



جامعة الإخوة منتوري قسنطينة
Université Des Frères Mentouri

لجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR

ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



جامعة الإخوة منتوري قسنطينة
Université Des Frères Mentouri

Faculté de sciences de la nature et de la vie

Département de Biochimie et Biologie Cellulaire et Moléculaire

Mémoire Présenté en vue de l'obtention du

Diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filié : Science Biologique

Spécialité: Biochimie appliquée

Intitulé :

*Etude des propriétés physico-chimiques de
l' α -amylase levurienne*

Présenté par :

BOULHOUT ROUMEISSA

BOUKEBOUS HIND SELOUA

➤ *Jury d'évaluation*

Présidente du jury : NOUADRI T. M.C.A, Université des Frères MENTOURI Constantine

Encadreur : DAKHMOUCHE S. M.C.A, ENS, ASSIA DJEBAR, Constantine

Examinatrice : BOUKHALFA H. M.C.B, Université des Frères MENTOURI Constantine.

Année universitaire 2020/2021

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

Remerciements

Nous tenons à remercier en premier le DIEU qui donnée lepuissant, la force, le courage et la volonté afin de pouvoir accomplir ce modeste travail.

*Nous adressons le grand remerciement chaleureusement et avec gratitude la meilleure professeurs, à notre encadreur **Mme DAKHMOUCHE-DJEKRIF S.** Maitre de conférences « A » à l'ENS Assia DJEBAR, Constantine, pour sa disponibilité à tout instant, sa gentillesse, ses conseils, et son aide malgré toutes les circonstances, et ses directives, vous avez été avec nous du début à la fin de ce travail, et la confiance qu'elle nous a accordé, son énorme soutien et le temps précieux qu'il nous a consacré, merci chère Mme, puissirz-vous trouver notre profonde reconnaissance, sachant que sans elle ce mémoire n'aurait jamais vu le jour.*

Nous tenons également à remercier les membres de jury

*Notre profonde gratitude va également à professeur **Mr NOUADRI.T** Maitre de conférence « A » á Université des Frères Mentouri-Constantine 1, pour l'honneur qu'il nous a accordé en acceptant de présider le jury de ce mémoire, et évaluer ce travail.*

*C'est avec un grand plaisir que nous remercions **Mme BOUKHALFA.H** Maitre de conférence « B » à l'université des Frères Mentouri Constantine 1 pour avoir accepté d'examiner notre travail.*

Nos remerciements s'adressent aussi à toute l'équipe du laboratoire de Génie enzymatique et applications et à mes collègues aux laboratoires de biopole et à tous ceux qui ont contribué à la réalisation de ce modeste travail.

Dédicace

Je décide ce modeste travail

Aux êtres les plus chérées : Mes parents

A ce qui sont les plus chères au monde, nos parents que dieu vos protège.

A mon très chers père Mohamed tu as toujours été pour moi bon exemple du père respectueux, honnête, grâce a toi j'ai appris le sens du travail et de la responsabilité, je te remercie pour ton amour, ta générosité, ton soutien, de m'encourager et votre sacrifice que tu as déployés pour mon éducation, que dieu le tout puissant te préserve, t'accorde santé, bonheur et te protège de tout mal.

A ma très chère mère Ghaniya aucun phrase ou mots exprime le degré d'amour et ton sacrifice et d'affection que j'éprouve pour toi, tu n'as cessé de me soutenir et de m'encourager durant toutes les années de mes études, tu es toujours été présente à mes coté pour me consoler quand il fallait puisse le tout puissant te donner santé, bonheur et longue vie.

A mon formidable grand frère Fares

A mon chère la plus belle sœur Sandra

Sans oublier mon frère Hicham qui est mort sans voir ce beau jour, qui m'a toujours soutenue, m'a aidé et m'a encouragé. je vous donne cette travaille, oeuvre de joie, de tristesse pour votre absence de nous, que dieu vous bénira, mon meilleur frère et ami, je ne t'oublierai jamais tu as toujours reste dans ma mémoire et dans mon cœur.

A mes adorables oncles, tantes, et mes cousins et cousines nabila, hajer, sara, chahi, ainsi qu'à toute la famille de BOULHOUT.

A la personne qui a toujours su m'épauler et me pousser

A mes très chers amis et mes collègues qui étaient avec moi « kamar, Abdlhak, somaia, kami »

A toutes les personnes que j'aime et que je respecte.

Roumaissa

Dédicace

A la précieuse source de tendresse a ma très chère mère

Malika

Aucune dédicace ne saurait exprimer mon amour éternel et ma considération pour les sacrifices que tu as consenti pour mon instruction et mon bien être, Tu as fait plus qu'une mère puisse faire pour que ses enfants suivent le bon chemin dans leur vie et leurs études, je te dédie ce travail en témoignage de mon profond amour, puisse dieu le tout puissant, te préserver et t'accorder santé, longue vie et bonheur

J'espère que je serai une source de fierté pour toi.

A mon père Ahmed, je te remercie pour ta patience, ton encouragement, tes sacrifices. et ton soutien infini

A mes belles sœurs Hadjer et Hadil Qui ont toujours été a mes cotes durant mes années d'étude

Je ne pourrais jamais imaginer ma vie sans vous

Vous comptez énormément pour moi, je n'oublierais jamais votre encouragement, votre soutien moral et votre sacrifices tout au long de mes études

Je vous aime beaucoup et Je vous souhaite beaucoup de succès de prospérité et une vie pleine de joie et de bonheur

*Spécialement à : A Celui que j'aime vraiment et qui m'a soutenue tout au long de mon projet et qui m'a encouragé tout au long de mon parcours universitaire et qui m'a beaucoup aidé pour accéder à cette filière mon fiancé **NADIR***

Hind

Résumé

Cette étude a été réalisée afin de connaître les propriétés physico-chimiques de l' α -amylase de *Candida sp.* isolée à partir de pelures de pomme de terre. La production de l' α -amylase est réalisée par fermentation solide sur un milieu, préalablement optimisé. Le milieu est à base de déchets de banane enrichie par le glucose 1%, la peptone 0,5%, l'humidité à 60%, l'inoculum à 4,105, la température de 37°C, le pH 7 et le temps d'incubation 48h. La production a atteint 6126,71 U/g de substrat. La purification partielle de l' α -amylase de *Candida sp.* par le sulfate d'ammonium à 40% et la dialyse a donné des degrés de purification de 18,3 et 24,2 et un rendement de 35,3 et 13,4. L'étude des caractères physico-chimiques de l' α -amylase a montré que l'enzyme montre deux pH optimaux de 5 (2443 UI) et de 8 (2559,4 UI) apparemment deux isoenzymes. Leur température optimale est de 75°C. Quant à la stabilité thermique, l'enzyme maintient 80% de son activité initiale, après incubation de 120min à 70°C et perd 43% après 3h d'incubation à 100°C. L'effet des sels (MgSO₄, CaCl₂ et FeSO₄, NaCl, ZnCl₂, CuSO₄, MnSO₄) a été aussi étudié. Les résultats montrent que MgSO₄, CaCl₂ et FeSO₄, sont des activateurs puisqu'ils ont augmenté l'activité de 114%, 101,2% et 129% respectivement. Tandis que NaCl, ZnCl₂, CuSO₄, MnSO₄ sont des inhibiteurs. L'effet des détergents (EDTA, SDS, urée et tween80) a été aussi, élaboré et il s'est avéré que l'activité α -amylasique a augmenté en présence de l'EDTA et le SDS avec un taux de 110,065% et 115,152% respectivement alors qu'elle est diminuée par l'urée et le tween 80. Ces résultats indiquent que l'enzyme partiellement purifié peut être utilisée dans plusieurs applications industrielles notamment l'industrie des détergents, du textile, et du papier, mais pour les domaines alimentaires et pharmaceutiques, elle doit être totalement purifiée.

Mots clés : *Candida sp.*, α -amylase, déchets de banane, FMS, purification.

Abstract

This study was carried out in order to know the physicochemical properties of the α -amylase of *Candida sp.* isolated from potato peels. The production of α -amylase is carried out by solid fermentation on a medium, previously optimized. The medium is based on banana waste enriched with 1% glucose, 0.5% peptone, 60% humidity, inoculum at 4.105, temperature 37 ° C, pH7 and time of. 48h incubation. The production reached 6126.71 U / g of substrate. The partial purification of α -amylase from *Candida sp.* By 40% ammonium sulfate and dialysis gave a degree of purification of 18.3 and 24.2 and a yield of 35.3 and 13.4. The study of the physicochemical characters of the α -amylase showed that the enzyme shows two pH optimum of 5 (2443 IU) and 8 (2559.4 IU) apparently two isoenzymes. Their optimum temperature is 75C °. As for thermal stability, the enzyme maintains 80% of its initial activity after incubation for 120min at 70C ° and loses 43% after 3h of incubation at 100C °. The effect of salts (MgSO₄, CaCl₂ and FeSO₄, NaCl, ZnCl₂, CuSO₄, MnSO₄) was also studied. The results show that MgSO₄, CaCl₂ and FeSO₄, are activators since they increased the activity by 114%, 101, 2% and 129% respectively. While NaCl, ZnCl₂, CuSO₄, MnSO₄ are inhibitors. The effect of detergents (EDTA, SDS, urea and tween80) was also developed and it turned out that the α -amylase activity increased in the presence of EDTA and SDS with a rate of 110.065% and 115.152% respectively while it is reduced by urea and tween 80. These results indicate that the partially purified enzyme can be used in several industrial applications including the detergents, textiles, and paper industry, but for the food and pharmaceutical fields, it must be completely purified.

Keyword: *Candida sp.*, α -amylase, banana waste, FMS, purification.

ملخص

أجريت هذه الدراسة لمعرفة الخواص الفيزيائية والكيميائية لـ α -amylase من *Candida sp*. معزولة عن قشور البطاطس. يتم إنتاج α -amylase عن طريق التخمير صلب على وسيط تم تحسينه مسبقاً. يعتمد الوسط على نفايات الموز الغنية بنسبة 1 % جلوكوز، 0.5 % ببتون، 60 % رطوبة، اللقاح عند 43105 ، درجة حرارة 37°C ، درجة الحموضة 7 ووقت الحضانة 48 سا. بلغ الإنتاج 6126.71 وحدة / جرام من الركيزة. التنقية الجزئية لـ α -amylase من *Candida sp*. مع 40% كبريتات الامونيوم و التصفية اعطت درجة تنقية 18.3 و 24.2 و مردود 35.3 و 13.4. أظهرت دراسة الخصائص الفيزيائية والكيميائية لـ α -amylase أن الإنزيم يُظهر اثنين من الأس الهيدروجيني الأمثل 5 (UI2443) و 8 (UI 2559.4) على ما يبدو اثنين من نظائر الإنزيم. درجة الحرارة المثلى 75°C . بالنسبة للثبات الحراري ، يحافظ الإنزيم على 80% من نشاطه الأولي بعد الحضانة لمدة 120 دقيقة عند 70 درجة مئوية ويفقد 43% بعد 3 ساعات عند 100°C . تمت دراسة تأثير الأملاح (MgSO_4 و CaCl_2 و FeSO_4 و NaCl و ZnCl_2 و CuSO_4 و MnSO_4)، وأظهرت النتائج أن MgSO_4 و CaCl_2 و FeSO_4 هي منشطات لأنها زادت النشاط بنسبة 114% و 101.2% و 129% على التوالي.. بينما يعتبر كل من NaCl و ZnCl_2 و CuSO_4 و MnSO_4 مثبطات. تم دراسة تأثير المنظفات (EDTA ، SDS ، Urée ، tween 80) واتضح أن نشاط α -amylase زاد في وجود EDTA و SDS بمعدل 110.065% و 115.152% على التوالي بينما انخفض بواسطة Urée و tween 80. تشير هذه النتائج إلى أن الإنزيم المنقى جزئياً يمكن استخدامه في العديد من التطبيقات الصناعية بما في ذلك صناعة المنظفات والمنسوجات والورق ، ولكن في المجالات الغذائية والصيدلانية ، يجب تنقيته بالكامل.

الكلمات الرئيسية : *Candida sp* ، α -amylase ، نفايات الموز ، FMS ، التنقية

LISTES ABREVIATIONS

SDS :	Sodium Dodécyl Sulfate.
EDTA :	Ethyéne Diamine Tétra-Acétique
Sp.:	Espèce
DNSA :	Dinitro Salicylic Acide
UI :	Unité Internationale
YPGA:	Yeast extract-Peptone-Glucose-Agar
min :	minute
S :	Seconde
μ/ml :	Unité intensionnelle
BSA :	Sérum Albumine Bovin
T° :	Température
pH :	potentiel d'hydrogène
h:	heure
ml:	millimètre
C° :	Degré Celsius
% :	Pourcentage
nm:	nanomètre
CaCl ₂ :	Chlorure de Calcium
FMS :	Fermentation Mlieu Solide
FML :	Fermentation Mileu Liquide

LISTES DES FIGURES

Figures 01 : Aspect morphologique d'une levure	4
Figures 02 : Types de division des levures et caractérisation de la cellule typique	6
Figures 03 : Cycle de reproduction sexuée de la levure	7
Figures 04 : Fonctionnement de l'enzyme	10
Figures 05 : Structure de l'amylose et de l'amylopectine	12
Figures 06 : Enzymes amylolytiques	13
Figures 07 : Structure de l' α -amylase	14
Figures 08 : Domaines de structure de l' α -amylase	15
Figures 09 : Différents modes d'action de l' α -amylase	16
Figures 10 : Mécanisme de l' α -amylase	17
Figures 11 : Production d'enzymes par fermentation en milieu solide (FMS) et fermentation en milieu liquide (FML) (Schinkawa et Mitsuzawal, 2020).	21
Figures 12 : Répartition de l'enzyme dans le secteur agro-alimentaire	29
Figures 13 : Application de l' α -amylase	32
Figures 14 : Production de bananes dans le monde	33
Figures 15 : Bananiers et banane de diverses maturités	34
Figures 16 : Déchets de banane et l'amidon	34
Figures 17 : Composition chimique des déchets de banane	35
Figures 18 : Composition nutritionnel chimique de déchets de banane	36
Figures 19 : Identification de la levure (A) Protocol d'encemencement de la galerie API 32C et (B) fiche de résultats	38
Figures 20 : Production industriel et de purification partielle de l' α -amylase	40
Figure 21: Protochole de mesure l'activité de l' α -amylase par DNSA	41
Figures 22 : Courbe étalon de BSA	43
Figures 23 : Courbe étalon du maltose	44
Figure 24 : pH paramètre et mesure du Ph	45
Figures 25 : Lecture de la galerie API 32C inoculée par <i>Candida sp.</i> , après incubation à 37°C pendant 48h	48
Figures 26 : Effet du pH sur l'activité enzymatique de <i>Candida sp</i>	50
Figure 27 : Effet de la température sur l'activité amylasique de <i>Candida sp</i>	51

Figures 28 : Etude de la thermostabilité de <i>Candida sp</i>	53
Figures 29 : Effet des sels sur l'activité enzymatique de <i>Candida sp</i>	54
Figure 30 : Effet des détergents sur l'activité enzymatique de <i>Candida sp</i>	54

LISTES DES TABLEAUX

Tableau 01 : Habitats de levure	4
Tableau 02 : Souches levuriennes amylolytiques	8
Tableau 03 : Classification des enzymes	11
Tableau 04 : Nomenclature de l' α -amylase	14
Tableau 05 : Sources de l' α -amylase chez les plantes	18
Tableau 06 : Sources animales de la production de l' α -amylase	18
Tableau 07 : Sources microbiennes de la production d' α -amylase	19
Tableau 08 : Levures productrices de l' α -amylase	20
Tableau 09 : Caractéristiques de l' α -amylase levuriennes	26
Tableau 10 : Dosage de BSA	43
Tableau 11 : Dosage de maltose	44
Tableau 10 : Etapes de purification partielle de l' α -amylase de <i>Candida sp</i>	49

TABLE DES MATIERES

Remerciements
Dédicace
Résumés
Liste des abréviations
Liste des figures
Liste des tableaux
Introduction générale1

Partie 1

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre 1 : Les levures

1. Levures3
 1.1 Généralités3
 1.2 Habitats3
 1.3 Caractères des levures.4
 1.4 Morphologie4
 1.5 Reproduction5
 1.5.1 Reproduction asexuée5
 1.5.2 Reproduction sexuée7
 1.6 Levures amylolytiques.....8
 1.7 Applications des levures9

Chapitr 2 : α -amylase

1.2.1 Généralités10
 1.2.2 Classification des enzymes11
 1.2.3 Enzymes amylolytiques11
 1.2.4 Définition15
 1.2.4.1 Nomenclature14
 1.2.4.2 Structure14
 1.2.4.3 Mode de l' α -amylase15
 1.2.4.4 Mécanisme d'action17

1.2.4.5	Origine d' α -amylase	17
1.2.4.5.1	α -amylase animals	18
1.2.4.5.2	α -amylase végétale	18
1.2.4.5.3	α -amylase microbien.....	19
1.2.5	Production et fermentation de l' α -amylase	20
1.2.5.1	Facteurs influençant la production de l' α -amylase	21
1.2.5.1.1	Source de carbone	22
1.2.5.1.2	Oligoéléments et facteurs de croissance	22
1.2.5.1.3	Température	22
1.2.5.1.4	pH	24
1.2.5.1.5	Pression osmotique et activité de l'eau	24
1.2.5.2	Type de la fermentation pour la production de α -amylase	24
1.2.5.2.1	Fermentation en milieu solide	24
1.2.5.2.2	Fermentation en milieu liquide.....	25
1.2.6	Purification de l' α -amylase	25
1.2.7	Facteurs influençant l'activité amylasique	25
1.2.7.1	pH optimal	25
1.2.7.2	Température optimale	26
1.2.7.3	Thermo stabilité	26
1.2.7.4	Effecteurs	26
1.2.8	Applications industrielles et biotechnologiques de l' α - amylase.....	27
1.2.9	Utilisation de l' α amylase dans les industries alimentaires	27
1.2.10	Autres Domaines d'application de l' α -amylase	29

Chapitre 3 : Déchets de banane

1.3.1	Définition de Déchets de banane	33
1.3.2	Origine et structure de déchets de banane	33
1.3.3	Caractérisation chimique de déchets de banane	33
1.3.4	Application de déchets de banane	36

Partie 2
Matériels et méthodes

2.1	Identification de la levure	37
2.2	Production de l' α -amylase	38
2.3	Purification de l' α -amylase	41
2.4	Etude physicochimique de l'activité de l'enzyme	45
2.4.1	Effet du pH sur l'activité de α -amylase	45
2.4.2	Effet de la température sur l'activité de α -amylase	45
2.4.3	Thermostabilité de l' α -amylase	45
2.4.4	Effet des sels sur l' α -amylase	46
2.4.5	Effet des détergents sur l' α -amylase	46

Partie 3

Résultats et discussion

3.1	Identification de la souche levurienne	47
3.2	Production de α -amylase.....	48
3.2.1	Evaluation de l'activité enzymatique	48
3.3	Purification partielle de l' α -amylase.....	49
3.3.1	Précipitation par le sulfate d'ammonium.....	49
3.3.2	Dialyse	50
3.4	Etude physicochimique de α -amylase pareillement purifiée	50
3.4.2	Effet du pH sur l'activité de l' α -amylase	50
3.3.3	Effet de la température sur l'activité enzymatique	52
3.3.4	Etude la thermostabilité de l' α -amylase	53
3.3.5	Effet des sels sur l' α -amylase.....	54
3.4.3	Effet des détergents sur l' α -amylase	54

Conclusion	56
-------------------------	-----------

Références

Annexes

Introduction

Durant les trois dernières décennies, les microorganismes ont apporté une contribution significative dans certains domaines industriels notamment l'agroalimentaire. Diverses industries dépendent en grande partie de leurs métabolites (**Mishra, 2020**).

Parmi eux on distingue les levures : ces eucaryotes unicellulaires, ayant des capacités à se multiplier rapidement car elles sont moins exigeantes en nutriments, facilement mises oeuvre dans d'autres application et possèdent un capital génétique qui subit peu de mutations. Aussi, elles interviennent dans divers domaines, et l'intérêt, qu'elles suscitent aujourd'hui est dû à leur grande diversité. Un grand nombre de levures communément utilisées en biotechnologie a été obtenu à partir d'habitats naturels où elles ont développé une faculté d'adaptation à un grand nombre de niches écologiques grâce à leurs propriétés physiologiques très caractéristiques (**Dakhmouche, 2016**) et par leur capacité à produire des métabolites fonctionnels, sont mis à contribution dans l'élaboration de biomedicaments ; de plus ils constituent un vaste réservoir de catalyseurs biologiques à savoir les enzymes (**Mishra, 2020 ; Saci, 2012**).

Le marché mondial des enzymes est représenté par 80% des hydrolases, particulièrement les amylases et les protéases (**Morvan, 2010**). Et comme toutes les enzymes, l' α -amylase est une macromolécule appartenant à la classe des protéines globulaires. Certe, elle provient de différentes sources (plantes, animaux et microorganismes), mais celle d'origine microbienne est la plus utilisée industriellement : l'industrie alimentaire, pharmaceutique, textile, papeterie, et détergent, en raison de leur grande productivité, thermostabilité (**Merabti, 2006**), faible coût, protection de l'environnement, plasticité et leur grande disponibilité (**Burhan et al., 2003**).

La production d' α -amylase par des procédés biotechnologiques (fermentations), nécessite non seulement l'identification et la sélection des microorganismes amylolytiques, mais également le choix du substrat de la fermentation à faible coût d'une part et riche en élément nutritifs nécessaires au développement des microorganismes et à la production d' α -amylase d'une autre part (**Bouchelaghem et Mersaoui, 2018**)

Pour la production de la plupart des metabolites d'origine microbienne, le processus fermentaire s'effectue soit sur substrat solide, soit en culture submergée (**Dubey et al., 2000**). Un nombre important de ces fermentations est réalisé sur des déchets agroalimentaires pour produire principalement des hydrolases (**Srinubabu et al., 2007**). Le recyclage des résidus agro-alimentaires tels que le lactosérum, les déchets d'oranges ...etc, contribue, d'une part à

réduire la pollution de l'environnement et d'autre part, à produire par le biais des biotechnologies, des métabolites à haute valeur ajoutée, en particulier des enzymes.

Les pays en développement, à l'instar de l'Algérie, la plupart des déchets à la une décharge à ciel ouvert. Il devient donc urgent de mettre en place de nouvelles technologies permettant leur valorisation (**Dekhmouche, 2016**) pour cela différentes recherches ont été menées pour valoriser les déchets industriels en tant que source de carbone. Parmi ces travaux, citons la production d'alpha-amylase (**Djekrif, Dakhmouche et al, 2006**), la production des protéases (**Nouadri et al., 2005**)

Ce manuscrit comprend deux parties. La première partie concerne l'étude bibliographique, elle comporte 03 chapitres : des connaissances sur les levures, l' α -amylase et les déchets de banane

La deuxième partie expérimentale renferme les techniques et les méthodes ainsi que les résultats et leur discussion.

L'objectif de ce travail est :

- Production de l' α -amylase par la levure *candida sp* en fermentation solide.
- Etude des caractéristiques physico-chimiques de l' α -amylase à savoir le pH optimum, la température optimale, la thermostabilité de l'enzyme, l'effet de différents sels et des détergents sur l'activité α -amylasique.

Chapitre I

LES LEVURES

1. Les levures

1.1 Généralités

Les levures c'est un groupe taxonomiquement hétérogène de champignons unicellulaires, (Buzzin *et al.*, 2017). Selon Labrecque, (2003), elles survivent sous des conditions aérobies qu'anaérobies et dans des milieux composés de sources métabolisables : de glucide, d'azote, de vitamines et de minéraux.

Les levures se distinguent des autres champignons par une taxonomie basée à la fois sur des caractères morphologiques et physiologiques et ce sont des microorganismes eucaryotes avec un ADN double brin (Kurtzman *et al.*, 2011). Ces 1500 espèces appartiennent à deux phyla fongiques distinctes : Ascomycota et Basidiomycota. Dans chacun de ces phyla, les levures se différencient selon plusieurs lignées, reflétant ainsi la grande diversité de leurs origines évolutives et leurs propriétés biochimiques (Lachance, 2011). Et leurs faibles exigences en nutriments permettent un développement rapide

Aussi, elles sont utilisées comme un système modèle en Biochimie, en Génétique et en Biologie Moléculaire. Les levures sont les premiers micro-organismes à être domestiqué pour la production de la bière, du pain ou du vin et continuent d'être utilisées pour le bénéfice de l'humanité dans la production de protéines recombinantes et d'autres substances (Lachance, 2011). Cependant, certaines espèces sont pathogènes comme *Candida albicans* (Kurtzman, 2011).

1.2 Habitats

Les levures peuplent de nombreux habitats sur notre planète (tableau 1). Ils se produisent dans les environnements aquatiques et terrestres ainsi que dans l'atmosphère; cependant, ils ne sont pas uniformément répartis. Alors que certaines espèces sont omniprésentes dans une large aire de répartition géographique, d'autres peuvent avoir une répartition plus restreinte. Certaines sont connues à partir de très peu d'isolats, et environ un tiers des espèces de levures connues sont représentées par une seule souche. Dans ces cas, leur écologie reste à élucider. En tant qu'organismes immobiles, leur dispersion dépend des vecteurs qui les transportent. Les insectes sont d'une importance exceptionnelle parmi les vecteurs de levure (Buzzin *et al.*, 2017).

Tableau 01: Habitat de levure

Habitat	Référence
Fromage	Binetti et <i>al.</i> , 2013
Jus de fruits	Jairath et <i>al.</i> , 2012
Déchets industriels	Ouédragao et <i>al.</i> , 2012
Spécimens cliniques	Zhang et <i>al.</i> , 2010 et Lachanc, 2011
Cornichons, dattes	Rezki et <i>al.</i> , 2013
Grains de blé	Dekhmouche, 2016
Sol	Bennamoun, 2017

1.3 Caractères des levures

Les levures se développent, soit en surface, soit en profondeur des aliments (milieux solides ou liquides). Certaines levures sont cultivées industriellement et commercialisées pour leurs propriétés particulières de fermentation des sucres et leur transformations partielles en alcool et en gaz (production de bière et d'autres boissons alcoolisées fermentées, production de pain en utilisant la levure de boulangerie). En général, les levures ne provoquent pas de dangers pour la santé, même si certaines altèrent les aliments en les rendant impropres à la consommation (Fao, 2007).

1.4 Morphologie

Les cellules de levures (Figure1) sont généralement ovoïdes ou sphériques, parfois cylindriques (Madigan et John, 2007). Leurs dimensions sont très variables de 1 à 5 microns et de diamètre jusqu'à 5 à 30 μ de longueur. Les dimensions et les aspects varient selon l'âge, l'environnement et le milieu de culture (Ati, 2008).

