

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

Université des Frères Mentouri
Constantine



جامعة الاخوة منتوري قسنطينة

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

كلية عاوم الطبيعة والحياة

Département BIOCHIMIE/BIOLOGIE CELLULAIRE et MOLECULAIRE

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

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : *Biochimie / Analyse Protéomique et Santé*

Intitulé :

α - glucosidase thermostable de la levure *Candida sp.* : Production, Purification et Caractérisation

Présenté par :

- BOUKAIL Hanifa- Amina
- MAAZI Asma

Soutenu le : 13 Juillet 2015

Jury d'évaluation :

Président : BENHAMDI A.

M.C.B., Université Frères MENTOURI Constantine

Rapporteur : MERAIHI Z.

Professeur, Université Frères MENTOURI Constantine

Co-rapporteur : DAKHMOUCHE S.

M.A.A., ENS, Université Constantine 3

Examinatrice : BENNAMOUN L.

M.A.A., Université Frères MENTOURI Constantine

Année universitaire : 2014 – 2015

Remerciements

On voudrait en premier lieu remercier notre dieu Allah qui nous a donné la volonté et le courage pour la réalisation de ce travail.

*Nous tenons en second lieu à remercier chaleureusement notre directrice **Madame MERAIHI** qui a dirigé ce modeste travail de recherche de Master. Nous lui remercions pour tout ce qu'elle nous a apporté, pour ses conseils, sa présence, sa patience, pour nous avoir fait confiance et pour nous avoir laissé la liberté nécessaire à l'accomplissement de nos travaux, tout en y gardant un œil critique et avisé. Nous lui remercions également pour plusieurs relectures de ce rapport.*

*Merci également à Madame **DAKHMOUCH-DJEKRIF S.** Notre co-encadreur pour son aide et pour ses conseils.*

Nos plus vifs remerciements s'adressent :

*À **Mlle BENHAMDI A.** Maître de conférences à l'U. Frères **MENTOURI** pour le grand honneur de présider le jury.*

*À **Mme BENNAMOUN L.** Maître assistante à l'U. Frères **MENTOURI** pour avoir bien voulu examiner ce travail.*

*Aussi on présente notre reconnaissance à monsieur **BOULAHROUF Abderrahmane.** Professeur à l'université Frères **MENTOURI** d'avoir accepté de nous accueillir dans son labo, merci aussi à **BOULAHROUF Khaled** et à toute l'équipe de la microbiologie générale qui ont accepté de répondre à nos interrogations avec gentillesse.*

Enfin, nous tenons également à remercier tous nos professeurs qui nous ont enseigné durant nos études et toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Amina et Asma

Dédicaces

Je tiens à exprimer ma plus profonde reconnaissance à

Ma mère

Celle a œuvré pour ma réussite, de par son amour, son soutien, tous les sacrifices consentis et ses précieux conseils et pour sa présence dans ma vie.

Mon père

Celui qui peut être fier et trouver ici le résultat de longues années de sacrifices et de privations pour m'aider à avancer dans la vie. Merci pour les valeurs nobles, l'éducation et le soutien permanent venu de toi.

Mes chers frères Zaki et Anis

Ceux n'ont cessé d'être pour moi des exemples de persévérance, de courage et de générosité.

*Une spéciale dédicace à une personne qui a été très paternaliste avec moi **Meriem**. Trouvez dans ce modeste travail mes sincères gratitude.*

Amina

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail

À mes parents .Aucun hommage ne pourrait être à la hauteur de l'amour dont ils ne cessent de me combler. Que dieu leur procure bonne santé et longue vie.

*Aux personnes dont j'ai bien aimé la présence dans ce jour, à tous mes frères et mes sœurs, ma nièce **Bouchra**, et mes neveux **Salah, Ramzi et Mouncef, Nabil**, je dédie ce travail dont le grand plaisir leurs revient en premier lieu pour leurs conseils, aides, et encouragements.*

*À mes chères amies **Amina, Sara, Kouather, khadija**.*

Et à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin pour que ce projet soit possible, je vous dis merci.

Asma

Introduction	1
Revue bibliographique	
1. L'α- glucosidase	3
1.1. Définition et nomenclature	3
1.2. Mode d'action de l' α- glucosidase.....	4
1.3. Structure de l'α- glucosidase	5
1.4. Spécificité de substrat	7
1.5. Caractéristiques de l'α- glucosidase	7
✓ Température optimale et stabilité thermique.....	7
✓ pH optimum.....	8
✓ Masse moléculaire.....	9
✓ Effecteurs.....	9
✓ Source de carbone et d'azote.....	10
2. Applications l'α- glucosidase	11
2. Les levures.....	13
2.1. Généralités sur les levures.....	13
2.2. Habitats et nutrition.....	14
2.3. Minéraux, oligo-éléments et vitamines	14
2.4. Besoins physicochimiques	15
2.4.1. Effet de la température.....	15
2.4.2. Effet de pH.....	15
2.4.3. Pression osmotique et activité de l'eau	16
2.5. Isolement des levures	16
2.6. Classification et identification des levures.....	17

2.6.1. Classification des levures	17
2.6.2. Techniques d'identification	18
2.6.3. Phylogénies des levures	19
2.7. Le genre <i>Candida</i>	21
2.7.1. Morphologie.....	21
2.7.2. Habitats.....	21
2.7.3. Classification.....	22
2.7.4. Pathogénicité des espèces de <i>Candida</i>	22
2.7.5. Phylogénie des espèces de <i>Candida</i>	22
2.8. Applications des levures en Biotechnologie.....	24

Matériels et Méthodes

1. Le matériel biologique.....	28
2. Mise en évidence sur boîte d'activité de la maltase.....	28
3. Cinétique de production de la maltase à partir de la souche <i>Candida sp</i>	28
3.1. Préparation de l'inoculum.....	28
3.2. Dénombrement des cellules.....	28
3.3. Conduite de la fermentation.....	29
3.3.1. Mesure du pH.....	29
3.3.2. Mesure de la biomasse.....	29
3.3.3. Dosage de l'activité de la maltase.....	30
3.3.4. Dosage des protéines.....	30
4. Purification de la maltase à partir de la levure <i>Candida sp</i>	33
4.1. Précipitation par le sulfate d'ammonium.....	33
4.2 Dialyse	33
4.3. Chromatographie sur gel filtration sur Séphacryl S-200.....	35

5. Etudes des propriétés de la maltase de l'extrait brut et de l'extrait enzymatique partiellement purifié.....	35
5.1. Effet du pH.....	35
5.2. Effet de la température.....	35
5.3. Stabilité thermique.....	35

Résultats et Discussion

1. Repiquage de la souche de <i>Candida sp</i>	37
2. Mise en évidence de l'activité maltasique sur boîte de Pétri	38
3. Cinétique de la production de la maltase par <i>Candida sp</i>	39
3.1. Evolution de la biomasse et de la production de <i>Candida sp</i> au cours de la fermentation.....	39
3.2 Evolution des protéines et du pH au cours de la fermentation	41
4. Purification partielle de la maltase de <i>Candida sp</i>	42
5. Caractérisation de la maltase de <i>Candida sp</i> de l'extrait brut et de l'enzyme partiellement purifiée.....	45
5.1- Etude de l'effet de pH de la maltase de <i>Candida sp</i>	45
5.2-Etude de l'effet de la température de la maltase acide de <i>Candida sp</i>	47
5.3-Etude de la thermostabilité de la maltase de <i>Candida sp</i>	49
Conclusion	53
ملخص	55
Abstract	56
Références bibliographiques	57

Annexes

Figure 1: Mécanisme d'action des glucosidases à rétention de configuration.....	5
Figure 2 : Structure monomérique de l' α glucosidase.....	5
Figure 3 : Effet de différents sels sur l'activité et la stabilité de la maltase.....	10
Figure 4 : Division de cellules levuriennes par bourgeonnement.....	13
Figure 5: Arbre phylogénique des genres de Levures.....	20
Figure 6 : Colonies de <i>Candida albicans</i>	21
Figure 7 : Arbres phylogénique selon UPGMA d'espèces les plus courantes des espèces de <i>Candida</i>	23
Figure 8 : La courbe étalon pour le dénombrement des cellules.....	29
Figure 9 : La courbe étalon du glucose.....	31
Figure 10: la courbe étalon pour le dosage des protéines (sérum albumine bovine , BSA comme solution stock).....	31
Figure 11 : Protocole de purification de la maltase de <i>Candida sp</i>	32
Figure 12 : Colonies de <i>Candida sp.</i> sur un milieu solide YPGA.....	37
Figure 13 : La détection de zone de lyse de la maltase par <i>Candida sp</i> Cultivée sur milieu YPMA en boîte de pétri.....	38
Figure 14 : Profils cinétiques de la croissance, de la production de la maltase au cours de la fermentation de <i>Candida sp</i>	40
Figure 15 : Profils cinétiques des protéines et de pH au cours de la fermentation de la maltase acide par <i>Candida sp</i>	41
Figure 16 : Profil chromatographique de la maltase de <i>Candida sp.</i> sur Séphacryl S-200.....	44
Figure 17 : Effet du pH sur l'activité de la maltase de <i>Candida sp</i>	44
Figure 18 : Effet de la température sur l'activité de la maltase de <i>Candida sp</i>	47
Figure 19 : Etude de la thermostabilité de la maltase de l'extrait brut.....	50
Figure 20 : Etude de la thermostabilité de la maltase de <i>Candida sp</i>	51

Liste des tableaux

<u>Tableau 1</u> : Différentes nomenclature de l' α glucosidase.....	4
<u>Tableau 2</u> : Température optimale pour la croissance des levures.....	15
<u>Tableau 3</u> : Aw minimale permettant la croissance de certaines levures.....	16
<u>Tableau 4</u> : Classification des principaux genres des levures.....	18
<u>Tableau 5</u> : Nomenclature des <i>Candida sp</i>	22
<u>Tableau 6</u> : Production et utilisation de certaines enzymes levuriennes.....	26
<u>Tableau 7</u> : Production et utilisation de certaines enzymes ou protéines recombinantes synthétisées par des levures utilisées en thérapie.	27
<u>Tableau 8</u> : Différentes étapes de purification de la maltase produite par <i>Candida sp</i>	43

Liste des abréviations

μmol : 1 micro-mole.

AW: Activité de L'eau.

B. subtilis : *Bacillus Subtilis*.

BSA: Albumine de Sérum Bovin.

C. albicans : *Candida albicans*.

C/N : Carbone sur Azote.

CO₂ : Dioxyde de Carbone.

EC : Enzyme Commission number.

EDTA : Ethylene-Diamine Tetra Acetate.

EGF : Epidermal Growth factor.

G6PD : Glucose-6-Phosphate

Déshydrogénase.

GRAS : Generally Recognized As Safe.

IAA : Industrie Agro-Alimentaire.

INA : Industrie Non Alimentaire.

Na Cl : Chlorure De Sodium.

Na OH : Hydroxyde De Sodium.

(NH₄)₂SO₄ : Sulfate d'ammonium.

PAGE : Poly-Acrylamide Gel

Electrophoresis.

PM : Poids Moléculaire.

POU : protéines d'organismes

unicellulaires.

rpm: Rotation Par Minute.

S-200 : Séphacryl -200.

SCP : Single Cell Protein.

sp : Espèce.

UPGMA : Unweighted Pair Group

Methode with Arithmetic Mean.

V/V : Volume Par Volume.

W/V : Weight Par Volume.

YPGA : Yeast Peptone Glucose Agar.

YPMA : Yeast Peptone Maltase Agar.

