonnement axial et bilatérale (figure 15).

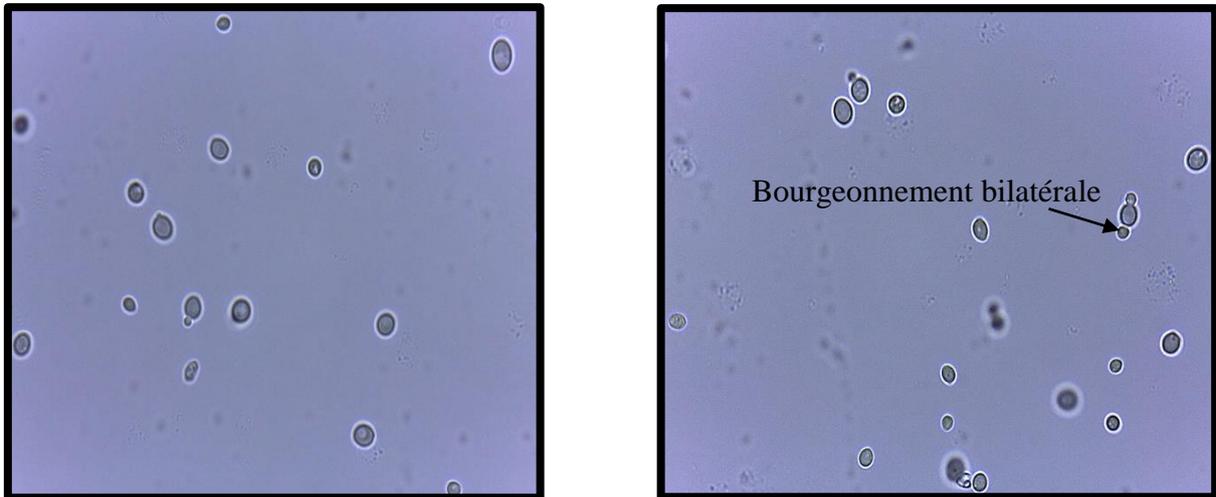


Figure 15 : Reproduction asexuée chez la souche P3 par bourgeonnement.

III.1.3.2. Reproduction sexuée

La souche P3 a aussi un mode de reproduction sexuée par la formation des asques à 2 spores (figure 16).

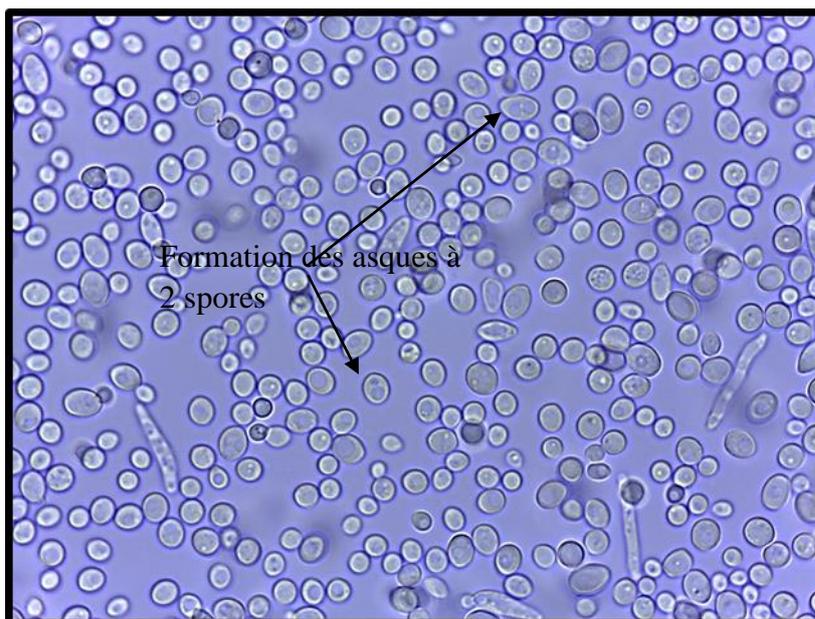


Figure 16 : Reproduction sexuée par formation d'asques à 2 spores.

III.2. Caractères physiologiques

III.2.1. Galerie API 32C

Les levures ont la capacité d'utiliser une large gamme des composés carbonés. Vu l'importance de ce critère dans la physiologie des levures nous avons utilisé la galerie API 32C pour l'identification de la souche P3 sélectionnée. Les résultats sont interprétés en utilisant le téléchargement d'APIWEB fourni par le fabricant (tableau 6).

La souche P3 sélectionnée, c'est une souche appartenant au genre *Candida sp*, Nous attendons la confirmation par laboratoire de biologie moléculaire.

Tableau 6 : Identification à partir de caractères biochimiques (ID 32C) et microscopiques.

Origine	Code	Caractères biochimique	Sporulation	Identification
Pelure de pomme de terre	P3	7546350777 Lac+ et ESC+	+	<i>Candida sp.</i>

IV Milieu de base et type de fermentation

La production d' α -amylase par *Candida sp* P3 a été réalisée en présence de différents résidus agroalimentaire tels que les pelures de pomme de terre (PPT) et les déchets de peau de banane (DPB).

Les deux types de fermentation liquide et solide sont étudiée pour la production α -amylasique afin de déterminer le meilleur substrat et le meilleur type de fermentations.

Les résultats (figure 17) indiquent que la meilleure activité α -amylasique de *candida sp* P3 1522.46 ± 359.12 UI/g est produite dans le milieu de DPB et par la fermentation solide.

Des productions de l' α -amylase moins importantes ont été obtenues dans le milieu PPT en fermentation solide et liquide et dans le milieu DPB en FML (988.81 ± 359.12 UI/g, 739.16 ± 359.12 UI/g, 788.95 ± 359.12 UI/g respectivement).

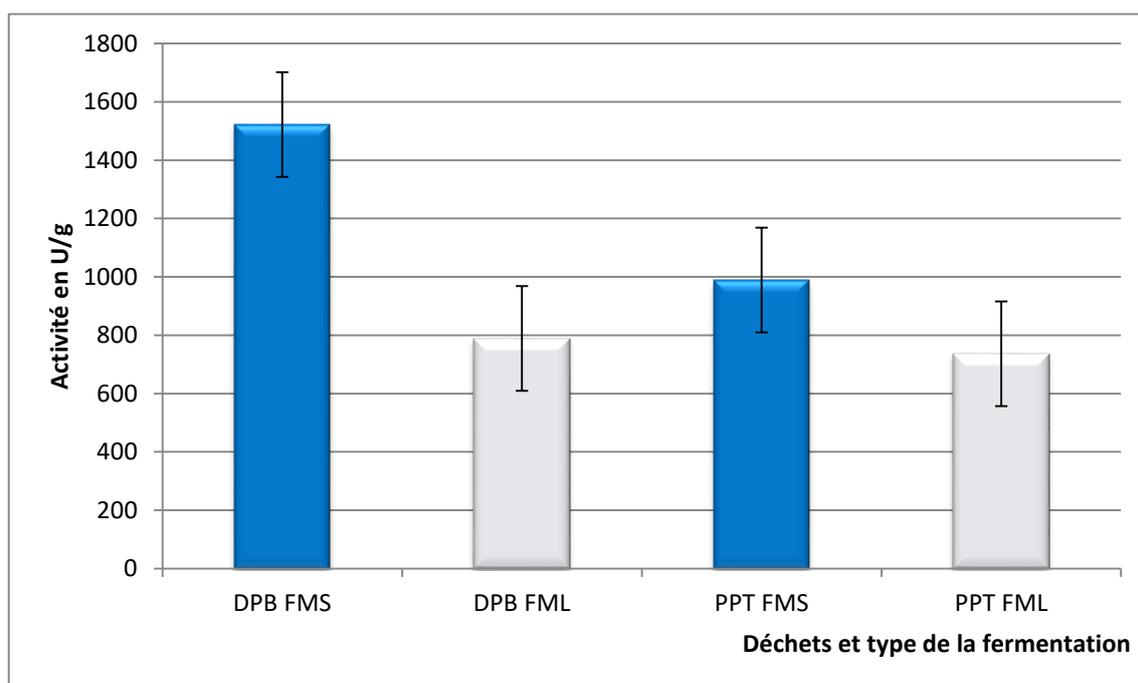


Figure 17 : Choix du substrat et de type de fermentation.

Le substrat à base de peau de banane en FMS a été soutenu la production d'amylase de *B.subtilis* (Almanaa et al., 2020).

Les déchets de peau de banane a été utilisés par Rashmi et al., (2020) pour la production d'éthanol de la levure *saccharomyces cerevisiae* .

IV.1. Amélioration du milieu de production

IV.1.1. Effet du PH

Déférents pH de 4.0 à 8.0 ont été testées sur la production α -amylasique chez *Candida sp* P3, les résultats les résultats sont montre dans la figure 18. Nous remarquons que la formation maximale d' α -amylase est atteinte à pH 7.0 (1719.29 ± 105.77 UI/g) et que la formation d'enzyme est produite dans une large gamme de pH.

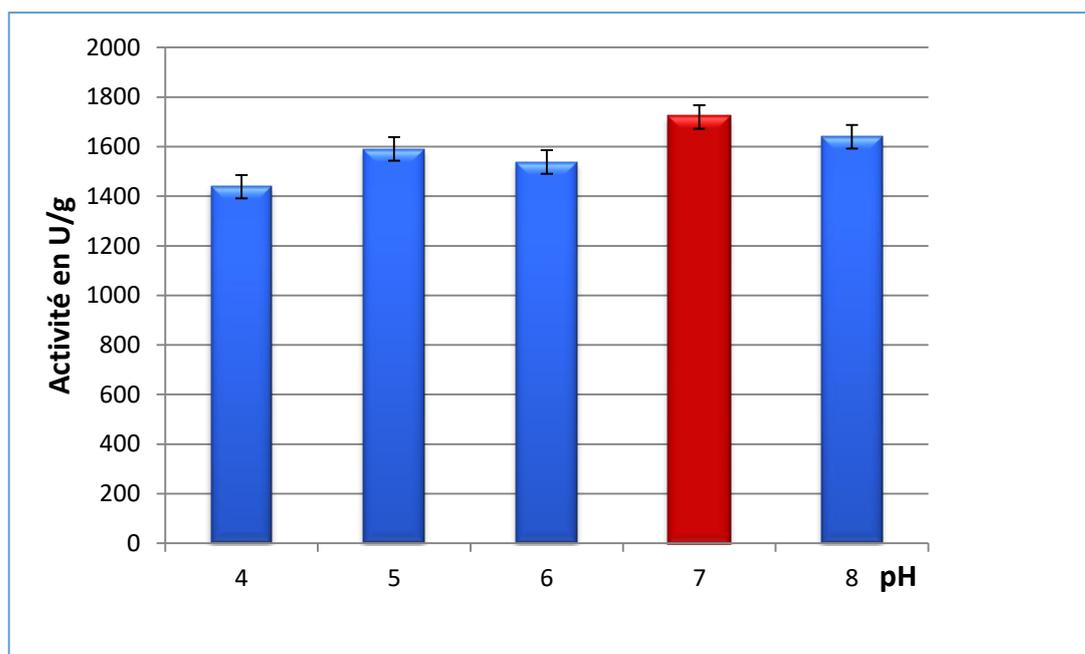


Figure 18 : Effet du PH sur la production de l' α -amylase de *Candida sp*.

L'activité α -amylasique augmente avec la variation du pH jusqu'à 7.0 où elle atteinte son max 1719.29 ± 105.77 UI/g, puis elle diminue.

Ces résultats corroborent ceux de **Kannan & Kanagaraj, (2019)**, qui ont également obtenu la quantité maximale de l' α -amylase de *Bacillus licheniformis* (JQ946317) à pH 7.0, par fermentation sur milieu solide en utilisant différents substrats (son noir, son de riz et son de blé). **Vaseekaran et al., (2011)**, ont rapporté que *Bacillus licheniformis* produit une activité amylase élevée au pH neutre et *Streptomyces aureofaciens* ont montré un maximum d' α -amylase activité à pH 7,0. *A. flavus* a produit plus d'amylase sous fermentation aérobie submergée en utilisant la Farine de *Cocos nucifera* comme substrat à pH 7 (**Arunsasi et al., 2010**).