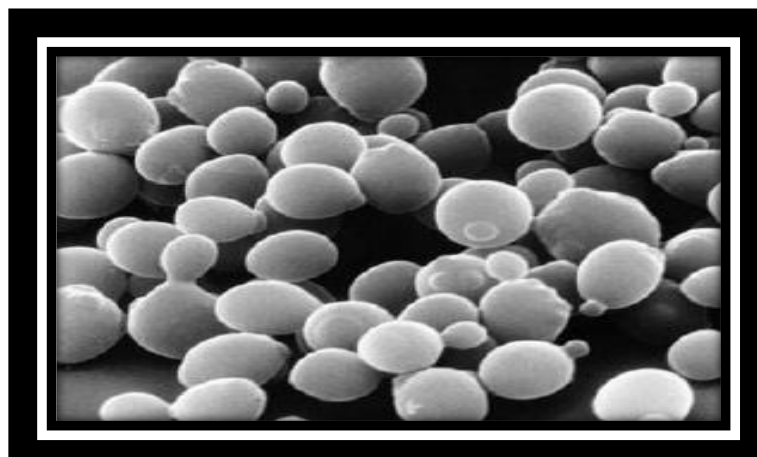


Figure1: Aspect morphologique d'une levure (Alberts, 2008).

1.5 Reproduction

Les levures se reproduisent selon deux modes :

1.5.1 Reproduction asexuée

Le bourgeonnement est la forme de reproduction végétative qui se produit chez la plupart des levures. La division de la levure bourgeonnante est asymétrique; la cellule fille est plus petite que la cellule mère. Les bourgeons peuvent naître de n'importe quel point de la paroi cellulaire; cependant, ils ne proviennent pas plus d'une fois du même point (**Briggs, 2004**). Au cours du processus de bourgeonnement, une nouvelle cellule se forme sous la forme d'une petite excroissance de la cellule mère au cas où les cellules mères atteignent une taille de cellule critique. Après l'agrandissement du bourgeon, la division nucléaire, la formation de la paroi cellulaire et enfin, la séparation de la cellule fille de la cellule mère ont lieu (**Walker, 1998 et Briggs, 2004**).

Selon Dickinson et *al.* (**2004**). Les haploïdes et les diploïdes ont un modèle de bourgeonnement différent. En milieu riche, les haploïdes et les diploïdes homozygotes MATa/MATa et MAT α /MAT α) bourgeonnent selon un motif axial. Cependant, les cellules diploïdes hétérozygotes (MATa/MAT α) présentent un bourgeonnement polaire. Même si les nutriments sont fournis de manière illimitée, une cellule de levure individuelle ne pourrait pas continuer à produire de nouvelles cellules filles pour toujours. Chaque levure a une durée de vie finie caractéristique.

Les cellules de levure bourgeonnent (figure2) près de 20 fois au cours d'une période de vie (**Burke et al., 2000**). L'âge d'une cellule peut être déterminé par le nombre de cicatrices de bourgeons présentes sur la surface cellulaire d'une seule cellule de la levure.

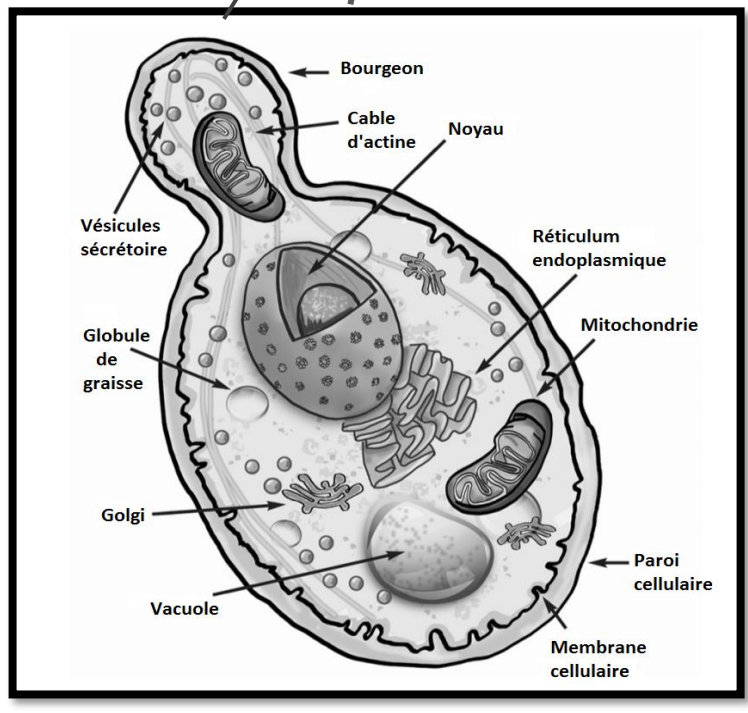
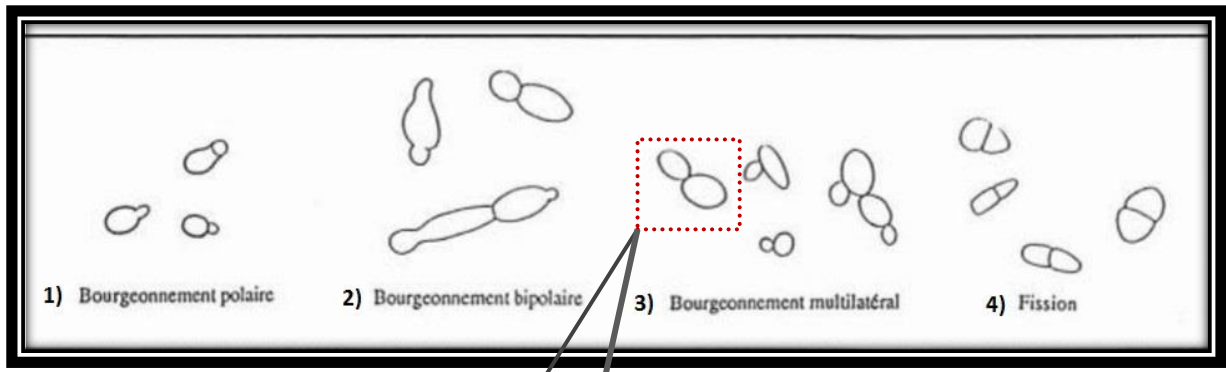


Figure 2: Types de division des levures et caractérisation de la cellule typique ,
1- Bourgeoisement simple, polaire (*Saccharomyces*), 2- Bourgeoisement bipolaire (*Saccharomyces*), 3- Bourgeoisement multilatéral, 4 - Scissiparité, fission (*Scizosflccharomyces*), (Walker et Stewart, 2016 et Schaechter, 2009).

1.5.2 Reproduction sexuée

Certaines cellules présentent une reproduction sexuée (figure3) via un processus d'accouplement, dans lequel deux cellules de levure se réunissent et fusionnent. Il existe deux types d'accouplement différents des haploïdes désignés par a et α . Les types d'accouplement peuvent être considérés comme analogues aux gamètes mâles et femelles. Les haploïdes de type d'accouplement a produisent «facteur a».

De plus, les haploïdes de type d'accouplement α produisent un «facteur α ». Ces deux facteurs sont des hormones peptidiques (phéromones) qui attirent les cellules du type d'accouplement opposé. C'est-à-dire que les cellules de type a s'accouplent uniquement avec les cellules de type α . En raison de cette caractéristique, le type d'accouplement d'une cellule peut être déterminé génétiquement en croisant cette cellule avec une cellule dont le type d'accouplement est connu (Madigan *et al.*, 2009).

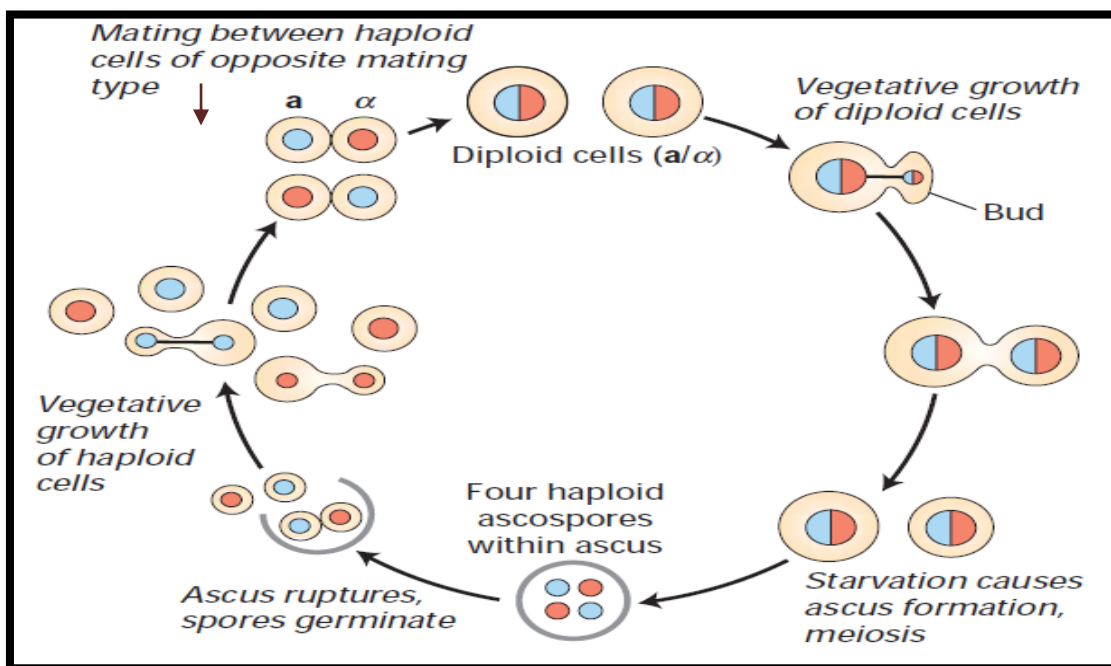


Figure 3 : Cycle de reproduction sexuée de la levure (Aksit, 2012)

1.6 Levures amylolytiques

Ce sont des levures productrices de différentes enzymes amylolytiques (Tableau 2), leur facilité de culture a attiré l'intérêt des chercheurs pour leur application dans la bio-industries et c'est pour cette raison que leur utilisation dans la production d'enzymes est de plus en plus demandée (Fossi et al., 2005). Tandis que l'excrétion des amylases dépend de la composition du milieu de culture (Aiyer, 2005), le système amylolytique de la levure est très diversifié et les principales enzymes de ce système sont : α amylase, glucoamylase, pullulanase et cyclodextrinase (Ouédraogo et al., 2012; Moubasher et al., 2013).

Tableau 02: Souches levuriennes amylolytiques

Levure	Référence
<i>Candida utilis</i> , <i>Candida guilliermondi</i> <i>Candida famata</i> <i>Trichosporon mucoides</i>	Ouédraogo et al., 2012
<i>Aureobasidium pullulans</i>	Gaur et al., 2010
<i>Saccharomycopsis fibuliger</i>	Gonzalez et al., 2008
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Acourene et al., 2012
<i>Clavispora lusitaniae</i>	Ouédraogo et al., 2012
<i>Wickerhamia sp</i>	Hernandez et al., 2012
<i>Lipomyces sp</i>	Wenderly, 2014

1.7 Applications des levures

Les levures ont de grandes activités métaboliques et sont donc utilisées dans :

➤ **Boissons alcoolisées**

Le rôle le plus ancien des levures est la fabrication de boissons alcoolisées (bière, vin, cidre) (**Deak, 2007**). Cette fabrication repose sur la fermentation alcoolique, qui consiste à transformer les sucres simples en alcool. Ainsi, elles interviennent au cours de la vinification et de l'élaboration de la bière. L'espèce la plus utilisée par l'homme est *Saccharomyces cerevisiae*, appelée aussi levure de bière (**Hencké, 2000**).

➤ **Panification**

Une autre utilisation, connue depuis l'antiquité, est la fabrication du pain : Le dégagement de gaz carbonique, qui accompagne la fermentation, permet de faire lever la pâte en lui conférant une texture légère (**Cofalec, 2006**).

➤ **Production de protéines**

Les levures constituent une source précieuse de protéines car elles sont le siège d'une biosynthèse protéique très active. Elles sont utilisées dans la production de protéines d'organismes unicellulaires, qui sont souvent incorporées à l'alimentation animale et humaine. Cette production peut s'effectuer sur des substrats considérés comme des déchets tels que le lactosérum et les résidus de pâte à papier (**Benaouid, 2008**).

Chapitre II

α -amylase

1.2.1 Généralités

Ces dernière années, le développement industriel du domaine de la chimie notamment les enzymes, est devenu une science de la technologie alimentaire, une matière essentielle dans notre vies. Les enzymes sont appliquées dans plusieurs domaines tels que la fabrication d'aliments comme le pain et les boissons, elles ont été développés pour l'intérêt des consommateurs et de l'humanité en général, Elles sont produites à partir de plusieurs sources comme les micro-organismes (levures, moisissures et bactérie) (Spinnler, 2018 et Adhikari, 2019).

Les enzymes sont des protéines vitales, qui accélèrent les réactions. Biologiques, en forme de poche spéciale, chaque enzyme possède un site actifs spécifique, forme poche spécial au substrat pour libérer leur produit (figure 4) (Svenjer, 2016).

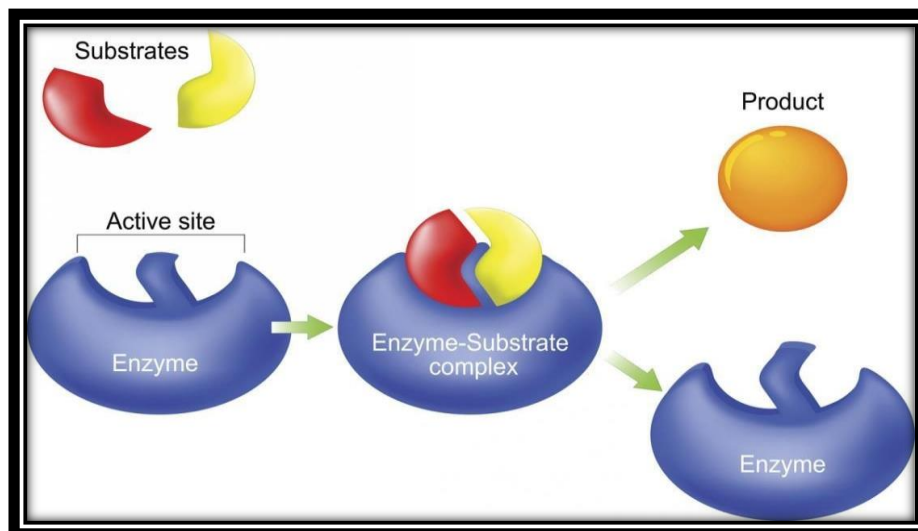


Figure 4 : Fonctionnement de l'enzyme (Luo, 2018).

1.2.2 Classification des enzymes

Le développement de la technologie a conduit à une explosion de nombreuses données biologiques, notamment des informations sur les enzymes, grâce aux études menées et aux chercheurs scientifiques que les enzymes ont de nombreuses fonctions et propriétés sur les réactions chimiques.

Par conséquent, les séquences de protéines et leurs applications dans diverses réactions chimiques doivent être connues et déterminées. Ainsi, cette grande variété de protéines conduit à différentes actions et activités des molécules, ce qui a conduit à la séparation et à la classification des enzymes (Zhiyutao, 2020 et Britannica, 2019).

Tableaux 03: Classification des enzymes (Bensafi, 2019 et Vandenberghe et al., 2020)

Classe	Groupe généraux		Rôle	Exemple
E.C.1	1	Oxydoréductase	Catalysent les oxydoréductions (transferts de H ⁺ et d'e ⁻ entre 2 substance)	Catalase
E.C.2	2	Transférase	Catalysent le transfert de groupements moléculaires entre 2 substances	Méthyle transférase qui transfère le groupement méthyle
E.C.3	3	Hydrolase	Catalysent hydrolyse de liaisons diverses	l' α -amylase qui hydrolyse l'amidon
E.C.4	4	Lyase	Catalysent soit l'enlèvement d'un groupe (autrement que par hydrolyse) soit l'addition d'un groupement moléculaire	Adénylatecyclase qui produit l'Amp cyclique a partir de Atp
E.C.5	5	Isomérisation	Catalysent les isomérisations	Topo isomérisation
E.C.6	6	Ligase (synthèse)	Catalysent l'union de deux molécules en utilisent de l'énergie	ARN et ADN polymérase
E.C.7	7	Translocases	Catalyser le mouvement des ions ou des molécules à travers les membranes	Transporteurs de type ABC

1.2.3 Enzymes amylolytiques

Les enzymes amylolytiques sont largement appliquées à l'industrie papetiers, alimentaire, pharmaceutique et sucrières qui exigent un profil d'hydrolyse spécifique, et dans les agro-industrielles comme substrat de fermentation, (Gandgadhan, 2009). Le substrat classique de l' α -amylases est l'amidon. C'est la molécule la plus utilisée depuis

des milliers d'années, en particulier dans l'industrie. Se trouve largement dans les plantes comme le blé, les fruits (banane), et le riz. Il est constitué de l'amylose et l'amylopectine (figure 5) :

- L'amylose est un polymère linéaire constitué d'un maximum de 6000 unités de glucose avec des liaisons glycosidiques α -1,4.
- L'amylopectine est composée de courtes chaînes linéaires de 10 à 60 unités de glucose liées par α -1,4 et liées par α -1,6 à des chaînes latérales avec 15 à 45 unités de glucose. (Copeland *et al.*, 2009).

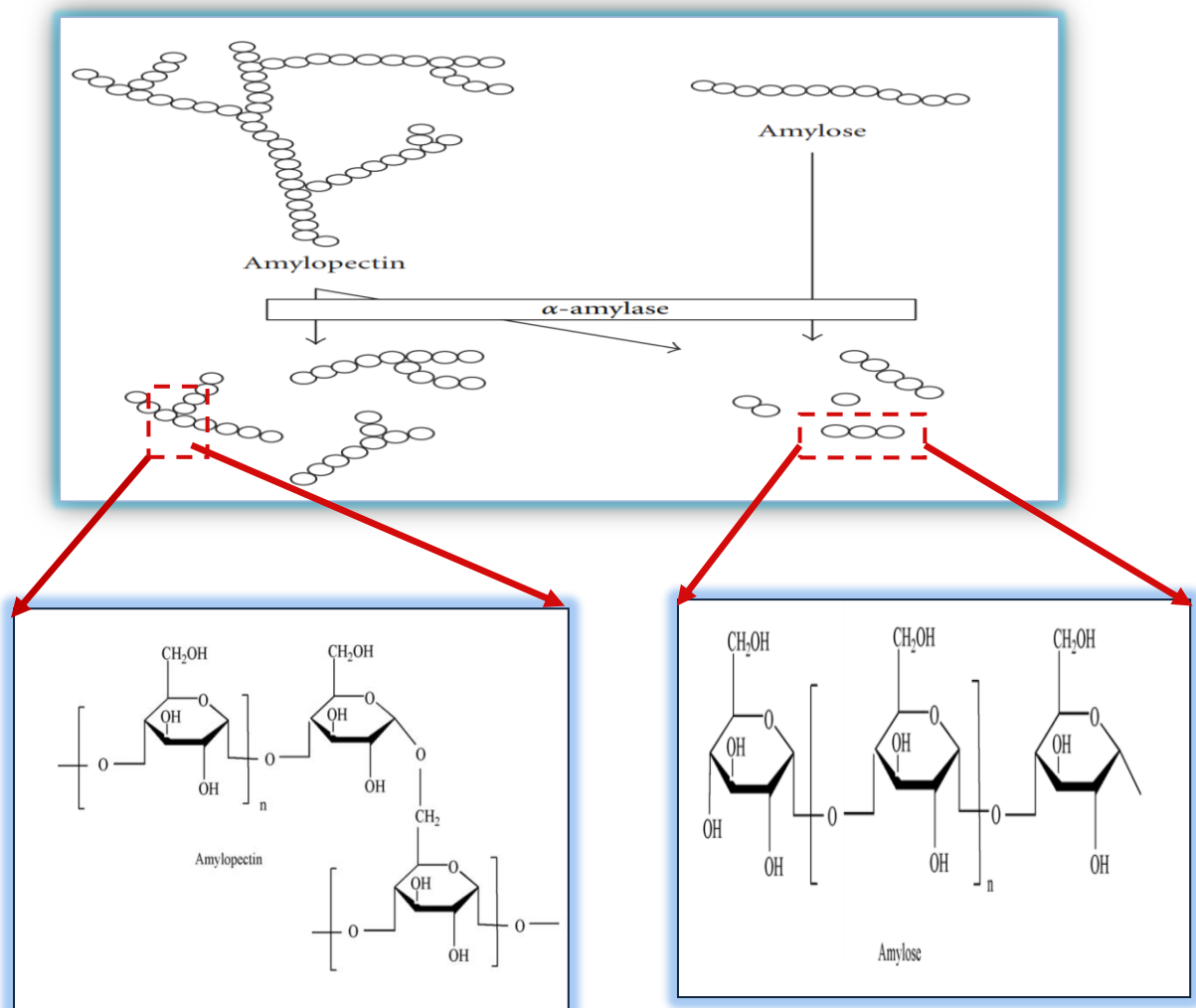


Figure 5 : Structure de l'amylose et de l'amylopectine (Hii *et al.*, 2012 et Ismail *et al.*, 2013)

Les enzymes amylolytiques tel que l' α -amylase, la β -amylase et la pullulanase (Figure 6) dégradent spécifiquement le substrat au cours de la réaction, par exemple,

l' α - amylase hydrolyse l'amidon pour la production de maltose (Marc et *al.*, 2009).

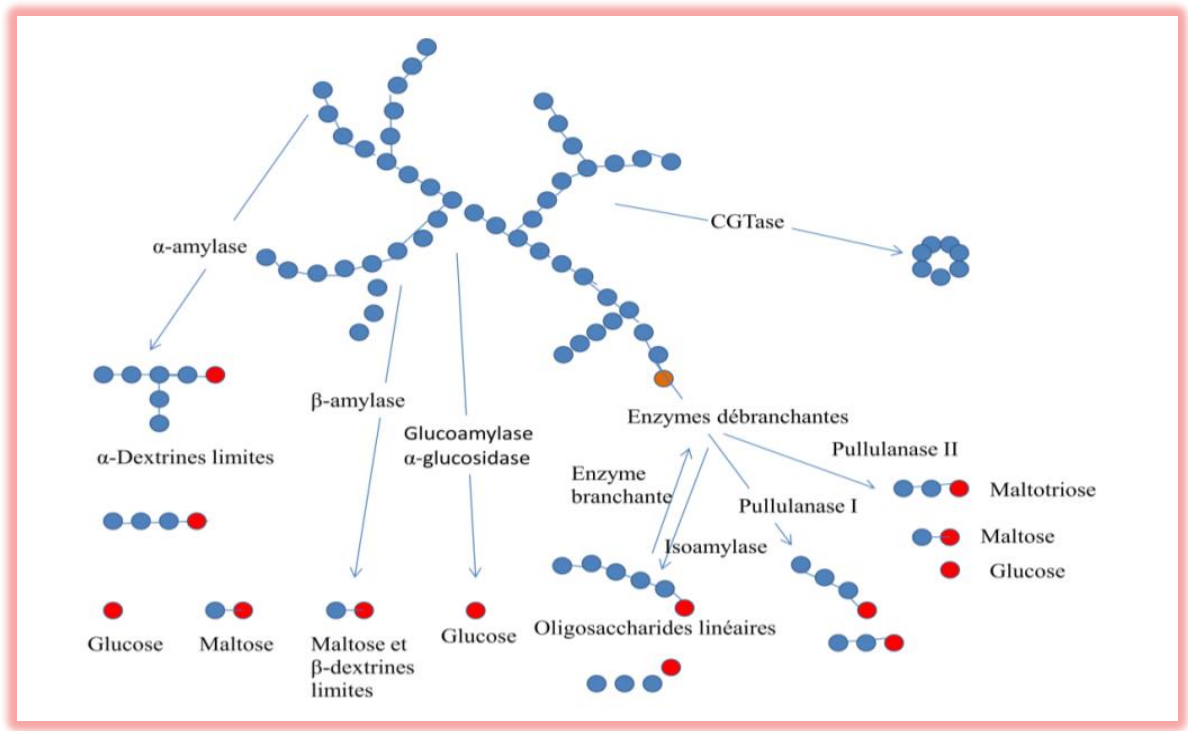


Figure 6 : Enzymes amylolytiques. (Dakhmouch-djekrif, 2016)

1.2.4 α -amylase

➤ Définition

C'est une glycosidase (EC 3.2.1.1) qui hydrolyse les liaisons osidiques α -1,4 des polysaccharides (amidon et glycogène) en libérant du glucose, du maltose et des maltodextrines solubles de taille variable (Elleuche et Antranikian, 2013). Elle se trouve dans la plupart des êtres vivants (animaux, plantes et microorganismes). Cette enzyme constituée d'une longue chaine d'acides aminés (figure 7), a été utilisée depuis des années immémoriaux dans l'industrie notamment l'industrie alimentaire (Farooq et *al.*, 2021 et Dehkordi, 2012).

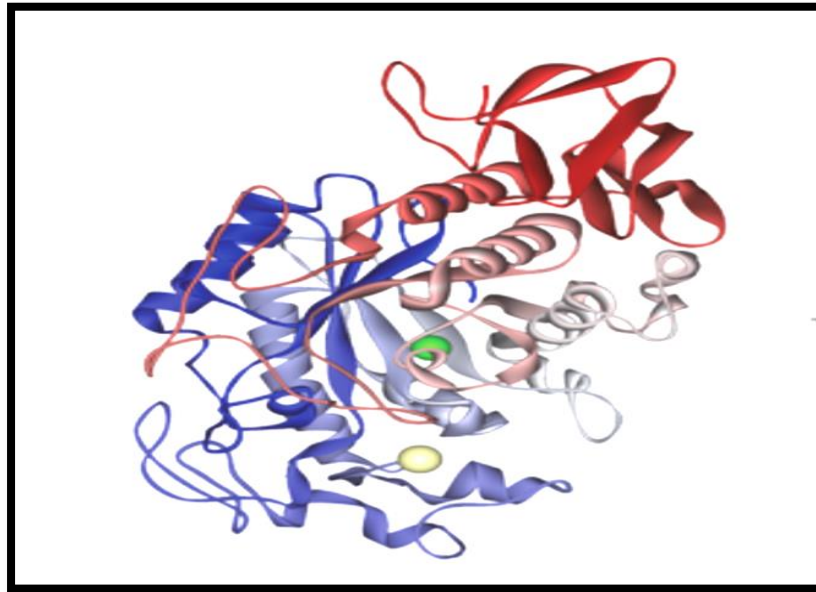


Figure 7 : Structure de l' α -amylase (Subash, 2017)

1.2.4.1 Nomenclature

D'après Olempska, (2004), La take-amylase A est classée dans la famille d'hydrolase, Elle a agit sur les polypeptides et les oligosaccharides, effectue de coupour les liaisons α (1-4)-D-glucose des sucres de manière aléatoire, le nomenclature de l' α -amylase et la suivant :

Tableau 04: Nomenclature de l' α -amylase

Terme(α)	Nom codifié	Nom accepté	Autre nom(s)	Nom systématique
Rapporté à la configuration a numérique initial qui associer au carbone du sucre	EC (3,2,1,1)	α -amylase	glycogénèse; α -amylase; endoamylase ; Maxilase ; Take-amylase A	1-4- α -D-glucane glucanohydrolase

1.2.4.2 Structure d' α -amylase

L' α -amylase est une glycoprotéine, une métalloenzyme aux ions de Ca^{2+} (figure8), leur structure est constituée en chaine polypeptide de 471 à 483 résidus d'acides aminés et quatre ou cinq ponts disulfure (Subash, 2017). L'enzyme possède 3 domaines (Zhang et Xiao, 2016 et ben-abdelmalek et al.,&² 2009) (figure8) :

Domaine A : contient la terminaison N-terminale site catalytique dont il s'agit en repli très symétrique qui comprend 8 brins β parallèle disposé dans un tonneau entouré de 8 α -hélice.