Introduction

L'utilisation des levures à des fins industrielles, est un processus développé depuis des siècles par l'homme, pour la panification, la fabrication de boissons alcoolisées (Bière). La levure de bière revivifiable Super Diet est riche en nutriments pour la santé : acides aminés essentiels, de vitamines B, en protéines, en minéraux. D'autres métabolites des levures sont produits industriellement : « SCP ou POU » (Nigam , 2000 ; Rajoka et al., 2004), enzymes d'intérêts industriels (Saxena et al., 2004), protéines ou enzymes à visée thérapeutique (Keller et Layer, 2003), production de bioéthanol comme substitut du pétrole (Modl et al., 2004), production d'acides organiques, en particulier le vinaigre et les probiotiques (Lourens-Hattingh et al., 2001), production d'arômes (Hansen et al., 2005) de vitamines, en particulier la vitamine B9 (Francisco et al., 2012), production d'acides gras essentiels en particulier les oméga 3 (Bekatorou et al., 2006).

Le progrès actuel à l'échelle industrielle et à la technologie post-génomique des levures présente des avantages importants dans la production de protéines recombinantes d'intérêt médical ou industriel. Il existe une large gamme d'importantes hôtes d'expression des levures, y compris les espèces *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*, *Hansenula polymorpha*, *Kluyveromyces lactis*, *Schizosaccharomyces pombe*, et *Yarrowia lipolytica*. (Eda et Pinar Cal, 2011).

L'intérêt pour les maltases d'origine fongique a augmenté ces dernières années, où plusieurs investigations sont menées sur ces enzymes secrétées par les espèces : *Xanthophyllomyces dendrorhous* (Marin et al., 2006), *Saccharomycopsis fibuligera* (Hostinova et al., 2005), *Saccharomyces cerevisiae* (Zhang et al., 2015).

Dans ce contexte, nous cherchons à produire une maltase EC (3.2.1.20) thermostable par des levures isolées localement, une enzyme qui catalyse le clivage des liaisons α -D glycosidiques de l'extrémité non réductrice des maltooligosaccharides, des α -glycosides et des α -glycanes y compris l'amylose, pour libérer α -glucose (Giovana et al., 2006).

La première partie de la bibliographie sera consacrée à l'étude de la maltase et ses applications dans les Industries Agro- Alimentaires et dans l'industrie pharmaceutique. La

deuxième partie de la bibliographie porte sur les connaissances des levures et leur intérêt industriel.

La partie expérimentale est consacrée à l'étude de production de la maltase par la levure *Candida sp.* par fermentation, sa purification et sa caractérisation, en particulier sa thermostabilité. Cette dernière propriété est très recherchée pour le potentiel de ces enzymes à être exploiter industriellement (Prakash et al., 2009).

Nous terminons par une conclusion générale en envisageant les perspectives possibles pour la poursuite de ce travail.

Revue bibliographique

Le maltose attire beaucoup d'intérêt en raison de ses applications largement potentielles dans l'alimentation des diabétiques et dans la production pharmaceutique (Wang et al., 2013).

Le maltose appelé également (1- α -D-Glucopyranosyl-4- α -D-glucopyranose) est un disaccharide constitué de deux unités de glucose liées par des liaisons α 1-4 (Brongijk et al., 2001), il est le produit de l'hydrolyse de l'amidon sous l'action des amylases donc il peut être trouvé lors de la dégradation de l'amidon (Demir et al., 2013).

Le métabolisme du maltose chez la levure est sous le contrôle de trois mécanismes de régulation générale : induction, répression et inactivation de glucose (Novak et al., 2004). Le maltose est transporté dans la cellule avec la plupart des acides aminés par l'absorption des protons à partir du milieu. Un proton est transporté avec chaque molécule de maltose (Busturia et al., 1985). Le système de transport du maltose peut être inhibé par le glucose et également par le fructose (Siro et Lovegren, 1979). A l'intérieur de la cellule, le maltose est hydrolysé par la maltase enzymatique ou α -glucosidase (α -D-glucoside glucohydrolase) EC (3.2.1.20), en deux unités de glucose qui sont ensuite acheminées par la voie glycolytique (Novak et al., 2004).

1. L' α -glucosidase

1.1. Définition et nomenclature

L' α -glucosidase (α -D-glucoside glucohydrolase), EC (3.2.1.20) est une enzyme extracellulaire (Nimpiboon et al., 2011), codée par le gène MALx2 (Cohen et al., 1985), ubiquitaire (Wataru et al., 2015). Elle a été purifiée et caractérisée à partir de divers animaux, des plantes, des insectes, des bactéries et à partir des champignons (Song et al., 2013).

L' α -glucosidase catalyse le clivage des liaisons α -D glycosidiques de l'extrémité non réductrice des maltooligosaccharides, des α -glycosides et des α -glycanes y compris l'amylose, pour libérer deux unités de glucose (Giannesi et al., 2006 ; Nimpiboon et al., 2011), mais elle a une très faible affinité vis à vis les polysaccharides et attaque donc l'amidon à un rythme très lent (Beldjil et al., 2013). Dans les environnements de faible activité d'eau, elle peut être contrainte à synthétiser obligatoirement des liaisons glycosidiques via un mécanisme de transglucosylation (Tsuyoshi et al., 2008 ; Ojiha et al., 2013), par le mécanisme

ping-pong dans lequel un intermédiaire covalent est formé entre la portion hydrate de carbone d'une molécule de donneur et d'un acide carboxylique dans le côté actif (Pavlovic et al., 2013) en produisant des oligosaccharides et des glycoconjugués (Tsuyoshi et al., 2008).

Les α -glucosidases offrent de nombreuses possibilités d'applications dans l'industrie pour produire du glucose, oligosaccharides et d'autres conjugués de sucre en tant que composés biologiquement utiles (Pavlovic et al., 2014).

Tableau 1 : Différentes nomenclature de l' α -glucosidase.

Non systématique	glucane 1-4 α glucosidase	Nimpiboon et al., 2011
Non codifié	EC (3.2.1.20)	Nimpiboon et al., 2011
Non recommandé	Maltase	Zhang et al., 2015
Synonymes	Amyloglucosidase, γ -amylase, α – glucosidase lysosomale, exo-1,4- α -glucosidase, glucose amylase, γ -1,4-glycan glucohydrolase, maltase acide, 1,4- α –D glucane glucohydrolase, glucoamylase, α -glucoside hydrolase , 1,4-glucoside α -D-glucosidase , maltase-glucoamylase.	Jannavi, 2013 Sim et al., 2010 Sim et al., 2008 Ren et al., 2011

1.2. Mode d'action de l' α – glucosidase

Les α -glucosidases catalysent deux types de réactions : transfert d'un résidu de glycosyle à partir de l'extrémité non réductrice d'un oligosaccharide dans de l'eau (hydrolyse) ou transfert de ce résidu sur une molécule d'accepteur (transglucosylation). Ces réactions procèdent par le maintien de la configuration anomérique α qui s'opère par un mécanisme à double déplacement conduisant à une rétention de la configuration (Figure 1) du carbone anomère (Hancock, 2006 ; Soro, 2007).

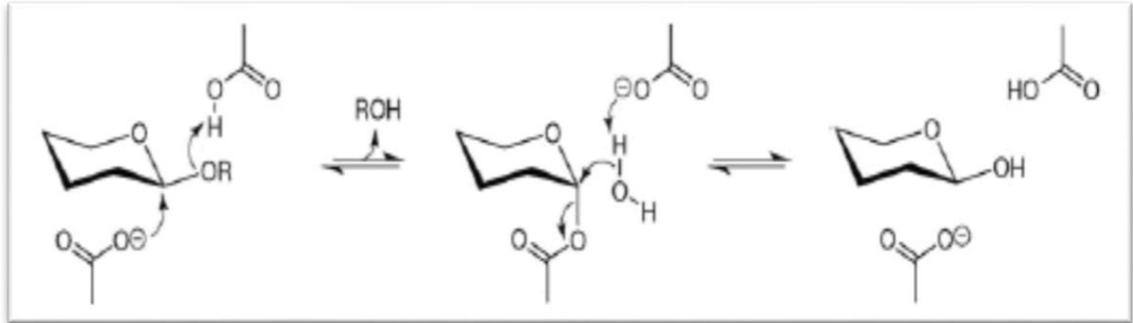


Figure 1 : Mécanisme d'action des glucosidases à rétention de configuration (Hancock et al., 2006).

1.3. Structure de l' α - glucosidase

L' α - glucosidase est une glycoprotéine appartient à la famille des glycosides hydrolases (Soro, 2007). Elle peut avoir une structure monomérique ou homodimérique (Shirai et al., 2008) et est constituée de 4 grands domaines et deux sous-domaines (figure 2).

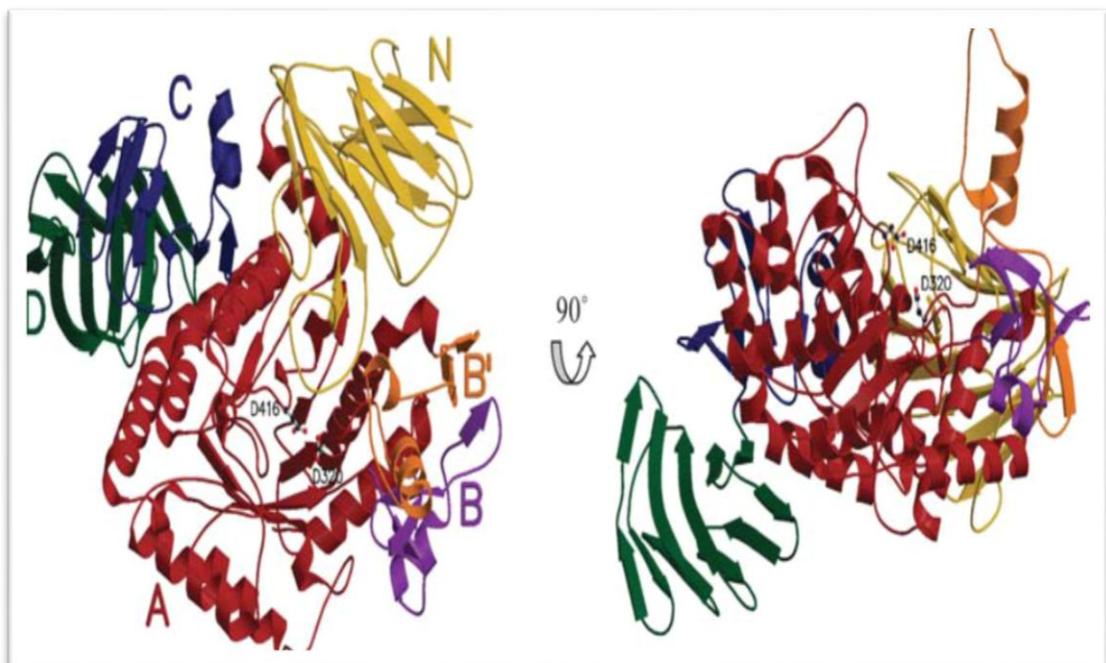


Figure 2 : Structure monomérique de l' α - glucosidase (Ernst et al., 2006).

- Domaine N (N-terminal) : jaune
- Domaine A (β/α)₈ (central catalytique) : rouge
- Sous-domaine B (boucle $A_{\beta 3} \rightarrow A_{\alpha 3}$) : violet
- Sous-domaine B' (boucle $A_{\beta 4} \rightarrow A_{\alpha 4}$) : orange
- Domaine D (C-terminal) distale : vert
- Domaine C (C-terminal) proximale : bleu

➤ Domaine N :

Le domaine N-terminal (résidus 1-153) comporte 11 brins antiparallèles comprenant plusieurs longues boucles (résidus 17- 42, 66 -78 et 84 -99). Elles contiennent trois motifs de séquences courtes et coopèrent avec le domaine catalytique. Les résidus hautement conservés dans le domaine N-terminal sont Asp 87 Tyr 99 qui contribuent au fonctionnement du site actif, ce qui suggère que le domaine N pourrait être directement impliqué dans la liaison au substrat et / ou le maintien de la structure du site actif. Le domaine N contient ainsi des sites secondaires pour la reconnaissance d'hydrates de carbone (Ernst et al., 2006).