Résultats et discussions

La souche levurienne isolée, sélectionnée par **Toumi, (2018)** pour la production d'α-amylase LB3 a manifesté une excellente production (4409 UI/ml) à pH 6.

IV.1.2. Effet du temps d'incubation

Quatre jours d'incubations ont été testées pour déterminer le temps maximal de la production de l'α-amylase de *Candida sp*, les résultats sont illustres dans la figure 19. L'activité α-amylasique la plus élevée a été obtenue après 48 h d'incubation (1635.23±268.23), au-delà l'enzyme diminue.

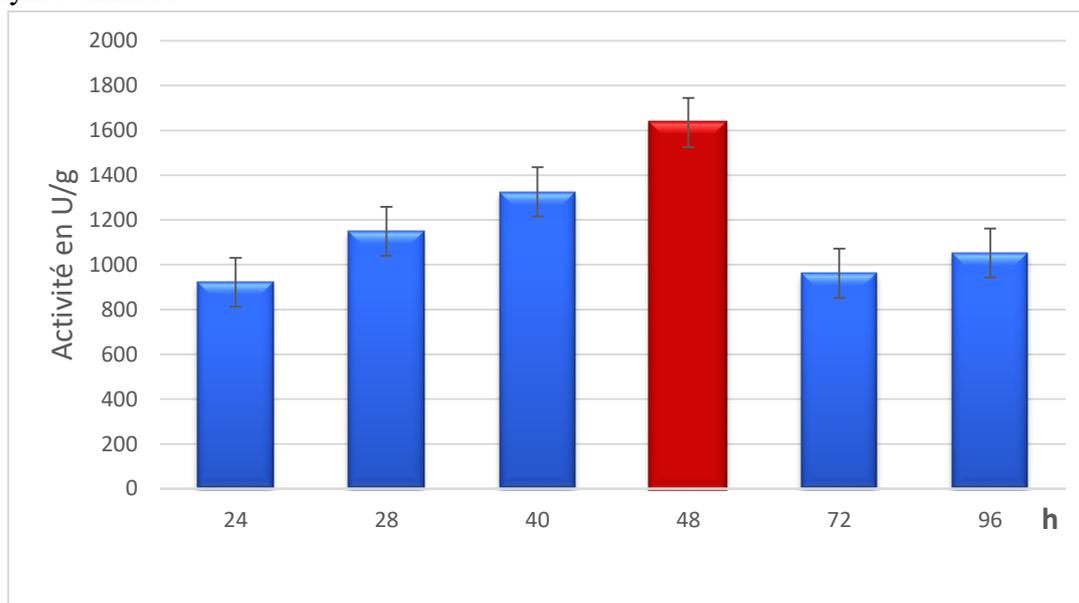


Figure 19 : Effet du temps d'incubation sur la production de l'α-amylase.

Différents travaux, ont été réalisés sur l'effet du temps d'incubation sur la production α-amylasique. **Saad et al., (2021)**, la souche *B. licheniformis* WF67 a été cultivé pendant 72h l'activité α-amylasique mesurés périodiquement et il a été trouvé que le temps 48h est le meilleur. Le même résultat est obtenu par l'α-amylase de *Bacillus amyloliquefaciens* ATCC 23842 (**Gangadharan et al., 2008**). **Aiyer, (2004)** a enregistré le temps d'incubation le plus faible (16 h) pour une production maximale d'-amylase en utilisant *Bacillus licheniformis* SPT27.

IV.1.3. Source de carbone

La réponse des souches levurienne aux sources de carbone est différentielle. bien que les sources de carbone soient essentielles à la croissance levurienne en tant que source de carbone et d'énergie ces composés peuvent inhiber la synthèse de certain enzyme (**Saad et al., 2021**).

Les résultats sont représentés dans la figure 17 ont révèlent que *Candida sp.* peut se développer et produire d' α -amylase en utilisant une variété de source de carbone.

Le glucose était clairement la source de carbone optimale pour la production maximale d' α -amylase par *Candida sp* (1631.98 ± 175.64 U/g).

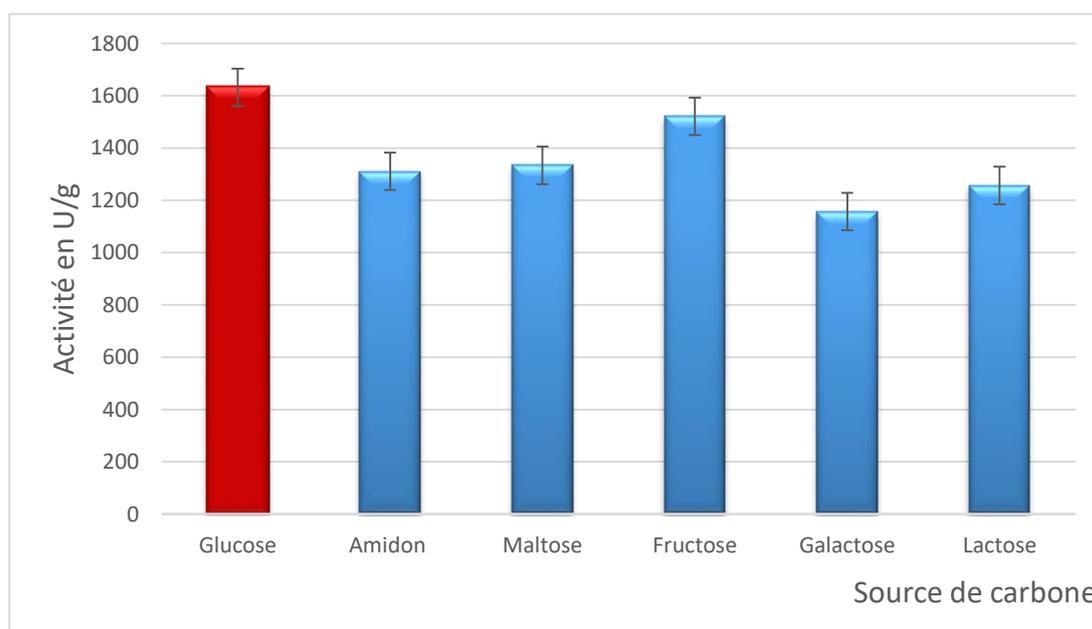


Figure 20 : Effet de différent source de carbone influencent la production d' α -amylase par *Candida sp.*

Ces résultats corroborent ceux de **Saad et al., (2021)**, pour l' α -amylase de *B. licheniformis* WF67. tandis que d'autres découvertes ont démontré que le glucose était la source de carbone optimale pour rendement maximal en α -amylase (122 ± 5 U/g) (**Anto et al., 2006**).

Msarah et al., (2020) ont montré que il y a une préférence pour les sources de carbone utilisées par *B. subtilis* SUNGB2 dans l'ordre de la source hautement préférée d'amidon suivie par le saccharose et le glucose.

IV.1.4. Source d'azote

La source d'azotes est l'un des paramètres chimiques qui affectent la croissance des levures et la synthèse des enzymes.

La figure 21 démontre que la levure *Candida sp* est capable de se développer sur toutes les source d'azote testées et sécréter de l' α -amylase. Nous constatons que les niveaux élevés de formation d'enzyme obtenus avec la peptone comme source d'azote organique où l'activité enzymatique est maximale 1091.47 ± 55.41 U/g, et avec le sulfate d'ammonium comme source d'azote inorganique avec une activité maximale de 1091.32 ± 55.41 U/g.

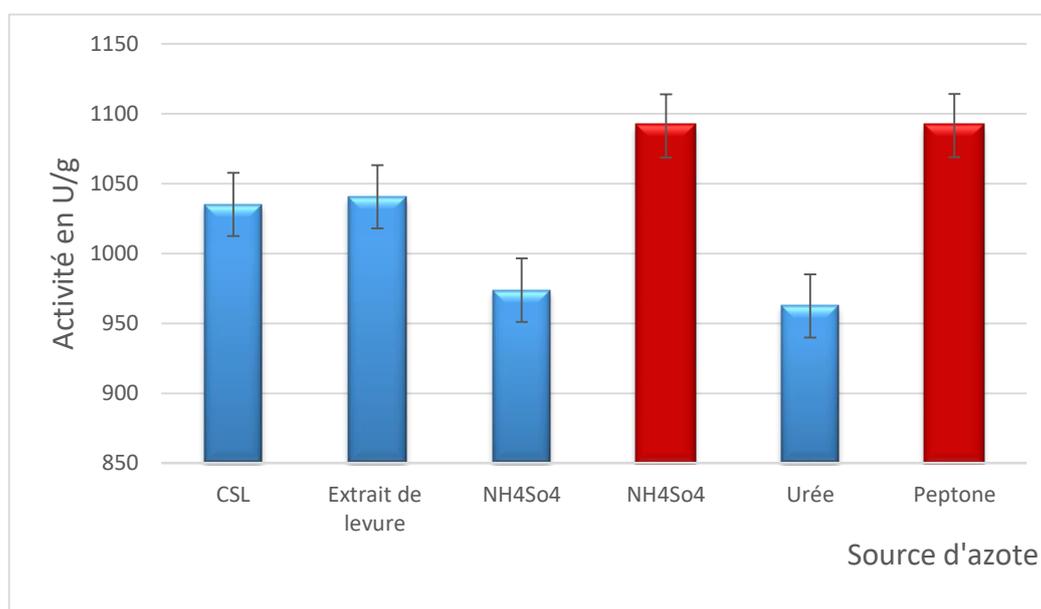


Figure 21 : Effet de diverse sources d'azote organique et inorganique sur la production d' α -amylase de *Candida sp*.

Saad et al., (2021) ont démontré que *B. licheniformis* WF67 peut bien pousser sur toutes les sources d'azote testés et sécrète l' α -amylase. L'activité d' α -amylase est plus importante en présence de l'extrait de levure suivi d'un mélange de peptone et d'extrait de levure. Par ailleurs, l'extrait de bœuf consiste aussi la meilleur source d'azote pour l'enzyme de *Bacillus sp* MTCC 7521 (**Ray et al., 2008**), en revanche, le tourteau de soja s'est avéré être la meilleure source d'azote pour la production d' α -amylase par *Bacillus sp*. PS-7 (**Sodhi et al., 2005**). **Jin et al., (1998)** ont indiqué que La supplémentation en nutriments des sources d'azote et de phosphore n'a pas amélioré de manière significative ($P > 0.05$) les activités microbiennes d'*A. oryzae*.

IV.1.5. Taux d'inoculum

Le taux d'inoculum joue un rôle clé dans la croissance levurienne en particulier la phase de latence. Les faible taux d'inoculum prolongent la phase de latence, tandis que les taux élevés augmentent la teneur en humidité dans le milieu de fermentation à l'état solide. Indiqué qu'au fur et à mesure que la taille de l'inoculum introduit était augmentée, l'activité relative de l' α -amylase a augmenté progressivement (figure 22) pour atteindre son valeur maximale en utilisant différents taux d'ensemencement, ont été testés 4.10^4 , 4.10^5 , 4.10^6 , 4.10^7 cellule/ml. D'après les résultats, le meilleur activités α -amylasique est produite avec le tauc d'inoculum de 4.10^5 cellule/ml avec une activité de 1654.08 ± 153.81 U/g.