Domaine B: possède un grand partie de la liaisons avec le substrat selon leur spécificité et enroulé autour le domaine A et C par liaison disulfate.

Domaine C : constitue de la terminaison C-terminale sous forme de feuille bêta antiparallèle, il joue un rôle dans la reconnaissance et la liaison du substrat.

Ca²⁺ : situé entre le domaine A et domaine B, possède un rôle important pour conserver la stabilité de l'enzyme par 4 acide aminé lequel (His, Glu, Asp, Asn).

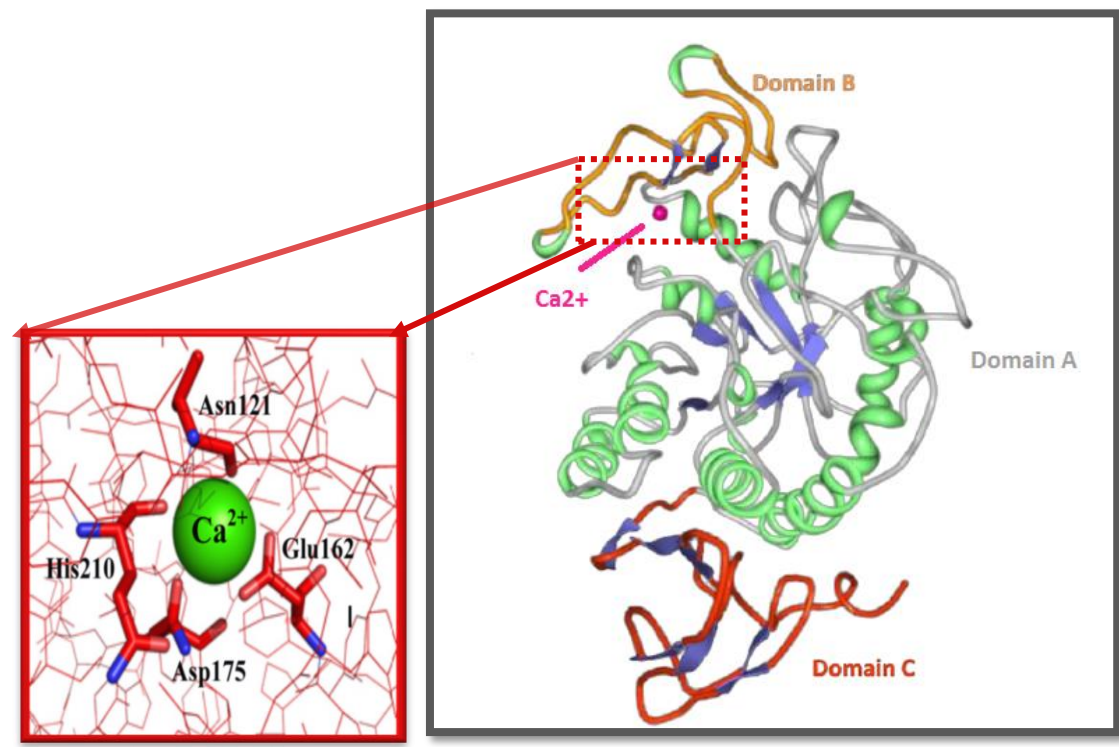


Figure 8 : Domaines de structure de l' α -amylase (Zhang et Xiao, 2016 et ben-abdelmalek et *al.*, 2009).

1.2.4.3 Mode d'action de l' α -amylase

En général, il existe plusieurs modes d'actions des α -amylases. Selon les conditions (température, pH, taille et structure du substrat), l'enzyme peut utiliser l'un

ou l'autre mode et même une combinaison entre plusieurs modes (Nielson *et al.*, 2001) (figure 9).

- **Attaque aléatoire ou au hasard** : n'importe quelle liaison α -(1-4) peut être hydrolysée à partir de l'extrémité réductrice. Elle provoque la formation de glucose, maltose et surtout du D-dextrine.
- **Attaque préférée** : l' α -amylase montre une préférence pour certaines liaisons glucosidiques dans le substrat.
- **Attaque multiple ou répétitive** : elle implique le déplacement de l'enzyme tout au long de la chaîne du substrat et l'enzyme hydrolyse les liaisons glucosidiques sans se dissocier du substrat.
- **Attaque uni-chaîne** : l'enzyme dégrade une chaîne avant de passer à l'autre. Une fois que l'enzyme forme le complexe actif avec le premier substrat, elle catalyse la réaction et ne forme pas un autre complexe actif avec d'autres substrats jusqu'à l'achèvement de la dégradation de la première chaîne.
- **Attaque multi-chaîne** : toutes les chaînes sont dégradées parallèlement (Bédou, 2019).

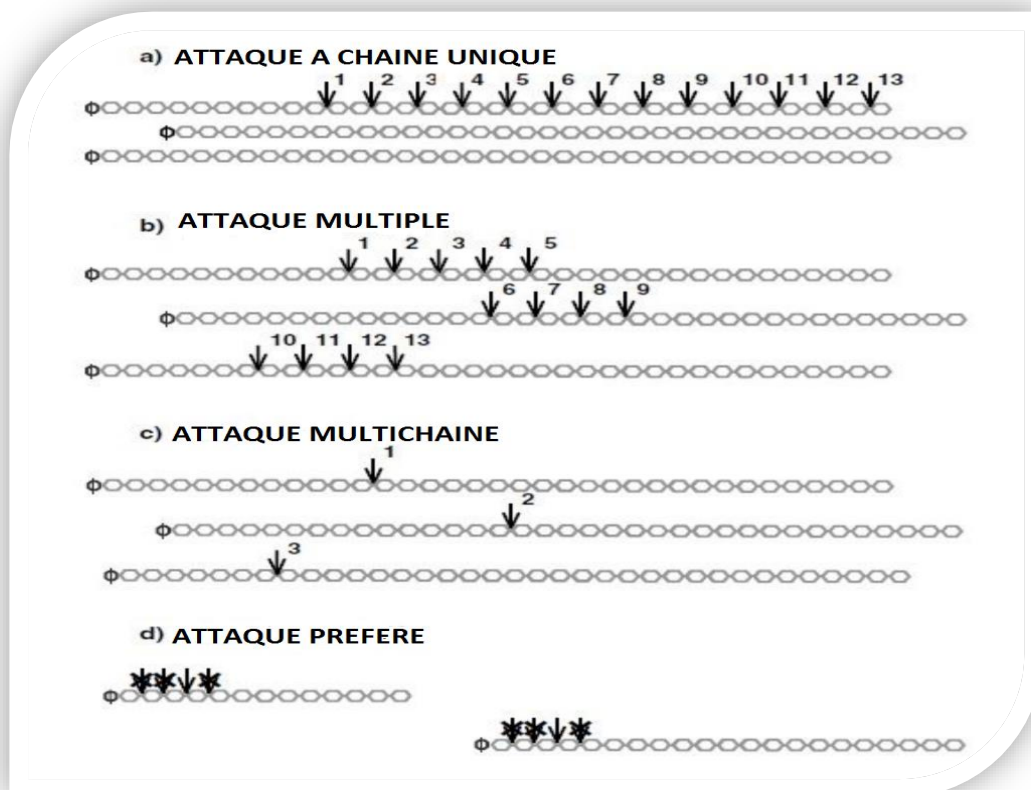


Figure 9 Différents modes d'action de l' α -amylase (Bijtebier, 2008)

1.2.4.4 Mécanisme d'action

➤ Selon l'étude de Lim et Oslan (2021), le mécanisme de l' α -amylase catalyse les liaisons endo-hydrolyse de son substrat tel que l'amidon, et trois résidus des acide aminés interviennent (figure 10):

- ✓ Le glutamate catalyse l'attaque nucléophile du C1.
- ✓ deux Aspartate, le première Asp joue un rôle de nucléophile et aussi il maintient l'acide glutamique en protonosation correct pour l'activité, et le deuxième Asp se lie aux 2^{ème} et 3^{ème} groupe hydroxyle (OH-2, OH-3) du substrat via des liaisons d'hydrogène, déformant le substrat.

Le mécanisme se déroule en 02 étapes :

- Fixation de substrat dans le site actif induit l'acide Glu pour donner un proton à la liaison glycosidique de l'oxygène au centre anomérique, successive avec l'attaque de l'acide aminé Asp nucléophile sur le C1 du sucre et réduit leur extrémité de substrat
- Régénération de l'état initiale et libération d'autre substrat après la formation de la liaison covalente de la molécule de l'eau et départ de glycone (HCO) et pénètre dans le site actif et attaque la liaison covalent entre le glucose, Asp et le C1 du sucre

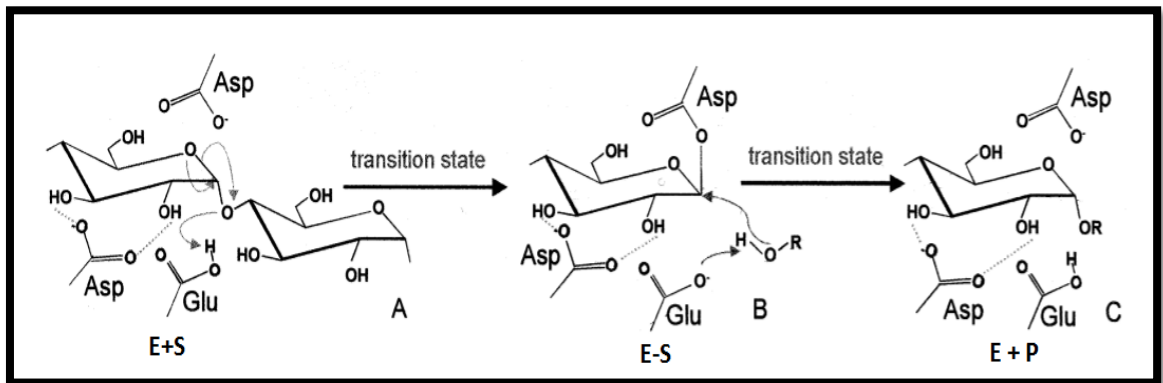


Figure 10 : Mécanisme de l' α -amylase (Lim et Oslan, 2021)

1.2.4.5 Origine de l' α -amylase

L' α -amylase provient de plusieurs sources telles que: les animaux, les plantes, les bactéries et les champignons.

1.2.4.5.1 α -amylase végétale

Il existe de nombreuses plantes (tableau.04) qui produisent de l' α -amylase par exemple : *Arabidopsis sp*, elle joue un rôle important dans la dégradation des liaisons dans l'amidon présent dans les granules de germination en particulier (le riz, les céréales, et le maïs), ainsi que sur le métabolisme, tels que la régulation en cas de l'accumulation dans la plaste et la phosphorylation d'amidon (Elsbeth, 2014 et Stanley, 2005). Les α -amylases d'origine végétale ne sont pas beaucoup utilisées dans le domaine industriel elle est dépendante des contraintes géographiques et saisonnières (John, 2017).

Tableau 05: Sources de l' α -amylase chez les plantes

Sources	Références
<i>Oryza sativa</i>	Dengqun., 2010
<i>Carthamus tinctorius</i>	Ben el elarabi et al., 2009
<i>Hylocereus polyrhizus</i>	Amid et al., 2014
<i>Pachyrhizus erosus</i>	Noman et al. 2006
<i>Triticum aestivum</i>	Singh et al., 2014
<i>Malus pumila</i>	Kanwal et al., 2004

1.2.4.5.2 α -amylase animale

L' α -amylase chez les animaux est présente dans la salive et le pancréas des mammifères (Nouadri, 2011), elle n'est pas beaucoup utilisée dans l'industrie, car son approvisionnement est limité et également son coût est élevé en termes de milieu ou de type d'animal (Khairuddin et al., 2016).

Tableaux 06: Sources animales de la production de l' α -amylase

Sources	Références
<i>Bacterocerra aleae</i>	Delkash-roudsari et al., 2014
<i>Lutzomyia longipalpis</i>	Vale et al., 2012
<i>Sparus aurata</i>	Ma et al., 2004
<i>Salmo salar</i>	Froystadez et al., 2006
<i>Scorpiones</i>	Louati et al., 2010
<i>Sus scrofa domesticus</i>	Tecles et al., 2011

1.2.4.5.3 α -amylase microbienne

Les α -amylases microbiennes sont les plus utilisées dans les différents domaines de l'industrie car elles ne sont pas coûteuse, indépendante des contraintes géographiques et saisonnières, matière première bon marché. Elles sont faciles à manipuler pour la production d'enzymes extracellulaires donc cela évite quelques étapes comme l'extraction (Lim et Oslan, 2021 et Paula et López, 2018).

Les amylases bactériennes les plus utilisées sont celles de *Bacillus sp* comme *Bacillus licheniformis* (Vaseekaram, 2010 et Bano et al., 2011), et *Bacillus staphylothermus* (Li et al., 2010).

Chez les moisissures, l'*Aspergillus sp* est le plus utilisé pour la production de cette enzyme tels que *Aspergillus phoenicis* (Bennasi, 2013), et *Aspergillus tubingensis* (Viktor et al., 2013). Aussi, il a été révélé que *Penicillium sp* (Saleem et mohsen, 2014), ainsi que *Cylindrocephalum* (Sunitha et al., 2012) sont de bons producteurs de l' α -amylase.

Tableau 07: Sources microbiennes de la production d' α -amylase

Sources	Origine	Références
<i>Tepidimonas fonticaldi</i>	Bactérie	Allala et al., 2019
<i>Bacillus pacificus</i>	Bactérie	Alonazi et al., 2021
<i>Bacillus subtilis</i>	Bactérie	David et al., 2017
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Bactérie	Du et al., 2018
<i>Bacillus licheniformis</i>	Bactérie	Wu et al. 2017
<i>Anoxybacillus flavithermus</i>	Bactérie	Aguloglu et al., 2016
<i>E.coli</i>	Bactérie	Emtenani et al., 2015
<i>Geobacillus bacterium</i>	Bactérie	Fincan et Enez., 2014
<i>Streptomyces fragilis</i>	Bactérie	Nithya et al., 2017
<i>Geobacillus bacterium</i>	Bactérie	Sudan et al., 2018
<i>Penicillium chrysogenum</i>	Fongique	Dar et al., 2015
<i>Trichoderma pseudokoningii</i>	Fongique	Abdulaal, 2018
<i>Talaromyces pinophilus</i>	Fongique	Xian et al., 2015
<i>Aspergillus niger</i>	Fongique	Oluwabunmi, 2019
<i>Aspergillus flavus</i>	Fongique	Karim et al., 2018
<i>Rhizopus oryzae</i>	Fongique	Hadef et al., 2017
<i>Aspergillus terreus</i>	Fongique	Kumar et al., 2016

Peu étude ont été réalisées sur la production de α -amylase chez levures. Ces microorganismes sont favorables dans le domaine de l'industrie à cause de leur adaptation au milieu, croissance rapide, faciles à manipuler, avec des moyens et des conditions simple et peu couteuses,

Différents travaux ont été réalisés sur la production de l' α -amylase levurienne par *Pichia pastori* (Gandhi et al., 2015), *Clavispora lusitaniae* (Dakhmouche-Djekrif, 2016) et *Talaromyces pinophilus* (Xian et al., 2015).

Tableau 08 : Levures productrices de l' α -amylase

Souches	Références
<i>Cryptococcus flavus</i>	Kenya et al., 2004
<i>P.membranaefacins</i>	Salah et al. 2021
<i>Streptomyces sp</i>	Santos, 2012
<i>Pichia pastoris</i>	Huang et al., 2017
<i>Trichosporon cutaneum</i>	Wang, 2015
<i>Candida tropicalis</i>	Hesham et al., 2020
<i>Pichia kluyveri</i>	
<i>Candida parapsilosis</i>	
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	Aguero et al., 2015
<i>Candida glabrata</i>	
<i>Clavispora lusitaniae</i>	Dakhmouche, 2016
<i>Lipomyces sp</i>	Wanderly, 2014

1.2.5 Production d' α -amylase

L' α -amylase alcaline est produite par les deux processus, la fermentation en milieu solide (FMS) et la fermentation en milieu liquide (FML) (figure 11). Le substrat peut être issu des déchets agricoles et industriels comme les déchets bananes utilisé comme source de nutriments, soit simplement un support imprégné par des nutriments appropriés qui permettent le développement des micro-organismes et la production d'enzymes utilisés dans les domaines industriels (Paula et al., 2010 et Couto et Sanromán, 2006).

La production de l' α -amylase a été étudiée par FMS chez *Candida glabrata* (Laiche et Siboukeur, 2018 et Aguero et al., 2015), et chez *Pichia pastorie* (Huang et al., 2017) et par fermentation en milieu liquide (FML) chez *Aspergillus sp* (Aggarwal, 2019). Par ailleurs D'autres études ont comparé la production alpha amyliasique par les deux types fermentations chez *Anoxybacillus amylolyticus* (Finore et al., 2014).

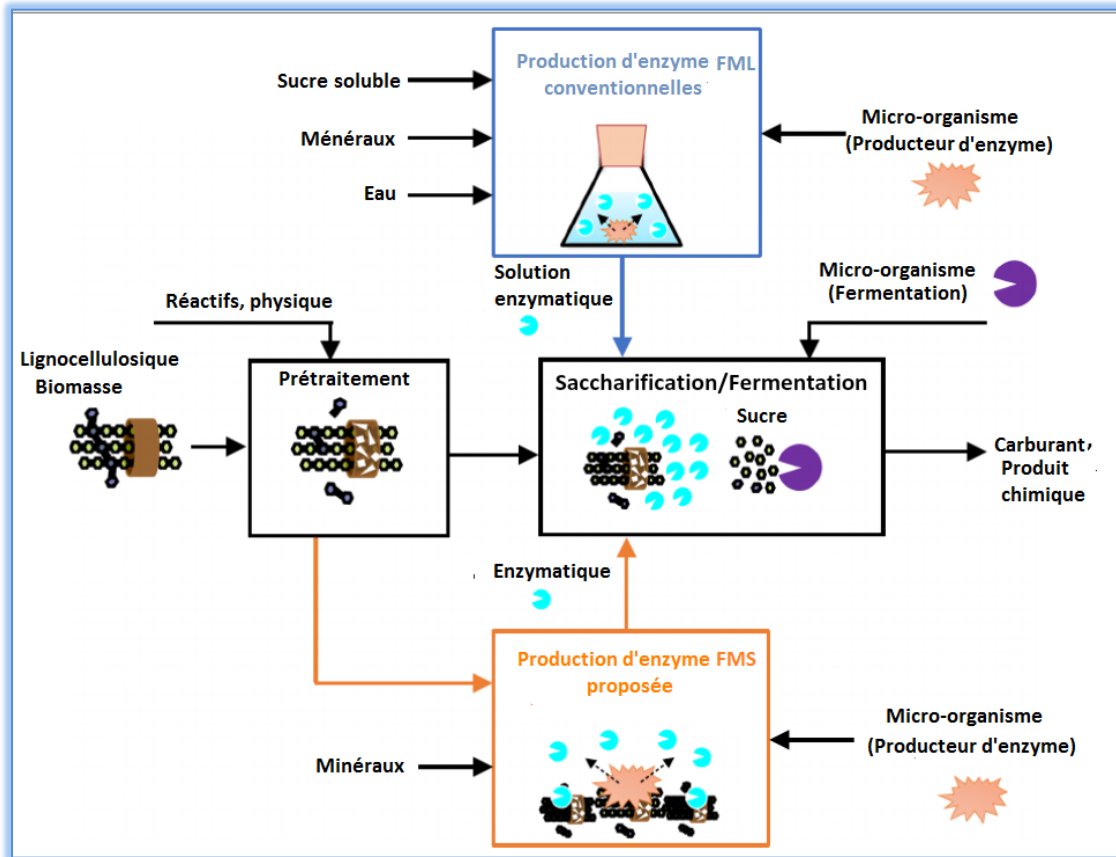


Figure 11: Production d'enzymes par fermentation en milieu solide (FMS) et fermentation en milieu liquide (FML) (Schinkawa et Mitsuzawal, 2020).

1.2.5.1 Facteurs influençant la production de l' α -amylase

1.2.5.1.1 Source de carbone

Les levures sont des chimiohétérotrophes, elles ont besoin de composés organiques carbonés, servant à la fois comme source de carbone et source d'énergie pour leur développement. Toutes les levures sont capables de métaboliser le glucose, le fructose et le mannose (Walker, 2009).

Selon Kutzman et Suzuki (2010) d'autres saccharides, des polyols, des alcools (éthanol, méthanol, glycérol), des polysaccharides (amidon soluble, pectine), l'acide lactique et l'acide citrique peuvent être utilisés par les levures grâce aux enzymes de leur capital génétique. Aussi, l'amidon et le glycérol étaient connus pour augmenter la production d'enzymes par *B. subtilis* IMG22, *Bacillus sp.*, PS-7 et *Bacillus sp.*1-3 (Maryam et al., 2010).

Des sources de carbone telles que le galactose, le glycogène et l'inuline ont été signalées comme des substrats appropriés pour la production d'amylases par

B.licheniformis et *Bacillus.sp.1-3* (Xusheng et al., 2011).

Les déchets agricoles sont également, utilisés pour la fermentation liquide et solide afin de réduire le coût des milieux de fermentation, ils constituent une source de carbones et d'azote nécessaire à la croissance et au métabolisme de l'organisme. Ces sources de nutriments comprennent les déchets d'orange, de banane, l'amidon de millet, la pomme de terre, le maïs, le tapioca, le blé et le riz sous forme de farines (Lin Hui et al., 2011)

Le glucose peut avoir un effet répressif et inhibiteur sur l'assimilation d'autres sucres par les levures (Walker, 1998).

Les souches de *Schwanniomyces castellii*, *S. fibuligera* produisent la biomasse à partir de l'amidon non hydrolysé (à partir des pommes de terre ou leurs pelures, l'amidon soluble) (Ouédragao et al., 2012) et les hydrolysats de plantes et le moût de pomme, (Bekatorou et al., 2006)

1.2.5.1.2 Source d'azote

Les levures poussent sur des milieux riches en sources azotées organiques (peptone, extrait de levure et autres). L'extrait de levure constitue le principal stimulateur de la croissance microbienne en particulier pour les levures (Deak, 2006).

Une grande variété de composés organiques azotés (glutamine, acide aspartique, peptides, bases purines et pyrimidines, amines, peptone et urée...) peut couvrir également les besoins azotés de la levure (Deak, 2006).

1.2.5.1.3 Oligoéléments et facteurs de croissance

Comme la plupart des microorganismes, les levures ont besoin d'éléments nutritifs pour assurer un développement adéquat au cours de la production d'enzyme. Il s'agit des sels minéraux et d'oligoéléments nécessaires à de très faibles concentrations. De plus, d'autres facteurs leur sont essentiels, comme les vitamines (la biotine, la thiamine et l'acide nicotinique, riboflavine, phosphate pyrodoxal) et les acides aminés, (glycine, L-lysine) et aussi des sels de Mg^{2+} et de Zn^{2+} . Ces facteurs interviennent lors des réactions enzymatiques, comme des éléments constitutifs des coenzymes variés, (Bhardwaj et Angayarkanni, 2015 et Walker et Stewart, 2016).

1.2.5.1.4 Température

La levure, comme les autres microorganismes, ne peut se développer que dans une gamme de température «optimale» située généralement entre 25°C et 30°C, jusqu'à une température critique au delà de laquelle elle ne peut survivre. Dans la majorité des cas, la température ne reste pas constante pendant la croissance. Les levures peuvent y résister, mais cette dernière peut avoir des effets sur le métabolisme qui diffèrent d'une souche à une autre.

Certains travaux ont bien montré, chez certaines levures et en particulier chez *S. cerevisiae*, qu'une température supérieure à 30°C accroît la vitesse de production de certains métabolites comme l'éthanol (Aldiguier *et al.*, 2004), mais augmente la sensibilité et accroît l'effet néfaste des stress (chocs osmotiques, inhibition par l'éthanol) en entraînant une diminution de la viabilité (Beney *et al.*, 2001) et de l'activité cellulaire (Maréchal *et al.*, 1999).

Toutefois, il a été démontré que la température de croissance influe sur la composition en acides gras des membranes plasmiques (Watson et Rose, 1980). Ainsi la membrane cytoplasmique des cellules cultivées à température élevée est plus résistante aux dénaturations thermiques que celle des cellules cultivées à basse température (Rezki ; 2014)

La température optimale dépend de si la culture est mésophile ou thermophile. Parmi les champignons, la plupart des études sur la production d'amylase ont été réalisées avec des champignons mésophiles dans une plage de températures de 25 à 37 °C (Takahiro *et al.*, 2011). Une amylase brute dégradant l'amidon a été produite par *Aspergillus ficum* à 30°C par Hayashida *et al.* en 1986. La production d'amylase à un niveau optimal a été rapportée entre 50-55 °C pour les cultures fongiques thermophiles telles que *Talaromyces emersonni*, *Thermomonospora fusca* etc (Ahmad *et al.*, 2010). Les micro-organismes thermophiles poussent à des températures comprises entre 45-80°C (Rudiger *et al.*, 1995 et Madigan et Martino, 2006).

Dans une étude portant sur 600 souches et plus de 100 espèces des genres de *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Debaryomyces*, *Pichia*, *Candida*, 98% des levures ont une température de croissance comprise entre 24 et 48 °C (Deak, 2006). La levure *Candida thermophila*, isolée du sol en Corée, croît à 51°C (Shin *et al.*, 2001). Contrairement aux procaryotes, la plupart des eucaryotes ne résistent pas à des températures supérieures à 60 °C (Madigan *et al.*, 1997).

Raspor et Zupan (2006) notaient une survie des eucaryotes à des températures élevées impliquant probablement la stabilité des membranes des organelles qui doivent rester assez poreuses pour permettre le passage des molécules telles que l'ATP et l'ARN.

1.2.5.1.5 pH

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

La nature de l'acide (forme dissociée ou non) a une grande importance. Les levures supportent la plupart des acides organiques et sont inhibées par les acides lactique, citrique et acétique et elles le sont encore plus avec les acides sorbique et propionique (**Rezki, 2014**).

1.2.5.1.6 Pression osmotique et activité de l'eau

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

1.2.5.2 Type de fermentation pour la production d' α -amylase

Des l' α -amylase microbiennes sont maintenant industriellement produites, par des espèces de *Bacillus*, *Aspergillus* et *Rhizopus*, par fermentation liquide ou solide (**Niehaus et al., 1999** et **Belen et al., 2006**).

1.2.5.2.1 Fermentation en milieu solide (FMS)

Selon Rahardjo et al (2006) la fermentation sur milieu solide est défini comme des particules sur matière solide avec l'absence d'eau, Cette technique est la plus adaptée pour les microorganismes à savoir les levures (**Gervais et al, 2003**)

La fermentation en milieu solide est utilisée pour divers buts notamment la production

d'enzymes (amylases, cellulases...), dans l'alimentation humaine (fromage, production de champignons) (Cattalan et Sanchez, 2020).

FMS c'est une technique simple permettant une grande productivité et une meilleure circulation de l'oxygène, la matière première utilisée est à faible coût, et elle ressemble à l'habitat naturel de plusieurs micro-organismes (Couto et Sanroman, 2006).