➤ Domaine A :

Le domaine catalytique (résidus 154 - 251, 291 - 324 et de 368 - 529) comporte des hélices ($A\alpha'$ et $A\alpha 8'$) qui assurent un emballage serré avec l'extrémité N et avec le domaine C-terminal et il contient un tonneau (β/α)₈ dans chaque extrémité (Ernst et al., 2006).

➤ Domaine C :

Le domaine C-terminal proximale (résidus 530 - 604) correspond à une séquence plus conservée par rapport aux domaines terminaux N et D, Il comporte deux petits segments hélicoïdaux ($C\alpha 1$ et $C\alpha 2$) qui remplissent une cavité entre les domaines N, A et C, et contribuent ainsi à la compacité de la structure multi-domaine (Ernst et al., 2006).

➤ Domaine D :

Le domaine distale D-terminal (résidus 605 - 693) forme 11 brins essentiellement antiparallèles, bêta sandwich et il est composé de deux feuilles l'une contient cinq brins et l'autre six brins (Ernst et al., 2006).

L' α -glucosidase comporte un site de liaison du calcium avec l'ion calcium est coordonné avec les atomes O-Asp 21, Asn 23-O, Asp 25-O, O-Ile 27, Asp 29-O, et une molécule d'eau (Tsuyoshi et al., 2008). La maltase est donc une métalloenzyme à calcium dépendante qui joue un rôle dans la stabilité structurelle thermique (3D) et participe à une augmentation de l'activité enzymatique (Zhang et al., 2013).

1.4. Spécificité de substrat

Les α -glucosidases sont classées en trois catégories (I, II et III) en fonction de leurs spécificités de substrat : Type I ; les α -glucosidases ont une spécificité pour les substrats hétérogènes comme le saccharose et aryle glycosides mieux que le maltose, type II : les α -glucosidases sont plus actifs sur les substrats homogènes comme le maltose et l'isomaltose et présentent une faible activité vers les substrats hétérogènes, les enzymes de type III ressemblent aux enzymes de type II par rapport à la spécificité du substrat, mais capables de bien hydrolyser les polysaccharides tels que l'amylose et l'amidon (Song et al., 2013).

Bien que la spécificité du substrat de l' α -glucosidase varie considérablement en fonction de la source (Kimura et al., 2004), la plupart des α -glucosidases levuriennes et bactériennes appartiennent au type I (Wang et al., 2004 ; Nimpiboon et al., 2011), tandis que les α -glucosidases isolées à partir des divers champignons répartissent principalement en type II (Yamamoto et al., 2004 ; Zhang et al., 2011) mais également en type I.

le domaine catalytique N-terminal de l' α -glucosidase agit préférentiellement sur les liaisons α -1,4 des oligosaccharides linéaires courts, influençant ainsi la spécificité de substrat de cette enzyme (Xuan et al., 2014).

1.5. Caractéristiques de l' α -glucosidase

✓ Température optimale et stabilité thermique

La température optimale varie selon l'espèce et l'origine de l'enzyme, certaines α -glucosidases sont identifiées et caractérisées à partir de diverses espèces fongiques vivantes dans des milieux extrêmes et peuvent supporter des températures élevées parfois à $-2=0^{\circ}\text{C}$ comme chez *Thermoascus aurantiacus* (Carvalho et al., 2010) et à 65°C pour *Aspergillus niveus* (Da Silva et al., 2009), d'autres sont moins thermostables : comme chez *Chaetomium thermophilum var. coprophilum* à 60°C (Giannesi et al., 2006), *Malbranchea cinnamomea* montre une température optimale de 50°C (Yan et al., 2015), *Trichoderma longibrachiatum* avec 45°C (Akinloye et al., 2012). Les α -glucosidases bactériennes ont des activités maximales à des températures très différentes inter-espèces et inter-genres, à titre d'exemple : *Bacillus licheniformis* ; 45°C (Nimpiboon et al., 2011), *Geobacillus sp.* avec une

température de 60°C (Cihan et al., 2009), *Thermus caldophilus* ; 90°C (Oyekanmi et al., 2001). Les α -glucosidases d'origine levurienne ont des températures maximales, variant de 40 à 60°C (Oyekanmi et al., 2001) comme : *Saccharomyces cerevesiae* dont la température optimale est 40° C (Zhang et al., 2015) , *Xanthophyllomyces dendrorhous* possède un optimum de 45° C (Marin et al., 2006), la levure *Saccharomycopsis fibuligera* qui est plus thermostable avec une température optimale de 55°C.

Les α -glucosidases bactériennes ont généralement une large gamme de thermostabilité , *Geobacillus thermodenitrificans* F84 est stable pendant 5 h à 60°C et conserve 68 % de son activité initiale (Cihan et al., 2010), *Geobacillus sp. A333* et *thermophilic bacterium A343* gardent des activités initiales de 83% et 92% respectivement pendant 5 h à une température de de 60°C (Cihan et al., 2009). Cette thermostabilité peut être expliquée par la présence des ponts S-S qui stabilisent l'enzyme (Prakash et Jaiswal, 2010).

L' α -glucosidase d'origine fongique comme pour *Aspergillus niveus*, la sensibilité thermique est 60 min à 60°C (Da Silva et al., 2009), une autre espèce des moisissures ; *Mortierella alliacea* est stable à 50°C pendant 15 minutes (Tanaka et al., 2002). Chez les levures : l'enzyme de *Xanthophyllomyces dendrorhous* montre stable et sa demi- vie est de 3 h à 50°C (Marin et al., 2006). Celle de la levure *Saccharomycopsis fibuligera* présente une thermostabilité de 55°C pendant 10 min (Hostinova et al., 2005).

✓ *pH optimum*

La plupart des α - glucosidases ont un pH optimal entre 4,5- 9,0 (Giannesi et al., 2006 ; Zhang et al., 2011). Chez les levures le pH varie selon les souches : pH 4,5 pour *Schizosaccharomyces pombe* (Okuyama et al., 2001), pH 5,5 pour les deux espèces : *Xanthophyllomyces dendrorhous* et *Saccharomycopsis fibuligera* (Hostinova et al., 2005 ; Marin et al., 2006). pH 7 pour *Saccharomyces cerevesiae* (Zhang et al., 2015).

Le pH optimum des α - glucosidases bactériennes est proche de la neutralité : pH 6,0 pour l'enzyme de *Bacillus licheniformis* (Nimpiboon et al., 2011) , pH 6,5 de *Thermus caldophilus* (Oyekanmi et al., 2001), pH 6,8 pour l'enzyme de *Geobacillus sp.* (Cihan et al., 2009).

Le pH des α -glucosidases d'origine fongique est variable : pH 4,5 pour *Thermoascus aurantiacus* (Carvalho et al., 2009) qui est similaire à celui de *Trichoderma longibrachiatum* (Akinloye et al., 2012), pH 6 pour *Aspergillus niger* (Zhang et al., 2011) et pH 7 pour *Chaetomium thermophilum* (Giannesi et al., 2006). Un pH 5 est observé chez la moisissure *Malbranchea cinnamomea* (Yan et al., 2015).

✓ *Masse moléculaire*

Les α -glucosidases ont généralement des poids moléculaires qui varient entre 60 et 409 kDa (Nashiru et al., 2001). Chez certaines moisissures le PM est très faible : 54 kDa pour la maltase synthétisée par *Paecilomyces lilacinus* (Kobayashi et al., 2003) et 56 kDa pour celle d'*Aspergillus niveus* (Da Silva et al., 2009), 58 kDa pour l'enzyme de *Trichoderma longibrachiatum* (Akinloye et al., 2012). D'autres α -glucosidases ont des masses moléculaires plus élevées : 107 kDa chez la moisissure *Chaetomium thermophilum var. coprophilum* (Giannesi et al., 2006) et 107 kDa pour *Aspergillus niger* (Zhang et al., 2011). Tandis que les enzymes de levures peuvent avoir des masses moléculaires qui semblent compatibles : 63 kDa pour *Saccharomyces cerevisiae* (Pavlovic et al., 2013), 65 kDa pour l'enzyme de *Candida albicans* et 105 kDa pour celle de *Schizosaccharomyces pombe* (Marin et al., 2006). Par ailleurs la levure *Saccharomyces cerevisiae* synthétise une maltase avec un PM de 68 kDa (Zhang et al., 2015).

✓ *Effecteurs*

Les effets de différents sels sur l'activité de l' α -glucosidase ont été étudiés par l'équipe de Ojima et al., (2012) (figure 3) dans le but de déminer l'influence des différents cations monovalents et divalents comme Mg^{2+} et Ca^{2+} sur l'activité de l'enzyme. L'activité de la maltase en absence des sels a été considérée comme 100%, correspondant à une valeur de 5% dans la figure 3. Les activités relatives en présence d'une concentration en sel de 10 mM sont les suivants : LiCl 151%; NaCl 116%; KCl 601%; RbCl 579%; CsCl 332%; NH_4Cl 548%; $MgCl_2$ 30%; $CaCl_2$ 20%; $CoCl_2$ 1%.

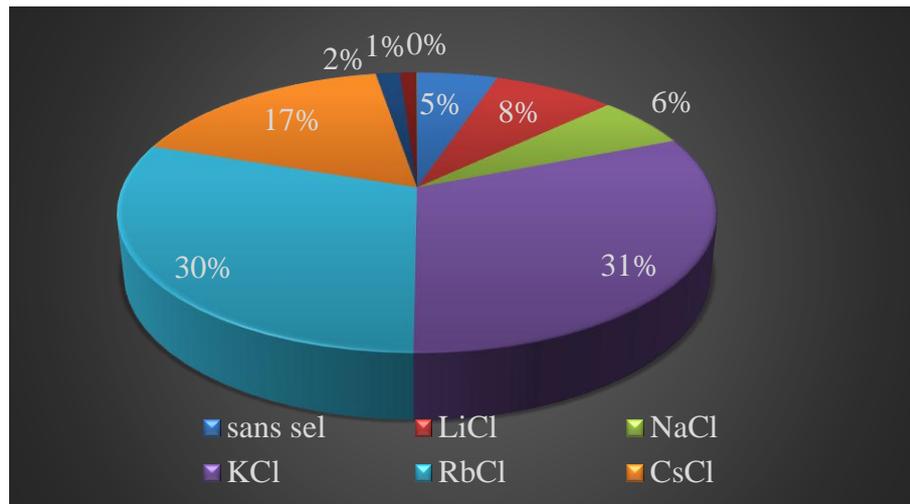


Figure 3 : Effet de différents sels sur l'activité et la stabilité de la maltase (Ojima et al., 2012).

Cependant plusieurs inhibiteurs de l' α -glucosidase sont mis en évidence : CuSO_4 , CoCl_2 , MnSO_4 et l'extrait de viande de bœuf, Hg^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} , Ca^{2+} (Kwong et al., 1983 ; Zhang et al., 2014), l'urée, le rose bengale et le 2-iodoacétamide (Zhang et al., 2013) et notamment les xanthones isolées à partir des sources naturelles comme les fleurs de *swertia mussotii*, *tectona grandis*. Le triterpène glycoside à partir des feuilles des méfaits d'*Acanthopanax*, glycosides flavonoïdes de *Microctis folium* et les polyphénols du thé vert (Xuan et al., 2014 ; Wang et al., 2012 ; Chen et al., 2013).

Au contraire, les cations Mn^{2+} , Mg^{2+} , et les acides aminés : L-cystéine, L-histidine, le Tris et l'EDTA stimulent l'activité de la maltase (Kwong et al., 1983), selon les mêmes auteurs, la peptone et l'extrait de levure améliorent la production de l'enzyme.