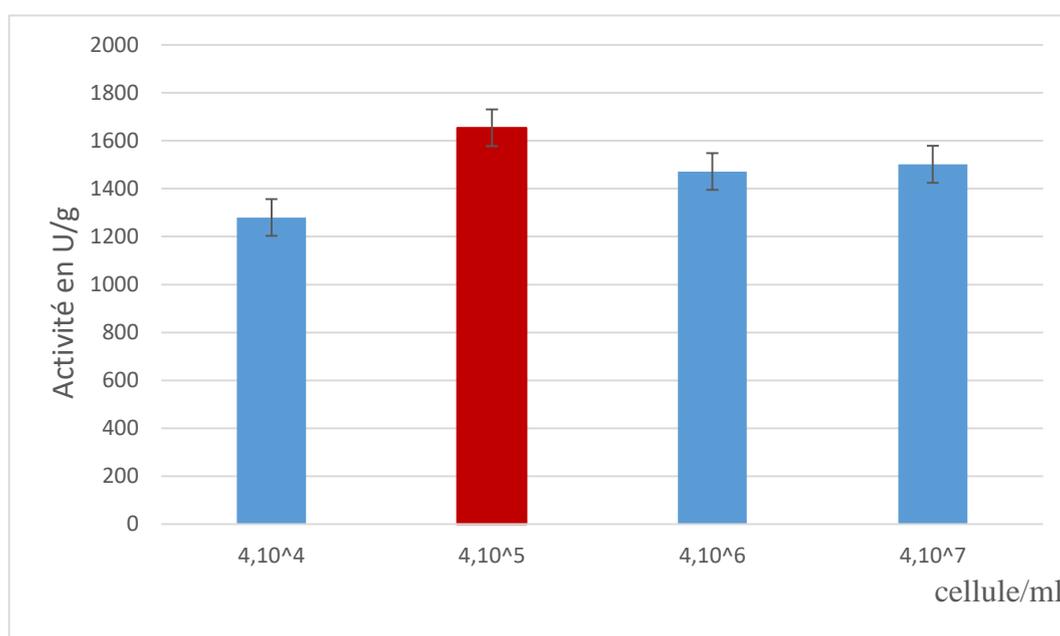


Figure 22 : Effet d'inoculum sur la production par FMS de l'alpha amylase.

Il y a une grande influence de la concentration de l'inoculum dans la production d'enzymes et par conséquent, ce paramètre doit être dûment pris en compte pour un niveau optimal de production d' α -amylase Divers niveaux d'inoculum ont été essayés pour déterminer leur effet sur la production d'enzymes. La production d'enzymes la plus élevée avec une activité de $1453,1 \pm 36,3$ U/mg pour le son de riz était obtenu à un niveau d'inoculum de 30 % (**Serin & Akcan, 2017**). **Ray et al., (2008)** ont rapporté que la production d'-amylase la plus élevée par *Bacillus sp* MTCC 7521 a été obtenue avec une taille d'inoculum de $1,0 \times 10^6$ CFU/ml.

IV.1.6. Humidité

La FMS permet la dégradation aérobie d'un substrat organique dans des faibles niveaux d'eau afin d'obtenir une molécule désirée. Il est important d'éviter d'utiliser de grandes quantités d'eau pour deux raisons, la première, pour éviter la dilution de la molécule et la seconde pour éviter le risque de la contamination bactérienne (**Melnichuk *et al.*, 2020**). La figure 20 montre l'effet de la variation de l'humidité pour la production d' α -amylase. On peut observer une augmentation de la production d' α -amylase avec les taux de l'humidité de 30 à 60%, où elle atteint son maximum de 2304.73 ± 399.68 U/g puis elle diminue à 70%.

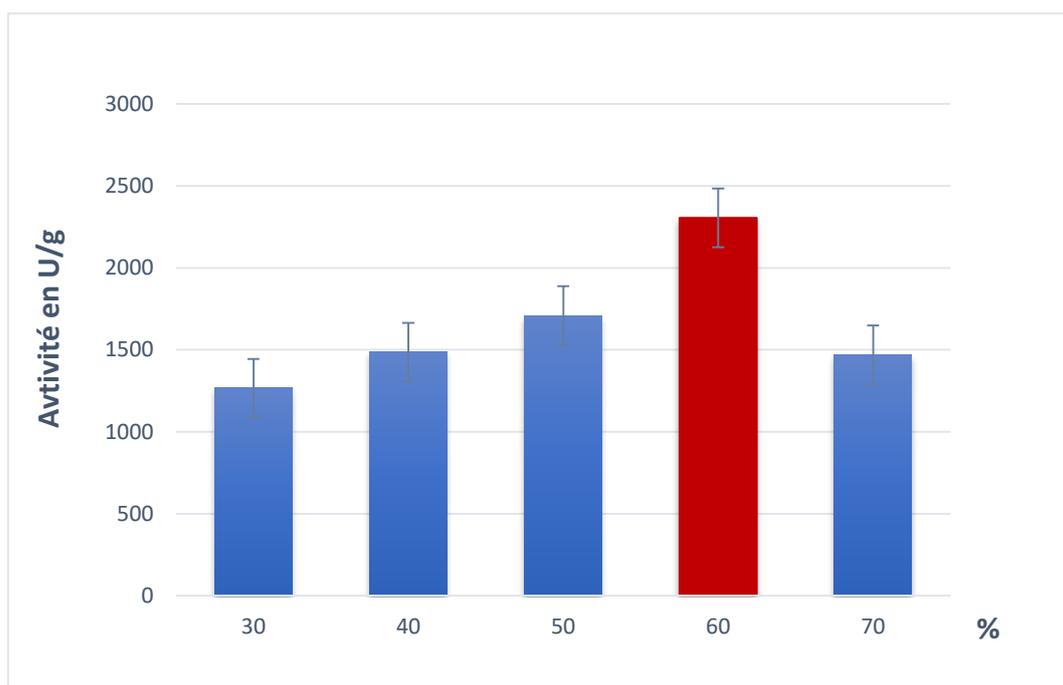


Figure 23 : Effet de l'humidité sur la production enzymatique.

La teneur en humidité du substrat est l'un des facteurs critiques influençant le résultat de la FMS et est régie par la capacité de rétention d'eau du substrat, le type de produit final et les exigences du microorganisme. Le transfert de masse inter-particulaire au sein de la phase solide vers le micro-organisme en croissance dépend des caractéristiques du substrat et de la teneur en humidité, une production élevée d'enzymes a été obtenue lorsque le niveau d'humidité a été maintenu à 20 % par *Bacillus licheniformis* ATCC 12759 sur milieu à base de son de riz (**Serin & Akcan, 2017**).

IV.1.7. Effet de température

La température est l'un des facteurs importants qui affectent fortement le processus FMS. Elle joue un rôle important dans le développement du processus biologique car elle cause la dénaturation des protéines, l'inhibition de la croissance cellulaire. Elle a été rapporté qu'au cours de la culture de *Candida sp* en FMS. L'effet de la température sur la production d' α -amylase de *Candida sp* pendant la fermentation a montré optimale à 37°C de 1925.49±362.68 U/g (Figure24).

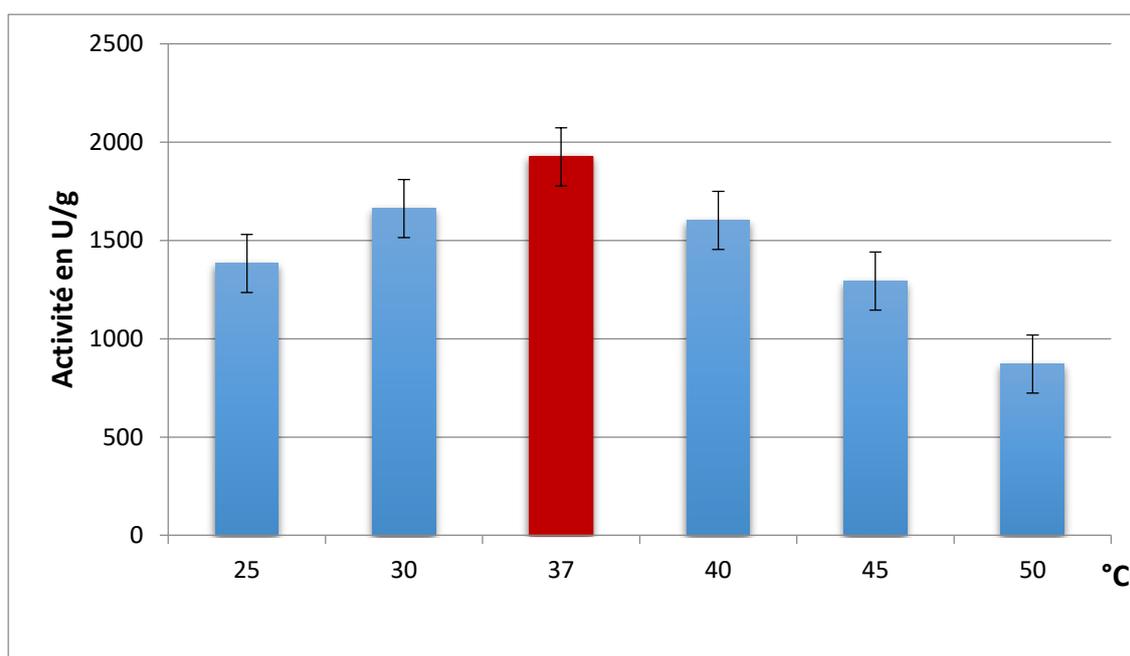


Figure 24 : Effet de la température sur la production l' α -amylase par *Candida sp*.

Même température optimale est obtenue pour *Bacillus strain* (Mishra & Behera, 2008), *Bacillus licheniformis* ATCC 12759 (Serin & Akcan, 2017), *Aspergillus oryzae* (Jin et al., 1998).

Alors que chez *Aspergillus flavus* elle est de 30°C (Bhattacharya et al., 2011).

V Purification partielle de l' α -amylase

V.1. Précipitation par sulfate d'ammonium

Comme le montre le tableau 7, l' α -amylase de *Candida sp* a été partiellement purifiée. La précipitation de l'enzyme brute avec un précipité de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Différentes concentrations du sulfate d'ammonium de 20 à 80% ont été tester pour concentrer l'enzyme. La fraction reformant le maximum d'enzyme est-elle de 40% avec une activité spécifique de 20728.91 U/g,

Résultats et discussions

avec un taux de récupération de 1.36 et un rendement de 34.72%. La moitié d'activité α -amylasique a été perdue après la précipitation, peut-être dénaturée par le sulfate d'ammonium qui joue peut-être un rôle dénaturant des protéines produites par cette nouvelle souche *Candida sp.*

Cette concentration de sulfate d'ammonium a été aussi la meilleure aussi pour précipiter l' α -amylase de *C. gileadensis* (Al-Harbi & Almulaiky, 2020).

Tableau 7 : Précipitation de l' α -amylase par 40% de $(NH_4)SO_4$

Etape	Activité totale U/g	Protéine totaux g/l	Activité spécifique	Degrée de purification	Rendement %
Extrait brute	1179517.5	262.35	25517.36	1	100
$(NH_4)SO_4$	25517.36	16.236	34955.28	1.36	44.25
Dialyse	20024.136	21.252	20728.91	0.81	34.72

V.2. Précipitation par acétone

Candida sp produit des activités α -amylasique de 2237901.24 UI/g. L'utilisation de l'acétone a conduit à la concentration de protéines et une augmentation de l'activité spécifique de l' α -amylase de 2102.22 à 6406.28 U/mg avec une récupération de 13.09% respectivement (Tableau 08).

*Tableau 8 : Purification partielle de l' α -amylase de *Candida sp* par acétone.*

Etape	Activité totale U/g	Protéines totaux g/l	Activité spécifique U/g	Degrée de purification	Rendement %
Extrait brute	2237901.24	1064.54	2102.22	1	100
Acétone	293151.6	457.95	6406.28	3.04	13.09

VI Immobilisation de l' α -amylase

Les applications industrielles des enzymes sont souvent entravées par le manque de disponibilité, le prix élevé et la stabilité limitée dans les conditions de fonctionnement.

L'utilisation d'enzymes sous forme libre n'est pas très économique car elles ne peuvent pas être récupérées en fin de procédé. Ceci peut être comblé par leur immobilisation, cette procédure augmente la stabilité des enzymes et permet leur récupération et leur recyclage. L'enzyme immobilisée a ouvert la voie au développement industriel de réacteurs enzymatiques continus. L'immobilisation évite la perte d'enzymes due au lavage, tout en maintenant les enzymes à une concentration élevée pour réduire les coûts (Al-Harbi & Almulaiky, 2020 & Dakhmouche-Djekrif, 2016a).

Tableau 9 : Activité de l' α -amylase dans les différents fraction durant l'immobilisation.