1.2.5.2.2 Fermentation en milieu liquide (FML)

C'est la croissance microbienne dans un milieu nutritif contenant un grand volume d'eau (Dandey, 2003 et Francis, 2011).

Selon Mouas (2016), la fermentation en milieu liquide agité a été utilisée, dans la production industrielle des enzymes en raison de la facilité du contrôle des différents paramètres comme le pH, la température, l'aération et l'humidité.

Ces procédés sont aussi bien aérobiques qu'anaérobique mais ils nécessitent des conditions de stérilisation strictes et ils sont particulièrement bien adaptés aux cultures de microorganismes unicellulaires comme les bactéries (Dhillon et al., 2010).

1.2.6 Purification d' α -amylase

La purification de l' α -amylase se fait par plusieurs techniques telles que précipitation par le sulfate d'ammonium, la dialyse, la chromatographie gel filtration, échangeuse d'ions, et SDS-PAGE.

L'extrait brut peut être utilisé directement sans le purifier ou partiellement purifier si l'enzyme va être utilisée dans l'industrie du textile, du papier et des détergents par contre dans l'industrie pharmaceutique ou alimentaire, l'enzyme doit être complètement purifiée avec un taux de purification élevé. Kenya et al. (2004) pour purifier l' α -amylase *Cryptococcus flavus* a utilisé la gel filtration sur sephacryl-S100 et SDS-PAGE. Gauraw et al. (2011) ont juste précipité l'enzyme par le sulfate d'ammonium (60%) et ont réalisé une SDS-PAGE, Celusk et al. (2015) ont utilisé la précipitation par le sulfate d'ammonium et la chromatographie d'affinité pour l' α -amylase de *Yarrowia lipolytica*, et pour l'enzyme de *Pichia burtonii*. Takeuchi et al. (2006) ont utilisé plusieurs méthodes à savoir, DEAE-sepharose, chromatographie sur sephacrylS-300 et sur séphadex G-75 et aussi une SDS-PAGE.

1.2.7 Facteurs influençant l'activité amylasique

1.2.7.1 pH optimum

Les α -amylases sont généralement stables dans une gamme de pH de 4 à 8 (Laiche et Siboukeur, 2018), avec un pH optimum situé entre 4 à 5 pour les α -amylases fongiques (Ait Kaki *et al.*, 2012), 6 à 8.5 pour les α -amylases bactériennes e 6 à 7 pour les α -amylases végétales (Saini *et al.*, 2017).

Tandis que, Le pH optimum de l'enzyme des levures varie, généralement, entre 4 à 6,5 (Zoubiri, 2017)

1.2.7.2 Température optimale

En général, les α -amylases ont une température optimale comprise entre 25 °C et 70 °C (Toumi, 2018). Celle des α -amylases bactériennes varie de 50 °C à 90 °C accompagnée avec une résistance thermique à des températures très élevées chez des souches thermophiles (Nouadri, 2011 et Zoubiri, 2017). Cependant, la température optimale des α -amylases fongiques est de 40°C à 60°C (Bakri *et al.*, 2009). Et pour la température optimale de α -amylase végétale, elle diffère d'une espèce à une autre et varié entre 5 à 75°C (Saini *et al.*, 2017).

Tableau 09 : Caractéristiques de l' α -amylase levuriennes

Espèces	pH optimum	Temperature optimum	Référence
<i>Endomycopsis capsularis</i>	4,5	40-50 °C	Panchal, 2020
<i>Filobasidium capsuligenum</i>	5,6	55 °C	Kar et Ray, 2008
<i>Lipomyces kononenkoa</i>	5,5	40 °C	Ramachandran <i>et al.</i> , 2005
<i>Pichia burtonii</i>	5	40 °C	Takeuchi <i>et al.</i> , 2006
<i>Cryptococcus flavus</i>	5	50 °C	Barros <i>et al.</i> , 2009
<i>Shwanniomyces occidentalis</i>	5,5 et 6,5	70°C	Fossi <i>et al.</i> , 2004
<i>Saccharomyces cerevisia</i>	5	55°C	Sakwa <i>et al.</i> , 2018
<i>Clavispora lusitaniae</i>	9	75°C	Dakhmouche, 2016

1.2.7.3 Thermo stabilité

les amylases microbiennes ont une forte thermostabilité (30°C–60°C) (**Park et al., 1997**), Les α -amylases bactériennes ont une grande stabilité thermique (**Toumi, 2018**), alors que celle des champignons est généralement assez faible (**Nouadri, 2011**).

1.2.7.4 Effecteurs

Toutes les α -amylases connues contiennent un ion calcique entre les domaines A et B (**Lindenetal., 2003**). Cet ion de calcium est indispensable pour la stabilité et l'activité des α -amylases. Si le calcium est éliminé expérimentalement, l' α -amylase perd ses propriétés catalytiques d'une façon réversible (**Larson et al., 1994**).

Le calcium est éloigné du site actif pour contribuer directement à la catalyse ce qui explique son rôle structural et il joue également un rôle dans la stabilisation de la thermostabilité d'une amylase. cela peut s'expliquer par le fait que le relargage des résidus hydrophobes par l'ion calcium dans la structure protéique conduit à la formation d'une structure compacte donc le calcium ne participe pas directement à la formation de complexe enzyme-substrat mais il maintient l'enzyme dans une conformation optimale pour un maximum d'activité et de stabilité vis à vis de la dénaturation thermique (**Savcheko et al., 2002 ; Peixoto-Nogueira et al., 2008**).

Certaines α -amylases contiennent une triade métallique calcium—sodium—calcium qui fait le pont entre les domaines A et B et contribue donc au maintien et la stabilité conformationnelle des protéines ainsi que la résistance à l'inactivation thermique de l'enzyme (**Khajeh et al., 2001 et Goyaletal, 2005**) d'autres α -amylases possèdent deux ions de sodium qui conservent la structure et la fonction de l'enzyme, au lieu des ions calcium (**Lee et al., 2006**).

Les ions Cl^- , Zn^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{2+} sont également des activateurs de l' α -amylase (**Saini et al., 2017**) car ils augmentent l'affinité de l'enzyme pour le calcium, par conséquent, il est fort probable que la liaison de ces ions induisent également des changements du conformation autour du site actif ou se situent au site actif ce qui améliore l'efficacité catalytique de l'enzyme. l'activité reste intacte, en présence de K^+ , Na^+ , NH_4^+ (**Nouadri, 2011**) mais elle est fortement inhibée par l'acide formique, l'urée, l'acide oxalique, l'acide citrique et par l'EDTA et les métaux lourds (**Amutha et Jaya, 2011**).

1.2.8 Applications industrielles de l' α - amylase

Les amylases ont des applications potentielles dans un certain nombre de processus industriels tels que dans les industries alimentaires, textiles, papetières, panification, détergents, jus de fruits, boissons alcoolisées, édulcorants, aide digestive et détachant dans le nettoyage à sec...etc. (figure 12) (**Saranraj et Stella, 2013 et Singh et al., 2011**).

Actuellement, les α -amylases microbiennes sont parmi les enzymes les plus utilisées en raison de leur productivité et thermostabilité (**Mobini-Dehkordi et Javan, 2012**).

1.2.9 Utilisation de l' α -amylase dans les industries alimentaires

L' α -amylase est utilisée dans les différentes industries alimentaires, (figure12) :

2. Glucoserie

Solubilisation de l'amidon, accompagné d'une importante viscosité (liquéfaction) (**Alais et al., 2008**) .

3. Sucrierie

Réduction de la viscosité des sirops et de canne a sucre, en hydrolysant les contaminants amylicés pour assuré le processus de cristallisation (**van der et al., 2002**).

4. Biscuiterie

Amélioration des propriétés rhéologique et fermentaires de la pate, ainsi que le volume de la mie et la coloration de la croûte (**Pandey et al, 2000**).

5. Boissons alcoolisées

Le rôle, le plus ancien des levures est la fabrication de boissons alcoolisées (bière, vin, cidre), (**Deak, 2007**). Cette fabrication repose sur la fermentation alcoolique, qui consiste à transformer les sucres simples en alcool. Ainsi, elles interviennent au cours de la vinification et de l'élaboration de la bière. L'espèce la plus utilisée par l'homme est *Saccharomyces cerevisiae*, appelée aussi levure de bière (**Hencké, 2000**).

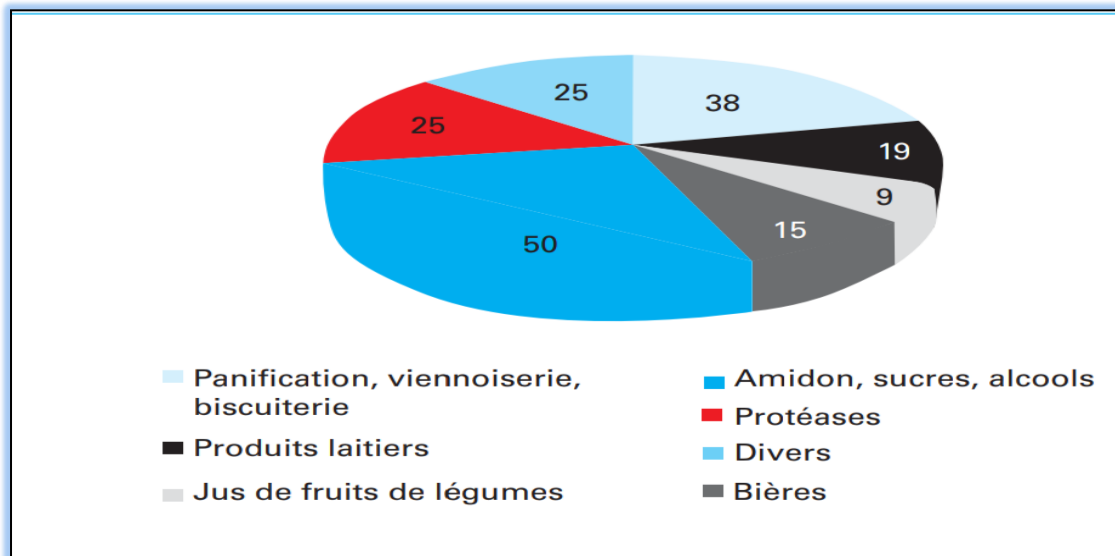


Figure12 : Répartition de l'enzyme dans le secteur agro-alimentaire (Spinnler et al, 2013).

1.2.10 Autres Domaines d'application de l' α -amylase

L' α - amylase est utilisée, aussi, dans d'autres secteurs industriels (figure 13)

A- Domaine pharmaceutique

Les α -amylases sont utilisées comme

- Agents anti- inflammatoires
- Des aides pour le traitement des troubles digestifs (Mobini-Dehkordi et Javan, 2012), tels que : les dyspepsies et les fermentations intestinales (Nouadri, 2011)
- Traitement de diabète et de l'obésité (Niélsion et al, 2001).

B- Domaine médical

Une concentration plus élevée que la normale des α -amylases peut refléter plusieurs atteintes médicales, y compris une inflammation aiguë du pancréas mais également un ulcère gastroduodéal perforé, une torsion d'un kyste ovarien, un iléus d'étranglement et des oreillons. L'amylase peut être mesurée dans d'autres fluides corporels, y compris l'urine et le liquide péritonéal (Saranraj et Stella, 2013; Singh et

al, 2011).

C- Domaine de biologie moléculaire

En biologie moléculaire, la présence de l' α -amylase peut servir comme cible mutationnelle dans la méthode de sélection des cellules ayant inséré un gène étudié (Mobini-Dehkordi et Javan, 2012). Une intégration réussie perturbera le gène de l'amylase et empêchera la dégradation de l'amidon, qui est facilement détectable par coloration à l'iode (Singh et al., 2011).

D- Industrie de détergent

L'utilisation d'enzymes dans les détergents a augmenté avec les méthodes changeantes de la vaisselle et de lessive. Les consommateurs préfèrent utiliser de l'eau froide et des conditions douces. Plus tôt les produits chimiques utilisés dans les détergents ont causé des dommages en cas d'ingestion et les conditions de la vaisselle étaient très dures. Cependant, les enzymes microbiennes ont montré à l'industrie un chemin alternatif. car disponibles et facile à manipuler (Mitidieri et al., 2006).

E- Désencollage des textiles

L'amidon est un agent d'encollage préféré car il est facilement disponible, moins coûteux. La couche de l'amidon est soumise à une hydrolyse dans le procédé de désencollage où l' α -amylase est utilisée pour cliver des particules d'amidon au hasard en composants solubles dans l'eau qui peuvent être éliminés par lavage. L'enzyme agit spécifiquement sur les molécules d'amidon seul, en laissant les fibres non affecté (Ahlawat et al., 2009).

F- Industrie de biocarburant

L'amidon est un produit de départ économique, il est utilisé pour la production d'éthanol en tant que biocarburant. (Moraes, et al., 1995).

Ceci est réalisé dans une série d'étapes. Tout d'abord, l'amidon est soumis à une Gélatinisation pour former une suspension d'amidon visqueux. Ceci est suivi par le processus de saccharification, où l'amidon est hydrolysé par l' α -amylase pour obtenir

les sucres fermentescibles et pour produire de l'éthanol. (Chi et al, 2009).

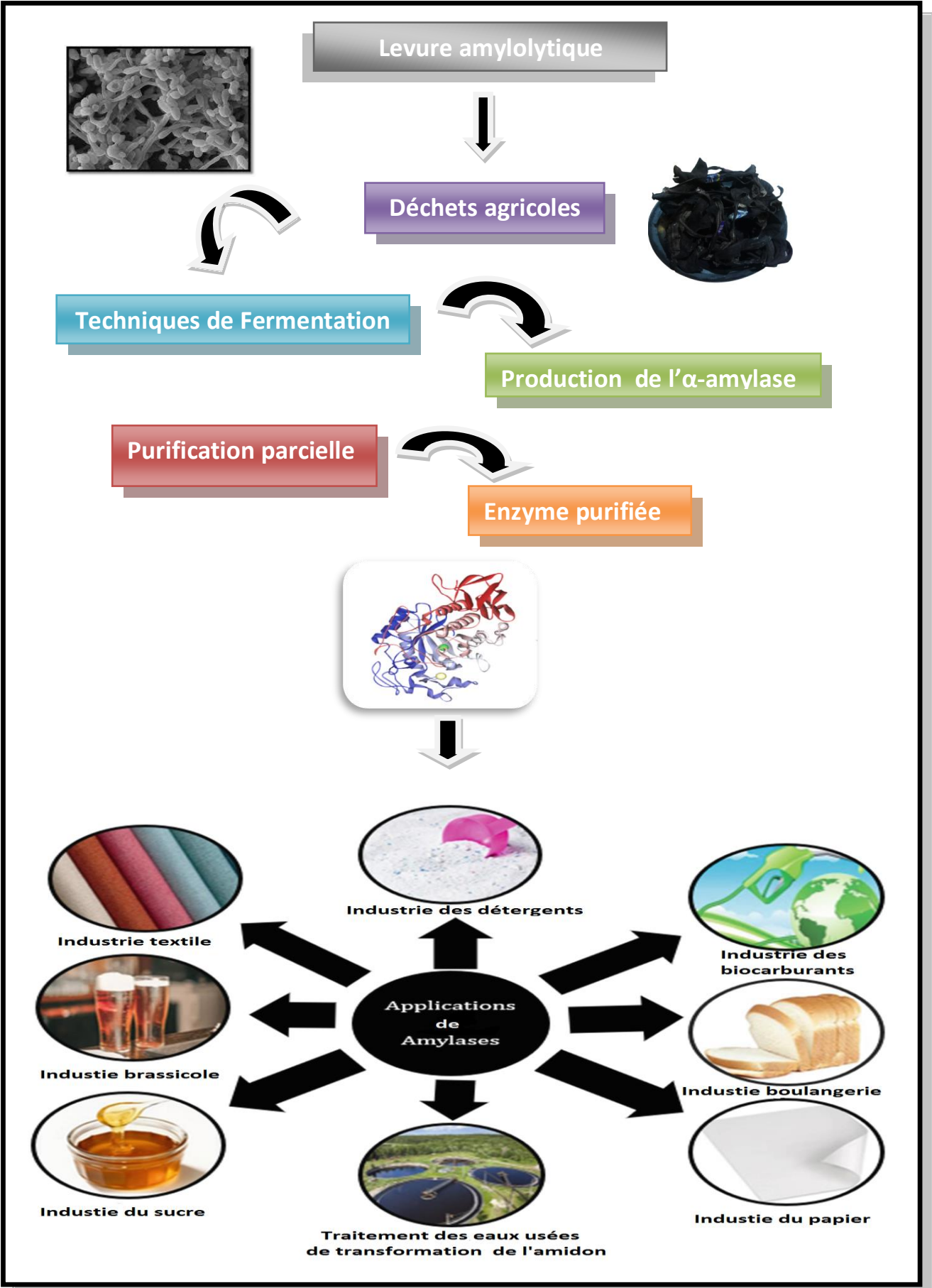


Figure 13 : Application de l' α -amylase (Bhatt et al., 2020).

1.3.1 Déchets agricoles

Les déchets agricoles appelés agro-déchet sont définis comme déchets alimentaires ou de récolte (fruits, produits laitiers, déchets d'animaux, déchet agriculture). Parmi les fruits, la banane est très consommée dans le monde, car elle n'est pas cher et les récoltes sont abondantes (Obi et al., 2016)

1.3.2 Banane

Selon Arurore et al. 2009, le bananier (*Musa sp.*) n'est pas un arbuste mais une plante herbacée car il ne possède pas de tronc. On dit que c'est la plus grande herbe du monde c'est un élément nutritionnel essentiel par rapporte à d'autres fruits, considéré comme une source d'énergie

Plusieurs pays (figure 14) produisent et exportent des bananes comme l'Inde, le Brésil, Equateur et la Chine. La production de bananes est de 32,8 % en Inde, de 11,4% en China, 8,1% en Indonésie, 10,1% en Brésil, et 22.3% en Philippine.

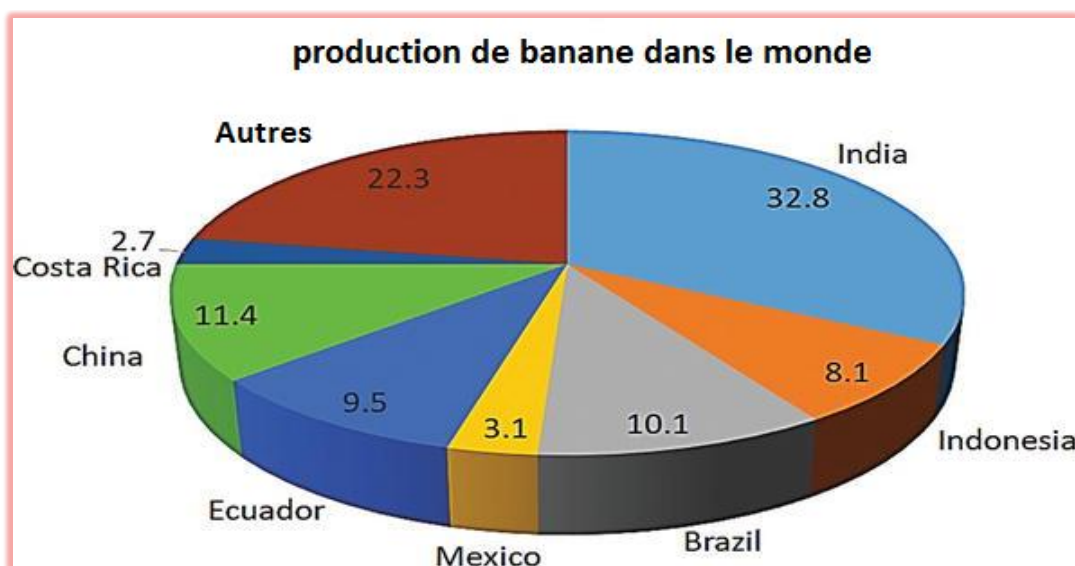


Figure14 : Production de banane dans le monde (Subagyo et Chafidz, 2018).

1.3.3 Origine

Selon Prabha et Kumar (2015), les bananiers sont originaires d'Asie et sont cultivés depuis près de 1000 ans, la première trace en Guinée. La banane est reproduite par les graines (Figure 16). La banane est le nom commun des plantes herbacées et des fruits qu'elles produisent. Il existe plusieurs types de bananes avec une variété de tailles et de couleurs à maturité, y compris le jaune, le violet et le rouge (figure 15).

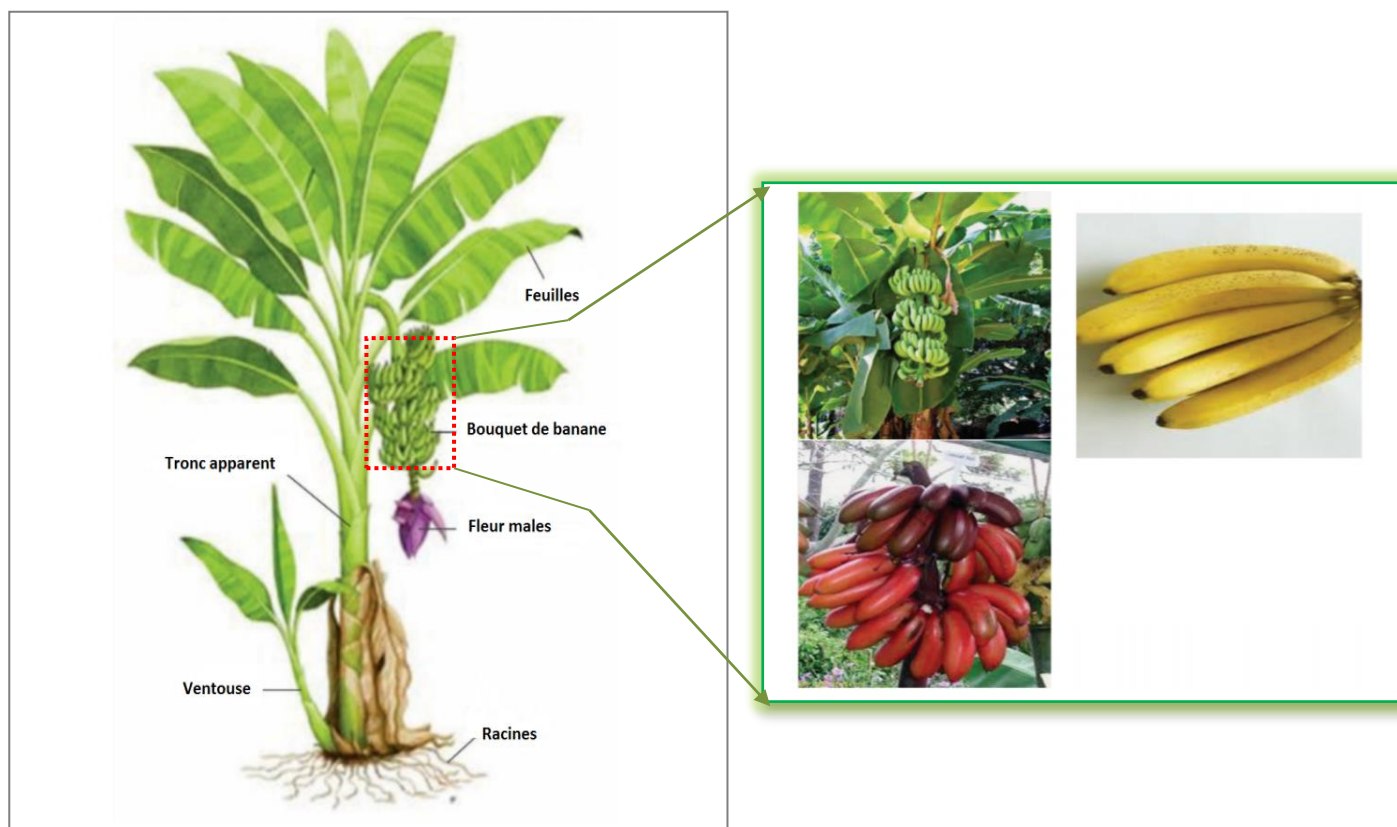


Figure15 : Bananier et banane de divers maturités (Sidhu et Zafar, 2018 et Acevedo et al., 2021)

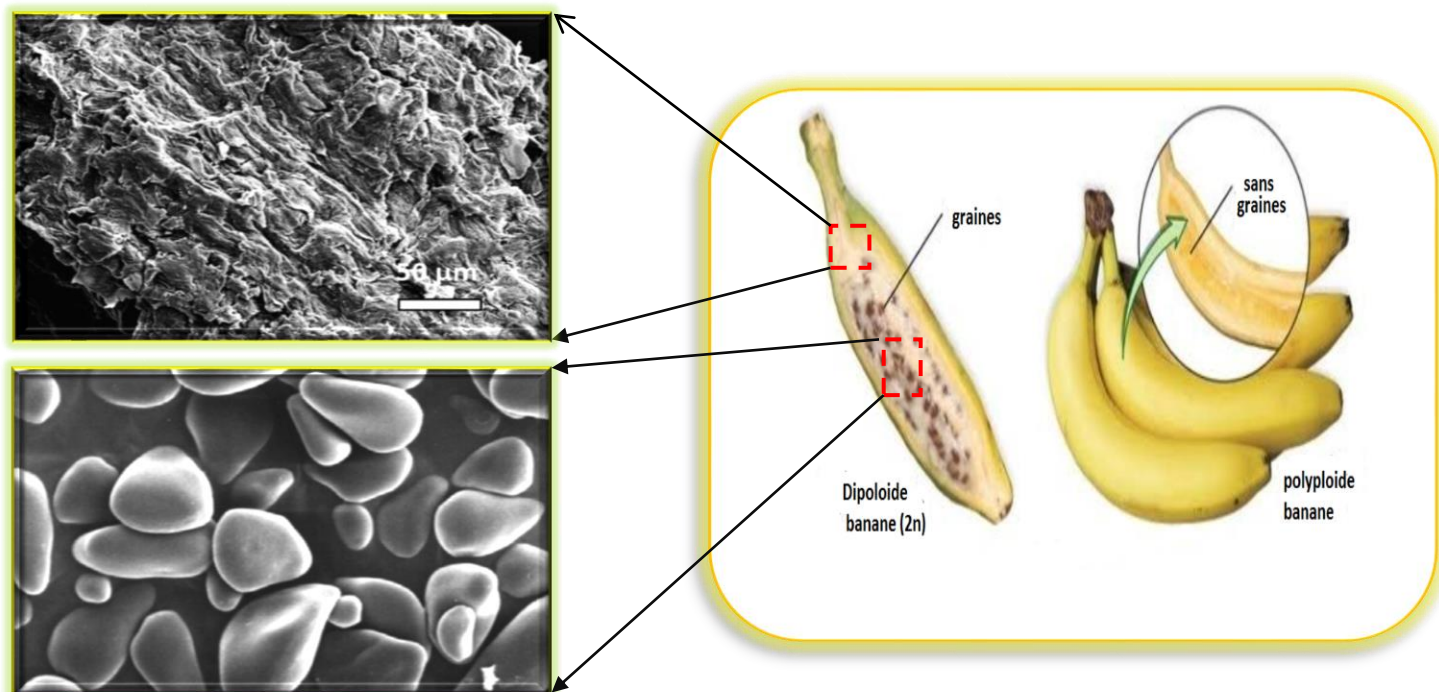


Figure 16: Déchet de banane et l'amidon (Yang, 2018 et Li et al., 2018 et Osbay et al., 2019)

1.3.4 Caractérisation de déchet de banane

Selon Li et *al.* (2018) a été trouvé que le déchet de banane constitue une ressource importante d'amidon, une matière première pour l'industrie et transformation d'alimentaire, les granules d'amidon ont une structure semi-cristalline et stable, possède plusieurs tailles et formes selon l'origine végétale, l'amidon de déchet de banane se compose d'environ 56,95- 75% de glucides.