✓ Les sources de carbone et de l'azote

Les sources de carbone et de l'azote sont indispensables à la croissance et à la survie des microorganismes. Pour les champignons le rapport C/N = 20 est nécessaire pour une bonne croissance (Botton et al., 1990).

Les besoins en ces matières carbonées et azotées varient selon les souches. Il existe plusieurs substances en tant que source de carbone qui peuvent induire l'expression de la maltase principalement le maltose. Son substrat (1- α -D-Glucopyranosyl-4- α -D-glucopyranose) comme chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* utilisée au cours de la

fermentation de bière (Jens et Brandt, 2006), amylose, l'amidon, maltooligosaccharides et isomaltose (Giannesi et al., 2006), Les sources azotées organiques sont la poudre de soja pour les enzymes d'*Aspergillus oryzae*, *Actinomucorelegans*, *Rhizopusarrhizus*, et notamment pour *B. subtilis* B2 (Zhu et al., 2008), la peptone, l'extrait de levure, ou le mélange des deux ; extrait de bœuf pour la bactérie *Lactobacillus acidophilus*. (Kwong et al., 1983).

2. Applications de l' α -glucosidase

Les propriétés catalytiques efficaces des enzymes ont déjà promu leur introduction dans plusieurs produits et procédés industriels (Ole et al., 2002) : en IAA, en industries, chimiques, et surtout dans le domaine médical et pharmaceutique, en effet, le marché biopharmaceutique a atteint en 2003 un chiffre d'affaires de 38 Milliards de dollars représentant 8% du marché pharmaceutique mondial (Little, 2004). Selon le même auteur, ce marché devrait atteindre près de 100 milliards de dollars en 2010 et représenter 12% du marché pharmaceutique mondial.

Dans ce contexte, l' α -glucosidase est utilisée :

- **Dans l'industrie pharmaceutique** : la production de glucose, des oligosaccharides et d'autres conjugués de sucre et des composés biologiquement utiles en tant que médicaments (Pavlovic et al., 2012 ; Pavlovic et al., 2014). L'hydrogénation du maltose en maltitol est d'une grande importance en raison de l'application potentielle de maltitol comme un substitut de sucre dans l'alimentation moderne, surtout pour les diabétiques (Wang et al., 2013) ou les formes de l'hyperlipoprotéïnémie et de l'obésité (Baron, 1998 ; Carvalho, 2006).
- **En panification** : la maltase produite par la levure *Saccharomyces cerevisiae* est utilisée comme additif dans la pâte (Jens et Brandt, 2006).
- **Domaine thérapeutique** : l' α -glucosidase recombinante des levures *Saccharomyces pombe* et *Pichia pastoris* est efficace pour le traitement de la forme infantile de la maladie de Pompe (Kishnani et al., 2007 ; Praline et al., 2009).

- **l'industrie de la biotechnologie** : les α glucosidases sont des enzymes clés pour la préparation de boissons alcoolisées et de la brasserie (vin, saké) (Iwata et al., 2003).

2. Les levures

2.1. Généralités sur les levures

Les levures sont des champignons microscopiques unicellulaires aux cellules ovoïdes ou sphériques, parfois cylindriques ou allongées (Bouix et Leveau, 1991) se détachant facilement les unes des autres et de ce fait bien adaptées à la propagation dans les liquides. Leur cytoplasme abrite l'ensemble des organites habituels des végétaux supérieurs non photosynthétiques (Guirau, 1998). Leur taille est d'environ 20 μm en longueur et d'environ 1 μm en largeur (Giannesi et al., 1994).

Les levures présentent deux modes de reproduction :

➤ La reproduction végétative

Réalisée en général par bourgeonnement multilatéral à un ou deux pôles cellulaires (figure 4), quelques levures se multiplient par fission comme la levure *Schizosaccharomyces pombe* donnant naissance à deux cellules filles de taille identique (Balasubramanian et al., 2004).

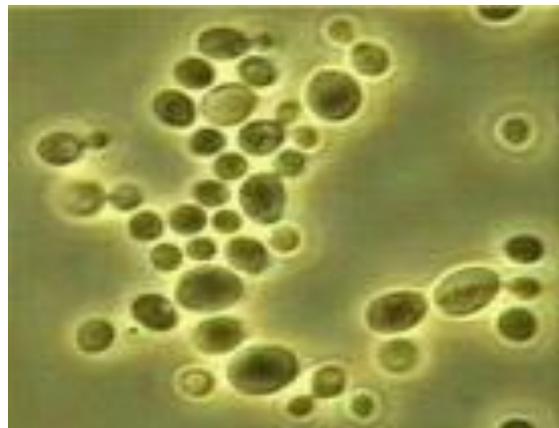


Figure 4 : Division des cellules levuriennes par bourgeonnement (Kwon-Chung et Bennett, 1992).

➤ La reproduction sexuée

S'effectue dans les conditions de stress élevés, les cellules haploïdes mourront, cependant les cellules diploïdes peuvent subir sporulation, entrant dans la reproduction sexuée (méiose) et la production d'une variété de spores haploïdes, qui peuvent aller à s'accoupler par conjugaison, donnant des cellules diploïdes (Neiman, 2005).

2.2. Habitats et Nutrition

Les levures sont des microorganismes ubiquitaires (Phaff et al., 1978 ; Bonaly, 1991) qui peuvent se trouver dans l'air, l'eau, le sol (Lo Presti et al., 2001). D'autres vivent sur les végétaux riches en sucres, dans les liquides sucrés, ou dans les aliments tels que le pain ou les céréales (Rocco et al., 1985). Elles peuvent également coloniser le tube digestif de certains animaux et les galeries des insectes (Rose et Harrison, 1987). D'autres levures sont isolées de l'Antarctique (Satyanarayama et Kunze, 2009). Généralement, les levures utilisent les glucides comme source principale de carbone et par conséquent d'énergie ; les oses comme le glucose, le fructose ou le galactose, les diholosides comme le saccharose, le maltose ou bien le lactose et les triholosides ; le raffinose et les polyosides : l'amidon, les dextrines. D'autres sources de carbone sont catabolisables par les levures : alcools, hydrocarbures (Waldron, 2010), éthanol ou glycérol (Barnett, 1976 ; Tamaki et Hama, 1982).

Les levures ne peuvent pas fixer l'azote libre, elles dépendent de ses formes oxydées ou réduites pour la synthèse des composés azotés structuraux et fonctionnels de la cellule (Babjeva et al., 1977 ; Walker, 1997). La plupart des levures utilisent l'azote sous forme d'ion ammonium nécessaire à la synthèse de certains acides aminés (Larpent et Larpent-Gourgaud, 1997 ; Guiraud, 1998).

2.3. Minéraux, oligo-éléments et vitamines

Comme pour tous les microorganismes, les minéraux jouent un rôle important et fonctionnel pour les levures car ils constituent des facteurs de croissance ou des cofacteurs pour les enzymes (Leblon , 1988).

Les Oligo -éléments (Al, Cr, Br, Cu, Pb, Mn, Ag, Sr, TI, Zn, Sn...) sont indispensables à la survie des levures mais à de très faible dose comme stabilisateurs des biomolécules (Larpent-Gourgaud et Sanglier, 1992) ou constituants essentiels des systèmes enzymatiques.

D'autres facteurs comme les vitamines (la biotine, la thiamine et l'acide pantothénique) sont essentiels à la croissance des levures comme éléments constitutifs de coenzymes variés (Riviere, 1975 ; Botton et al., 1990).

2.4. Besoins physicochimiques

2.4.1. Effet de la température

La température est un facteur prépondérant pour la vie des cultures, les levures comme les autres microorganismes ne peuvent fonctionner que dans une gamme de température optimale qui se situe généralement entre 25°C et 30°C, Toutefois, cette température ne représente pas forcément la température optimale de croissance que les levures trouvent dans certains habitats, à savoir les régions à température constamment basse ou élevée.

les levures psychrophiles se développent avec une température maximale de croissance proche de 5°C , tandis que les levures psychrotrophes sont capables de bien cultiver à des basses températures, jusqu'à 0°C et ayant une température optimale de croissance à 35°C, les mésophiles : cette catégorie regroupe notamment tous les agents pathogènes humains, leur température optimale est assez constante à 30°C, les levures thermophiles ont besoin d'une température élevée pour vivre qui peut aller jusqu'à 100°C (Leveau et Bouix, 1993 ; Prescott et al., 1995) (voir tableau 2).

Tableau 2 : Température optimale pour la croissance des levures (Leveau et Bouix, 1993 ; Prescott et al., 1995 ; Gournier et al., 1994 ; Bourgeois et al., 1996 ; Larpent et al., 1996)

	Température de croissance minimale	Température de croissance optimale	Température de croissance maximale
Levure psychrophile	0-1° C	<15° C	<20° C
Levure psychrophile facultatif=psychotrophe	Jusqu'à 0°C	20-30° C	35 °C
Levure mésophile	15-20 °C voir 0° C	20-45°C	<45° C
Levure thermophile	45°C	55-65 °C	100°C

2.4.2. Effet de pH

En général, les levures ont tendance à coloniser des environnements acides et par leurs activités métaboliques (la respiration et la sécrétion d'acide organique) acidifiant encore plus le milieu. Leur croissance optimale se fait à des pH entre 4,6 à 6,5 et certaines espèces tolèrent de grandes variations de pH et peuvent s'adapter à des milieux acides (pH 2,8 à 3,0) ou alcalins (pH 8 à 8,5) (Jones, 1981).

Les levures sont fortement inhibées par les acides acétique, lactique citrique, l'acide ascorbique et propionique (Nancy, 1983).

2.4.3. Pression osmotique et activité de l'eau

L'effet de la pression osmotique varie d'une souche à une autre (Leveau et Bouix, 1979). 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 d'eau de l'ordre de 0,60 mais avec un métabolisme lent (Leveau et Bouix, 1979). Plus une levure est osmophile, plus l'activité de l'eau est basse pour inhiber son développement (Larpen et Larpen –Gourguad, 1997).

Les levures ont des activités d'eau différentes qui peuvent varier d'une souche à autre (Tableau 3)

Tableau 3 : Aw minimale permettant la croissance de certaines levures (Larpen et Larpen – Gourguad, 1997).

Aw	Levures
0.92	- <i>Rhoaotoruta</i> - <i>Pichia</i>
0.90	- <i>Hansenula</i> - <i>Saccharomyces</i>
0.88	- <i>Candida</i> - <i>Debaryomyces</i> - <i>Hanseniaspora</i>
0.87	- <i>Debarvamyces</i>
0.80	- <i>Saccharomyces</i>

2.5. Isolement des levures

Les levures sont des microorganismes faciles à isoler et à cultiver en raison de leurs applications agro-alimentaires généralement diverses (Pol, 1996). Plusieurs études ont démontré leurs isollements sur des milieux organiques complexes, à base d'extrait de malt,

d'extrait de levure ou de peptone, en combinaison avec le glucose (Hagler et Mendonca, 1981) ou sur le milieu de Sabouraud (Guiraud et Rose, 2004).

2.6. Classification et identification des levures

2.6.1. Classification des levures

Les levures sont regroupées en deux ou trois grandes classes selon leur capacité ou non à élaborer des organes de reproduction sexuée (Hesclot et Vladescu, 1994 ; Bourgeois et Larpent, 1996).

La classification des levures est celle de (Kreger-Van., 1984) (tableau 4).

- **Les ascomycètes** : genres sexués, où les produits de la méiose ou ascospores sont endogènes et enfermés dans une structure issue du zygote : l'asque.
- **Les basidiomycètes** : genres sexués, où les produits de la méiose ou basidiospores (chez les levures sont souvent appelés balalistospores) sont exogènes et émis à l'extérieur du zygote.
- **Les deutéromycètes** : ou levures imparfaites : genres asexués ne se multipliant que par reproduction végétative.