Etape	Activité UI
Enzyme immobilisée	2195.18
Enzyme libre	3963.96
Rendement %	55.37

La concentration de 3% d'alginate de sodium à donner un rendement acceptable de 55.37%. Cette concentration donne un rendement de 72.3% de l' α -amylase de *Clavispora lusitaniae* (Dakhmouche-Djekrif, 2016b) et de 54.4% de l' α -amylase de *C. gileadensis* (Al-Harbi & Almulaiky, 2020).

Par contre, la concentration de 2% d'alginate de sodium semble être le meilleur pour l'immobilisation de l' α -amylase (Dey *et al.*, 2003).

VI.1. Efficacité de la réutilisation de l'enzyme

Le principal avantage de l'immobilisation de l'enzyme est son recyclage. L'efficacité de la réutilisation de l'enzyme est un facteur clé pour son utilisation industrielle rentable (Almulaiky *et al.*, 2021; Dakhmouche-Djekrif, 2016a). L' α -amylase immobilisée dans les billes d'alginate de calcium à 3% peut être réutilisé après filtration. La réutilisation de cette enzyme immobilisée est étudiée jusqu'à 03 cycles. L'activité de l' α -amylase maintient presque totale 99.63 % de son activité initiale.

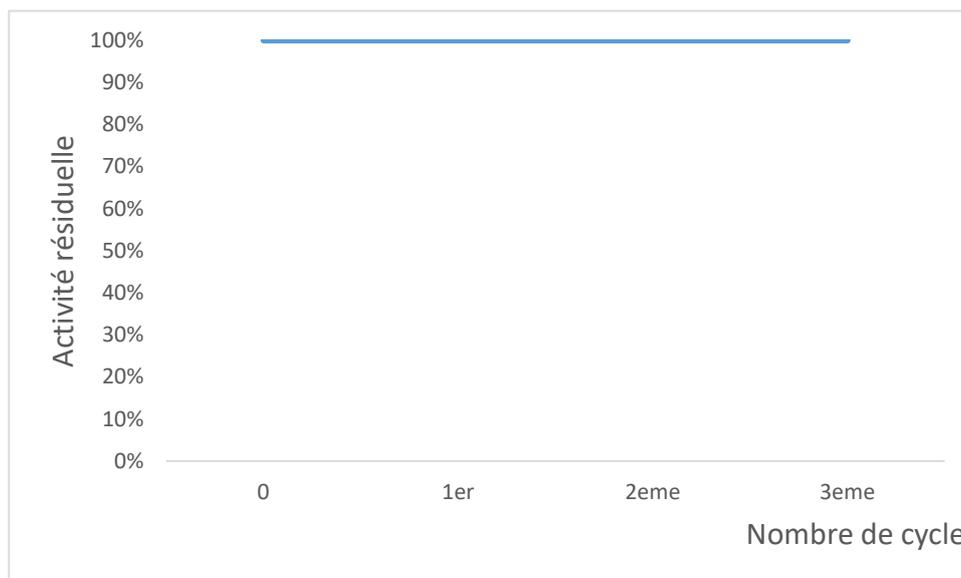


Figure 25 : α-amylase immobilisée

Dakhmouche-Djekrif, (2016b) a réutilisé l'α-amylase et la pullulanase immobilisées jusqu'à 07 cycles. L'activité de l'α-amylase garde 77,9 % de son activité initiale et celle de la pullulanase conserve 75,6 %.

Mulko et al., (2019) ont réutilisé l'enzyme jusqu'à cinq cycles. Une réduction d'activité enzymatique de plus de 70% a été observée.

Homa et al., (2014) ont montrés que l'efficacité de la réutilisation des CLEA α-amylases a été évaluée jusqu'à 15 cycles. L'activité des CLEA α-amylases restée à 76,1 % de son activité initiale après 10 cycles, ce qui suggère une forte stabilité opérationnelle. Cependant, l'activité a encore diminué à environ 63,75 % de l'activité d'origine après 15 cycles.

VI.2. Etude des paramètres physicochimiques des enzymes libres et immobilisées

VI.2.1. Effet de la température sur l'α-amylase libre et immobilisée

L'effet de la température sur l'activité d'α-amylase libre et immobilisée a été étudié entre 30 et 100°C.

Résultats et discussions

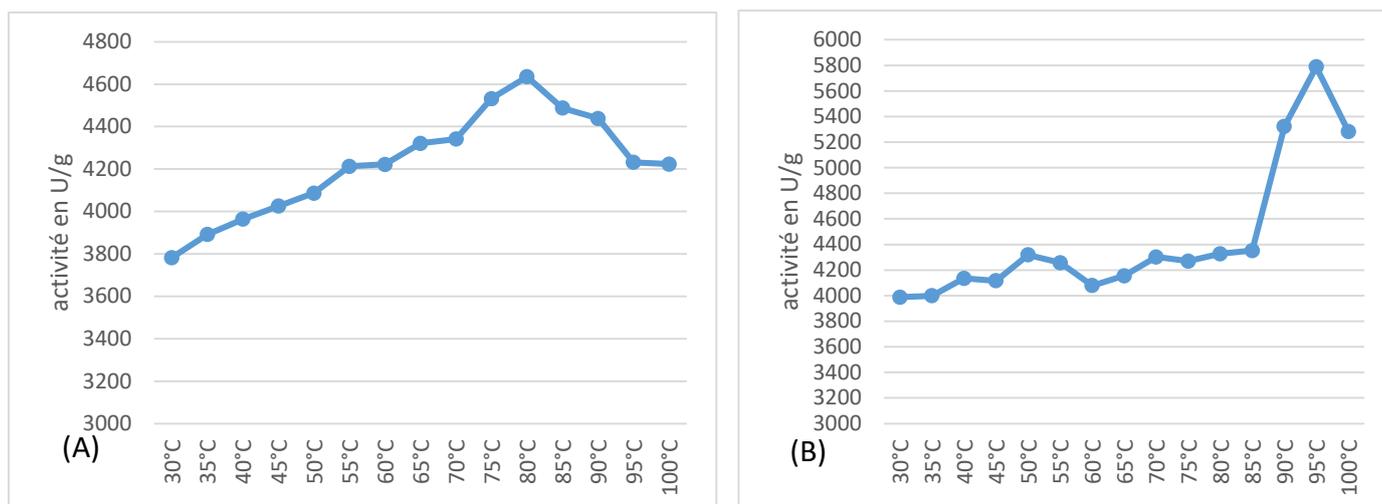


Figure 26 : Effet de la température sur l' α -amylase : (A) libre et (B) immobilisée.

D'après les résultats de la figure 26, nous remarquons que l' α -amylase libre et immobilisée également fortement dépendante de la température. L'activité de l' α -amylase libre et immobilisée, augmentent avec la température, l'enzyme libre est obtenue la température optimale de 80°C et 95°C pour l'enzyme immobilisée.

L'étude de **Almulaiky et al., (2021)** montre que la température optimale de l' α -amylase libre était de 50 °C et après immobilisation elle augmente à 60 °C.

Selon les résultats de **Frota et al., (2020)**, l'immobilisation n'est pas toujours efficace sur la température de l'activité enzymatique.

Par ailleurs d'autres études ont indiqué que l'activité de l'enzyme est fortement dépendante de la température. L' α -amylase libre donne une activité maximale à 50°C, la forme immobilisée (par l'alginate de calcium) a montré une activité optimale à 60°C (**Talekar & Chavare, 2012**).

Résultats et discussions

VI.2.2. Etude de la thermo-stabilité de l' α -amylase libre et immobilisée

La stabilité thermique de l'enzyme est étudiée après son incubation à différentes températures pendant 30-180 min dans le tampon à pH 7.0 pour et immobilisée.

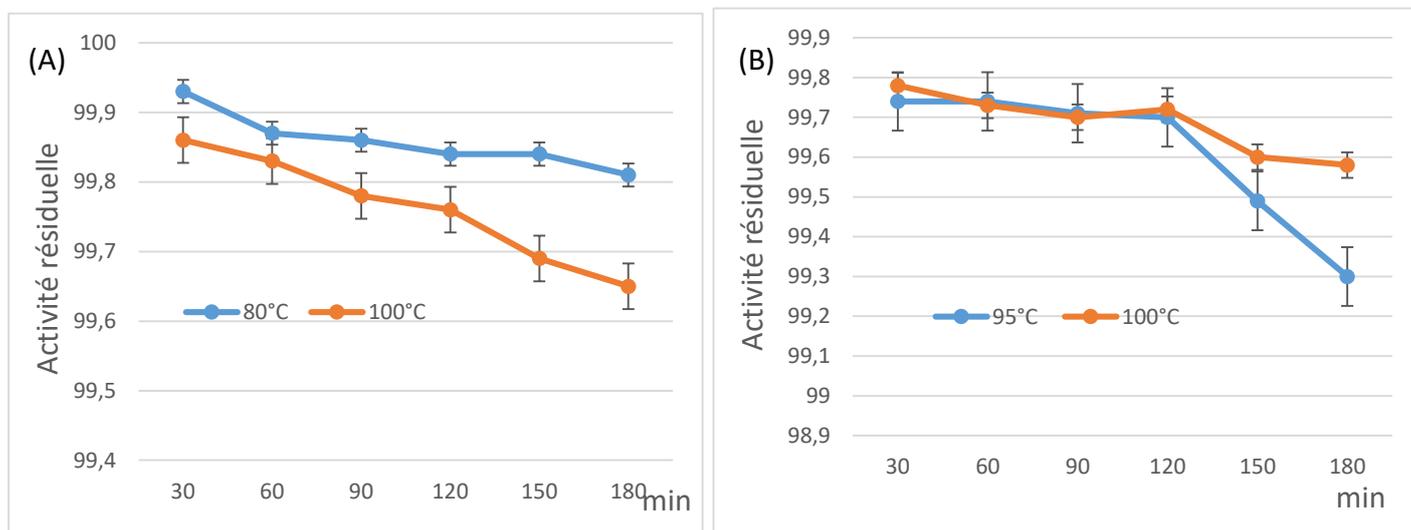


Figure 27 : Etude de la stabilité thermique de l' α -amylase : (A) libre et (B) immobilisée.

Les résultats de la figure 27 montre que :

L' α -amylase de *Candida sp* P3 conserve 99.8% et 99.65% de son activité initiale après 180min d'incubation 80°C et à 100°C respectivement.

Il est noté que la durée de la demi vie n'est pas atteinte après 3h d'incubation, un traitement thermique à 100°C pendant trois heures a provoqué une perte de 0.3% de l'activité initiale de l' α -amylase immobilisée, alors qu'à 95°C, elle conserve presque la totalité de son activité 99.65% après 180min d'incubation.

Nous remarquons :

Cette résistance de l' α -amylase à la dénaturation thermique est généralement observé chez les enzymes bactériennes et rarement chez les levures. Ceci peut être expliqué par le fait que l'enzyme n'est pas totalement purifiée, donc la présence des sels spécialement le calcium et certains composés comme le substrat dans le milieu maintient la stabilité de l'enzyme et augmente sa stabilité thermique.

VII Application de l' α -amylase dans les industries de textile

Dans l'industrie textile, les amylases jouent un rôle important dans le désencollage. L'efficacité de désencollage du l' α -amylase de *Candida sp* P3 a été prouvée lorsque des morceaux de tissu de coton blanc amidonné ont été traités avec l'enzyme amylase, ont pu éliminer avec succès l'amidon, ce qui est clairement visible sur la figure. Comparé au contrôle, au traitement à l'eau et traitement avec l'enzyme commerciale de *Aspergillus oryzae*. L'élimination de l'amidon par le traitement enzymatique (produite par *Candida sp*) était presque complète. Des études ont rapporté qu'une α -amylase extracellulaire a été produit par *Bacillus subtilis* marin avec des capacités de désencollage (Kalpana *et al.*, 2014), d'une souche mutante de *Bacillus amyloliquefaciens* (Haq *et al.*, 2010) et d'une souche non identifier P109 (Harisree . & Sarita G., 2020).