Kabenge et *al.* (2015), la composition de déchet de banane est la suivante : le carbone entre 34 et 35%, l'hydrogène entre 4,5 et 9%, l'oxygène de 40 à 45%, l'azote 3% et soufre inférieur 1% (figure17)

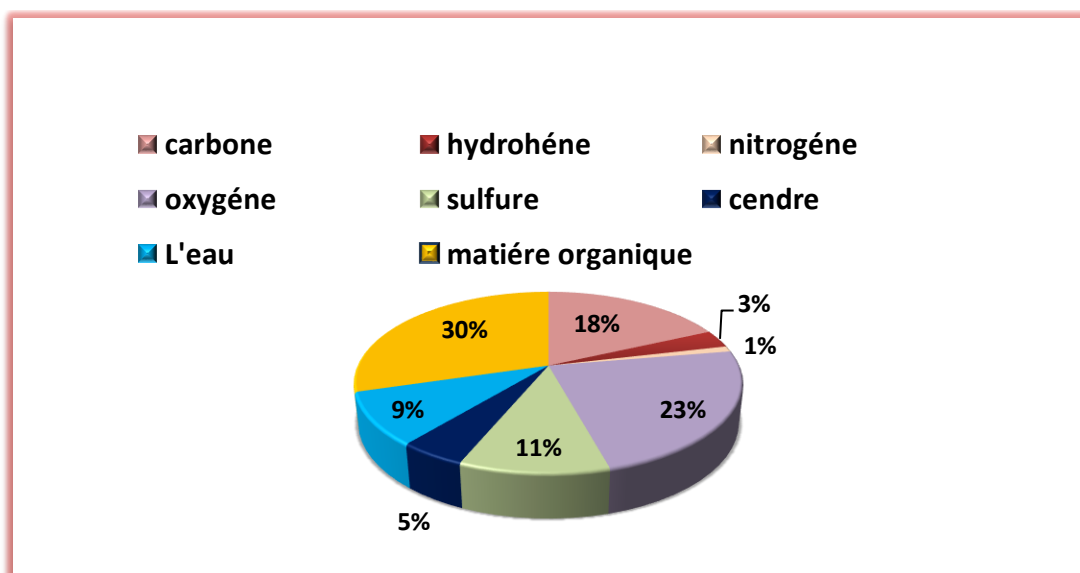


Figure 17 : Composition chimique des déchets de banane (Kabenge et *al.*, 2015).

D'après la composition chimique Samuel (2015) et Acevedo et *al.* (2021) ont trouvé que les déchets de banane sont riches en fibre 5,82g en polysaccharide et en glucide environ 22-88g, en phénol 1-8g, en protéine 1-2g, en lipide 0,3-1,78g, avec d'autre élément essentiels tel que le magnésium, le calcium, le potassium, le sodium, la vitamine C et la chlorine (figure18).

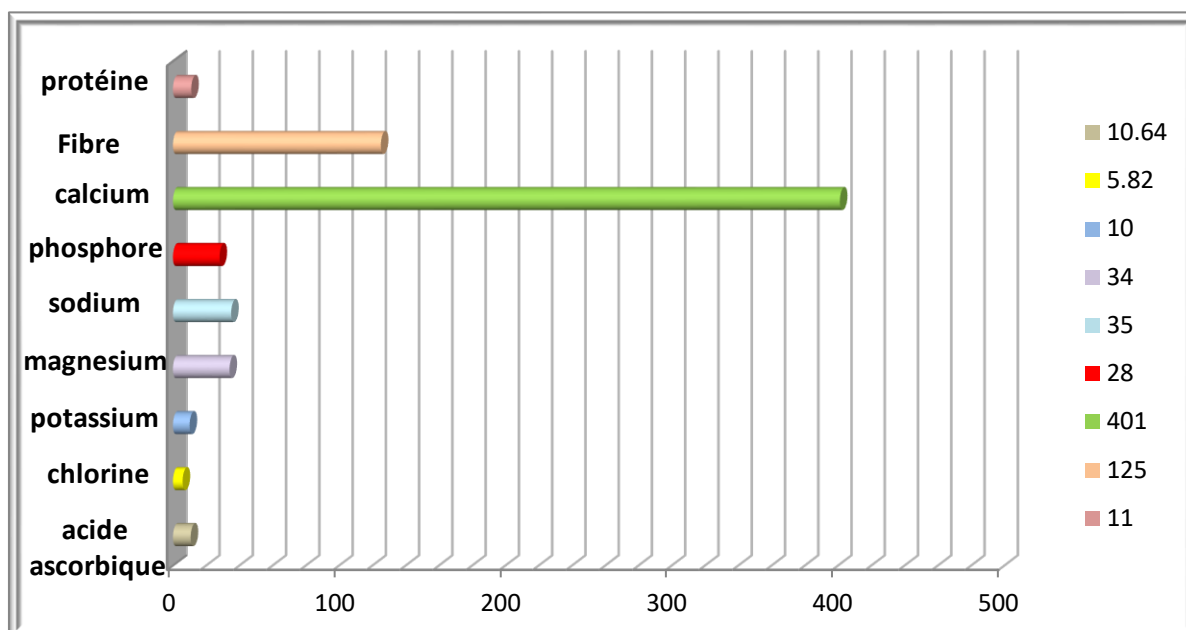


Figure 18: Composition nutritionnel chimique de déchet de banane (Samuel et al., 2015).

1.3.4 Application de déchet de banane

D'après Padam et al. (2014), les déchets agricoles sont utilisés dans différents processus tels que les biocarburants, le traitement des eaux usées, les bioplastiques, les engrais organiques.

Ainsi les déchets de banane à faible coût, produits de l'agro-industriel ont été utilisés dans la fermentation pour divers production enzymatique. Zehra et al. (2020) ont utilisé le déchet de banane pour la production de la pectinase.

Krischna et al. (2012) ont produit l' α -amylase d'*Aspergillus niger* par fermentation en milieu solide et ils ont utilisé les déchets de banane comme substrat et support.

Saccharomyces cerevisia et *Bacillus sp.* ont été cultivé sur les déchets de banane pour produire l' α -amylase (Guerrero et al., 2018). Aussi, Gana et al. (2014) ont étudié la production d'enzymes amylolytiques sur les déchets de banane chez la levure *Pichia sp.*

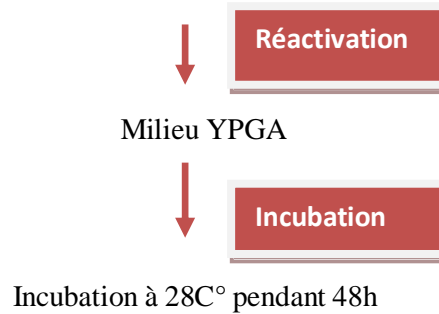
MATERIEL ET METHODE

- **Matériel biologique**

2 Réactivité de la levure

La souche de levure isolée et conservée dans la mycothèque du laboratoire de GMA

Souche conservée dans les cryobilles à (-80C°)



2.1 Identification de levure

- L'identification de levure se fait par la galerie ID 32C contenant 30 cupules, chacune contient un substrat carboné sous forme déshydratée.
- Quelques colonies sont suspendues dans de l'eau distillée stérile jusqu'à l'opacité Mac Ferland 2, 250 µl sont transférés dans une ampoule de milieu semi-solide APIC fourni avec la galerie (figure 19).
- Après homogénéisation, chaque cupule de galerie estensemée par 135µl du milieu APIC. La galerie recouverte est incubée à 30C° pendant 48h.
- La lecture visuelle est réalisée après 24h et 48h. Après comparaison au contrôl (O) le test est positif si la capsule est plus trouble que le contrôl et le résultat de la galerie est sous forme d'un code. L'identification de la levure à partir de ce code est réalisée à l'aide de site de donnée d'APIWEB,

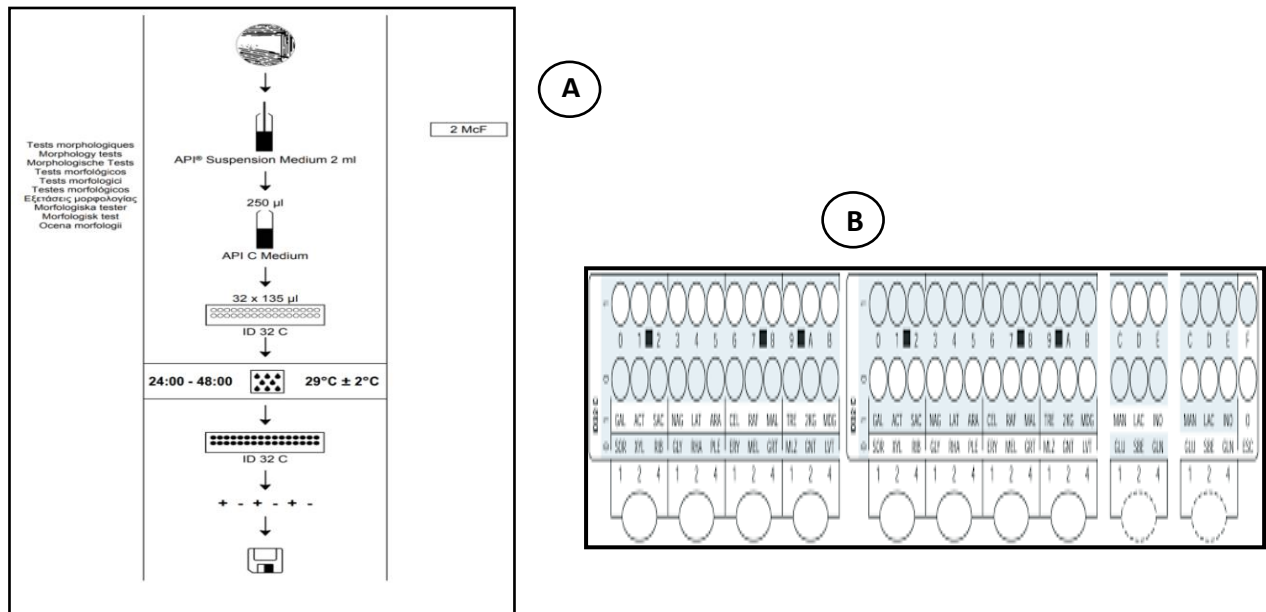


Figure 19: Identification de la levure (A) Protocol d'encemencement de la galerie API 32C et (B) fiche de résultats

2.1.1 Préparation de inoculum

A partir d'une souche jeune, l'inoculum est préparé comme suit :

- 40 ml du milieu de YPGA sont placés dans un erlen de 250 ml
- Après encemencement et incubation à 28C° pendant 48h, 50 ml d'eau distillée stérile sont ajoutées, et les cellules sont suspendues par faible agitation manuelle.

2.1.2 Dénombrement

Il se fait par le comptage sur la cellule de Thoma (0,1 mm, 1/400 mm²) en observation microscopique. Le nombre de cellules levuriennes dans la suspension est déterminé.

2.2 Production de l'α-amylase par les déchets de banane

La production de l'α-amylase est réalisée en fermentation solide. Les déchets de banane sont utilisés comme support et substrat et les étapes de la production de l'α-amylase sont présentés dans la figure 20.

2.2.1 Préparation de déchets de banane

Les déchets de banane, riches en carbohydrates surtout le glucose, sont des déchets alimentaires de cuisine. Après la collecte, ils sont séchés à l'air libre (25 – 30°C) pendant quelques jours. Après broyage et tamissage, la poudre est conservée dans des boites hermétiquement fermées.

2.2.2 Fermentation en milieu solide

. La production de l' α -amylase est réalisée dans des erlenmeyers de 250 ml, effectuée sur un milieu de déchets de banane préalablement optimisé. Dans chaque erlens, on met 5g de déchets de banane, on enrichi avec 1% de glucose et 0.5% de peptone, et le milieu est humidifié avec un taux de 60% à pH7. Après stérilisation à 120°C pendant 20 min, le milieu est ensemencé par 4.10^5 cellules/ml incubé à 37C° pendant 48h (Anto *et al.*, 2005).

2.2.3 Extraction

Aprés fermentation, la moitié du mlieu est utilisée pour la détermination de la matière sèche. On ajoute de l'eau distillée à l'autre moitié du milieu. Après agitation, le mélange est centrifugé à 4°C et à 10000 rpm pendant 10 min. Le surnageant constitue l'extrait enzymatique (Dutta *et al.*, 2006) .

2.2.4 Détermination la matière sèche

La moitié du mileu de fermentation est mise dans des creusets en porcelaine prèpesés et incubés à 105°C jusqu'au poids sec. (Martelli, 1963).

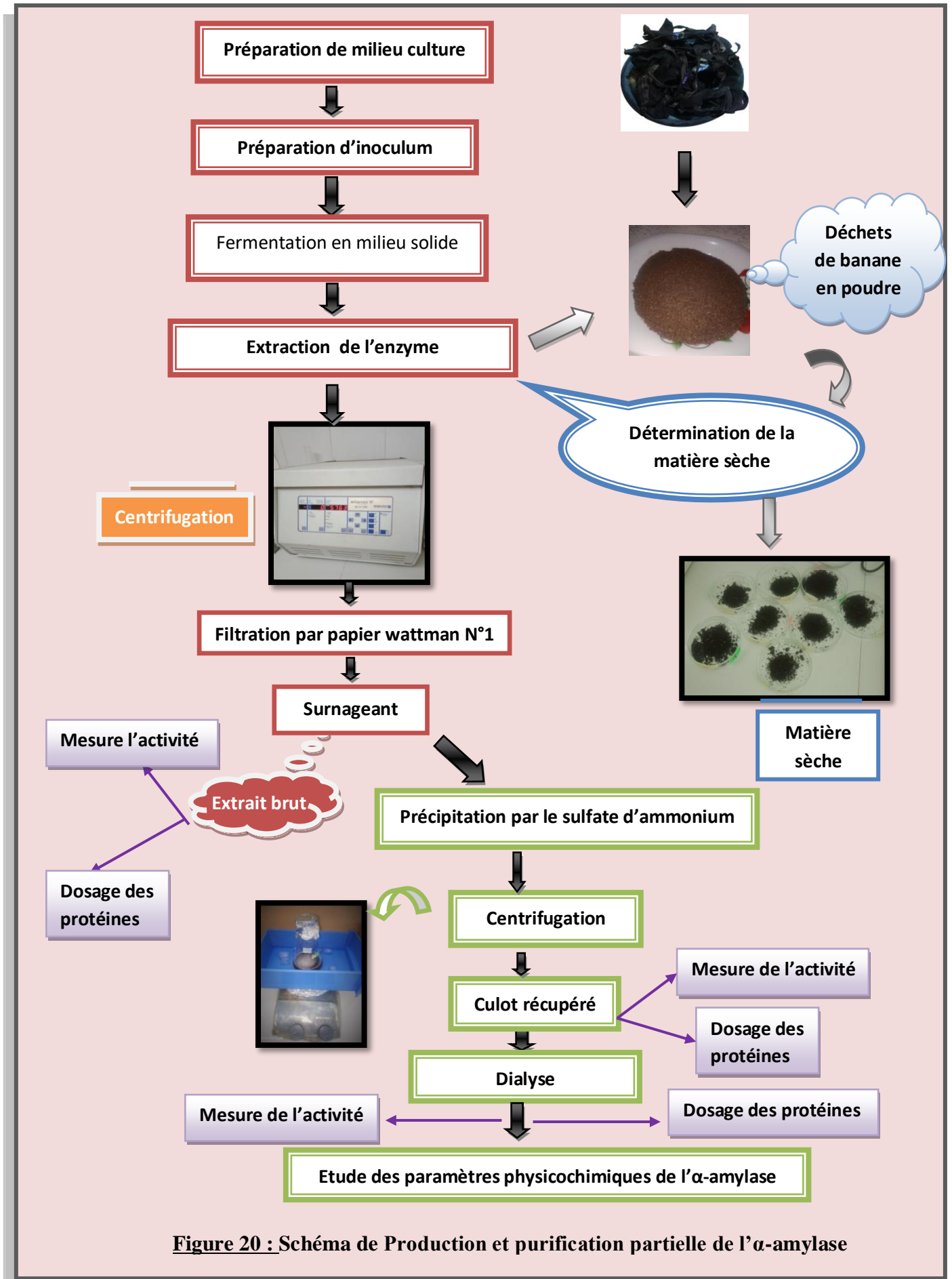


Figure 20 : Schéma de Production et purification partielle de l' α -amylase

2 Méthode d'analytique

2.1 Dosage de l'activité enzymatique

Le dosage de l'activité enzymatique selon la méthode décrite par la Vazquez. (2004) hydrolyse enzymatique pour détecter l'activité de α -amylase (figure 21), le milieu contient 0,5 μ l de extrait enzymatique et tamponné par favorable de pH c'est le pH=8, Mélanger d'amidon (1%) et 0,5 μ l de extrait enzymatique diluée agiter et incubé au bain-marie a 40C° pendant 30min, selon Bernfeld. (1955) la réaction est arrête par 1ml de DNS qui réduction le sucre , puis incubé a 100C° au bain-marie pendant 10min, Ensuite refroidis dans bain de glace avec l'ajout de 10ml de l'eau distillé, observer l'absorbance a l'aide de spectromètre a 580nm .

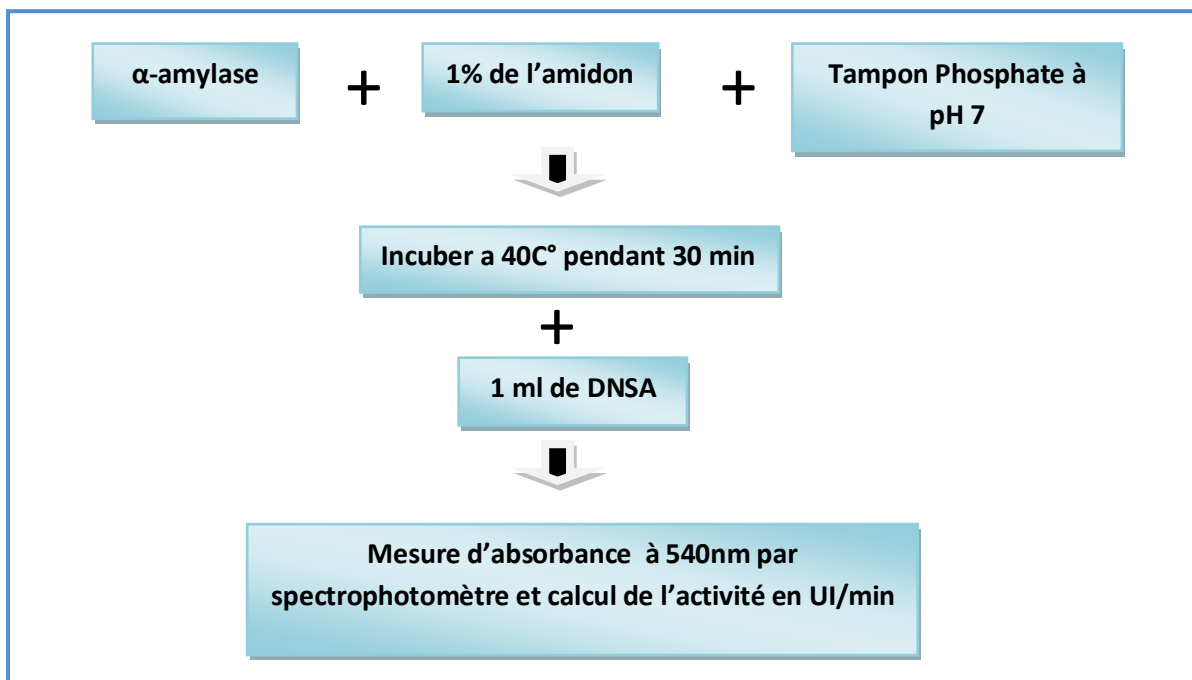


Figure 21: Protochole de mesure_l'activité de l' α -amylase par DNSA

2.2 Purification pareille de l'enzyme

La purification de l'enzyme α -amylase est effectuée a partir de extrait brut de la levure, la protéine de surnageant de volume totale a été 134,5 ml précipiter avec le sulfate d'ammonium solide a 40% dans bécher de 200ml (Dutta et al., 2006) et placer au bain de glace avec sous agitation pendant 1h jusqu'a dissous, après la centrifugation à 10000tour/min pendant 30min, on a obtient le culot après homogenèse avec 0,5ml de tampon pH 7, utilisé 0,5 ml pour mesure l'activité de extrait brut par la méthode Bernfeld, et dialysé leur extrait enzymatique brut qui placé dans un boudin avec le

tampon pH=7, pendant la nuit au sous agitation jusqu'a purifier(Nabti et *al.*, 2005 et Dennason, 1999).

2.3 Dosage des protéines

Les protéines sont dosées selon la méthode de Lowry (1951), en utilisant la BSA comme protéine de référence pour d'établir la courbe d'étalonnage. Ils sont coloré par le réactif de Folin-Ciocalteu (**Samain et Boucher, 1974**), pour préparer la solution étalon a été diluée la solution mère BSA a 2g/L, donc on a dessous de 0,5 BSA dans 40ml pour 50ml de l'eau distillé.

Le réactifs de folin commercial à diluée 3 fois dans l'eau distillé au moment de l'emploi.

- Solution réactifs :
 - Solution A : Na_2CO_3 à 2% dans NaOH 0,1 N
 - Solution B : tartrate double Na et K à 20 g/L
 - Solution C : sulfate de cuivre CuSO_4 à 1 %
- Prépare extemporanément la solution réactifs en respectent l'ordre d'addition des réactifs et en agitant bien après chaque addition
 - Solution A : 0.5 cm^3
 - Solution B : 0.5 cm^3
 - Solution C : 50 cm^3
- Préparer le mélange a l'aide des solutions de étalon

On mélange 50 ml Na_2CO_3 de solution A, avec 0.5 ml tartrate de solution B et 0.5 ml CuSO_4 de solution C

2.3.1 Dosage de BSA

Le dosage de BSA a été effectué par méthode de Bradford. (1976), pour établir un courbe étalon (figure22), a partir de la solution étalon de sérum albumin bovine à 2g/ pour l'amener à $0.5 \text{ g} / \text{dm}^3$, Dans un tube essai, réaliser le tableau de dilution :

Tableau 10: Dosage de BSA

Tube N°	blanc	1	2	3	4	5
BSA (µL)	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1
ED (µL)	1	0.8	0.6	0.4	0.2	0
Mélange (ml)	5 ml	5	5	5	5	5
Agiter et incubé ambiante pendant 10min						
Folin (ml) dilué 1/3	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Agiter et incubé à 30 min à l'obscurité						
Lire l'absorbance par spectrophotomètre de gamme 650nm						

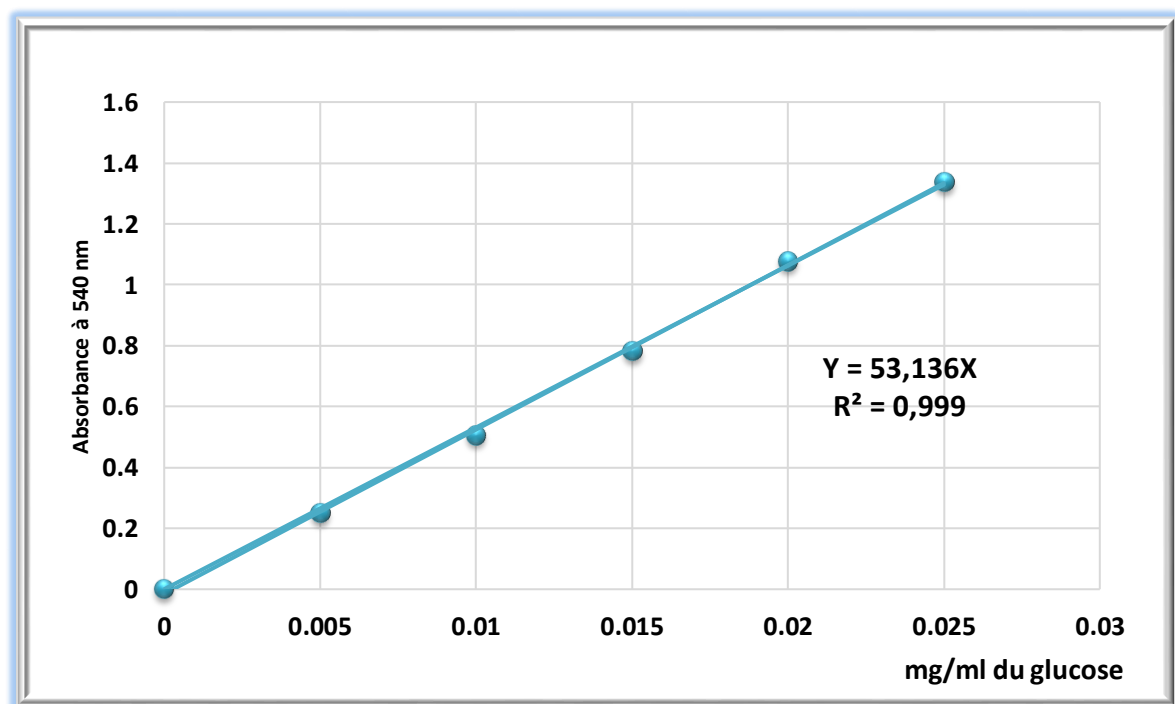


Figure 22: Courbe étalon de BSA

2.3.2 Dosage de maltose

Le maltose est sucre produit de la réaction enzymatique de substrat et leur enzyme α -amylase, mesure l'activité par méthode Bradford et établir leur courbe de maltose (figure23), a partir de 2mg/ml de solution mère dissous 0,2g de maltose + dans 100ml de l'eau distillé, à été réaliser au tableau suivant :

Tableau 11 : Dosage de maltose

Solution/ mg/ml	blanc	1	2	3	4	5
Solution mère	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1
Eau distillé (ml)	1	0.8	0.6	0.4	0.2	0
DNSA (ml)	1	1	1	1	1	1
Agiter et et incubé a 100c° pendant 10 min ; puis déplacer dans bain de glace						
Eau distillée (ml)	10	10	10	10	10	10
Agiter et Mesure l'absorbance à 540 nm						

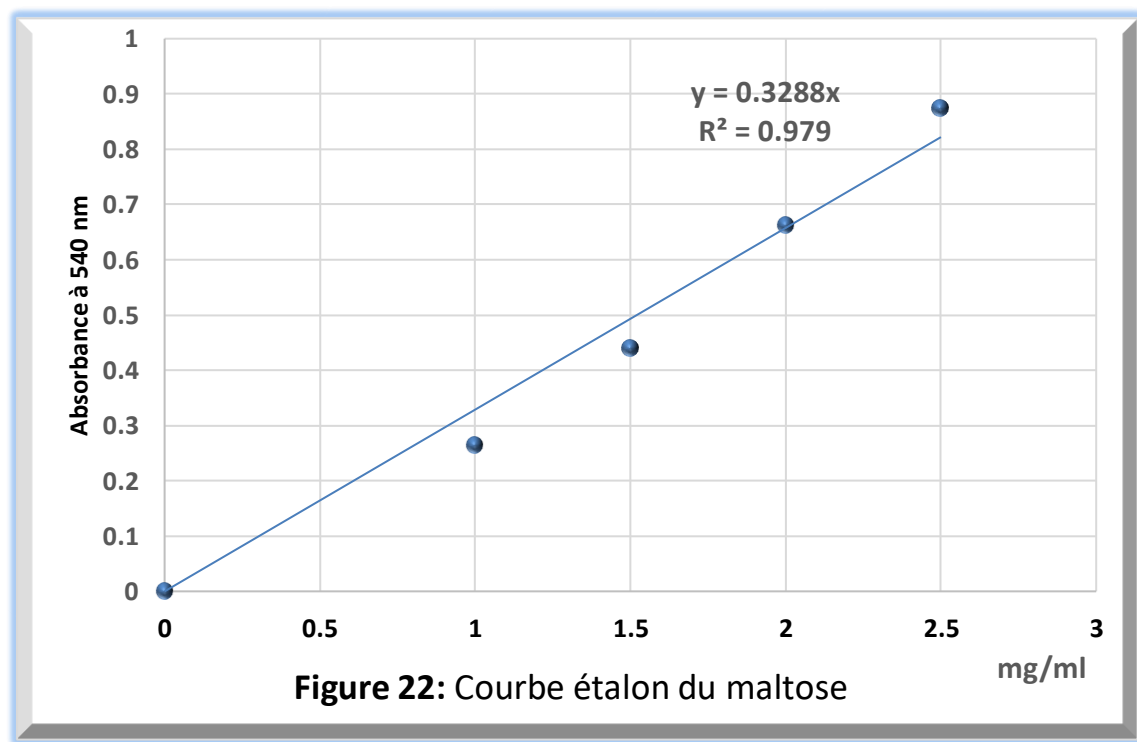


Figure 23: Courbe de maltose

2.3.3 Détermination de pH

L'influence du pH sur l'activité enzymatique est déterminée par la mesure de l'activité à différents pH variant de 3 à 9. Le tampon citrate-phosphate est utilisé pour la zone de pH 3 à 5, le tampon phosphate dissodique et monossodique pour la zone de pH 6 à 8 et le tampon glycine-NaOH pour le pH 9. La mesure du pH est réalisée à l'aide d'un pH mètre (figure 24).