Tableau 4 : Classification des principaux genres des levures (Kreger-Van, 1984).

Les levures ascomycètes	Les levures basidiomycètes	Les levures deutéromycètes
<ul style="list-style-type: none"> ○ Hemiascomycètes Endomycétales Spernophthoraceae <i>Metschnlkowia</i> <i>Nematospora</i> ○ Saccharomycetaceae Lipomycetoideae <i>Lipomyces</i> Nadsonioideae <i>Hanseniaspora</i> <i>Nadsonia</i> <i>Saccharomycodes</i> ○ Saccharomycernideae <i>Citeromyces</i> <i>Clavispora</i> <i>Hansennla</i> <i>Pichia</i> <i>Saccharomyces</i> <i>Saccharomycopsis</i> <i>Schwanniomyces</i> <i>Torulaspora</i> <i>Zygosaccharomyces</i> 	<ul style="list-style-type: none"> ○ Ustomyères Spondiliales <i>Leucosporidim</i> <i>Rhodosporidim</i> 	<ul style="list-style-type: none"> ○ Blastomycètes Sporobolomycetuceae <i>Bullera</i> <i>Sporobotomyces</i> Cryprococcncae <i>Brettanomyces</i> <i>Candida</i> <i>Cryptococcus</i> <i>Kloeckera</i> <i>Malassezia</i> <i>Rhodotorula</i> <i>Sterigmatomyces</i> <i>Trichosporon</i> <i>Trigonopsis</i>

2.6.2. Techniques d'identification

Il existe de nombreuses méthodes d'identification des microorganismes basées sur les caractéristiques phénotypiques, physiologiques et génomiques. La combinaison de ces trois caractéristiques est utilisée pour les études de taxonomie des levures (Barnett et al., 1990 ; Cahagnier, 1998).

- ***Les caractéristiques phénotypiques***

Elles comprennent :

- ✓ les caractères cultureux : examen de l'aspect, de la forme, la couleur et de la consistance des cultures (Guiraud, 1998).
- ✓ les caractères morphologiques cellulaires : la formation de chlamydospores et de ballistospores, la formation d'ascospores, l'observation microscopique des filaments mycéliens, permettant de définir la forme, l'arrangement et le mode de division des cellules, ainsi que de mesurer leur taille (Wickerham, 1951 ; Van der Wal et Yarrow, 1984).

- ***Les caractéristiques physiologiques***

La classification des levures se base sur un ensemble de paramètres physiologiques et biochimiques tel que la température optimale et le pH optimum de croissance (Larpen, 1991), l'assimilation de différents substrats carbonés ; critère pour la distinction des levures est soulignée (Wickerham, 1951). D'autres méthodes basées sur le typage moléculaire sont largement répandues (Vanhee et al., 2010), tel que le séquençage de l'ARNr ou l'ADNr devenus disponibles pour la classification et la réalisation phylogénétique (Boekhout et al., 1994 ; Kurtzman, 1998 ; Cai et al., 1996 ; James et al., 1997). Le métagénomique, nouvelle technique se base sur l'étude génomique est utile actuellement pour la classification des microorganismes. Il existe également des puces phénotypiques pour l'étude des caractères physiologiques (Cuadros – Orellana et al., 2013).

2.6.3. Phylogénie des levures

Après des travaux récents de Scannell et al., (2007) la phylogénie des levures a démontré que plus de 1000 espèces de *Saccharomycotina* ont été décrites leur grande biodiversité semble être dans les tripes d'insecte, et il est probable que des milliers d'autres espèces restent à découvrir à partir de cet écosystème.

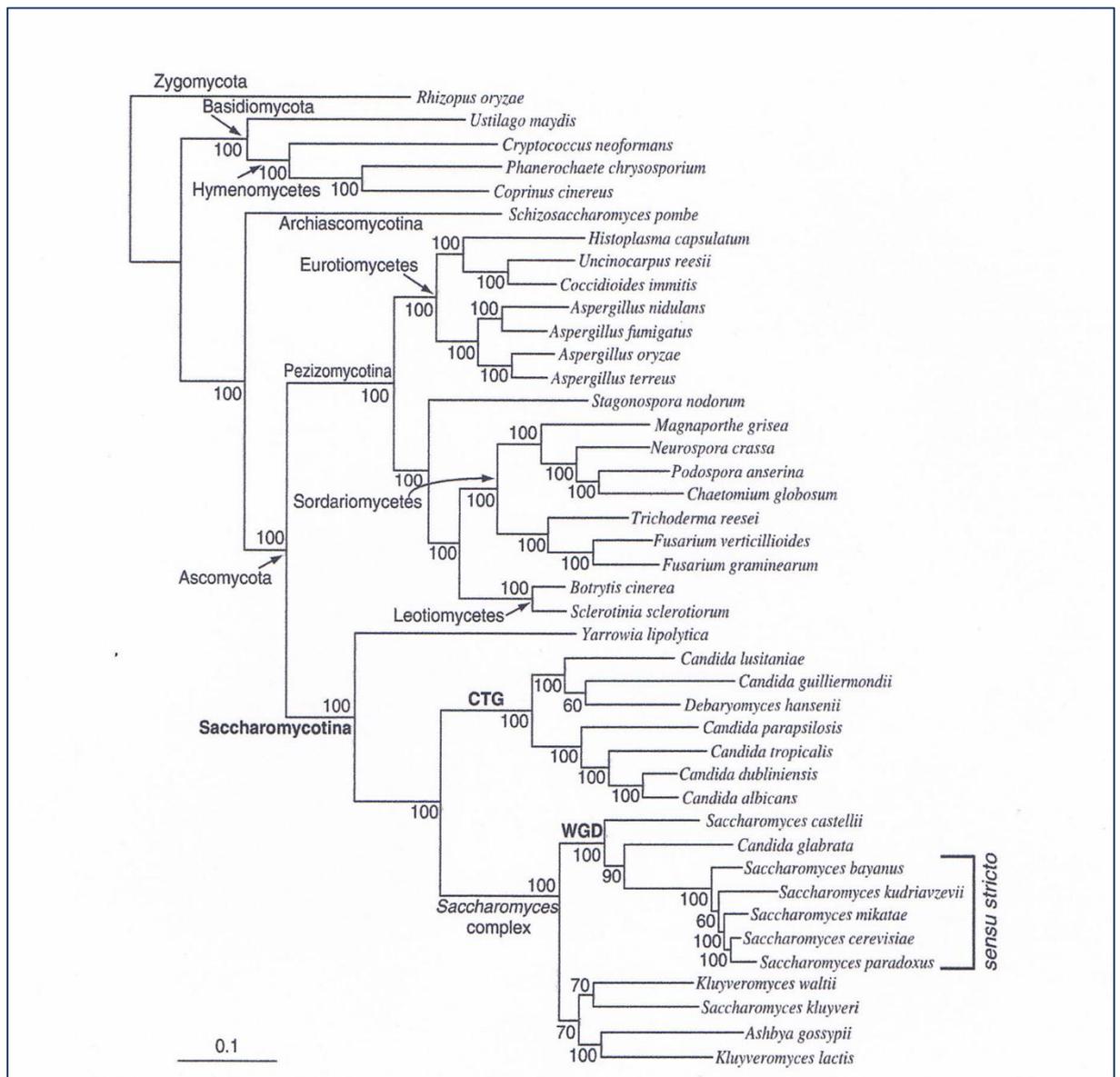


Figure 5: Arbre phylogénique des genres de Levures (Scannell et al., 2007).

Le génome de *Saccharomycotina* est séquencé et classé en trois groupes (figure 5)

- ✓ Le premier groupe est composé principalement des espèces des genres *Saccharomyces* et *Kluyveromyces*, et il est en général dénommé comme le complexe de *Saccharomyces* (Fitzpatrick et al., 2006).
- ✓ Le deuxième groupe se compose des espèces qui traduisent les codons CTG comme la serine plutôt que la leucine, Ce groupe comprend des espèces de genre *Candida* telles

que *Candida Debaryomyces hansenii* et *Candida Lodderomyces elongisporus* (Fitzpatrick et al., 2006).

- ✓ Le seul membre séquencé du troisième groupe est *Yarrowia lipolytica* (Dujon et al., 2004).

2.7. Le genre *Candida*

2.7.1. Morphologie

Le genre *Candida* peut avoir plusieurs formes : globuleuse, ovoïde, cylindrique ou allongée (Kwon- Chung, 1992), avec des couleurs différentes selon les espèces crème à jaunâtre, dont la texture peut être pâteuse, lisse, luisante ou sèche, ridée et terne, (Larone, 1995).

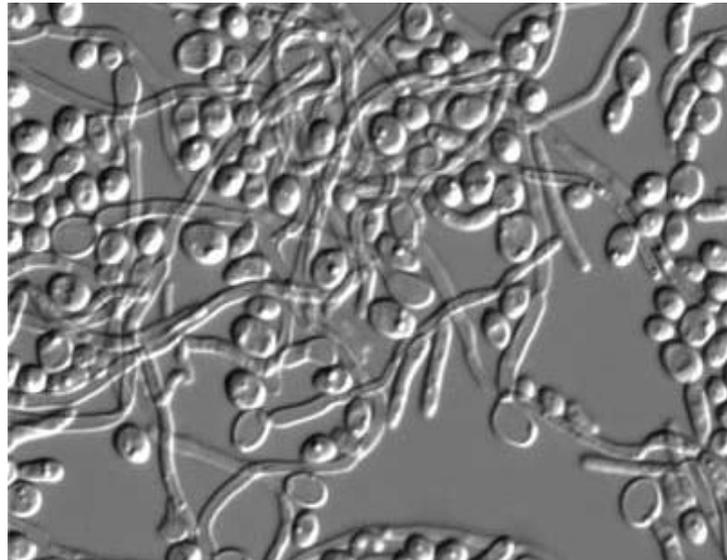


Figure 6 : Colonies de *Candida albicans* (Judith et Peter, 2002)

2.7.2. Habitats

La majorité des espèces du genre *Candida* peuvent se rencontrer dans une grande variété de niches écologiques, où elles vivent généralement en saprophytes (sur les feuilles, les fleurs, l'eau et le sol), en commensalisme inoffensive, des hôtes surtout chez les humains et les insectes, Les autres espèces sont exosaprophytes, retrouvées sur la peau et dans l'environnement (Nguyen et al., 2007, Spanakis et al., 2010).

2.7.3. Classification

Le genre de levure le plus étudié est *Candida* qui peut avoir un nombre de 196 et 200 espèces hétérogènes recensées (Kwon-Hung et al., 1992, Murray et al., 1995).

Les auteurs Kurtzman et Fell (1998) ont classé ce genre selon le tableau 5 :

Tableau 5 : Taxonomie des *Candida sp.* (Kurtzman et Fell , 1998).

Règne	Fungi
Phylum	Ascomycota
Classe	<i>Hemiascomycetes</i>
Ordre	<i>Saccharomyceales</i>
Famille	<i>Candidaceae</i>
Genre	<i>Candida</i>

2.7.4. Pathogénicité des espèces de la levure *Candida*

Les levures du genre *Candida* peuvent causer nombreuses pathologies graves et dont la fréquence reste constante (Pfaller et al., 2007), malgré le développement de nouveaux moyens thérapeutiques, en particulier chez des patients immunodéprimés (Benedict et al., 1994).

Les espèces de *Candida* peuvent provoquer plusieurs infections (Manolakakid et al., 2010), *Candida albicans* est l'espèce la plus pathogène du genre *Candida* chez l'homme (plus de 50 %) (Bodey, 1984 ; Edwards, 1991) elle provoque des infections chez l'homme et chez d'autres animaux (candidose ou muguet). Cependant, d'autres espèces comme *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Candida krusei*, peuvent sous certaines conditions ou dans certains groupes de population être pathogènes (Wingard, 1979 ; Meunier-Carpentier et al., 1981 ; Merz et al.,1986).