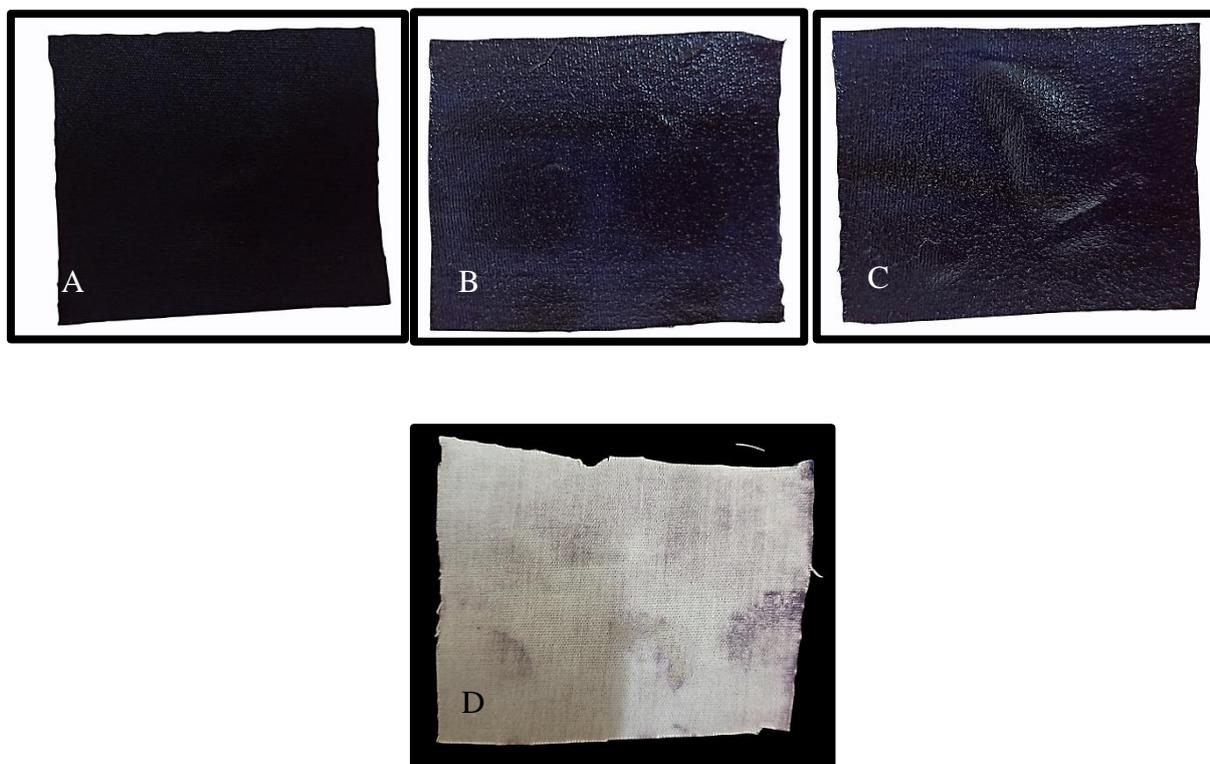


Figure 28 : Application de l' α -amylase de *Candida sp* dans le désencollage : (A) témoin , (B): témoin traité avec l'eau de robinet, (C) traité avec l' α -amylase commerciale de *A.oryzae*, (D) traité avec l' α -amylase de *Candida sp*.

Conclusion générale

Conclusion générale

Un lot des souches de levures isolées à partir de pelures de pomme de terre, miel, yaourt et grain de blé et conservées dans la mycothèque de laboratoire de GEA (UFMC1). La mise en évidence de l'activité α -amylasique a été effectuée sur YPSA pour déterminer et sélectionner des souches productrices d' α -amylase d'intérêt industriel. La P3 a été sélectionnée car, elle a montré la meilleure activité α -amylasique.

L'étude de caractères morphologiques et physiologiques par les galeries API 32C de la P3 indique qu'elle est une *Candida sp.*

Pour la production d' α -amylase, différents milieux de base aux déchets de banane (DPB) et pelures de pomme de terre (PPT) ont été testés sur les deux types de fermentation solide et liquide avec un taux d'ensemencement de 4.10^6 cellules/ml. Le DPB sur fermentation solide donne une production très élevée (1522.46 U/g) par rapport que l'autre milieu de base et au type de fermentation.

L'optimisation des paramètres physicochimiques de la production enzymatique est effectuée en erlenmeyers par la méthode de OFAT, elle permet de déterminer les conditions optimales de la production par fermentation solide (pH 0.7, température 37°C, glucose 1%, peptone 0.5%, inoculum 4.10^5 cellules/ml, temps d'incubation 48h et 60% d'humidité).

L'activité d' α -amylase obtenue dans les conditions optimales est 3963.96U/g. L'optimisation des conditions a permis de doubler la production enzymatique 1584.24 ± 359.12 U/g.

L'extrait enzymatique est purifié partiellement par le sulfate d'ammonium puis par dialyse, et par acétone, il s'observe que l'acétone est meilleur pour la précipitation de l'enzyme avec un taux de purification de 3.04 et un rendement de 13.09%. L'immobilisation de l' α -amylase sur billes d'alginate de calcium est effectuée à 3% est effectuée.

Ces résultats ouvrent d'autres perspectives tels que :

- ❖ Identification de la souche par les techniques de la biologie moléculaire.
- ❖ Purification de l'enzyme par d'autres méthodes électrophorétiques, chromatographique, gel de filtration, échangeuse d'ions, d'affinité, HPLC ...etc.
- ❖ Etudes protéomiques de l' α -amylase de *Candida sp* P3.

Les levures ne sont pas connues par leurs résistances de la température élevée, alors que certaines bactéries sont considérées comme thermorésistantes.

Conclusion générale

Des études montrées que la collaboration des bactéries et des levures dans le même milieu peut avoir pour conséquence un transfert de gène des bactéries vers les levures, justifiant aussi le comportement thermique industriel des enzymes des souches levuriennes étudiées, comparable à celui des amylases bactériennes (**Dakhmouche-Djekrif, 2016b**).

L'enzyme immobilisées : la température optimale de l'enzyme immobilisée a augmenté à 95°C par rapport à celle de l'enzyme libre (80°C). l' α -amylase libre ont montré une résistance remarquable à la température.

Comportement industriel vis-à-vis de la résistance thermique.

*Références
bibliographiques*

- Ademakinwa, A. N., Agunbiade, M. O., Ayinla, Z. A., & Agboola, F. K. (2019). Optimization of aqueous two-phase partitioning of *Aureobasidium pullulans* α -amylase via response surface methodology and investigation of its thermodynamic and kinetic properties. *International Journal of Biological Macromolecules*, 140, 833-841.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.08.159>
- Afzaljavan, F., & Mobini-Dehkordi, M. (2013). *Application of alpha-amylase in biotechnology*.
- Aiyer, P. D. (2004). Effect of C:N ratio on alpha amylase production by *Bacillus licheniformis* SPT 27. *African Journal of Biotechnology*, 3(10), 519-522.
<https://doi.org/10.4314/ajb.v3i10.15010>
- Ajita, sundarram, & P T Krishna, M. (2014). *α -Amylase Production and Applications : A Review*.
- Al-Harbi, S. A., & Almulaiky, Y. Q. (2020). Purification and biochemical characterization of Arabian balsam α -amylase and enhancing the retention and reusability via encapsulation onto calcium alginate/Fe₂O₃ nanocomposite beads. *International Journal of Biological Macromolecules*, 160, 944-952.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.05.176>
- Almanaa, T. N., Vijayaraghavan, P., Alharbi, N. S., Kadaikunnan, S., Khaled, J. M., & Alyahya, S. A. (2020). Solid state fermentation of amylase production from *Bacillus subtilis* D19 using agro-residues. *Journal of King Saud University - Science*, 32(2), 1555-1561. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2019.12.011>
- Almulaiky, Y. Q., Khalil, N. M., El-Shishtawy, R. M., Altalhi, T., Algamal, Y., Aldahri, M., Al-Harbi, S. A., Allehyani, E. S., Bilal, M., & Mohammed, M. M. (2021). Hydroxyapatite-decorated ZrO₂ for α -amylase immobilization : Toward the

- enhancement of enzyme stability and reusability. *International Journal of Biological Macromolecules*, 167, 299-308. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.11.150>
- Anto, H., Trivedi, U., & Patel, K. (2006). α -Amylase Production by *Bacillus cereus* MTCC 1305 Using Solid-State Fermentation. *Food Technology and Biotechnology*, 44(2), 241-245.
- Arunsasi, M., Kani, S. M., Jegadeesh, G., & Ravikumar, M. (2010). Submerged fermentation of amylase enzyme by *Aspergillus flavus* using *Cocos nucifera* meal. *Kathmandu University Journal of Science, Engineering and Technology*, 6(2), 75-87. <https://doi.org/10.3126/kuset.v6i2.4015>
- Ashkan, Z., Hemmati, R., Homaei, A., Dinari, A., Jamlidoost, M., & Tashakor, A. (2021). Immobilization of enzymes on nanoinorganic support materials : An update. *International Journal of Biological Macromolecules*, 168, 708-721. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.11.127>
- Avwioroko, O. J., Anigboro, A. A., Unachukwu, N. N., & Tonukari, N. J. (2018). Isolation, identification and in silico analysis of alpha-amylase gene of *Aspergillus niger* strain CSA35 obtained from cassava undergoing spoilage. *Biochemistry and Biophysics Reports*, 14, 35-42. <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2018.03.006>
- Baeza, M., Flores, O., Alcaíno, J., & Cifuentes, V. (2019). Yeast Thriving in Cold Terrestrial Habitats : Biodiversity and Industrial/Biotechnological Applications. In S. M. Tiquia-Arashiro & M. Grube (Éds.), *Fungi in Extreme Environments : Ecological Role and Biotechnological Significance* (p. 253-268). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-19030-9_13
- Baloch, K. A., Upaichit, A., & Cheirsilp, B. (2019). Use of low-cost substrates for cost-effective production of extracellular and cell-bound lipases by a newly isolated yeast

- Dipodascus capitatus A4C. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 19, 101102.
<https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101102>
- Barnett, J. A. (2004). A history of research on yeasts 8 : Taxonomy. *Yeast (Chichester, England)*, 21(14), 1141-1193. <https://doi.org/10.1002/yea.1154>
- Barnett, J. A., Payne, R. W., & Yarrow, D. (1990). *Yeasts : Characteristics and Identification* (\$ {number}nd édition). Cambridge University Press.
- Ben Atitallah, I., Antonopoulou, G., Ntaikou, I., Alexandropoulou, M., Nasri, M., Mechichi, T., & Lyberatos, G. (2019). On the evaluation of different saccharification schemes for enhanced bioethanol production from potato peels waste via a newly isolated yeast strain of *Wickerhamomyces anomalus*. *Bioresource Technology*, 289, 121614.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121614>
- Bennamoun Leila. (2017). *Isolement, sélection de souches levuriennes de sols arides sahariens Purification et caractérisation enzymatique* [Thèse doctorat]. Université Frères Mentouri-constantine1.
- Berber, N. (2017). *Caractérisation biomoléculaire et biotechnologique des souches de « Saccharomyces cerevisiae » issues des cépages Algériens* [Thèse doctorat]. UNIVERSITE ABDELHAMID IBN BADIS - MOSTAGANEM.
- Bharathiraja, B., Sridharan, S., Sowmya, V., Yuvaraj, D., & Praveenkumar, R. (2017). Microbial oil – A plausible alternate resource for food and fuel application. *Bioresource Technology*, 233, 423-432. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.03.006>
- Bhattacharya, S., Bhardwaj, S., Das, A., & Anand, S. (2011). Utilization of sugarcane bagasse for solid-state fermentation and characterization of α -amylase from *Aspergillus flavus* isolated from Muthupettai Mangrove, Tamil Nadu, India. *Undefined*.
<https://www.semanticscholar.org/paper/Utilization-of-sugarcane-bagasse-for-solid-state-of-Bhattacharya-Bhardwaj/74f5320db2f6c78e3ad2e267c990a3c953efa309>