Figure 24: pH paramètre et mesure du pH

2.4 Etude physicochimique de l'activité de α -amylase

2.4.1 Effet du pH optimum sur l'activité de α -amylase

Utilisé différents pH de 3 à 9 ont été étudiées sur l'activité de α -amylase, le tampon phosphate-citrate a été utilisé pour les pH de 3 à 8 et le tampon glycine-NaOH pour le pH 9. (Schafiei, 2010).

2.4.2 Etude de l'effet de la température sur α -amylase

L'effet de la température a été étudié par la mesure de l'activité à différentes températures variant de 30°C à 80°C avec un incrément de 5°C et au pH optimum (Karakas et al. (2010)).

2.4.3 Etude de la thermostabilité de α -amylase

L'étude de la thermostabilité de l' α -amylase a été effectuée par la mesure de l'activité enzymatique résiduelle après incubation de l'extrait enzymatique à 70°C

(température optimale de l'enzyme étudiée) et à 120°C et à différents temps variant de 30 à 180 min.

La solution enzymatique est répartie en volumes identiques dans des tubes séparés qui sont chauffés ensemble dans un bain-marie à une température soigneusement réglée. Les différents échantillons sont retirés les uns après les autres à des temps déterminés et refroidis instantanément dans un bain de glace. A chaque échantillon enzymatique traité par la température est appliqué le protocole de dosage de l'activité amylasique (**Dakhmouche, 2016**).

L'activité résiduelle est déterminée comme suit :

$$\text{Activité résiduelle} = 100 - \frac{\text{Activité à (T0)} - \text{Activité à (Tx)}}{\text{Activité à (T0)}} \times 100$$

T0= activité initiale

Tx=activité de chaque incubation

2.4.4 Etude de l'effet des sels sur l'activité de α -amylase

Pour l'étude de l'effet des ions sur l'activité α -amylasique de *Candida sp*, on utilise des sels tels que le FeCl₃, le ZnCl₂, le CuSO₄, le MgCl₂, le CaCl₂, le NaCl et le MnSO₄. Les échantillons d'amylase alcaline sont incubés avec chaque ion métallique (5mM) séparément, à 60°C pendant 30 min dans le tampon pH7 puis l'activité α -amylasique est mesurée.

2.4.5 Etude de l'effet des détergents sur l'activité de l' α -amylase

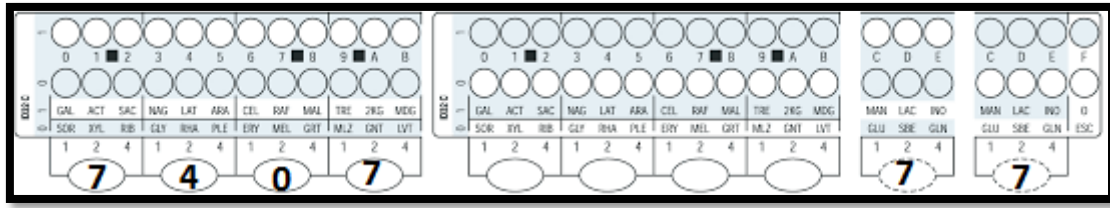
D'autres substances chimiques sont testées comme l'EDTA (2mM), l'urée (2M), le SDS (1%, w/v) et le tween 80 (1%) sur l' α -amylase. L'activité enzymatique est déterminée après le traitement de l'enzyme : une pré-incubation de l'enzyme avec chaque réactif à 40°C à pH 7.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

3.1 Identification de levure

L'identification de la souche levurienne a été réalisée par la galerie API 32C. Les résultats ont procuré à la souche un code de 740777. D'après l'identification de la souche en utilisant le catalogue ou le téléchargement d'APIWEB, ce code correspond au *Candida sp.*(figure 25)

A)



B)

déroulante la galerie API 20C Aux) ou en utilisant le talbeau ci-dessous :

TABLEAU D'IDENTIFICATION / IDENTIFICATION TABLE / PROZENTABELLE / TABLA DE IDENTIFICACION / TABELLA DI IDENTIFICAZIONE / QUADRO DE IDENTIFICAZIONE / ΠΙΝΑΚΑΣ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ / IDENTIFIKERINGSTABELL / IDENTIFIKATIONSTABELL / TABELA IDENTYFIKACJI

% de réactions positives après 48-72 h (± 6 h) à 29°C ± 2°C / % of reactions positive after 48-72 hrs. (± 6 hrs) at 29°C ± 2°C / % der positiven Reaktionen nach 48-72 Std. (± 6 Std) bei 29°C ± 2°C / % de las reacciones positivas después de 48-72 H (± 6 H) a 29°C ± 2°C / % di reazioni positive dopo 48-72 ore (± 6 ore) a 29°C ± 2°C / % das reações positivas após 48-72 H (± 6 H) a 29°C ± 2°C / % Βεβαιών εμπόδιστων μετά 48-72 ώρες (± 6 ώρες) στους 29°C ± 2°C / % positiva reaktionen efter 48-72 h. (± 6 h) vid 29°C ± 2°C / % at positive reaktionen efter 48-72 timer ved 29°C ± 2°C / % pozytywnych reakcji po 48-72 godzinach (± 6 godzin) w 29°C ± 2°C

API 20 C AUX	V4.0	0	GLU	GLY	ZKG	ARA	XYL	ADO	XLT	GAL	INO	SOR	MDG	NAG	CEL	LAC	MAI	SAC	TRE	MLZ	RAF	HY
<i>Candida albicans 1</i>	0	100	14	99	2	88	94	90	99	0	94	85	99	0	0	99	97	97	5	0	0	0
<i>Candida albicans 2</i>	0	100	1	99	1	90	1	75	99	0	70	1	99	0	0	90	1	5	1	0	0	0
<i>Candida bootii</i>	0	100	55	1	0	89	70	89	25	0	95	1	55	0	0	1	1	1	1	0	0	0
<i>Candida colliculosa</i>	0	100	96	100	0	0	0	5	13	0	60	1	0	0	0	3	99	60	0	96	0	0
<i>Candida dubliniensis</i>	0	100	96	99	0	1	99	50	100	1	99	0	40	0	0	100	60	1	0	0	0	
<i>Candida famata</i>	0	100	96	98	60	60	98	75	99	0	100	99	99	89	70	100	100	95	78	75	0	
<i>Candida glabrata</i>	0	100	201	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	94	0	0	
<i>Candida guilliermondii</i>	0	100	99	97	79	85	97	92	99	0	97	88	99	95	0	94	100	99	80	95	0	
<i>Candida kefyr</i>	0	100	27	0	1	18	1	25	100	0	34	0	0	1	95	1	100	1	1	96	0	
<i>Candida krusei/complicata</i>	0	99	73	0	0	0	0	0	6	0	2	0	64	0	0	0	0	0	0	0	0	
<i>Candida lusitanae</i>	0	100	90	95	1	65	95	20	30	0	99	60	95	80	0	100	99	100	99	0	0	
<i>Candida magnoliae</i>	0	100	32	50	0	0	0	0	10	0	60	0	0	0	0	2	97	10	1	75	0	
<i>Candida norvegensis</i>	0	100	85	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	25	0	0	0	0	0	0	
<i>Candida parapsilosis</i>	0	100	94	88	89	89	93	3	99	0	99	89	99	0	0	100	100	93	99	1	0	
<i>Candida pelliculosa</i>	0	100	99	0	0	87	1	1	55	0	70	95	1	70	0	97	99	97	96	30	0	
<i>Candida rugosa</i>	0	100	74	0	1	70	1	26	99	0	94	0	59	0	0	0	0	0	0	0	0	
<i>Candida sphaerica 1</i>	0	100	31	2	0	2	0	62	99	0	99	68	0	35	1	95	100	99	29	76	0	
<i>Candida sphaerica 2</i>	0	100	88	1	0	1	0	36	94	0	99	50	0	31	99	80	100	53	80	64	0	
<i>Candida tropicalis</i>	0	100	9	99	1	96	99	12	99	0	99	69	99	17	1	99	73	100	72	5	0	
<i>Candida utilis</i>	0	100	99	0	0	60	0	1	5	0	1	3	0	37	0	98	96	16	72	79	0	
<i>Candida zeylanoides</i>	0	100	100	87	0	0	1	0	1	0	99	0	99	0	0	0	0	0	74	0	0	
<i>Cryptococcus albidus</i>	0	100	0	98	80	81	0	0	6	30	60	65	0	99	10	98	100	82	81	51	0	
<i>Cryptococcus humicola</i>	0	100	92	100	100	36	62	100	100	95	100	100	98	100	100	99	99	95	99	0	0	
<i>Cryptococcus laurentii</i>	0	100	5	92	99	99	69	76	99	84	53	76	92	96	99	92	99	92	96	99	0	
<i>Cryptococcus neoformans</i>	0	100	0	100	14	91	71	1	93	97	100	99	88	10	0	99	99	75	97	88	0	
<i>Cryptococcus terreus</i>	0	100	0	100	87	100	0	0	45	50	99	0	96	96	36	0	0	54	0	0	0	
<i>Cryptococcus unguiculatus</i>	0	100	3	99	99	99	3	0	1	99	50	99	100	0	0	100	100	75	100	7	0	
<i>Geotrichum capitatum</i>	0	95	92	0	0	0	0	0	25	0	10	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	
<i>Geotrichum klebahnii</i>	0	100	100	0	0	92	0	0	75	0	88	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
<i>Kloeckera spp.</i>	0	100	0	50	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	96	0	0	0	0	0	0	
<i>Kodamaea ohmeri</i>	0	100	99	98	0	0	66	0	66	0	93	98	99	56	0	99	99	92	0	85	0	
<i>Pichia angusta</i>	0	100	84	0	1	1	66	36	0	0	90	11	11	20	0	94	90	50	97	0	0	
<i>Protobothra wickerhamii</i>	0	100	100	0	0	0	0	0	55	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0	0	
<i>Rhodotorula glutinis</i>	0	100	15	91	0	0	8	0	50	0	84	3	0	1	0	91	100	59	84	96	0	
<i>Rhodotorula minuta</i>	0	100	100	100	98	95	3	0	0	5	0	85	60	1	0	95	95	95	0	0	0	
<i>Rhodotorula mucilaginosa 1</i>	0	100	5	4	15	33	92	61	10	0	5	0	0	0	33	100	5	1	87	2		
<i>Rhodotorula mucilaginosa 2</i>	0	100	60	1	80	80	64	52	80	0	60	1	0	1	0	98	100	95	86	98		
<i>Saccharomyces cerevisiae 1</i>	0	100	8	0	0	0	0	0	78	0	1	13	0	0	0	75	90	2	1	62		
<i>Saccharomyces cerevisiae 2</i>	0	100	1	0	0	0	0	0	99	0	1	29	0	0	0	99	99	99	88	81		
<i>Sporobolomyces salmonicicola</i>	0	100	1	0	0	0	0	0	5	0	80	0	0	0	0	100	85	0	70	0		
<i>Staphanosaccharum ciferrii</i>	0	100	80	80	100	100	71	60	100	100	43	0	99	60	0	99	100	99	0	99		
<i>Trichosporon asahii</i>	0	100	20	100	100	100	0	5	100	0	1	94	100	100	100	100	98	66	20	0		
<i>Trichosporon inkin</i>	0	100	4	100	0	98	0	0	95	98	0	100	57	100	95	100	100	95	89	0		
<i>Trichosporon mucroides</i>	0	100	40	99	74	100	53	65	100	92	78	100	94	100	100	100	100	78	82	99		

bioMérieux® SA II

c)



Figure 25: Lecture de la galerie API 32C inoculée par *Candida sp.*, après incubation à 37°C pendant 48h

3.2 Production de l' α -amylase par fermentation solide

La souche de *Candida sp* a produit par la fermentation solide sur les déchets de banane, source de polysaccharide notamment l'amidon, une activité amylasique maximale de 6126,71 μ M/min.

L'activité amylasique d' α -amylase produite par notre levure est tout à fait considérable ce qui révèle l'induction efficace de la source de carbone fournie par le milieu de culture.

Il est bon de noter que le déchets de banane ont servis de matière première pour la production des enzymes utiles comme l' α amylase.

Ce déchets est considérés comme un milieu très riche en source de carbone et d'azote (Nishio et Nagai, 1981 ; Mahmood et al., 1998) et d'amidon et c'est un bon substrat avec un effet d'inducteur et de simulateur sur les α -amylases.

En effet, beaucoup de travaux de recherches se sont orientés vers l'utilisation de déchets de bananes comme substrat fermentescible citons :

La production d' α -amylase par *Bacillus subtilis* (Mahmood et al., 1998), *Aspergillus niger* (Djekrif-Dakhmouche et al. 2006 ; Mukesh et al., 2010), *Trichoderma reesei* (Momein et al., 2003) et *Aspergillus oryzae* (Raviyan et al., 2003). Notre résultat peut s'explique par le fait que les déchets de bananes renferment une quantité suffisante en glucides (Belitz et Grosch, 1987). Ainsi, plusieurs espèces de

Candida ont été utilisées pour la production de l'α-amylase comme *Candida utilis*, *Candida guilliermondii*, *Candida lusitanae*, *Candida famata* (Ouédraogo *et al.*, 2012) Et chez *Candida ontarionensi* (Hernandez-Montanez. *et al.*, 2010). Il a été noté que la production optimale de la production d'enzyme varie selon la souche (Jean-Paul *et al.*, 2016) .

3.3 Purification partielle de l'α-amylase

L'α-amylase produite par la levure *candida sp* en fermentation solide sur le milieu optimisé, l'extrait enzymatique (enzyme brut) précipité par le sulfate d'ammonium à 40% suivi d'une dialyse pour le dessalage. Les résultats de purification sont montrés dans un tableau (9).

La précipitation de l'α-amylase par le sulfate d'ammonium donne souvent un taux faible de purification, mais offre l'avantage de concentrer l'enzyme. Elle constitue donc, une technique de concentration et de conservation satisfaisante comme phase de préparation dans une étude de précaractérisation et comme première étape de purification.

Tableau 9: Etapes de purification partielle de l'α-amylase de *Candida sp*.

Etape Purification	Volume totale (ml)	Activité totale (U)	Protéine total (mg)	Activité spécifique (U/mg)	Degré de purifier	Rendement %
Extrait brut	134	82097	97,82	839,27	1	100
Précipitation (NH₄)₂SO₄ 40%	4	43973	14.892	2952,793	4	53.56
Dialyse	3	38011	12.175	3122.053	3.72	46.30

La purification partielle a permis de récupérer l'enzyme à 46.30% et avec un taux de purification de 3.72.

Laiche *et al.* (2018) ont utilisé la même technique de précipitation d'ammonium mais à différentes concentration de 30%, 60% et 80%, , pour l'alpha amylase de *Candida glabrata* avec des degrés purification successivement de 1,4 ; 2,73 ; 1,17.

Chez *Talaromyces pinophilus*, Xain et al., (2015) ont récupéré l' α -amylase à 80,13% par la précipitation de sulfate d'ammonium avec un degré de purification de 1,77 .

Nouadri et al. (2010) ont purifié cette enzyme du *Penicillium camemberti* avec un degré de purification de 16,3 et un rendement de 49,5%. Chez *Aspergillus flavus*, l'enzyme traité par le sulfate d'ammonium a été obtenue avec un degré de purification de 1,84 et un rendement de 30,69% (Karim et al., 2018).

Par ailleurs, pour une application dans d'autres domaines industriels (alimentaires ou pharmaceutiques), il est nécessaire de pousser la purification plus loin en utilisant d'autres techniques de purification telle que la chromatographie gel filtration, échangeuse d'ions, HPLC, ...etc.

3.4 Caractérisation de l' α -amylase

3.4.1 Etude l'effet du pH sur l'activité de l' α -amylase

L'activité de l'enzyme dépend de sa structure lorsque le pH du milieu change, la forme de l'enzyme change aussi, car le pH affecte l'état d'ionisation des acides aminés (basiques ou acides), ce changement de pH provoque une modification de la structure de l'enzyme. Les résultats de l'effet du pH sur l' α -amylase sont présentés dans la figure 26.

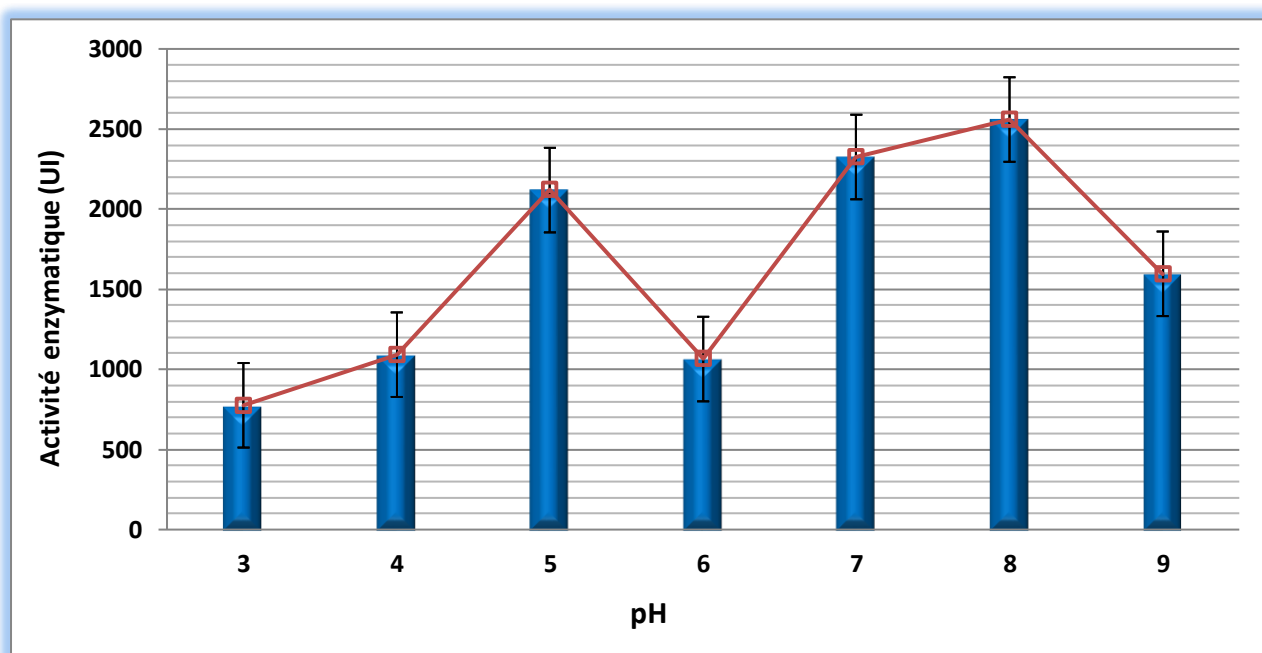


Figure 26: Effet du pH sur l'activité enzymatique de *Candida sp*

L' α -amylase levurienne est très sensible aux variations de pH. Une faible activité est observée aux pH 3, 4 et 6 pour l'extrait enzymatique brut. L'activité amylasique est affectée considérablement à pH acide suite à la dénaturation de l'enzyme.

L'activité amylasique commence à évoluer jusqu'à pH 5 (2243 UI) puis elle diminue et remonte pour atteindre l'activité maximale de 2559,4 $\mu\text{mol}/\text{min}$ à pH 8, puis elle baisse à pH9 ; cependant, nous remarquons qu'il a deux pH optimum un pH optimum acide et un autre alcalin le plus important est le pH alcalin de 8 et peut être que la souche *Candida sp.* isolée à partir de pelures de pomme de terre produit deux α -amylase (isoenzymes) : une α -amylase acide et l'autre basique.

Cette sensibilité aux variations de pH est due à l'ionisation du substrat et de la molécule enzymatique dont cet effet dépend des groupements ionisables participant à la fixation du substrat et au maintien des structures secondaire et tertiaires de la protéine (Mouas, 2016). Le pH optimum de 8 a été trouvé chez l' α -amylase de *Bacillus sp.*, (Alamri, 2010) et chez la souche fongique *Aspergillus niger* (Unal, 2015). Par contre le pH optimum de l'enzyme de la levure *Ascomycetes sp* (Fossi et al., 2005) de *Cryptococcus flavus* (Wanderly et al., 2004) est de 5.

3.4.2 Etude de l'effet de la température sur l' α -amylase

L' α -amylase est considérée comme conservatrice et résistante à la chaleur et sa capacité à maintenir sa fonction et s'adapter à certaines température. Les résultats de l'effet de la température sur l' α -amylase de *Candida sp.* Sont présentés dans la figure 27. Il ressort que la courbe de l'effet de la température sur l' α -amylase de *Candida sp.* est assez large. L'activité a ralenti entre 30°C et 45°C où elle remonte pour atteindre son maximum à 75°C (2409.35UI).

Selon les études précédentes, Saranraj et Stélla (2013), l'activité de α -amylase dépend de l'espèce du microorganisme. Ozdemuim et al. (2011) et kumar-singh (2015) révèlent que α -amylase est très sensible à la température et maintient une bonne stabilité dans les conditions optimal. Et lorsque la température est élevée, elle provoque la perte complète de l'activité suite à la mauvaise conformation d'enzyme, due à l'hydrolyse de la chaîne peptidique et destruction des acides aminés.

Balkan et Ertan (2005) ont observé que l'activité de l' α -amylase maximale est entre 30°C-40°C chez *Penicillium sp.* Chez *Candida glabrata*, elle est obtenue entre 50 et 55 °C (Toumi, 2016) et chez *Saccharomyces cerevisia*, elle est observée entre 50°C et 70°C (Favaro et al. (2015).

Par ailleurs, la température optimale de 75°C a été trouvée pour l' α -amylase de *Rhizopus oryzae* (Ferreira et al., 2014) et de *Clavispora lusitania* (Dakhmouche-Djekrif, 2016).

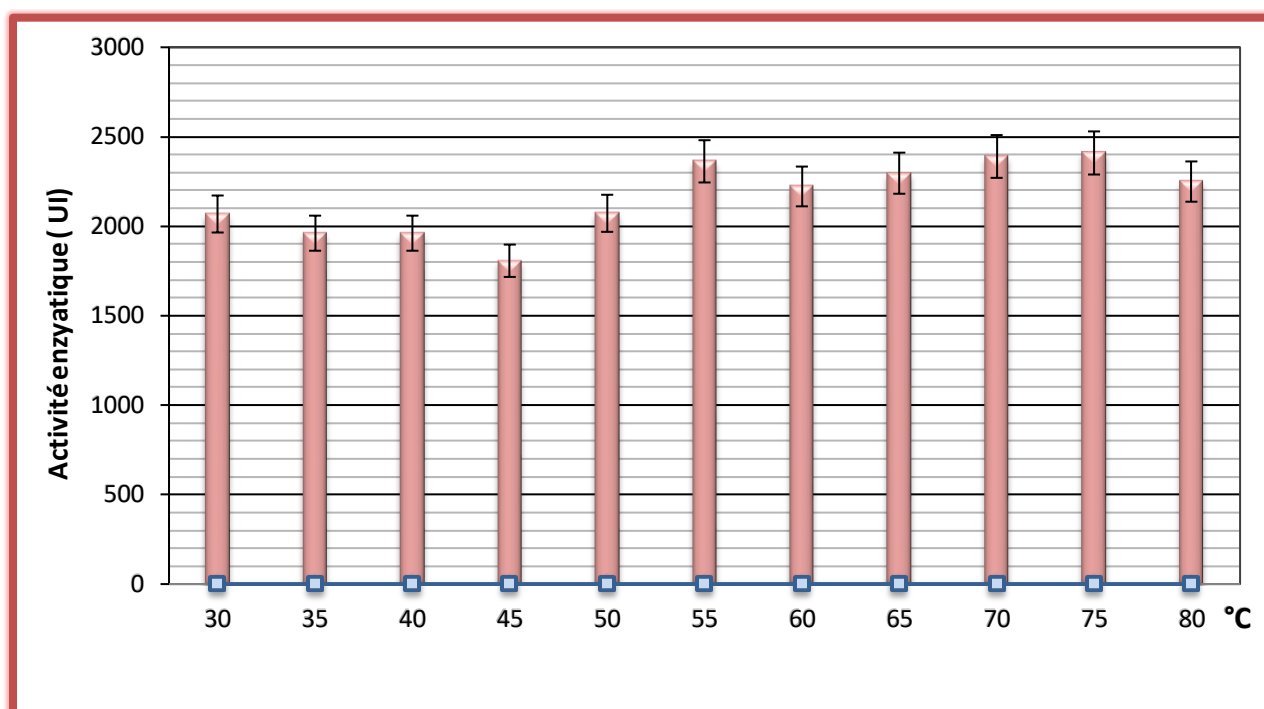


Figure 27: Effet de la température sur l'activité amylasique de *Candida sp*

3.4.3 Etude la thermostabilité de l'enzyme

Les résultats de l'étude de la thermostabilité de l' α -amylase à 70°C et à 120°C sont présentés dans la figure 28.