2.7.5 Phylogénie des espèces de *Candida*

Comme le montre la figure 7, les espèces de *Candida* sont au nombre de 26 (Yokoyama et al., 2000)

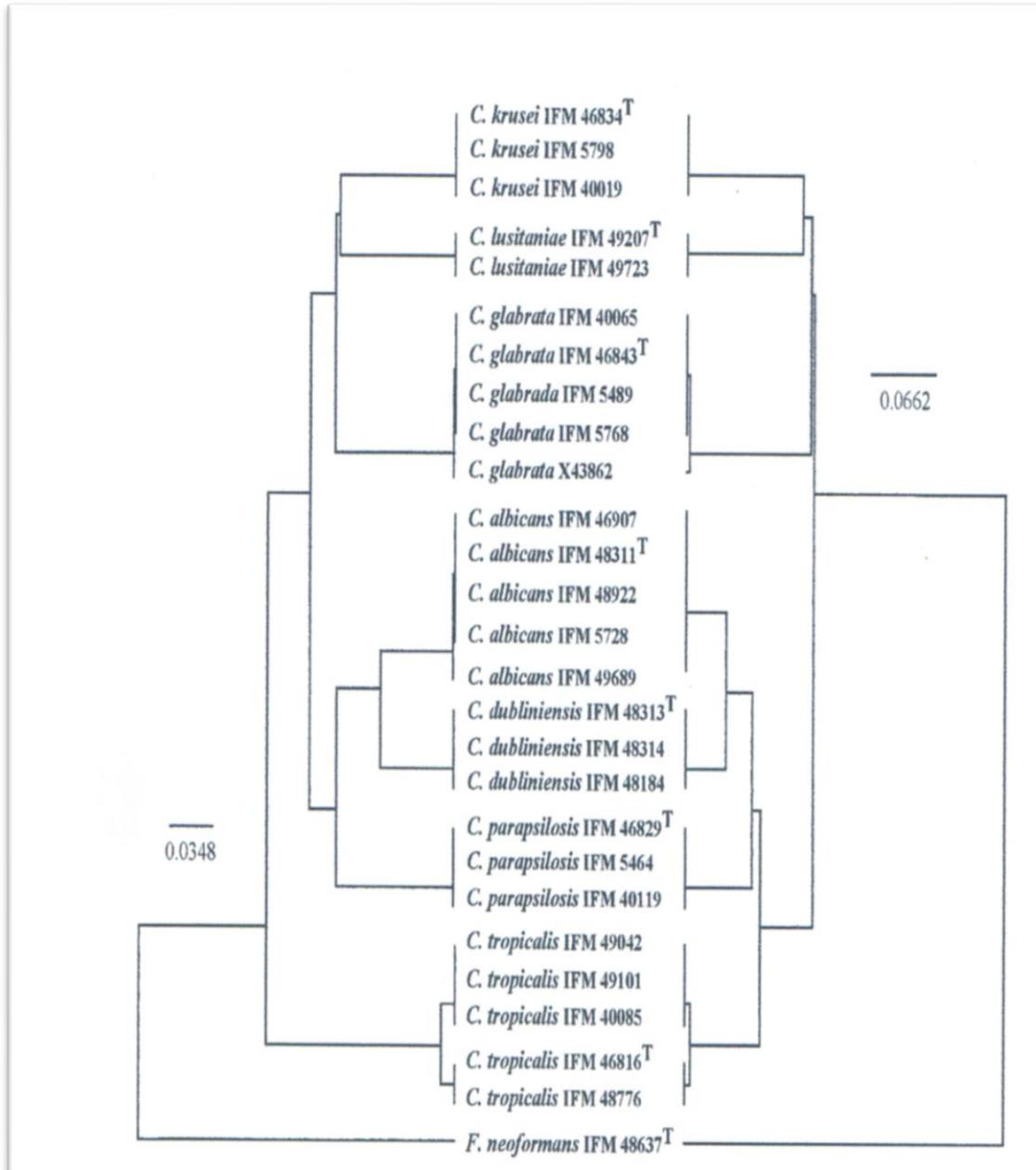


Figure 7 : Arbres phylogénique selon UPGMA d'espèces les plus courantes de *Candida* (Yokoyama et al ., 2000).

Les espèces de *Candida* partagent le même gène que l'espèce *Filobasidiella neoformans* en se basant sur la distance des gènes.

2.8. Applications des levures en Biotechnologie

Les applications des levures ou de leurs métabolites sont très variées par la facilité de leur manipulation génétique et une croissance rapide avec la possibilité d'effectuer des modifications post traductionnelles (Eda Celik et Pinar Cal, 2011).

✓ **Dans le domaine biomédical et biotechnologique**

Les levures modifiées génétiquement produisent l'antigène de surface du virus de l'hépatite C (Bitter et al., 1984) et le vaccin de l'hépatite B (Blin, 2002), des protéines recombinantes utilisées en thérapie, exemple l'hémoglobine par *Pichia pastoris* (Huaxin et al., 2007) ou par *Saccharomyces cerevisiae* (Wagenbach et al., 1991), sérum albumine humaine (Kobayashi et al., 2000) par *Pichia pastoris*, des hormones comme l'insuline (Kjeldsen, 2000) sécrétée par *Saccharomyces cerevisiae*, des facteurs de croissance EGF (Lee et al., 2006). Pour stimuler l'immunité l'intéréron γ (Derynck, 1983), des vitamines : vitamine C (Branduardi et al., 2007).

✓ **Panification et fermentation**

Depuis longtemps, les levures sont utilisées dans la panification, dans les fermentations pour la production de la bière et du vin (Rao et al., 2004).

✓ **Affinage des fromages**

Les levures participent à l'affinage des fromages ; en consommant l'acide lactique produit par les bactéries lactiques à partir des composants du lait. Elles contribuent aussi à réduire l'acidité du caillé (Leveau et Bouix, 1993). De nombreuses espèces se rencontrent en fromagerie, les plus fréquentes appartenant aux genres : *Kluyveromyces*, *Debaryomyces*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Torulopsis*, *Candida* et *Rhodotorula* (Larpen, 1991).

✓ **Production d'alcools**

L'éthanol est un produit chimique industriel important qui peut avoir plusieurs destinés en industrie chimique, pharmaceutique, cosmétique...

Une grande variété de microorganismes produit l'éthanol à partir de sucre mais les levures possèdent le meilleur rendement de production de l'alcool. Les souches les plus utilisées sont : *saccharomyces cerevisiae*, *saccharomyces uvarum* , *schizosaccharomyces pombe*, *kluveromyces sp.* (Zaldivar et al., 2001). D'autres alcools sont produits par des levures : xylitol (Rao et al., 2004), butanol et isobutanol (Branduardi et al., 2013), propanol (Matsuda al., 2011), acétone (Xiong, 2015).

✓ *Production d'enzymes ou de protéines recombinantes*

Les levures constituent une des importantes sources d'enzymes commerciales en raison de leurs capacités polyvalentes et de la frugalité de leurs exigences permettant d'obtenir une biomasse importante à bas prix (Pol., 1996). Comme exemples nous citons, l'invertase ou la saccharase sécrétée par diverses levures est utilisée industriellement pour produire du glucose et du fructose à partir de mélasses de betterave ou de cannes à sucre (tableau 6). La G6PD recombinante pour traiter le favisme (Loiudice et al., 2001), la glucose oxydase pour le dosage de la glycémie (Meng et al., 2014). La production de protéines recombinantes utilisées en thérapie est un marché en nette progression, peut atteindre 3 milliards de dollars en 2016 et plus de 20 milliards de dollars à l'horizon 2020 (Gaëlle Fleitour, 2012). Les enzymes digestives et leur utilisation en bio-industries sont très développées. A l'horizon 2015, les lipases constateraient 38,5 % du marché suivi par les amylases, 30,5 % Marché européen des enzymes dans les applications alimentaires (Morvan, 2010).

La plupart des enzymes utilisées industriellement sont des hydrolases (tableau 6) employées surtout en IAA car la majorité des levures de type GRAS.

Tableau 6 : Production et utilisation de certaines enzymes levuriennes.

Types d'enzymes	Levures utilisées	Utilisations	références
Amylases	- <i>Lipomyces starkey</i> - <i>Schwanniomyces castelli</i> - <i>Candida albicans</i>	Saccharification de l'amidon, Boulangerie, Textile, Papeterie.	Panchal, 1990 Clementi et al., 1980 Adekunle et al., 2013
Pullulanase	<i>Aureobasidium pullulans</i>	Industrie des textiles et papeterie, brasserie, domaine médical et pharmaceutique...	Moubasher et al., 2010
Maltase	- <i>Saccharomyces cerevisiae</i> - <i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i>	Traitements des maladies, brasserie, panification....	Zhang et al., 2015 Marin et al., 2006
Lipases	- <i>Candida lipolytica</i> - <i>Pichia burtonii</i>	Fromagerie, Laiterie.	Sikander et al., 2010 Sugihara et al., 1995
Lactases	- <i>Candida pseudotropicalis</i> - <i>Kluyveromyces marxianus</i> - <i>Kluyveromyces lactis</i>	Crèmes glacées.	De Bales et al., 1979 Bansal et al., 2008 Albert et al., 2006
Invertases	- <i>Saccharomyces carlbergensie</i> - <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Confiserie	Niuris et al., 2000 Shankar et al., 2013

Par leur caractère non toxique et leur capacité à faire de glycosylations des protéines (Spiro et al., 2002), les levures sont employées comme système d'expression de protéines ou enzymes recombinantes utilisées en thérapie (tableau 7).

Tableau 7 : Production et utilisation de certaines enzymes ou protéines recombinantes synthétisées par des levures utilisées en thérapie.

Types d'enzymes	Levures utilisées	Pathologie à traiter	Références
Amylases	<i>Saccharomyces carlbergensie</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Aide digestif	Wong et al., 2002
Lipases	<i>Candida lipolytica</i> <i>Kluyveromyces marxianus</i>	Aide digestif	Sikander et al., 2010 Deive et al., 2003
Hémoglobine	<i>Pichia pastoris</i>	Anémie ou thalassémie	Huaxin et al., 2007
Protéines vaccins	<i>Sporidiobolus</i>	Prévention des infections	Bitter et al., 1984, Blin., 2002.

Matériels et Méthodes

Ce modeste travail a été réalisé au laboratoire de Génie Microbiologiques et Applications sous la Direction du Professeur **MERAIHI .Z** et du l'Enseignante Doctorante Mme **DAKHMOCHE S.**

1. Le matériel biologique

La souche de levure utilisée dans ce travail est de genre *Candida sp.* fournie généreusement par Mme **Dakhmouche-Djekrif Schehrazad**, qui l'a isolée à partir des grains de blé de la Région de Sahara "Biskra" et conservée à (-80°C) dans des cryobilles.

Une seule bille de la levure est plongée dans de l'eau distillée stérile avec une agitation afin d'obtenir une suspension de la souche *Candida sp.* qui est ensuite repiquée et conservée sur des milieux de cultures et de conservation de la souche (Annexe 1).

2. Mise en évidence sur boîtes d'activité de la maltase

La mise en évidence de l'activité maltasique est effectuée sur un milieu YPMA (Yeast Peptone maltase Agar) contenant 5% de maltose (Annexe 2).

Les boîtes sont incubées à 40°C pendant 48h. Après incubation une solution de rouge Congo à 1% est versée sur la surface des boîtes afin de mettre en évidence l'activité maltasique. Après 15 minutes, des rinçages successifs sont effectués avec NaCl (1N) pour éliminer l'excès du colorant. La zone de lyse est ensuite observée (Moubasher et al., 2010).