- Bindu, V. U., & Mohanan, P. V. (2020). Thermal deactivation of α -amylase immobilized magnetic chitosan and its modified forms : A kinetic and thermodynamic study. *Carbohydrate Research*, 498, 108185. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2020.108185>
- Bonnet, B. C. (2012). *Valorisation de la banane Cavendish FWI, à différents stades physiologiques de récolte pour l'obtention par procédés de chimie verte de molécules d'intérêt biologique impliquées dans des activités anti-ulcères et cardiovasculaires* [Thèse doctorat]. Université des Antilles et de la Guyane.
- Bourgeois, C. M., Leveau, J. Y., & Association pour la promotion industrie-agriculture. (1991). *Techniques d'analyse et de contrôle dans les industries agro-alimentaires*. Lavoisier-Tec & Doc : Apria.
- Buzzini, P., & Martini, A. (2002). Extracellular enzymatic activity profiles in yeast and yeast-like strains isolated from tropical environments. *Journal of Applied Microbiology*, 93(6), 1020-1025. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2002.01783.x>
- Cai, Y.-D., & Chou, K.-C. (2005). Predicting Enzyme Subclass by Functional Domain Composition and Pseudo Amino Acid Composition. *Journal of Proteome Research*, 4(3), 967-971. <https://doi.org/10.1021/pr0500399>
- Carvalho, J. K., Panatta, A. A. S., Silveira, M. A. D., Tav, C., Johann, S., Rodrigues, M. L. F., & Martins, C. V. B. (2021). Yeasts isolated from a lotic continental environment in Brazil show potential to produce amylase, cellulase and protease. *Biotechnology Reports*, 30, e00630. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2021.e00630>
- Chapman, M., Mariano, K., & Macreadie, I. (2015). Lupin peptone as a replacement for animal-derived peptone in rich culture media for yeast. *Journal of Microbiological Methods*, 109, 39-40. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2014.12.005>
- Chi, Z., Chi, Z., Zhang, T., Liu, G., Li, J., & Wang, X. (2009a). Production, characterization and gene cloning of the extracellular enzymes from the marine-derived yeasts and

their potential applications. *Biotechnology Advances*, 27(3), 236-255.

<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2009.01.002>

Chi, Z., Chi, Z., Zhang, T., Liu, G., Li, J., & Wang, X. (2009b). Production, characterization and gene cloning of the extracellular enzymes from the marine-derived yeasts and their potential applications. *Biotechnology Advances*, 27(3), 236-255.

<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2009.01.002>

Concu, R., D. S. Cordeiro, M. Natália., Munteanu, C. R., & González-Díaz, H. (2019). PTML Model of Enzyme Subclasses for Mining the Proteome of Biofuel Producing Microorganisms. *Journal of Proteome Research*, 18(7), 2735-2746.

<https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.8b00949>

Cripwell, R. A., van Zyl, W. H., & Viljoen-Bloom, M. (2020). Fungal Biotechnology : Fungal Amylases and Their Applications. In *Reference Module in Life Sciences*. Elsevier.

<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.21082-0>

Dakhmouche-Djekrif, S. (2016a). *Production et caractérisation de l'amylopullulanase de la levure Clavispora lusitaniae ABS7 isolée de blé cultivé et stocké en zones arides*.

<https://bibliotheque.utc.fr/EXPLOITATION/doc/IFD/2016COMP2258/production-et-caracterisation-de-l-amylopullulanase-de-la-levure-clavispora-lusitaniae-abs7-isolee-d>

Dakhmouche-Djekrif, S. (2016b). *Production et caractérisation de l'amylopullulanase de la levure Clavispora lusitaniae ABS7 isolée de blé cultivé et stocké en zones arides* [Thèse doctorat]. Université de Technologie de Compiègne.

Dali, N. S. :, & Hamame, A. (2016). *Recherche de levures productrices d'enzymes glycolytiques exocellulaires thermostables : Production (sur boîte de Pétri et en batch) et Caractérisation des enzymes produites*. [Mémoire Master]. Université Frères Mentouri-constantine1.

Référence bibliographiques

- Daskaya Dikmen, C., Karbancioglu-Guler, F., & Ozcelik, B. (2018). Cold active pectinase, amylase and protease production by yeast isolates obtained from environmental samples. *Extremophiles*, 22. <https://doi.org/10.1007/s00792-018-1020-0>
- de Barros, M. C., do Nascimento Silva, R., Ramada, M. H. S., Galdino, A. S., de Moraes, L. M. P., Torres, F. A. G., & Ulhoa, C. J. (2009). The influence of N-glycosylation on biochemical properties of Amy1, an α -amylase from the yeast *Cryptococcus flavus*. *Carbohydrate Research*, 344(13), 1682-1686. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2009.06.006>
- de Oliveira, R. L., da Silva, O. S., Converti, A., & Porto, T. S. (2018). Thermodynamic and kinetic studies on pectinase extracted from *Aspergillus aculeatus* : Free and immobilized enzyme entrapped in alginate beads. *International Journal of Biological Macromolecules*, 115, 1088-1093. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.04.154>
- de Souza, P. M., & de Oliveira Magalhães, P. (2010). Application of microbial α -amylase in industry – A review. *Brazilian Journal of Microbiology*, 41(4), 850-861. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822010000400004>
- Dey, G., Bhupinder, S., & Banerjee, R. (2003). Immobilization of alpha-amylase produced by *Bacillus circulans* GRS 313. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 46, 167-176. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132003000200005>
- Duarte, A. W. F., Bonugli-Santos, R. C., Ferrarezi Duarte, A. L., Gomes, E., & Sette, L. D. (2021). Statistical experimental design applied to extracellular lipase production by the marine Antarctic yeast *Leucosporidium scottii* CRM 728. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 32, 101954. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2021.101954>
- Ejaz, U., Ahmed, A., & Sohail, M. (2018). Statistical optimization of immobilization of yeast cells on corn cob for pectinase production. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 14, 450-456. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2018.04.011>

- El Barnossi, A., Moussaid, F., & Iraqi Housseini, A. (2021). Tangerine, banana and pomegranate peels valorisation for sustainable environment : A review. *Biotechnology Reports*, 29, e00574. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2020.e00574>
- El-Shishtawy, R. M., Aldahri, M., & Almulaiky, Y. Q. (2020). Dual immobilization of α -amylase and horseradish peroxidase via electrospinning : A proof of concept study. *International Journal of Biological Macromolecules*, 163, 1353-1360. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.07.278>
- Ertan, F., Yagar, H., & Balkan, B. (2007). Optimization of α -Amylase Immobilization in Calcium Alginate Beads. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 37(3), 195-204. <https://doi.org/10.1080/10826060701386679>
- Essien, J. P., Akpan, E. J., & Essien, E. P. (2005). Studies on mould growth and biomass production using waste banana peel. *Bioresource Technology*, 96(13), 1451-1456. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2004.12.004>
- Ezzeddine Boutrif. (2007). *Les bonnes pratiques d'hygiène dans la préparation et la vente des aliments de rue en Afrique*. <http://www.fao.org/3/a0740f/a0740f00.htm>
- Ferreira, A., Cahú, T., Xu, J., Blennow, A., & Bezerra, R. (2021). A highly stable raw starch digesting α -amylase from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) viscera. *Food Chemistry*, 354, 129513. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129513>
- Fincan, S. A., Özdemir, S., Karakaya, A., Enez, B., Mustafafov, S. D., Ulutaş, M. S., & Şen, F. (2021). Purification and characterization of thermostable α -amylase produced from *Bacillus licheniformis* So-B3 and its potential in hydrolyzing raw starch. *Life Sciences*, 264, 118639. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.118639>
- Frota, E. G., Sartor, K. B., Biduski, B., Margarites, A. C. F., Colla, L. M., & Piccin, J. S. (2020). Co-immobilization of amylases in porous crosslinked gelatin matrices by

- different reticulations approaches. *International Journal of Biological Macromolecules*, 165, 1002-1009. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.09.220>
- Gaenssle, A. L. O., van der Maarel, M. J. E. C., & Jurak, E. (2020). Reliability factor for identification of amylolytic enzyme activity in the optimized starch-iodine assay. *Analytical Biochemistry*, 597, 113696. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2020.113696>
- Gali, K. K., Soundararajan, N., Katiyar, V., & Sivaprakasam, S. (2021). Electrospun chitosan coated polylactic acid nanofiber : A novel immobilization matrix for α – amylase and its application in hydrolysis of cassava fibrous waste. *Journal of Materials Research and Technology*. <https://doi.org/10.1016/j.jmrt.2021.05.001>
- Gangadharan, D., Sivaramakrishnan, S., Nampoothiri, K. M., Sukumaran, R. K., & Pandey, A. (2008). Response surface methodology for the optimization of alpha amylase production by *Bacillus amyloliquefaciens*. *Bioresource Technology*, 99(11), 4597-4602. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.07.028>
- Guerfali, M., Ayadi, I., Mohamed, N., Ayadi, W., Belghith, H., Bronze, M. R., Ribeiro, M. H. L., & Gargouri, A. (2019). Triacylglycerols accumulation and glycolipids secretion by the oleaginous yeast *Rhodotorula babjevae* Y-SL7 : Structural identification and biotechnological applications. *Bioresource Technology*, 273, 326-334. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.11.036>
- Gupta, R., Gigras, P., Mohapatra, H., Goswami, V. K., & Chauhan, B. (2003). Microbial α -amylases : A biotechnological perspective. *Process Biochemistry*, 38(11), 1599-1616. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(03\)00053-0](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(03)00053-0)
- Haghighatpanah, N., Khodaiyan, F., Kennedy, J. F., & Hosseini, S. S. (2021). Optimization and characterization of pullulan obtained from corn bran hydrolysates by *Aerobasidiom pullulan* KY767024. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 33, 101959. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2021.101959>

- Han, S., Kim, G.-Y., & Han, J.-I. (2019). Biodiesel production from oleaginous yeast, *Cryptococcus* sp. By using banana peel as carbon source. *Energy Reports*, 5, 1077-1081. <https://doi.org/10.1016/j.egy.2019.07.012>
- Haq, I., Ali, S., Javed, M., Hameed, U., Saleem, A., Adnan, F., & Qadeer, M. (2010). Production of alpha amylase from a randomly induced mutant strain of *Bacillus Amyloliquefaciens* and its application as a desizer in textile industry. *Pak. J. Bot*, 42, 473-484.
- Harisree P., N., & Sarita G., B. (2020). Arabian Sea metagenome derived— α -amylase P109 and its potential applications. *Ecological Genetics and Genomics*, 16, 100060. <https://doi.org/10.1016/j.egg.2020.100060>
- Hencke, S. (2000). *Utilisation alimentaire des levures* (p. non renseigné) [Other, UHP - Université Henri Poincaré]. <https://hal.univ-lorraine.fr/hal-01733295>
- Homa, T., Mohammad, T., & Mohammad, S. (2014). Immobilization of thermostable α -amylase from *Bacillus licheniformis* by cross-linked enzyme aggregates method using calcium and sodium ions as additives. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 108, 13-20. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2014.06.005>
- Janičková, Z., & Janeček, Š. (2020). Fungal α -amylases from three GH13 subfamilies : Their sequence-structural features and evolutionary relationships. *International Journal of Biological Macromolecules*, 159, 763-772. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.05.069>
- Jiang, H., Xue, S.-J., Li, Y.-F., Liu, G.-L., Chi, Z.-M., Hu, Z., & Chi, Z. (2018). Efficient transformation of sucrose into high pullulan concentrations by *Aureobasidium melanogenum* TN1-2 isolated from a natural honey. *Food Chemistry*, 257, 29-35. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.03.003>