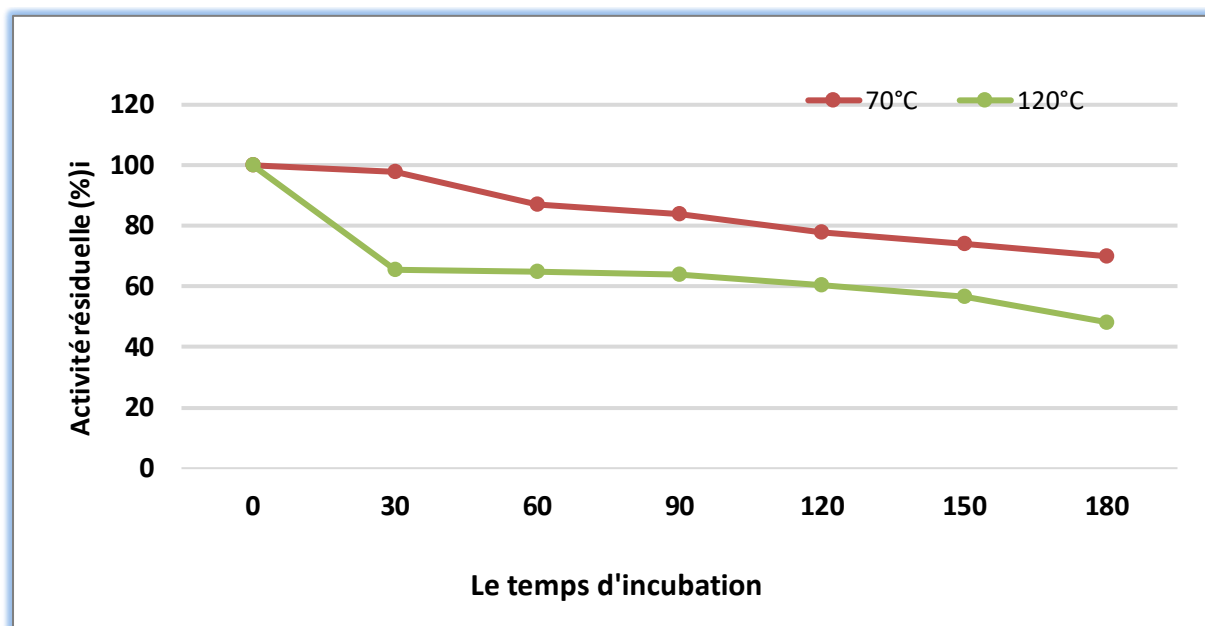


Figure 28: Etude de la thermostabilité de *Candida sp*

D'après ces résultats, nous remarquons que l' α -amylase de *Candida sp.* est stable. Elle maintient environ 80% et 60% de son activité après incubation de 120min et 70 % et 48% après un traitement de 180 min à 70°C et 120°C, respectivement. Sa demi-vie est de 170min à 120°C et elle n'est pas atteinte à 70°C après 180 min.

Sharma et al. (2019), la caractérisation de la thermostabilité de l'enzyme dépend de ses propriétés notamment la présence de calcium qui joue un rôle important dans le maintien de la structure de l'enzyme avec multi interactions des liaisons chimiques telles que que les liaisons d'hydrogène et d'électrostatique.

La thermostabilité est considérée comme un critère important et utile pour l'application industrielle de l' α -amylase à partir de micro-organismes

L' α -amylase de *Pichia pastorie* conserve son activité maximale (50-80%) à 60 et 70 C°avec un demi-vie respectivement de 85min à 60C°, 55min à 65C°et 40min à 70C°(Gandhi et al., 2015) . Par contre chez *Basillus sp* montre une bonne stabilité à 50 à 60C° et maintien respectivement 56 et 40% de l'activité après 2h d'incubation mais sa stabilité a fortement diminué a température de 65C° (Carvalho et al., 2008).

L' α -amylase de *Candida flavus* était stable pendant au moins 60 minutes lorsqu'elle était incubée à 50 °C et conservait 60 % de son activité maximale à 60 °C (Wanderley et al., 2004).

3.4.4 Etude effet des sels et les détergents sur α -amylase

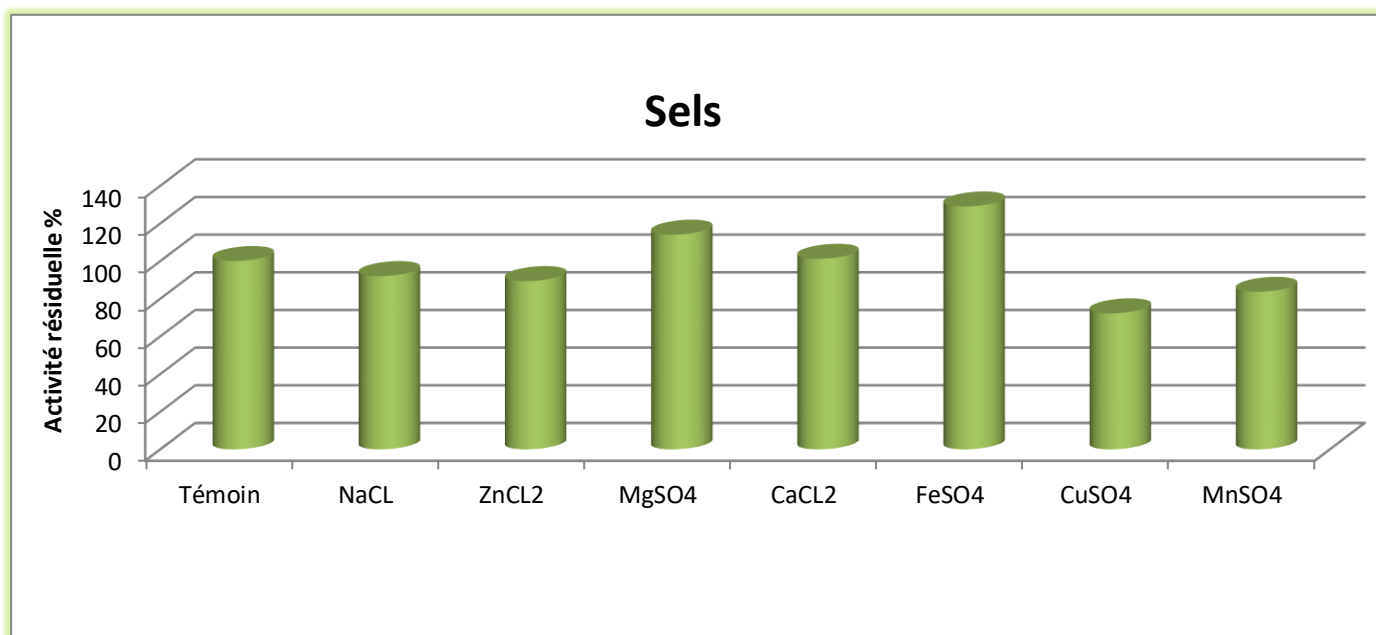


Figure 29 : Effet des sels sur l'activité enzymatique de *Candida sp*

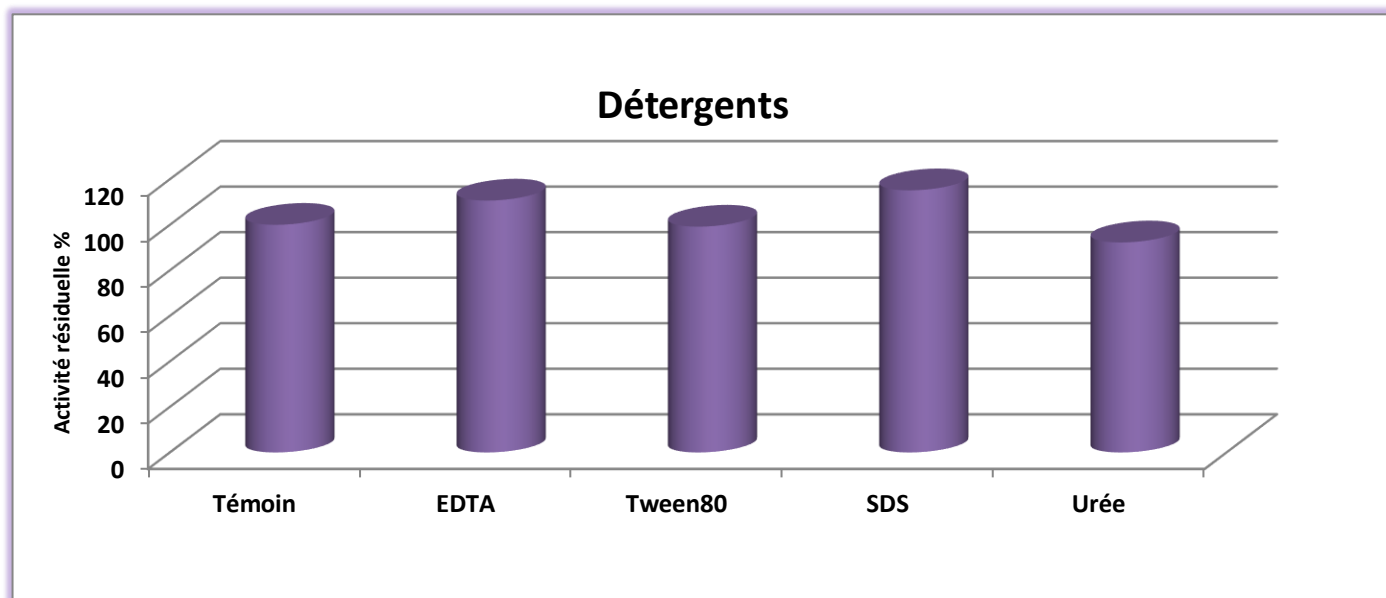


Figure 30 : Effet des détergents sur l'activité enzymatique de *Candida sp*

Les sels minéraux sont très importants pour l'activité enzymatique. Cependant l'activité amylasique montre que l'enzyme est inhibée par : le NaCl, le ZnCl₂, le CuSO₄ et le MnSO₄, le tween 80 et Urée). Alors que l'ajout des sels (figure 29) et des détergents (figure 30) suivants (CaCl₂, MgSO₄ et FeSO₄, EDTA, SDS) a un effet positif significatif sur l'activité enzymatique de l' α -amylase. L'activité résiduelle maximale a été obtenue dans le milieu contenant du FeSO₄ (129%). L'activité la plus faible est obtenue lorsque l'enzyme est incubé dans le milieu contenant du CuSO₄ (72.24%).

Les résultats sont en accord ceux avec Rahman et *al.* (1998) qui ont rapporté que l'activité enzymatique est renforcée par l'ion Ca²⁺. Ils ont également signalé que l'activité d' α -amylase de *Bacillus licheniformis* est stimulée par la présence des cations Ca²⁺, Fe²⁺, Mn³⁺.

El-Banna et *al.* (2008) ont également signalé que Cu²⁺ et Fe²⁺ protègent l' α -amylase - contre la perte d'activité induite par l'EDTA tandis qu'Agarwal et Henkin (1987) ont rapporté que les ions calcium stabilisent la structure tertiaire de l' α -amylase, maintenant ainsi l'enzyme dans la configuration correcte pour son activité

Des résultats similaires ont été rapportés par Ajayi et Fagade (2003) qui ont trouvé que l'activité enzymatique est améliorée par les ions de calcium, de magnésium et de sodium et que le NaCl est moins efficace pour l'enzyme. Fossi et *al.* (2004) indiquent que l'enzyme de *Cryptococcus flavus* est activée par les ions de Mn²⁺, de Zn²⁺ et de Ca²⁺, et inhibée par Hg²⁺, Fe²⁺ et Cu²⁺.

CONCLUSION

Conclusion

Notre étude a démontré que les déchets de banane en fermentation solide constituent une bonne source de carbone et d'énergie pour le développement des levures (*Candida sp*) et la production de l' α -amylase d'une importance à plusieurs titres : écologique, économique, alimentaire et industriel.

Le recyclage de ce déchet permet, d'une part, de lutter contre la pollution de l'environnement et d'autre part, de produire une enzyme à haute valeur ajoutée et à usage multiple dans l'industrie (alimentaire, pharmaceutique et autres).

La croissance de *Candida sp* en fermentation solide sur les déchets de banane enrichis de 1% de glucose et 0.5% de peptone a donné une bonne production α - amyliasique de 6126.71 UI.

La purification partielle de l'amylase levurienne par la précipitation au sulfate d'ammonium $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ et une dialyse a permis la récupération de 46.30% de l'enzyme avec un degré de purification de 3.51.

Le profil de l'étude des caractéristiques de l'activité α - amyliasique de *Candida sp*. mis en évidence l'existence de deux isoenzymes a activités enzymatiques qui se distinguent entre elle par leurs propriétés physico-chimiques : la première activité maximale est obtenue à pH acide de 5 (2443 UI) et la deuxième est la plus importante observée à pH alcalin de 8. Quant à la température optimale de l' α -amylase de *Candida sp.*, elle semble être de 75°C.

L' α -amylase de *Candida sp*. est stable. Elle maintient environ 80% et 60% de son activité après incubation de 120min et 70 % et 48% après un traitement de 180 min à 70°C et 120°C, respectivement. Sa demi- vie est de 170min à 120°C et elle n'est pas atteinte à 70°C après 180 min.

L'activité amyliasique montre que l'enzyme est inhibée par : le NaCl, le ZnCl_2 , le CuSO_4 et le MnSO_4 , le tween 80 et Urée). Alors que l'ajout des sels et des détergents suivants (CaCl_2 , MgSO_4 et FeSO_4 , EDTA, SDS) a un effet positif significatif sur l'activité enzymatique de l' α -amylase. L'activité résiduelle maximale a été obtenue dans le milieu contenant du FeSO_4 (129%) et l'activité faible est obtenue lorsque l'enzyme est incubé dans le milieu contenant du CuSO_4 (72.24%).

Enfin, il serait souhaitable de continuer ce travail par :

- Une purification totale de l'amylase de *Candida sp.* et une SDS-PAGE afin d'améliorer le rendement et le taux de purification de l'enzyme d'une part et de confirmer l'existence des isoenzymes.
- Une étude cinétique en fermenteur de paillasse.

REFERENCES

Ajayi A, O., Fagade, O, E. (2003), Utilization of corn starch as substrate for β -amylase by *Bacillus* spp. *African Journal of Biomedical Research*, 6. (1):37-42

Acevedo S ,A ,Carrillo A, J, D., Flórez-López E., Grande-Tovar C. (2021) Recovery of Banana Waste-Loss from Production and Processing: A Contribution to a CircularEconomy, *J Molecules*, (26):. 52-82.

Anto H., Trivedi U., Patel. K., (2006) , α -Amylase Production by *Bacillus cereus* MTCC 1305 Using Solid-State Fermentation .*Food Technol. Biotech.* 44(2). 241-245.

Ait Kaki- El-Hadef El-Okki H., Leghlimi,. S., Dakhmouche., Bennamoun L, Meraihi Z, (2012) , utilisation de la planification expérimentale pour l'optimisation de la production de l' α - amylase par *Rhizopus oryzae*. *Rev. Microbiol. Ind. San et Environn.* 6(1): 1-17.

Aiyer P, V. (2005) , Amylases and their applications. *African Journal of Biotechnology*, 4. (13) :1525-1529

Assamoi A, A., Destain J., Thonart P. (2009). Aspect microbiologiques de la production par fermentation solide des endo- β -1,4-xylanases de moisissures : le cas de *Penicillium canescens*, *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 13(2) :281-294.

Aldiguer A, S., Alfenore S., Cameleyre X., Goma, G., Uribelarrea J, L., Guillouet S, E., Molina-Jouve C. (2004) Synergistic temperature and ethanol effect on *Saccharomyces cerevisiae* dynamic behaviour in ethanol bio-fuel production., *Bioproc Biosyst Eng*, 26 : 217-222.

Aline L, F., Vincent, R., Pierre, S. (2010) *Micobiologie du vin. Bases fondamentales et applications.*Ed.TEC .DOC. Lavoisier.Paris. p83

Akşit A. (2012), thèse: molecular characterization of ethanol resistance in *saccharomyces cerevisiae*, istanbul technical university institute of science and technology.Turque

Ati abd elouahab N. (2008), *Micobiologie alimentaire.* 4362. Office des publications universitaires Constantine. Alger. 3^{ème} Edition. p147.

Aguero O, A, P., Silvestre M, A., Alves-Prado H, F., Rodrigues A., da Paz M .F, 1., Fonseca G, G., Leite R, S, R. (2015). Bioprospecting of yeasts for amylase production in solid state fermentation and evaluation of the catalytic properties of enzymatic extracts . *Afr. J. Biotechnol.* 14 (14) : 1215-1223.

Alamri S, A. (2010). Isolation, Phylogeny and Characterization of New α -amylase Producing Thermophilic *Bacillus* sp. from the Jazan Region, Saudi Arabia *International Journal of Biotechnology and Biochemistry*. *International Journal of Biotechnology and Biochemistry.* 6(4) :537–547 . <http://www.ripublication.com/ijbb.htm>.

Agulgolog S., Baris F, I. (2014) Production, purification, and characterization of thermostable α -amylase from thermophilic *Geobacillus stearothermophilus*, *Starch/Stärke* . 66:182–189.

Ait kaki A. (2017) . Thèse : L' α -Amylase d'une nouvelle souche de *Rhizopus oryzae* FSIS4 isolée de blé des zones arides : Production, Purification, Caractérisation, Etude des propriétés et Essai de panification, Biotechnologie et Génie Microbiologique, Algérie

Acourene S., Amourache L., Benchabane A., Djaafri K. (2013) Utilization of date wastes as substrate for the production of α -amylase. *International Food Research Journal*, 20 : 136-772

Aggarwal R., Dutta T., Sheikh J. (2019). Extraction of amylase from the microorganism isolated from textile mill effluent vis a vis desizing of cotton. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, 14:100-178 <https://doi.org/10.1016/j.scp.2019.100178>.

Ait Kaki E, A., Gagaoua M., Bourekoua H , Hafid K, Bennamoun L., Djekrif-Dakhmouche S., El-Okki H, M., Meraihi Z (2017) Improving Bread Quality with the Application of a Newly Purified Thermostable α -Amylase from *Rhizopus oryzae* FSIS4, *J. Foods*. 6(1): 1

Alonazi M., Karra A., Badjah A, Y., Hadj, A., Ben Bacha A (2021). Alpha Amylase from *Bacillus pacificus* Associated with Brown Algae *Turbinaria ornata*: Cultural Conditions, Purification, and Biochemical Characterization, *J. Processes* 9:16. <https://dx.doi.org/10.3390/pr9010016>.

Aurorea G., Parfaitb B., Fahasmaneb L . (2009). Bananas, raw materials for making processed food products .Universitedes Antilles et de la Guyane, *Trends in Food Science & Technology* Vol. 20. p. 78-91.

Ben Abdelmalek, I, Urdaci C. M, Ben Ali M, Denayrolles M, Chaignepain S, Limam F, Bejar S, Marzouki M. N. (2009) . Structural Investigation and Homology Modeling Studies of Native and Truncated Forms of α -Amylases from *Sclerotinia sclerotiorum*. *Institut National des Sciences Appliquées et de Technologie (INSAT), Microbiol. Biotechnol.* 19(11):1306–1318 .

Bennamoun L. (2017). Thèse: Isolement, sélection de souches levuriennes de sols arides sahariens (El-M'gheir) productrices de polygalacturonase : Purification et caractérisation enzymatique. Université Constantine 1. Algérie

Bhatt B, M., Trivedi U, B., Patel K, C.(2020). Extremophilic Amylases: Microbial Production and Applications, , Microbial Enzymes: Roles and Applications in Industries, Vol. 11, p 185-205

Bernfeld P. (1955) Amylases α - and β -methods, *Enzymology*, Vol. 1, p.149–158,

Bradford M, M. (1976.), A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding,"*Analytical Biochemistry*, 72 (2):248–254,

Bonechi C., Consumi, M., Donati A., Leone, G., Magnani, A., Tamasi, G., Rossi C. (2017) Biomass: An overview , University of Siena, Siena, Italy

Benaouida K. (2008). Etude de l'alpha amylase de levure isolées d'un écosystème extrême (sol environnant des sources thermales) et cultivées sur un milieu à base de lactosérum. Thèse de magister en Biotechnologie microbiennes, université Mentouri, Constantine

Bacha A. (2008). Production et etude de l'activite de l'invertase produite par la levure saccharomyces cereviisiae sur substrat a base de datte. These master : Technologie alimentaire. Batna. Universite el hadj lakhdar. p98.

Bakri Y., Magali, M., Thonart, P. (2009) .Isolation and identification of a new fungal strain for amylase biosynthesis. *Polish Journal of Microbiology*; Vol. 58. pp. 269-273

Beney L., Martinez, I., Marechal, P., Moundaga, S., & Gervais, P. (2001)., Osmotic destruction of *Saccharomyces cerevisiae* is not related to a high water flow rate across the membrane. *Biochemical Engineering Journal*, Vol. 9. p. 205-210.

Benaouida K. (2008). Etude de l'alpha amylase de levures isolees d'un ecosysteme extreme (sol environnant des sources thermales) et cultivees sur un milieu a base de lactoserum.Memoire de magister. Universite Mentouri Constantine.

- Bekatorou A., Psarianos C., Koutinas, A.A.** (2006). Production of food grade yeasts. *Food Technol. Biotechnol.* . 44: 407-415
- Binetti A., Carrasco M., Reinheimer, J., Suarez, V.** (2013), Yeasts from autochthonal cheese starters: technological and functional properties. *Journal of Applied Microbiology.* 115 :434-444.
- Bouix M., Leveau J.Y.** (1991) Les levures Ds : Bourgeois C. M., Leveau J.Y., Techniques d'analyse et de contrôle dans les industries agroalimentaires, édition 2. Lavoisier-Tec et Doc. Paris, 3 :p206-229
- Boiron P.** (1996) Organisation et biologie des champignons . Edition Nathan.p.13- 35
- Botton B., Breton A., Fevre M., Gauthier S., Guy, P. H., Larpent, J.P., Reymond, P., Sanglier J.J.,Vayssier Y., Veau, P.** (1990),. Moisissures utiles et nuisibles d'importance industrielle.2ème édition. Masson. Collection Biothechnologies, p34 -381.
- Bouchelaghem K et Mersaoui I.** (2018), Thèse : Production de l'enzyme alpha amylase par des champignons entomopathogènes cultivées sur milieu à base de déchets de bananes. Mémoire de Master en Mycologie et Biotechnologie fongique. Univesrité des frères Mentouri,Constantine. Algérie.
- Copeland L, Blazek J., Salman H., Chiming M, T, (2009)** .Form and functionality of starch *Food Hydrocolloids* Vol. 23. p. 1527–1534.
- Chi Z., Liu G., Wang F., Ju L., Zhang T.** (2009) . *Saccharomycopsis fibuligera* and its applications in biotechnology. *Biotechnol Adv.* 27(4) :423-431.
- Cofale C.** (2010) , Caracterisation des levures de boulangerie. Adopte par Comite de Fabrication de levures de panification de l union europeenne, Paris. p. 1-10,
- Carvalho D, R, V., Côrrea T, L, R., Silva D, J, C, M., Mansur , L, R, C, O., Martins M, L, L.** (2008), Propriedades de uma amilase de um termofílico *Bacillus sp.* *Industrial Microbiology Braz. J. Microbiol.* Vol.. 39(1). <https://doi.org/10.1590/S1517-83822008000100023>
- Couto S, R., Sanromán M. Á.** (2006). Application of solid-state fermentation to food industry—A review. *J. Food Eng.*, 76(3) : 291-302.

Références Bibliographiques

Deak T. (2006). Environmental Factors. Influencing yeasts. In *Yeast Handbook: Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts*. Carlos Rosa, Gabor Peter (Eds.). Springer-Verlag Berlin Heidelberg. pp155-174

Dos Santos É, R., Teles S, Z, N., Campos, N, M., de Souza, D, A, J., da Rocha, B, A, S., do Nascimento, R, P. (2012) . Production of α -Amylase from *Streptomyces* sp. SLBA-08 Strain Using Agro-Industrial By-Products , Núcleo de Estudos em Microbiologia Aplicada; Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas, 55:(5),p793-800.

DengQun L., Hong L, Z, L., Bennett, J. (2010) Characterization of evolution and tissue-expression of rice (*Oryza sativa* L.) α -amylase genes.Key Laboratory of Crop Genomics & Genetic Improvement of Ministry of Agriculture, China Agricultural University, China.. *Acta Agronomica Sinica* Vol.36. pp.17-27 .

Dar G, H, Kamili A, N, b, Ruqeya N, b., Suhaib A., Bandh b., Tariq R., Jan c., Chishti M, Z. (2015) Enhanced production of α -amylase by *Penicillium chrysogenum* in liquid culture by modifying the process parameters, Department of Environmental Science, University of Kashmir,India, *Microbial Pathogenesis*, Vol. 88, pp 10-15.

Dhillon G, S., Brar S, K., Verma M., Tyagi., R, D . (2010) .Recent Advances in Citric Acid Bio-productionand Recovery. review paper muchFood Bioprocess Techno.

Djekrif D, S., Gillmann L, Bennamoun L., Ait-Kaki A, Labbani K1, Nouadri T1, Meraihi Z. (2016). Amylolytic Yeasts: Producers of α -amylase and Pullulanase . *Int. J. Life. Sci. Scienti. Res.*,2(4) :339-354.

Dekhmouch-djekrif, S. (2016) Production et caractérisation de l'amylopullulanase de la levure *Clavispora lusitaniae* ABS7 isolée de blé cultivé et stocké en zones arides.université mentouri constantine 1.

Delkash-Roudsari S., Zibae A.,Mozhdehi, M, R, A. (2014). Digestive α -amylase of *Bacteroides thuringiensis* Gmelin (Diptera: Tephritidae): Biochemical characterization and effect of proteinaceous inhibitor. *J. King Saud Univ.*, Vol. 26. p. 53-58.

Deàk T, (2014) Corvinus University, Budapest, Hungary Elsevier Inc. All rights reserved. *Food Technologies: Pasteurization Encyclopedia of Food Safety*, Vol 3.

Références Bibliographiques

Egas M, C., da Costa M, S., Cowan D. A., Pires E, M. (1998), The Effect of Temperature, pH, and Salt on Amylase in *Heliodiaptomus viduus* (Gurney) (Crustacea: Copepoda: Calanoida), *Extremophiles* p. 23-32.

Far B, E., Ahmadi Y., Dilmaghani A. (2020), Microbial Alpha-Amylase Production: Progress, Challenges and Perspectives. Vol. 10 . (.3). p. 350-358.

Farooq M, A, I., Shaukat A., Ali H., Hafz T., Samaira M., Shumaila M. (2021) .Biosynthesis and industrial applications of α amylase: a review. *Archives of Microbiology* Vol. 203. pp. 1281–1292 <https://doi.org/10.1007/s00203-020-02128-y>

Favaro L., Viktor M, J., Rose S, H., Viljoen-Bloom M, W, H., Van Z, M, L., Casella C, S. (2015). Consolidated bioprocessing of starchy substrates into ethanol by industrial *Saccharomyces cerevisiae* strains secreting fungal amylases ,*Biofuels and Environmental Biotechnology Biotechnology and Bioengineering* . 112(9):1751-1760.

Finore I., Di Donato P., Poli A., Kirdar B., Kasavi C., Toksoy E, O., Lama L. (2014). Use of agro waste biomass for α -amylase production by *Anoxybacillus amylolyticus*: Purification and properties.*Journal of Microbial and Biochemical Technology*, Vol. 6, p. 320-326. <https://doi.org/10.4172/1948-5948.1000162>.