3. Cinétique de production de la maltase à partir de la souche *Candida sp.*

3.1. Préparation de l'inoculum

La souche *Candida sp.* était conservée au réfrigérateur à une température de 4°C et estensemencée sur le milieu de repiquage (YPMA) et incubée à 40°C pendant 2 jours. Une suspension de la souche est ensuite préparée à partir de courbe étalon des cellules.

3.2. Le dénombrement des cellules

Le dénombrement des cellules se fait par comptage sur la cellule de Thomas (0.100mm/0.0025mm²) par microscope. Des séries de dilution d'une solution mère sont faites pour établir une courbe étalon des cellules (Figure 8).

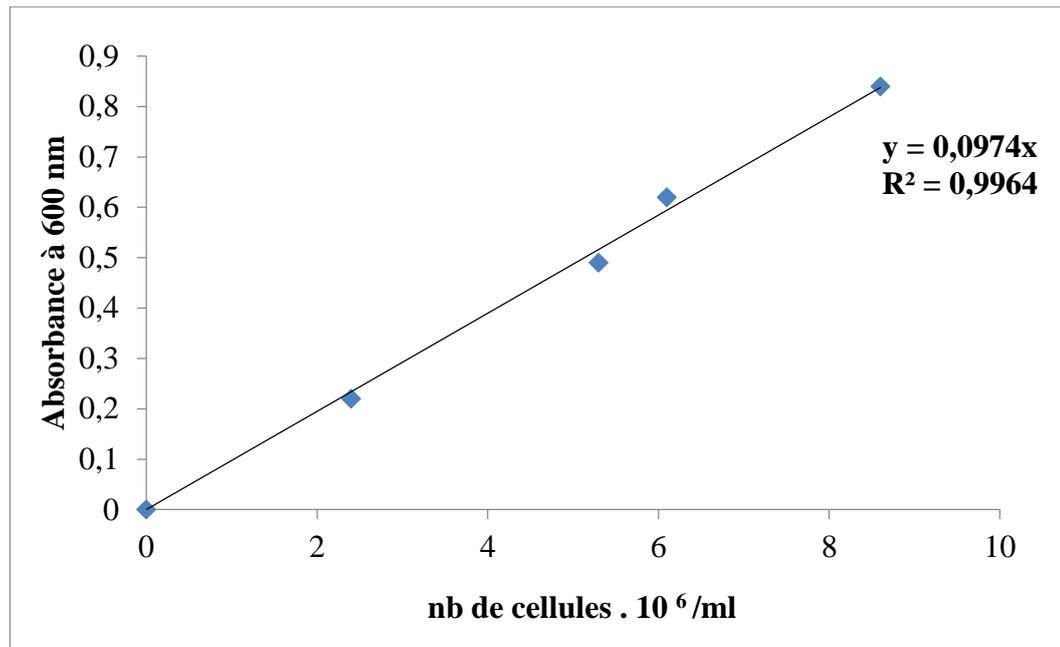


Figure 8 : La courbe étalon pour le dénombrement des cellules

3.3. Conduite de la fermentation

Dans notre travail, la fermentation a lieu dans des Erlen-Mayers de 250 ml contenant 50 ml de milieu de production dont le pH est ajusté à 5.

Après stérilisation à 120°C pendant 20min, le milieu estensemencé avec un taux de 1.8×10^6 cellules/ml et est incubé ensuite à 40°C sous agitation de 100 rpm dans un bain marie agitateur pendant 72h.

Dans le but de déterminer le temps d'incubation idéal pour la production de la maltase .Des prélèvements à chaque 24 h ont été réalisé pour l'étude cinétique après avoir centrifuger l'échantillon à 8000 rpm pendant 20 min afin de séparer la biomasse.

Le surnageant est récupéré pour la mesure du pH, ainsi que pour le dosage de l'activité maltasique et pour le dosage des protéines.

3.3.1. Mesure du pH

La mesure du pH est effectuée après chaque prélèvement à l'aide d'un pH mètre (Nahita® pH Meter Model 903).

3.3.2. Mesure de la biomasse

L'évolution de la densité cellulaire est estimée par spectrophotométrie à 650 nm (Spectrophotomètre Lambda-do-EZ 150). La suspension cellulaire est diluée de façon à obtenir une densité optique mesurable par spectrophotomètre.

3.3.3. Dosage de l'activité de la maltase

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

Le principe de cette méthode est basé sur la mesure du pouvoir réducteur du glucose libéré lors de l'hydrolyse enzymatique du maltose. La réaction est colorimétrique, l'intensité de la couleur est directement proportionnelle à la quantité du glucose libéré.

L'activité enzymatique est exprimée en unité internationale qui correspond à une μ mole du glucose libérée par minute et par litre de milieu à 40°C et à pH 5.

La courbe étalon du glucose est représenté dans la figure 9.

3.3.4. Dosage des protéines

Les protéines sont dosées par la méthode de Folin (Lowry et al. 1951), une méthode de dosage colorimétrique complémentaire à celle du Biuret. (Annexe 4).

En effet, en milieux alcalin la protéine réagit tout d'abord avec un réactif cuivrique alcalin (réactif de Gornall de la méthode du biuret) puis un second réactif, dit Folin-Ciocalteu (acide phospho-molybdique et phospho-tungstique) est ajouté qui permet la réduction des acides aminés aromatiques (tyrosine et tryptophane) conduisant à la formation d'un complexe coloré bleu dont l'intensité est proportionnelle à la concentration des protéines.

La courbe étalon du dosage des protéines est représenté dans la Figure 10.

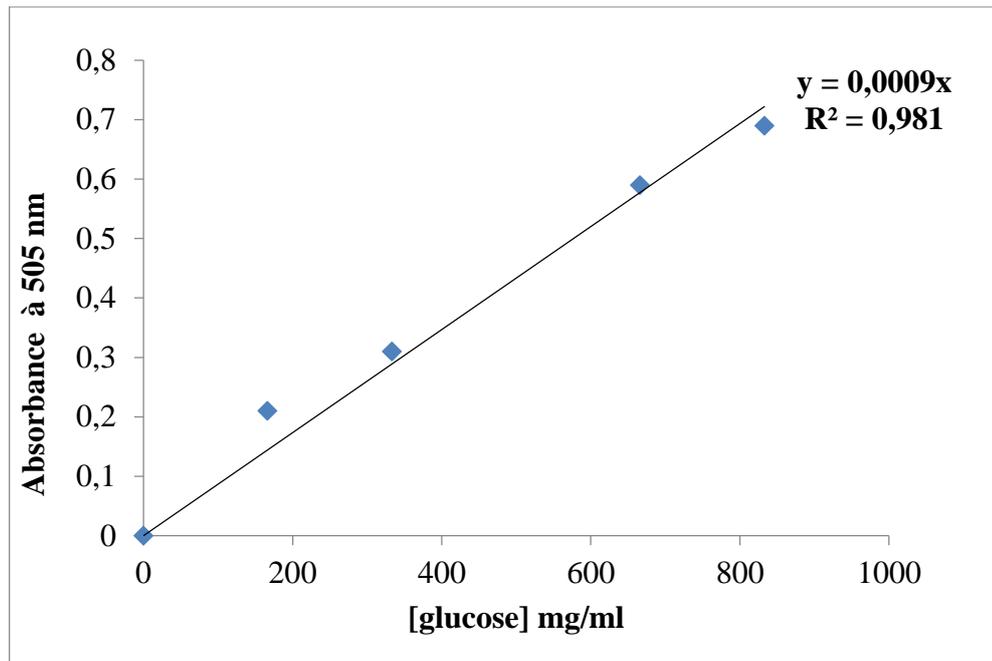


Figure 9 : La courbe étalon du glucose.

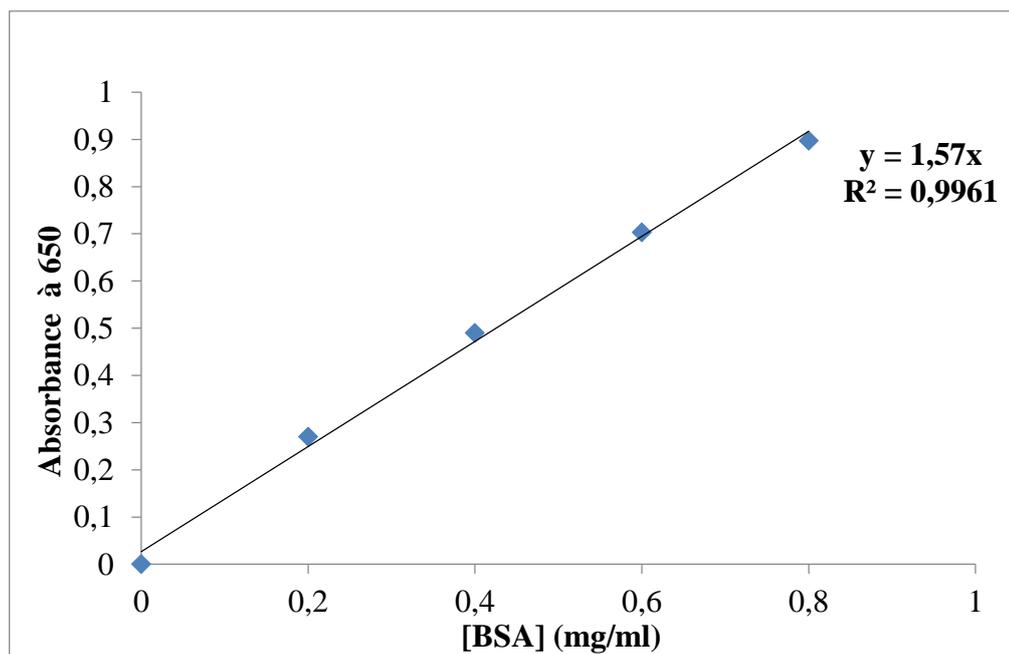


Figure 10: la courbe étalon pour le dosage des protéines (Serum albumine bovine, BSA comme solution stock).