Référence bibliographiques

- Jin, B., van Leeuwen, H. J., Patel, B., & Yu, Q. (1998). Utilisation of starch processing wastewater for production of microbial biomass protein and fungal α -amylase by *Aspergillus oryzae*. *Bioresource Technology*, *66*(3), 201-206.
[https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(98\)00060-1](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(98)00060-1)
- Kalia, S., Bhattacharya, A., Prajapati, S. K., & Malik, A. (2021). Utilization of starch effluent from a textile industry as a fungal growth supplement for enhanced α -amylase production for industrial application. *Chemosphere*, *279*, 130554.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.130554>
- Kalpana, B. J., Sindhulakshmi, M., & Pandian, S. K. (2014). Amylase enzyme from *Bacillus subtilis* S8-18 : A potential desizing agent from the marine environment. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, *61*(2), 134-144.
<https://doi.org/10.1002/bab.1122>
- Kannan, T. R., & Kanagaraj, C. (2019). Molecular characteristic of α -AMYLASE enzymes producing from *Bacillus licheniformis* (JQ946317) using solid state fermentation. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, *20*, 101240.
<https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101240>
- Karim, A., Gerliani, N., & Aïder, M. (2020a). *Kluyveromyces marxianus* : An emerging yeast cell factory for applications in food and biotechnology. *International Journal of Food Microbiology*, *333*, 108818. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108818>
- Karim, A., Gerliani, N., & Aïder, M. (2020b). *Kluyveromyces marxianus* : An emerging yeast cell factory for applications in food and biotechnology. *International Journal of Food Microbiology*, *333*, 108818. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108818>
- Kerényiová, L., & Janeček, Š. (2020). A detailed in silico analysis of the amylolytic family GH126 and its possible relatedness to family GH76. *Carbohydrate Research*, *494*, 108082. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2020.108082>

- Kieliszek, M., Kot, A. M., Bzducha-Wróbel, A., BŁażejka, S., Gientka, I., & Kurcz, A. (2017). Biotechnological use of *Candida* yeasts in the food industry : A review. *Fungal Biology Reviews*, 31(4), 185-198. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2017.06.001>
- Kim, J. (2010). Isolation of Protease-producing Yeast, *Pichia farinosa* CO-2 and Characterization of Its Extracellular Enzyme. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*, 53. <https://doi.org/10.3839/jksabc.2010.023>
- Kizhakedathil, M. P. J., & C, S. D. (2021). Acid stable α -amylase from *Pseudomonas balearica* VITPS19—Production, purification and characterization. *Biotechnology Reports*, 30, e00603. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2021.e00603>
- Knob, A., Izidoro, S. C., Lacerda, L. T., Rodrigues, A., & de Lima, V. A. (2020). A novel lipolytic yeast *Meyerozyma guilliermondii* : Efficient and low-cost production of acid and promising feed lipase using cheese whey. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 24, 101565. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101565>
- Kurtzman, C. P., Fell, J. W., & Boekhout, T. (2011). Chapter 1—Definition, Classification and Nomenclature of the Yeasts. In C. P. Kurtzman, J. W. Fell, & T. Boekhout (Éds.), *The Yeasts (Fifth Edition)* (p. 3-5). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-52149-1.00001-X>
- Laiche, A. touhami. (2019). *Production d'enzymes amylolytiques chez des souches levuriennes isolées à partir de deux origines (sol saharien et blé) et cultivées sur milieu à base de lactosérum* [Thèse doctorat]. Université Kasdi Merbah.
- Lario, L. D., Pillaca-Pullo, O. S., Durães Sette, L., Converti, A., Casati, P., Spampinato, C., & Pessoa, A. (2020). Optimization of protease production and sequence analysis of the purified enzyme from the cold adapted yeast *Rhodotorula mucilaginosa* CBMAI 1528. *Biotechnology Reports*, 28, e00546. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2020.e00546>

- Li, X., Yang, J., Zhu, S., Li, Y., Chen, W., & Hu, Z. (2020). Insight into the combinatorial transcriptional regulation on α -amylase gene in animal groups with different dietary nutrient content. *Genomics*, *112*(1), 520-527.
<https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2019.04.004>
- Lima, C. B. de, Coelho, L. F., Blanco, K. C., & Contiero, J. (2009). Response surface optimization of D(-)-lactic acid production by *Lactobacillus* SMI8 using corn steep liquor and yeast autolysate as an alternative nitrogen source. *African Journal of Biotechnology*, *8*(21), Article 21. <https://doi.org/10.4314/ajb.v8i21.66061>
- Lin, L.-L., Ma, Y.-J., Chien, H. R., & Hsu, W.-H. (1998). Construction of an amylolytic yeast by multiple integration of the *Aspergillus awamori* glucoamylase gene into a *Saccharomyces cerevisiae* chromosome. *Enzyme and Microbial Technology*, *23*(6), 360-365. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(98\)00058-1](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(98)00058-1)
- Martínez, J. L., Meza, E., Petranovic, D., & Nielsen, J. (2016). The impact of respiration and oxidative stress response on recombinant α -amylase production by *Saccharomyces cerevisiae*. *Metabolic Engineering Communications*, *3*, 205-210.
<https://doi.org/10.1016/j.meteno.2016.06.003>
- Melnichuk, N., Braia, M. J., Anselmi, P. A., Meini, M.-R., & Romanini, D. (2020). Valorization of two agroindustrial wastes to produce alpha-amylase enzyme from *Aspergillus oryzae* by solid-state fermentation. *Waste Management*, *106*, 155-161.
<https://doi.org/10.1016/j.wasman.2020.03.025>
- Mishra, S., & Behera, N. (2008). Amylase activity of a starch degrading bacteria isolated from soil receiving kitchen wastes. *African Journal of Biotechnology*, *7*(18), Article 18. <https://doi.org/10.4314/ajb.v7i18.59317>
- Mizutani, K., Toyoda, M., Otake, Y., Yoshioka, S., Takahashi, N., & Mikami, B. (2012). Structural and functional characterization of recombinant medaka fish alpha-amylase

Référence bibliographiques

- expressed in yeast *Pichia pastoris*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1824(8), 954-962. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2012.05.005>
- Msarah, M. J., Ibrahim, I., Hamid, A. A., & Aqma, W. S. (2020). Optimisation and production of alpha amylase from thermophilic *Bacillus* spp. And its application in food waste biodegradation. *Heliyon*, 6(6), e04183. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e04183>
- Mulko, L., Pereyra, J. Y., Rivarola, C. R., Barbero, C. A., & Acevedo, D. F. (2019). Improving the retention and reusability of Alpha-amylase by immobilization in nanoporous polyacrylamide-graphene oxide nanocomposites. *International Journal of Biological Macromolecules*, 122, 1253-1261. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.09.078>
- Nair, H. P., & Bhat, S. G. (2020). Arabian Sea metagenome derived— α -amylase P109 and its potential applications. *Ecological Genetics and Genomics*, 16, 100060. <https://doi.org/10.1016/j.egg.2020.100060>
- Nandy, S. (2016). Bioprocess Technology Governs Enzyme Use and Production in Industrial Biotechnology : An Overview. *Enzyme Engineering*, 05. <https://doi.org/10.4172/2329-6674.1000144>
- Naumova, E., Shalamitskiy, M., & Naumov, G. (2019). Molecular Polymorphism of Pectinase Genes PGU of *Saccharomyces bayanus* var. *Uvarum* Yeast. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 55, 882-887. <https://doi.org/10.1134/S0003683819090059>
- Nielsen, P. K., Bønsager, B. C., Fukuda, K., & Svensson, B. (2004). Barley α -amylase/subtilisin inhibitor : Structure, biophysics and protein engineering. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1696(2), 157-164. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2003.09.019>

- Nouadri, tahar. (2011). *L' α -amylase de Penicillium camemberti PL21: Production, Purification, Caractérisation et Immobilisation* [Thèse doctorat]. Université Frères Mentouri-constantine1.
- Novotný, Č., Doležalová, L., Musil, P., & Novák, M. (1988). The production of lipases by some *Candida* and *Yarrowia* yeasts. *Journal of Basic Microbiology*, 28(4), 221-227.
<https://doi.org/10.1002/jobm.3620280403>
- Park, C. S., Chang, C. C., Kim, J.-Y., Ogrydziak, D. M., & Ryu, D. D. Y. (1997). Expression, Secretion, and Processing of Rice α -Amylase in the Yeast *Yarrowia lipolytica**. *Journal of Biological Chemistry*, 272(11), 6876-6881.
<https://doi.org/10.1074/jbc.272.11.6876>
- Péter, G., Takashima, M., & Čadež, N. (2017). Yeast Habitats : Different but Global. In P. Buzzini, M.-A. Lachance, & A. Yurkov (Éds.), *Yeasts in Natural Ecosystems : Ecology* (p. 39-71). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-61575-2_2
- Petreaca, R. C. (2013). Yeast Genetics. In S. Maloy & K. Hughes (Éds.), *Brenner's Encyclopedia of Genetics (Second Edition)* (p. 385-387). Academic Press.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374984-0.01663-6>
- Pinto, É. S. M., Dorn, M., & Feltes, B. C. (2020). The tale of a versatile enzyme : Alpha-amylase evolution, structure, and potential biotechnological applications for the bioremediation of n-alkanes. *Chemosphere*, 250, 126202.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.126202>
- Porfirif, M. C., Milatich, E. J., Farruggia, B. M., & Romanini, D. (2016). Production of alpha-amylase from *Aspergillus oryzae* for several industrial applications in a single step. *Journal of Chromatography B*, 1022, 87-92.
<https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2016.04.015>

- Prajapati, V. S., Trivedi, U. B., & Patel, K. C. (2015). A statistical approach for the production of thermostable and alklophilic alpha-amylase from *Bacillus amyloliquefaciens* KCP2 under solid-state fermentation. *3 Biotech*, 5(2), 211-220. <https://doi.org/10.1007/s13205-014-0213-1>
- Priyadarshini, S., Pradhan, S. K., & Ray, P. (2020). Production, characterization and application of thermostable, alkaline α -amylase (AA11) from *Bacillus cereus* strain SP-CH11 isolated from Chilika Lake. *International Journal of Biological Macromolecules*, 145, 804-812. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.11.149>
- Qadir, F., Ejaz, U., & Sohail, M. (2020). Co-culturing corncob-immobilized yeasts on orange peels for the production of pectinase. *Biotechnology Letters*, 42. <https://doi.org/10.1007/s10529-020-02897-y>
- Qadir, F., Shariq, M., Ahmed, A., & Sohail, M. (2018). Evaluation of a yeast co-culture for cellulase and xylanase production under solid state fermentation of sugarcane bagasse using multivariate approach. *Industrial Crops and Products*, 123, 407-415. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.07.021>
- Rai, A. K., Pandey, A., & Sahoo, D. (2019). Biotechnological potential of yeasts in functional food industry. *Trends in Food Science & Technology*, 83, 129-137. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.11.016>
- Rane, A. S., Joshi, R. S., & Giri, A. P. (2020). Molecular determinant for specificity : Differential interaction of α -amylases with their proteinaceous inhibitors. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1864(12), 129703. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2020.129703>
- Rashmi, R., Barsha, S., Bikash, C. B., & Biswa. (2020). Process optimization for conversion of Waste Banana peels to biobutanol by A yeast Co-Culture fermentation system. *Renewable Energy*, 162, 478-488. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2020.08.045>

- Ray, R. C., Kar, S., Nayak, S., & Swain, M. R. (2008). Extracellular α -Amylase Production by *Bacillus brevis* MTCC 7521. *Food Biotechnology*, 22(3), 234-246.
<https://doi.org/10.1080/08905430802262558>
- Risandi, A., Fuady, R., Sukmawati, D., Husna, S., Nurjayadi, M., El Enshasy, H., & Ridawati, R. (2019). *Isolation and screening of amylolytic yeast from Paphiopedilum sp., originating from Bedugul Botanical Garden, Bali, Indonesia Isolation and screening of amylolytic yeast from Paphiopedilum sp., originating from Bedugul Botanical Garden, Bali, Indonesia*. <https://doi.org/10.1088/1742-6596/1402/3/033060>
- Roth, C., Moroz, O. V., Turkenburg, J. P., Blagova, E., Waterman, J., Ariza, A., Ming, L., Tianqi, S., Andersen, C., Davies, G. J., & Wilson, K. S. (2019). Structural and Functional Characterization of Three Novel Fungal Amylases with Enhanced Stability and pH Tolerance. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(19), 4902.
<https://doi.org/10.3390/ijms20194902>
- Roy, J. K., Rai, S. K., & Mukherjee, A. K. (2012). Characterization and application of a detergent-stable alkaline α -amylase from *Bacillus subtilis* strain AS-S01a. *International Journal of Biological Macromolecules*, 50(1), 219-229.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2011.10.026>
- Saad, W. F., Othman, A. M., Abdel-Fattah, M., & Ahmad, M. S. (2021). Response surface methodology as an approach for optimization of α -amylase production by the new isolated thermotolerant *Bacillus licheniformis* WF67 strain in submerged fermentation. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 32, 101944.
<https://doi.org/10.1016/j.bcab.2021.101944>
- Sadeghian Motahar, S. F., Ariaeenejad, S., Salami, M., Emam-Djomeh, Z., & Sheykh Abdollahzadeh Mamaghani, A. (2021). Improving the quality of gluten-free bread by