Fossi B, T, Taveal F, Ndjouenkeu R. (2005) Production and partial characterization of a thermostable amylase from ascomycetes yeast strain isolated from starchy soils . *African Journal of Biotechnology*. 4 (1) :14-18. <http://www.academicjournals.org/AJB>.

Fao H. (2007), Les bonnes pratiques d'hygiene dans la preparation et la vente des aliments de rue en Afrique: Outils pour la formation. Ed. Food & Agriculture Org, Italie. . p175.

Frøystad M, K., Lilleeng, E., Sundby, A., Krogdahl, A. (2006). Cloning and characterization of α -amylase from Atlantic salmon (*Salmo salar* L). *Comp. Biochem. Physio.* 145.: 479-92.

Francis D, (2011) Copinet .EstelleFermentation en milieu solide (FMS). *Techniques de l'ingénieur*.

Gana T, N, H., Mendoza B .C., Monsalud R .G. (2014). Isolation, Screening and Characterization of Yeasts with Amyolytic, Lipolytic, and Proteolytic Activities from

the Surface of Philippine Bananas (*Musa* spp.), *Philippine Journal of Science*, 143. (1) :81-87.

Gandhi S., Salleh, A, B., Abd Rahman R, N, Z, R ., Leow T.C., Oslan S, N. (2015) Research Article Expression and Characterization of *Geobacillus stearothermophilus* SR74 Recombinant α -Amylase in *Pichia pastoris*. *BioMed Research International*, p 9 <http://dx.doi.org/10.1155/2015/529059>.

George R., Georrg J.J . (2020). Thermostable alpha-amylase and its activity, stability and industrial relevance studies Department of Bioinformatics, Christ College, Gujarat .Center for Bioinformatics, Saarland University, Saarbrucken, Germany.

Gangadharan D., Sivaramakrishnan S. (2009) Amylolytic Enzymes. In: Singh nee, *Biotechnology for Agro-Industrial Residues Utilisation*. pp. 359-369 .

Gao H. Y . Zhou X. Zhang Y. Cai M (2017) Regulating unfolded protein response activator HAC1p for production of thermostable raw-starch hydrolyzing a-amylase in *Pichia pastoris* Mengmeng . (*Bioprocess Biosyst Eng*, 40: 341–350 .

Guerreroa A. B., Ballesterosb I., Ballesterosb M. (2018). The potential of agricultural banana waste for bioethanol production. p176–185

Hasan K. , Ismaya W, T, Kard I ,I., Andiyana Y, Susanti K , Ishmayana S, Subroto T, Soemitro S. (2008). Proteolysis of α -amylase from *Saccharomycopsis fibuligera*: characterization of digestion products . Biochemistry Laboratory, Department of Chemistry, Faculty of Mathematics and Natural Sciences, Padjadjaran. pp. 1044—1050,

Hii S, L., Tan J, S, T., Ling C., Bin Ariff A, H. (2012) . Pullulanase: role in starch hydrolysis and potential industrial applications Publishing Corporation Enzyme Research , p14 .

Hencké S. (2000), Utilisation alimentaire des levures. Diplome de Docteur: Pharmacie.Nancy I: Universite Henri Poincare. p188.

Ismail H., Irani M., Ahmad Z. (2013), Starch-Based Hydrogels: Present Status and Applications. School of Materials and Mineral Resources Engineering, Penang, Malaysia. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, 62(7): 411–420,

Références Bibliographiques

Jacques R. (1975) Les applications industrielles de microbiologie. Masson et Cie éditeurs, p.180-184.

John J. (2017). Bioprocess and Potential Applications: A Review. Intl. J.Bioinformatics and Biological 5(2): 41-50.

Jean-Paul K, B, M., Théodore D, N., Célah, K, A. (2016). Optimisation De La Production De L' α -Amylase Par Les Microorganismes Isolés Des Ferments Traditionnels De Manioc Provenant De Trois Zones De Production De L'attiéké En Côte d'Ivoire, European Scientific Journal 12 (9) : 1857 – 7881

Karakaş B., İnan M., Certel M., (2010) Expression and Characterization of *Geobacillus stearothermophilus* SR74 Recombinant α -Amylase in *Pichia pastoris*. J. Mol. Catal. B: Enzym. 64:129-134.

Karim K, M, R., Husaini A, T. (2017) Production and characterization of crude glucoamylase from newly isolated *Aspergillus flavus* NSH9 in liquid culture. Am J Biochem Mol Biol. 7:118–126 .

Khairuddin M., Norazan M., Parasuraman R., Othman N., RoslindaAbd M, Ramlan, A., Azzam A., El Enshasy H. (2016). Production of Cysteine Proteases by Recombinant Microorganisms: A Critical Review.Institute Bioproduct Development, UniversitiTeknologi Malaysia. Journal of Pharmacy and Biological Sciences, Vol. 11

Kabenge I., Omulo G., Banadda N., Seay J., Zziwa A., Kiggundu N. (2018) Characterization of Banana Peels Wastes as Potential Slow Pyrolysis Feedstock . Journal of Sustainable Development; 11 :(2)

Kurtzman C, P., Jack, W., Fell, Teun, B., Vincent, R. (2011) . Methods for isolation, phenotypic characterization and maintenance of yeasts. (Eds). The yeasts, a taxonomic study. Vol.1, 5^{ème} edition. Elsevier. p. 87-111.

Kar S., Ray C. (2008) . Parial characterization and optimization of extracellular thermostable Ca^{2+} inhibited α -amylase production by *Streptomyces erumpens* MTCC 7317. Journal of scientific et industrial research 67: 58-64.

Références Bibliographiques

Kurtzman C. P. Suzuki M. (2010) , Phylogenetic analysis of ascomycete yeasts that form coenzyme Q-9 and the proposal of the new genera *Babjeviella*, *Meyerozyma*, *Millerozyma*, *Priceomyces* and *Scheffersomyces*. *Mycoscience*. 1(1):2-14.

Kouassi D, M. (2019). Evaluation de l'activité inhibitrice des fruits de *Bauhinia thonningii* (Fabaceae) sur deux glycosidases et essai de traitement du diabète chez le rat Wistar., Docteurat de l'Université Félix Houphouët-Boigny, Spécialité : Pharmacologie des Substances Naturelles <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-02537203>.

Karim R, M, K., Husaini, A., Sing, N.N., Sinang F. M . Roslan., H, A ., Hussain H. (2018). Purification of an alpha amylase from *Aspergillus flavus* NSH9 and molecular characterization of its nucleotide gene sequence: *Biotech Vol. 8* . p. 204 <https://doi.org/10.1007/s13205-018-1225>.

Karim K, M, R., Husaini A, Hossain M, Sing N .N, Mohd Sinang F, Hussain M, H, M, Roslan H, A. (2016) Heterologous, expression, and characterization of thermostable glucoamylase derived from *Aspergillus flavus* NSH9 in *Pichia pastoris*. *BioMed Res Int* .pp.596-2028. <https://doi.org/10.1155/2016/59620>.

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

Makeri, M, S., Bala, M., Wante, P, S., Bitrus k.,V., Aliyu, H, U. (2021). Activity of α -amylase Produced by *Aspergillus niger* at Different pH, Temperature and Incubation Time Using Solid-state Fermentation Process of Corn and Wheat Wastes. *Asian Journal of Biotechnology and Bioresource Technology*. 7. (2):1-11.

Marc J.,E, .C., Maarel, V, D., Leemhuis, H . (2013) Starch modification with microbial alpha-glucan transferase enzymes, *Carbohydrate Polymers*,. 93:116–121.

Mishra Santosh Kumar, Priya Ranjan Kumar, Ravi Kant Singh² and Ajay Kumar Singh. (2020). Agro-Industrial Residues as Solid Substrate for α -Amylase Production Using Solid State Fermentation by Filamentous Fungi: A Review. *Biosc.Biotech.Res.Comm*. 13 (2) :550-555.

Mukherjee A, K ., Borah M., Raí S.K. (2009). To study the influence of different components of fermentable substrates on induction of extracellular α -amylase synthesis

by *Bacillus subtilis* DM-03 in solid- state fermentation and exploration of feasibility for inclusion of α -amylase in laundry detergent formulations. *Biochem. Eng. J.* 43:149– 156.

Ma P., Reddy., K.P., Chan W. K., Lam T. J. (2004). Hormonal influence on amylase gene expression during seabass (*Lates calcarifer*) larval development. *Gen. Comp. Endocrinol.* 138: 14-19.

Laiche A, T., Siboukeur O. (2018) . characterization of partially purified extracellular α -amylase from *Candida glabrata* grown in whey based medium, Laboratory for the protection of ecosystems in arid and semi-arid zones. Faculty of Science of Nature and Life,. Vol. 74.

Louati, H., Zouari, N., Fendri, A., Gargouri, Y. (2010). Digestive amylase of a primitive animal, the scorpion: Purification and biochemical characterization. *J. Chromatogr.*, Vol. 878. pp. 853-860.

Larson S, B., Greenwood A., Cascio D., Day J., McPherson A. (1994). Refined molecular structure of pigpan creatic alpha-amylase at 2.1 Å resolution. *J.Mol.Biol.* 235,1560–1584.doi:10.1006/jmbi.1994.1107.

Lim S .J. Oslan S, N. (2021). Native to designed: microbial α -amylases for industrial applications. *Peer J* . Vol. 9. p11-15 .<http://doi.org/10.7717/peerj.1131>

Larpent-Gourgaud M. et Sanglier J-J. (1992). *Biotechnologies. Principes et méthodes.* p. 574-58

Li Z., Guo K., Lin L., He W ., Zhang L., Wei C. (2018). Comparison of Physicochemical Properties of Starches from Flesh and Peel of Green Banana Fruit , Molecules.

Mobini-Dehkordi M., Javan A, F. (2012), Application of alpha-amylase in biotechnology. *Journal of Biology and today's world*, 1.(1):39-50.

Mitidieri S., Martinelli A. H, S., Schrank A., Vainstein M, H. (2006). Enzymatic detergent formulation containing amylase from *Aspergillus niger*: A comparative study with commercial detergent formulations, *Bioresource Technology*.

Moubasher H, Wahsh S. S., Abo El Kassem N. (2013) . Isolation of *Aureobasidium pullulans* and the effect of different conditions for pullulanase and pullulan production. *Microbiology.* 82(2) :155-161.

Madigan M. T., Martino J. M. (2006) . Brock Biology of Microorganisms. Pearson Education, Upper Saddle River, NJ, USA.

Merabti R. (2006), Isolement et caractérisation de souches levuriennes amylolytiques à partir de sol saharien algérien. Biochimie et microbiologie appliquée. Mémoire de master. Université Mentouri Constantine. Algérie.p85.

Nielsen J, E., Borchert T, V. Vriend, G. (2001), The determinants of α -amylase pH-activity profiles . Protein Engineering, Oxford University Press. 14(7):505-512.

Nouadri T. (2011). L' α -amylase de *Penicillium camemberti* PL21: Production, Purification, caractérisation et immobilisation. Thèse de doctorat. Université Mentouri Constantine.

Nouadri T, Meraihi Z, Djekrif-Dakhmouche S Bannamoun L, (2010) Purification and characterization of the α -amylase isolated from *Penicillium camemberti* PL21. Research Laboratory in Enzymatic Engineering, Department of Biochemistry and Microbiology, Mentouri- University, Constantine- Algeria, Vol. 4(6), pp. 155-162

Niehaus F., Bertoldo C., Kahler, M. et Antranikian, G. (1999) ,Extremophiles as a source of novel enzymes for industrial application. Applied Microbiology and Biotechnology, Vol. 50 .p.711-729.

Oluwabunmi M, A., Adesola A, A., Grace O . (2019) Production and Characterization of Partially Purified α -amylase from *Aspergillus niger* ,Journal of Physics: Conference Series, p. 13 -78.

Ozbay N., Yargic A., Sahin R, Z, Y., Yaman E. (2019) Valorization of banana peel waste via in-situ catalytic pyrolysis using Al-Modified SBA-15, Renewable Energy; 140:633-646.

Ouédraogo N., Savadogo A., Zongo C., Somda K. M. A., Traoré S. (2012,) ,High performance amylolytic yeast strains isolation and identification for valorization of potatoes waste available in Burkina Faso. Food Res. J. 19(4) :1463-1469.

Oteng-Gyang K. (1984) .Introduction à la microbiologie alimentaire dans les pays chauds. Edition Technique et documentation.Paris.

Olempska-Beer Z . (2004). Alpha-amylase from *bacillus licheniformis* Containing a genetically engineered alpha-Amylase gene from b. licheniformis (thermostable) ;chemical and technical assessment (cta).

Obi F, O., Ugwuishiwu B, O., Nwakaire J, N. (2016), agricultural waste concept, generation, utilization and management. agricultural and bioresources engineering dept, university of nigeria, nigerian journal of technology (nijotech). 35(4) :957 – 964. <http://dx.doi.org/10.4314/njt.v35i4.34>.

Pandey A ., Nigam P., Soccol, C. R., Singh D., Soccol, V. T. (2000). Mohan R. Advances in microbial amylases, Biotechnology and Applied Biochemistry. 31(2):135-152.

Park C, S., Chang, C.C., Kim J, Y., Ogrydziak, D, M., Ryui D, D, Y. (1997). Expression,secretion, and processing of rice Alpha-amylase in the yeast *Yarrowia lipolytica*. J. Biol.Chem. 272(11):6876-6881.

Padam B , S., Tin, H.S., Chye , F.Y ., Abdullah M.I. (2014). Banana by-products: an under-utilized renewable food biomass with great potential. J Food Sci Technol. 51(12) :3527–3545

Paula M, T., López N., I., Bédou D . (2018) Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Vol. 8 :8 .

Prabha D, S., Kumar J. S. (2015).Assessment of banana fruit maturity by image processing technique. J Food Sci Technol. 52(3) :1316–1327

Padam B, S., Hoe S, T., Fook Y, C., Mohd Ismail Abdullah. (2013). Banana by-products: an under-utilized renewable food biomass . with great potential. J Food Sci Technol .51(12) :3527–3545

Redondo-Gómez C., Quesada M. R ., Astúa Silvia V, J., Zamora P.G M., Lopretti M., Vega-Baudrit, J, R. (2020); Biorefinery of Biomass of Agro-Industrial Banana Waste to Obtain High-Value. Academic Editors: Alejandro Rodríguez and Eduardo Espinosa. Vol. 25 :38-29.

Ramachandran N, Pretorius S, I., Ricardo R., Otero C. (2005). Amyolytic enzymes from the yeast *Lipomyces kononenkoae*, Biologia, Bratislava, 16 : 103-110

Rezki-Bekki M. A., Benbadis L., DeBillerbeck G., Benbayer, Z ., Jean M .(2013) ,François. Isolation and physiological characterization of indigenous yeasts from some

Algerian agricultural and dairy products. *Journal of Yeast and Fungal Research*. 4(6):75-83.

Rudiger A. P. L., Jorgensen G., Antranikian. (1995), Isolation and characterization of a heat-stable pullulanase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus woesei* after cloning and expression of its gene in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(2):567-575.

Raspor P., Zupan J. (2006) , Yeasts in extreme environments. In: Rosa C. A. Peter G. (eds). *Biodiversity and ecophysiology of yeasts*. Springer, Berlin, , p. 371-417.

Rezki-Bekki M. A. (2014) Production de métabolites par les levures : Caractérisation et identification des arômes et des alcools Thèse : Biotechnologie. Oran.p158 .

Ravindran R., Hassan S, .S., Williams G.A., Jaiswal. K. (2018). A Review on Bioconversion of Agro-Industrial Wastes to Industrially Important Enzymes. *School of Food Science and Environmental Health. Bioengineering.* p.5– 93

Subagyo A., Chafidz A . (2018). Banana Pseudo-Stem Fiber : Preparation. Characteristics and Applications Reviewed : Open access peer-reviewed chapte.

Samuel P. O. (2015). Production of Biogas from Perennial and Biennial Crop Wastes : Peach Palm and Banana's Wastes as Alternative Biomass in Energy Generation and Environmental Sustainability. *American Journal of Environmental Engineering*. 5(4):79-89

Syed, M, N., Sohail, M. (2020). Banana Peels : A Promising Substrate ZEHRA for the Coproduction of Pectinase and Xylanase from *Aspergillus fumigatus* MS16 Polish. *Journal of Microbiology*. 69 (1): 19–26

Saloni J., Sahota P., Pandove G. (2012). Preparation of Non-Alcoholic Naturally Carbonated Beverage Using Yeast Isolate from Whey Beverage. *Czech J. Food Sci*. 30(2):135-143.

Svenja L., Buddies S ,(2016) Exploring Enzymes A catalyzing science project , Bring Science Home. <https://www.scientificamerican.com/article/exploring-enzymes/>

Shafiei M., Ziaee, A, A., Amoozegar, M, A. (2010) ,*Process Biochem*. Vol .45: 694-699. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2010.01.00>.

Sethi B., Jana A , Nanda P. K. , DasMohapatra P K., Santi L. Jayanta S, Kumar P. (2016) Production of α -Amylase by *Aspergillus*

Sharma S., Vaid S., Bhat B., Singh S., Kumar B . (2019). Thermostable Enzymes for Industrial Biotechnology .Bajaj School of Biotechnology, University of Jammu, Jammu, India . *Advances in Enzyme Technology* . p 469

Sanghvi G, V., Koyani R, D., Rajput K, S . (2011), Isolation, Optimization, and Partial Purification of Amylase from *Chrysosporium, asperatum* by Submerged Fermentation , Department of Botany, Faculty of Science, The Maharaja Sayajirao University of Baroda, 21(5):470–476.

Spinnler H, E. (2013) .Enzymes d'intérêt pour la fabrication d'aliments. Procédés chimie - bio - Agroalimentaire.. Centre français.

Sidhu J, S., Zafar T.A. (2018) .Bioactive compounds in banana fruits and their , health benefits.Department of Food Science & Technology. Food Quality and Safety, 2^{ème} Edition. . p .183–188.

Shinkawa S., Mitsuzawa S. (2020) .Feasibility study of on-site solid-state enzyme production by *Aspergillus oryzae*. Fundamental Technology Center. Shinkawa and Mitsuzawa Biotechnol Biofuels, <https://doi.org/10.1186/s13068-020-1669-3>

Singh S., Sharma V., Soni M., DAS S. (2011) ,Biotechnological applications of industrially important amylase enzyme. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 2:486-496.

Saranraj P., Stella D., (2013) Fungal amylase : a review. *Int J Microbiol Res*, 4 :203-211 .

Simon P., Meunier R (1970) , Microbiologie industrielle et genie biochimique. Masson ET Cie ,Editeurs. Paris Vie . p .385-411.

Sakwa L., Cripwell, R., Rose A. S., Viljoen-Bloom M.. (2018) Consolidated bioprocessing of raw starch with *Saccharomyces cerevisiae* strains expressing fungal alpha-amylase and glucoamylase combinations *FEMS Yeast Research*, 18, 2018, foy085

Sci A. (2012). Production de alpha amylase par streptomyces sp. Optimisation d'un milieu de production à base de dechet d'orange. Mémoire de magister. Université mentouri constantine

Subash C, B, G., Anbu, P., Arshad M, K, M.d, Lakshmipriya T., Voon, C, H., Hashim U., Chinni S, V. (2017) Biotechnological Processes in Microbial Amylase Production. *BioMed Research International* , p 9 , <https://doi.org/10.1155/2017/1272193>

Saini R., Saini H. S., Dahiya A.(2017) . Amylases: Characteristics and industrial applications. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. 6.:1865-1871

Savchenko A., Vieille C., Kang S., Zeikus J. G., (2002) *Pyrococcus furiosus* α -amylase is stabilized by calcium and zinc. *Biochemistry* ,41:6193-6201.

Salah H, A., Temerk H, A., Nivin A, S ,. Alshehri S. R.Z.,. Al-Harbi., J. A. , Mawad.A. M.M., Khaled, A, M. ,. Hesham, Abd, L., Amein K. A.. (2021) Production and Optimization of Xylanase and α -Amylase from Non-Saccharomyces

Yeasts (*Pichia membranifaciens*) .Molecular Biology Department, National Research Centre, Cairo. Vol 15.(1). pp. 452-461 . <https://doi.org/10.22207/JPAM.15.1.43>.

Syed D, G., Agasar D., Pandey A. (2009) Production and partial purification of α -amylase from a novel isolate *Streptomyces gulbargensis*. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology. Vol. 36 :18-94.

Toumi S, (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. Biologie moléculaire. (Doctoral dissertation. Université Djillali Liabes, Sidi Bel Abbes, Algerie). p129 .

Tapan Kr., Dutta J., Pahari M, P, R., Bhattacharya T. (2006) Department of Zoology, Vidyasagar University, Midnapore - 721 102, West Bengal - INDIA 2Section of Neuroscience, Department of Oral Biology, University of Nebraska Medical Center, 40th Holdrege, Lincoln, 30:187-195

Takeuch, A., Yoshitaka S, I, N., Mura K., Okada S., Tokue C., Arai S. (2006) . Purification and Characterization of an α -Amylase of *Pichia burtonii* Isolated from the Traditional Starter "Murcha" in Nepal Department of Nutritional Science. Faculty of Applied Bio-Science. Biosci. Biotechnol. Biochem, 70(12):3019–3024

Takeuchi A Shimizu-Ibuka A., Nishiyama Y., MURA K., OKADA S., TOKUE C., Arai S. (2006) Purification and Characterization of an α -Amylase of *Pichia burtonii* Isolated from the Traditional Starter "Murcha" in Nepa. Biosci. Biotechnol. Biochem., 70 (12) :3019–3024.

Vale V, F., Moreira B, H., Moraes C, S., Pereira M, H., Genta F.A., Gontijo, N.F. (2012). Carbohydrate digestion in *Lutzomyia longipalpis* larvae (Diptera- Psychodidae). J. Insect Physiol. 58 :1314-1324.

Van Der M, J, E. C., Van Der V, B., Uitdehaag J, C, M., Leemhuis H., Dijkhuizen L. (2002) Properties and applications of starch-converting enzymes of the α -amylase family. Journal of Biotechnology, Vol. 94.:137-155.

Unal A. (2015). Production of α -amylase from some thermophilic *Aspergillus species* and optimization of its culture medium and enzyme activity. Afr. J. Biotechnol. 14. (47) :3179-3183

Xian L., Wang F., Luo X., Yu-Liang F., Jia-Xun F . (2015), Purification and Characterization of a Highly Efficient Calcium- Independent α -Amylase from *Talaromyces pinophilus* 1-95, State Key Laboratory for Conservation and Utilization of Subtropical Agro-bioresources

Werner J. b., badoud R . (2010) , Entournand ; science et technologie des aliments. p978.288.

Références Bibliographiques

- Walker G. M.** (1998) *Yeast. Physiology and Biotechnology* John Wiley and Sons, , Chichester
- Walker G. M.** (2009), *Yeast*. In M. Schaechter, ed. *Desk Encyclopedia of Microbiology*. 2nd ed. London : Elsevier/ Academic Press, pp. 1174-1187.
- Walker G, M., Stewart Graham G., (2016),** *Saccharomyces cerevisiae* in the Production of Fermented Beverages, *Beverages*. Vol 2, (30).
- Wangsa T, I., Khomani H, Subroto, T. (2012) .** Chromatography as the Major Tool in the Identification and the Structure-Function Relationship Study of Amylolytic Enzymes from *Saccharomycopsis Fibuligera* R64 Dessy Natalia and Soetijoso Soemitro
- Wanderley K, J., Torres F, A, G., Moraes L, M, P., Ulhoa C, J. (2004).** Biochemical characterization of K-amylase from the yeast *Cryptococcus flavus*, Laboratório de Enzimologia, Departamento de Ciências Fisiológicas (ICB) ,FEMS Microbiology Letters. 2 (31):165-169.
- Yang F, H. (2018).** Triploid-tetraploid Technology for Oyster Aquaculture Industry Marine Laboratory, FSU,
- Zhang Q., Han .. Xiao H. (2016)** Microbial-amylase: A biomolecular overview School of Chemical Engineering and Technology, Tianjin University.Tianjin. China, p14, <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2016.11.0>.
- Zhang H., Li R, D, Y., Liu Y., Xiang Y., Zhang R., Dai Y. (2010) .** *Clavispora lusitaniae* and *Chaetomium atrobrunneum* as Rare Agents of Cutaneous Infection. *Mycopathologia*,169 (5) :373-380.
- Zoubiri L. (2017) ,** Thèse : Production d'alpha amylase par des moisissures cultivées sur milieu à base de rebuts de dattes. Mémoire de master . Univesrité Mentouri, Institut de la Nutrition de l'Alimentation et des Technologies Agro-alimentaires (INATAA).Constantine.Algerie.

Présenté par :

BOULHOUT ROUMEISSA

BOUKEBOUS HIND SELOUA

Encadrer par :

Dr. DAKHMOUCHE- DJEKIRIF Scheherazed

Etude des propriétés physico-chimiques de l' α -amylase levurienne

Résumé : Cette étude a été réalisée afin de connaître les propriétés physico-chimiques de l' α -amylase de *Candida sp.* isolée à partir de pelures de pomme de terre. La production de l' α -amylase est réalisée par fermentation solide sur un milieu, préalablement optimisé. Le milieu est à base de déchets de banane enrichie par le glucose 1%, la peptone 0,5%, l'humidité à 60%, l'inoculum à 4,105, la température de 37°C, le pH7 et le temps d'incubation 48h. La production a atteint 6126,71 U/g de substrat. La purification partielle de l' α -amylase de *Candida sp.* Par le sulfate d'ammonium à 40% et la dialyse a donné de degré de purification de 18,3 et 24,2 et un rendement de 35,3 et 13,4. L'étude des caractères physico-chimiques de l' α -amylase a montré que l'enzyme montre deux pH optimum de 5 (2443 UI) et de 8 (2559,4 UI) apparemment deux isoenzymes. Leur température optimale est de 75°C. Quant à la stabilité thermique, l'enzyme maintient 80% de son activité initiale, après incubation de 120min à 70°C et perd 43% après 3h d'incubation à 100°C. L'effet des sels (MgSO₄, CaCl₂ et FeSO₄, NaCl, ZnCl₂, CuSO₄, MnSO₄) a été aussi étudié. Les résultats montrent que MgSO₄, CaCl₂ et FeSO₄, sont des activateurs puisqu'ils ont augmenté l'activité de 114%, 101,2% et 129% respectivement. Tandis que NaCl, ZnCl₂, CuSO₄, MnSO₄ sont des inhibiteurs. L'effet des détergents (EDTA, SDS, urée et tween80) a été aussi, élaboré et il s'est avéré que l'activité α -amylasique a augmenté en présence de l'EDTA et le SDS avec un taux de 110,065% et 115,152% respectivement alors qu'elle est diminuée par l'urée et le tween 80. Ces résultats indiquent que l'enzyme partiellement purifié peut être utilisée dans plusieurs applications industrielles notamment l'industrie des détergents, du textiles, et du papier, mais pour les domaines alimentaires et pharmaceutiques, elle doit être totalement purifiée.

Mots clés : *Candida sp.*, α -amylase, déchets de banane, FMS, purification.

Présidente du jury : NOUADRI T. M.C.A, Université des Frères MENTOURI Constantine

Examinatrice : BOUKHALFA H. M.C.B, Université des Frères MENTOURI Constantine