Référence bibliographiques

- a novel acidic thermostable α -amylase from metagenomics data. *Food Chemistry*, 352, 129307. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129307>
- Sanchez, A. C., Ravanal, M. C., Andrews, B. A., & Asenjo, J. A. (2019). Heterologous expression and biochemical characterization of a novel cold-active α -amylase from the Antarctic bacteria *Pseudoalteromonas* sp. 2-3. *Protein Expression and Purification*, 155, 78-85. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2018.11.009>
- Saravanakumar, K., Wang, S., Dou, K., Lu, Z., & Chen, J. (2018). Yeast two-hybrid and label-free proteomics based screening of maize root receptor to cellulase of *Trichoderma harzianum*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 104, 86-94. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2018.10.002>
- Serin, B., & Akcan, N. (2017). Solid State Fermentation for Cultural Conditions Optimization and Production of α -Amylase from *Bacillus licheniformis* ATCC 12759. *Hacettepe Journal of Biology and Chemistry*, 4, 593-602. <https://doi.org/10.15671/HJBC.2018.202>
- Shofiyah, S. S., Yuliani, D., Widya, N., Sarian, F. D., Puspasari, F., Radjasa, O. K., Ihsanawati, & Natalia, D. (2020). Isolation, expression, and characterization of raw starch degrading α -amylase from a marine lake *Bacillus megaterium* NL3. *Heliyon*, 6(12), e05796. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e05796>
- Sodhi, H. K., Sharma, K., Gupta, J. K., & Soni, S. K. (2005). Production of a thermostable α -amylase from *Bacillus* sp. PS-7 by solid state fermentation and its synergistic use in the hydrolysis of malt starch for alcohol production. *Process Biochemistry*, 40(2), 525-534. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2003.10.008>
- Spencer, J. F. T., & Spencer, D. M. (1996). Maintenance and Culture of Yeasts. In I. H. Evans (Éd.), *Yeast Protocols : Methods in Cell and Molecular Biology* (p. 5-15). Humana Press. <https://doi.org/10.1385/0-89603-319-8:5>

- Sukmawati, D., Arman, Z., Sondana, G., Fikriyah, N., Hasanah, R., Nur Afifah, Z., Balqis, M., El Enshasy, H., Husna, S., Kurniati, T., & Puspitaningrum, R. (2019). Potential amylase-producing yeast isolated from indigenous fermented beverages originating from Bali, Indonesia Potential amylase-producing yeast isolated from indigenous fermented beverages originating from Bali, Indonesia. *Journal of Physics Conference Series*, *14*, 1-8.
- Talekar, S., & Chavare, S. (2012). Optimization of immobilization of α -amylase in alginate gel and its comparative biochemical studies with free α -amylase. *Undefined*.
<https://www.semanticscholar.org/paper/Optimization-of-immobilization-of-%CE%B1-amylase-in-gel-Talekar-Chavare/74ed71151912dd8c5b050ce47a8c84bab29ed7ac>
- Taskin, M. (2012). Co-production of tannase and pectinase by free and immobilized cells of the yeast *Rhodotorula glutinis* MP-10 isolated from tannin-rich persimmon (*Diospyros kaki* L.) fruits. *Bioprocess and biosystems engineering*, *36*.
<https://doi.org/10.1007/s00449-012-0771-8>
- Thongekkaew, J., Ikeda, H., Masaki, K., & Iefuji, H. (2008). An acidic and thermostable carboxymethyl cellulase from the yeast *Cryptococcus* sp. S-2 : Purification, characterization and improvement of its recombinant enzyme production by high cell-density fermentation of *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification*, *60*(2), 140-146. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2008.03.021>
- Thuriaux, P., & Goffeau, A. (2004). *Les organismes modèles : La levure*. Belin.
- Toumi, salima. (2018). *Isolement et caractérisation des souches levuriennes productrices d'amylase à partir de sol saharien Algérien et cultivée sur un milieu à base de lactosérum* [Thèse doctorat]. Université de Sidi Bel Abbès.

- Vaseekaran, S., Balakumar, S., & Arasaratnam, V. (2011). Isolation and Identification of a Bacterial Strain Producing Thermostable α - Amylase. *Tropical Agricultural Research*, 22(1), 1-11. <https://doi.org/10.4038/tar.v22i1.2603>
- Vu, H. T., Scarlett, C. J., & Vuong, Q. V. (2018). Phenolic compounds within banana peel and their potential uses : A review. *Journal of Functional Foods*, 40, 238-248. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.11.006>
- Walker, G. M. (2009). Yeasts. *Desk Encyclopedia of Microbiology*, 1174-1187.
- Wanderley, K. J., Torres, F. A. G., Moraes, L. M. P., & Ulhoa, C. J. (2004). Biochemical characterization of α -amylase from the yeast *Cryptococcus flavus*. *FEMS Microbiology Letters*, 231(2), 165-169. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(03\)00955-8](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(03)00955-8)
- Wang, Y., Hu, H., Ma, J., Yan, Q., Liu, H., & Jiang, Z. (2020). A novel high maltose-forming α -amylase from *Rhizomucor miehei* and its application in the food industry. *Food Chemistry*, 305, 125447. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125447>
- Wang, Y., Zhao, N., Ma, J., Liu, J., Yan, Q., & Jiang, Z. (2019). High-level expression of a novel α -amylase from *Thermomyces dupontii* in *Pichia pastoris* and its application in maltose syrup production. *International Journal of Biological Macromolecules*, 127, 683-692. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.01.162>
- Wulandari, T., Handayani, T., & Sukmawati, D. (2017). *Isolation And Screening Amylolytic Yeast fom Jackfruit (Artocarpus heterophyllus Lam.)*.
- Xie, F., Quan, S., Liu, D., Ma, H., Li, F., Zhou, F., & Chen, G. (2014). Purification and characterization of a novel α -amylase from a newly isolated *Bacillus methylotrophicus* strain P11-2. *Process Biochemistry*, 49(1), 47-53. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2013.09.025>

Référence bibliographiques

Yan, S., Xiangsong, C., & Xiang, X. (2019). Improvement of the aroma of lily rice wine by using aroma-producing yeast strain *Wickerhamomyces anomalus* HN006. *AMB Express*, 9(1), 89. <https://doi.org/10.1186/s13568-019-0811-8>

Express, 9(1), 89. <https://doi.org/10.1186/s13568-019-0811-8>

Zhang, Q., Han, Y., & Xiao, H. (2017). Microbial α -amylase : A biomolecular overview.

Process Biochemistry, 53, 88-101. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2016.11.012>

Zheng, T., Li, J., & Liu, C. (2021). Improvement of α -amylase to the metabolism adaptations of

soil bacteria against PFOS exposure. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 208,

111770. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111770>

Annexes

Composition des milieux de cultures :

Selon (**Spencer & Spencer, 1996**) :

YPGA : (Yeast extract, Peptone, Glucose, Agar).

-Extrait de levure :10 g/l

-Peptone :10 g / l

-Glucose :20 g / l

-Agar :20 g / l

Stérilisation à 121 °C pendant 20 min.

PDA (Potato, Dextrose, Agar)

-Amidon de pomme de terre 4 g

-Glucose 20 g

-Agar 20g

YPSA : (Yeast extract, Peptone, Strach, Agar).

-Extrait de levure :5g/l.

-Peptone :10g/l.

-Amidon :20g/l.

-Agar :20g/l.

TPA :

-Peptone :10g/l.

-Nacl :5g/l.

-CaCl₂ :2H₂O :0.1g/l.

-Agar :20g/l.

-Tween80 :10ml.

YPPA : (Yeast extract, Peptone, Pectine, Agar)

-extrait de levure :5g/l.

-Peptone :10g/l.

-Pectine :10g/l.

-Agar :20g/l.

YPCA :

-Extrait de levure :5g/l.

-Peptone :10g/l.

-cellulose :10g/l.

-Agar :20g/l.

Gélose caséinée : 20g Agar+ 20g lait stérile.

Solutions de révélation des activités enzymatique :

Lugole1 : 1% de I₂ + 2% de KI.

Lugole2 : 1g I₂ + 5g KI dans 330ml.

Na cl : 58.44g de Na cl dans 1L de l'eau distillée.

Rouge congo : 1% d'eau distillée.

-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.

Détermination de la matière sèche (AFNOR 1986)

La matière sèche est déterminée sur un échantillon de 10 ml de lactosérum par évaporation à une température 105 °C jusqu'à poids constant à 0.1%.

Etudiants :

- Ghomrani Said Djamel Eddine.
- Boukerrou Fatima Zohra Sara.

Date de soutenance : 22 / 09 / 2021.**Résumé :**

Le présent travail s'inscrit dans le cadre de la production d'une α -amylase levurienne avec des nouvelles propriétés. 24 souches isolées préalablement ont été utilisées pour l'étude de la production α -amylasique. La mise en évidence de l'activité de l'amylase a montré que 15 de ces souches sont des levures amylolytiques. Le screening par la mesure de la zone d'hydrolyse formée sur la surface du milieu de culture YPSA a permis la sélection de la souche la plus performante P3 car elle est hautement productrice de l' α -amylase. L'étude des caractères morphologiques et physiologiques indiquent que la souche P3, appartient au genre *Candida*. La production d' α -amylase a été réalisée en présence de différents résidus agroalimentaires tels que les pelures de pomme de terre (PPT) et les déchets de peau de banane (DPB) en fermentation liquide et solide. Les résultats indiquent que la meilleure production α -amylasique de 1522.46 ± 359.12 U/g est obtenue par fermentation en milieu solide à base de DBP. Afin d'améliorer la production enzymatique, la méthode d'OFAT a permis d'optimiser les conditions de la fermentation à savoir : température 37°C , pH 0.7, temps d'incubation 48h, glucose 1%, peptone 0.5%, humidité 60%, densité d'inoculum 4.10^5 cellules/ml. Dans ces conditions optimales, nous avons constaté que la production enzymatique a pratiquement doublé (3963.96 U/g) par rapport à la production non optimisée (1522.46 ± 359.12 U/g). L'extrait enzymatique est purifié partiellement par le sulfate d'ammonium puis par dialyse, et par acétone. Il s'est avéré que l'acétone est meilleure pour la précipitation de l'enzyme avec un taux de purification de 3.04 et un rendement de 13.09%. L'immobilisation de l' α -amylase sur billes d'alginate de calcium est effectuée à 3% de d'alginate de calcium avec un rendement acceptable de 55.37%. L' α -amylase immobilisée dans les billes d'alginate peut être réutilisée jusqu'à 03 cycles, elle maintient presque la totalité (99.63 %) de son activité initiale. L' α -amylase libre et immobilisée sont fortement dépendantes de la température, la température optimale de l'enzyme libre est de 80°C et celle de l'enzyme immobilisée est de 95°C . L' α -amylase de *Candida sp* P3 est thermostable car elle conserve 99.8% et 99.65% de son activité initiale après 180min d'incubation 80°C et à 100°C respectivement. L'application de l'enzyme dans la fabrication de tissus a également montré des résultats très positifs en analysant la couche d'amidon présente dans le tissu.

- Mots clé : levure, *candida sp*, α -amylase, optimisation, purification et immobilisation.

❖ Jury d'évaluation :

Présidente de jury : Bennamoun L. M.C.B, Université Frères Mentouri Constantine 1.
Encadreur : Dakhmouche S. M.C.A, ENS, Assia Djébar Université Constantine 3.
Examinatrice : Labbani F-Z.k. M.C.B, ENS, Assia Djébar Université Constantine 3.

Année universitaire : 2020/2021.