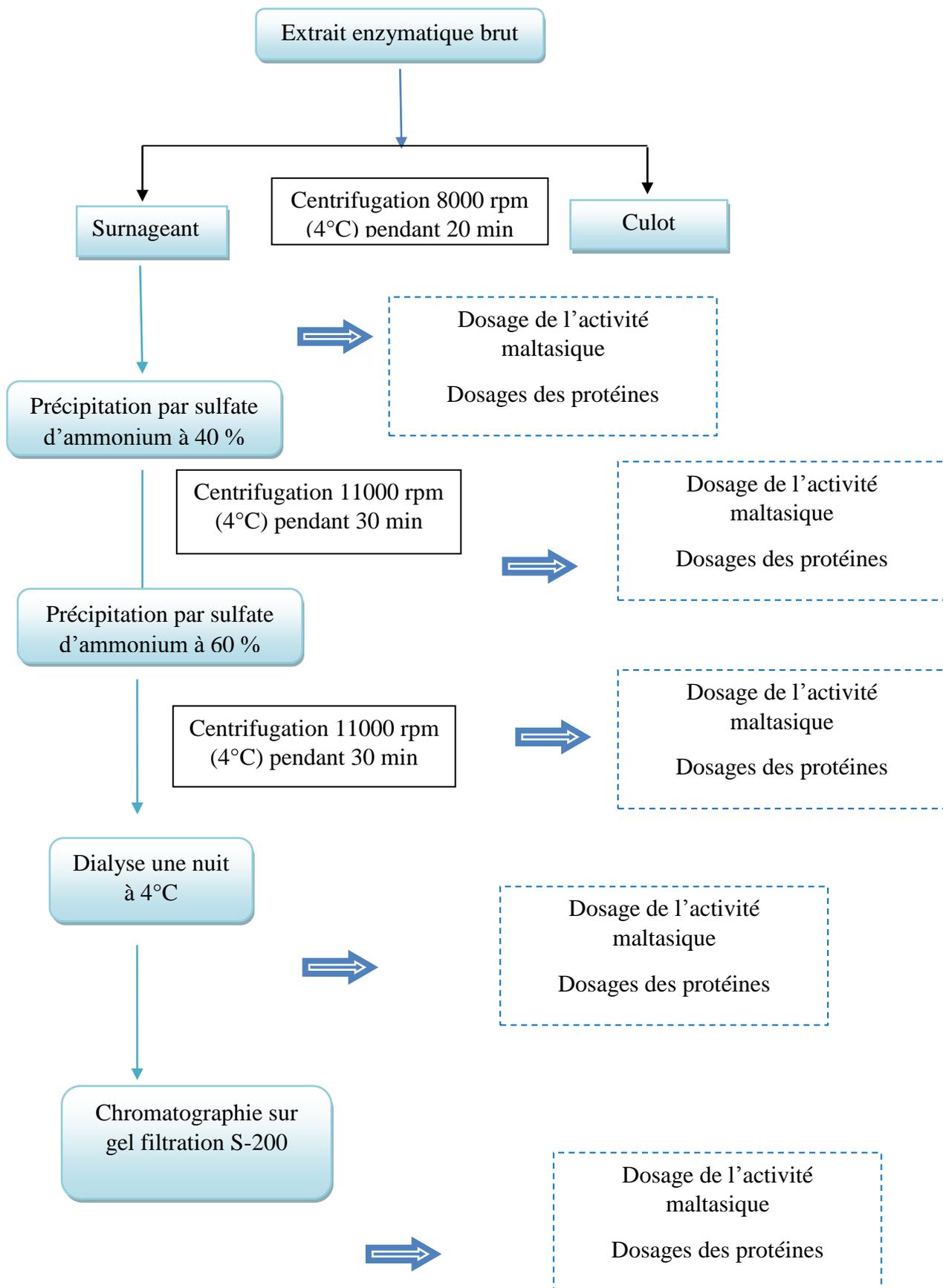


Figure 11 : Protocole de purification partielle de la maltase de *Candida sp.*

4. purification partielle de la maltase à partir de *Candida sp.*

Une culture de *Candida sp.* d'un volume de 400 ml de milieu optimisé réparti sur 8 Erlenmeyers de 250 ml à raison de 50 ml de milieu de production.

Après 72h d'incubation à 40°C sous agitation de 100 rpm, le milieu est centrifugé à 8000 rpm pendant 20 mn pour éliminer les cellules. Le surnageant constitue l'extrait enzymatique brut, qui sera soumis aux étapes de purification. Le protocole est décrit dans la figure 11 .

4.1. Précipitation par le sulfate d'ammonium

La première étape de purification est la précipitation des protéines par le sulfate d'ammonium, sel le moins dénaturant, moins coûteux, possédant le grand pouvoir réducteur et par voie de conséquence ; sel le plus utilisé (Kennedy, 1987).

Du sel d'ammonium est ajouté progressivement dans l'extrait enzymatique pour précipiter les protéines, y compris notre enzyme (maltase). Pour cela, 40 % de sulfate d'ammonium sont directement ajoutés à l'extrait brut sous agitation et dans un bain de glace. Après 2 heures, le filtrat obtenu est centrifugé à 11.000 rpm pendant 30 min à 4°C. Le surnageant est soumis à une précipitation au sulfate d'ammonium avec une saturation à 60 %. (Yan et al., 2015). Pour les précipités obtenus, un dosage de la maltase est effectuée après une mise en suspension (1/50 v/v, dans du tampon phosphate pH 5) puis centrifugé à 11.000 rpm pendant 30 min.

4.2 Dialyse

La suspension enzymatique est mise dans des boudins en cellophane préalablement préparés et est dialysée contre un tampon phosphate (0,1 M ; pH 5) sous agitation (Lenoir et Auberger. 1979) à froid (4°C) durant une nuit.

✓ Préparation de la membrane de dialyse

Les membranes de dialyse contiennent de la glycérine, des composés sulfurés et des métaux lourds qu'il faut préalablement éliminer par trempage. La technique usuelle consista à placer successivement les membranes dans :

- un mélange à volume égale éthanol et eau pendant une heure
- une solution de bicarbonate de sodium 10 mM pendant une heure
- une solution diluée d'EDTA (0,5 %) pendant une heure
- Enfin, dans l'eau distillée pendant deux heures

La membrane ainsi préparée peut être conservée à 4 °C pendant 2 à 3 jours dans l'eau distillée. Si le délai de conservation est plus long, il faut ajouter un inhibiteur de croissance bactérienne (solution d'azide de sodium).

Avant utilisation, la membrane est rincée avec le solvant utilisé pour la dialyse, c'est le tampon phosphate (pH 5-0.1M) dans notre travail (Kamoun, 1991). Après chaque étape, les protéines totales et l'activité totale de la maltase sont dosées afin d'établir le tableau de purification.

4.3. Chromatographie gel filtration sur Séphacryl S-200

Le dialysat (1.3 ml) est fractionné sur une colonne de Séphacryl S-200 (diamètre colonne 1cm, hauteur gel 50 cm), pré-équilibrée par un tampon phosphate (0.1M) pH 5 et la colonne est éluée avec le même tampon à un débit de 1ml/min.

La teneur en protéines de chaque fraction de 2ml est déterminée à 280 nm et l'activité maltasique est également mesurée dans les fractions actives correspondant aux pics des protéines (Carvalho et al. 2010).

5. Etude des propriétés de la maltase de l'extrait brut et de l'extrait enzymatique partiellement purifié

5.1. Effet du pH

L'influence du pH sur l'activité est déterminée dans un intervalle de pH [3 à 10] avec des variations de 1 unité, en utilisant les tampons citrate et phosphate :

- ✓ Acide citrique (0.5M) / phosphate de sodium dibasique (0.5M) : pour pH 3 et pH 4.
- ✓ Phosphate monopotassique (0.5M) / phosphate disodique (0.5M) pour pH 5, pH 6, pH 7 et pH 8.
- ✓ Glycine (0,1 M) / NaCl (0,1 M) : pour pH 9 et pH 10.

Cette manipulation permet la détermination du pH optimal.

5.2. Effet de la température

L'effet de la température d'incubation est étudié dans l'intervalle de 30 à 80° C (avec un pas de 5°C) en mesurant l'activité enzymatique de l'extrait brut et de l'enzyme partiellement purifiée incubé pendant 30 min au pH optimal.

5.3. Stabilité thermique

L'étude de la stabilité à la température est effectuée par la mesure de l'activité spécifique relative. Après incubation de l'extrait enzymatique et l'enzyme partiellement purifiée à différentes températures (50°C, 60°C, 70°C, 80 °C et à 90°C et 100°C) à une période de temps de 0 à 120 min soit 3 heures. Les différents échantillons sont retirés régulièrement les uns après les autres à des temps déterminés (après chaque 30 min) et refroidis instantanément dans un bain de glace.

L'activité relative des échantillons traités par la température est déterminée selon l'équation suivante :

$$\frac{(A_i - A_t)}{A_i} \times 100$$

A_i : activité **avant** traitement thermique.

A_t : activité **après** un traitement thermique.

Résultats et Discussion

Comme nous l'avons annoncé dans l'introduction, le but de ce travail est l'étude cinétique de production de la maltase de la levure *Candida sp.*, sa purification, la détermination de ses caractéristiques (pH optimum, température optimale) et l'étude de sa thermostabilité.

1. Repiquage de la souche de *Candida sp.*

La souche est sous forme Immobiliser que nous avons repiquée sur un milieu solide YPGA (Annexe1). Après une incubation à 40°C pendant 2 jours, des petites colonies apparaissent et d'aspect crémeux spécifique des souches de *Candida sp.* (figure 12).

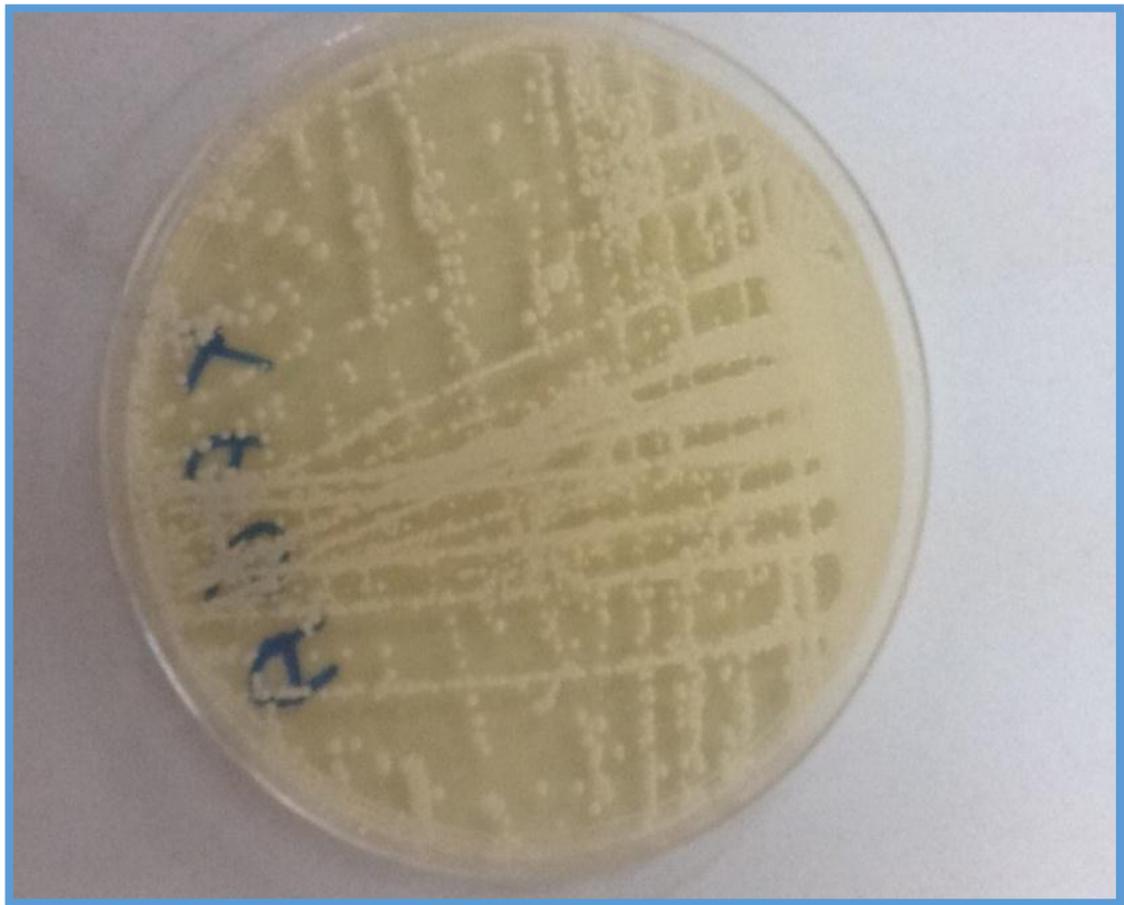


Figure 12 : Colonies de *Candida sp.* sur un milieu solide YPGA.

2. Mise en évidence de l'activité maltasique sur boîte de Pétri

La mise en évidence de l'activité maltasique est réalisée après la culture de la levure *Candida sp.* sur un milieu **YPMA** contenant 5% de maltose (Annexe 2). Les boîtes sont ensuite incubées à 40°C, pendant 48h.

Après avoir mis en culture notre souche, une solution de rouge Congo à 1 % est utilisée pour la détection de la zone de lyse selon (Moubasher et al., 2010).

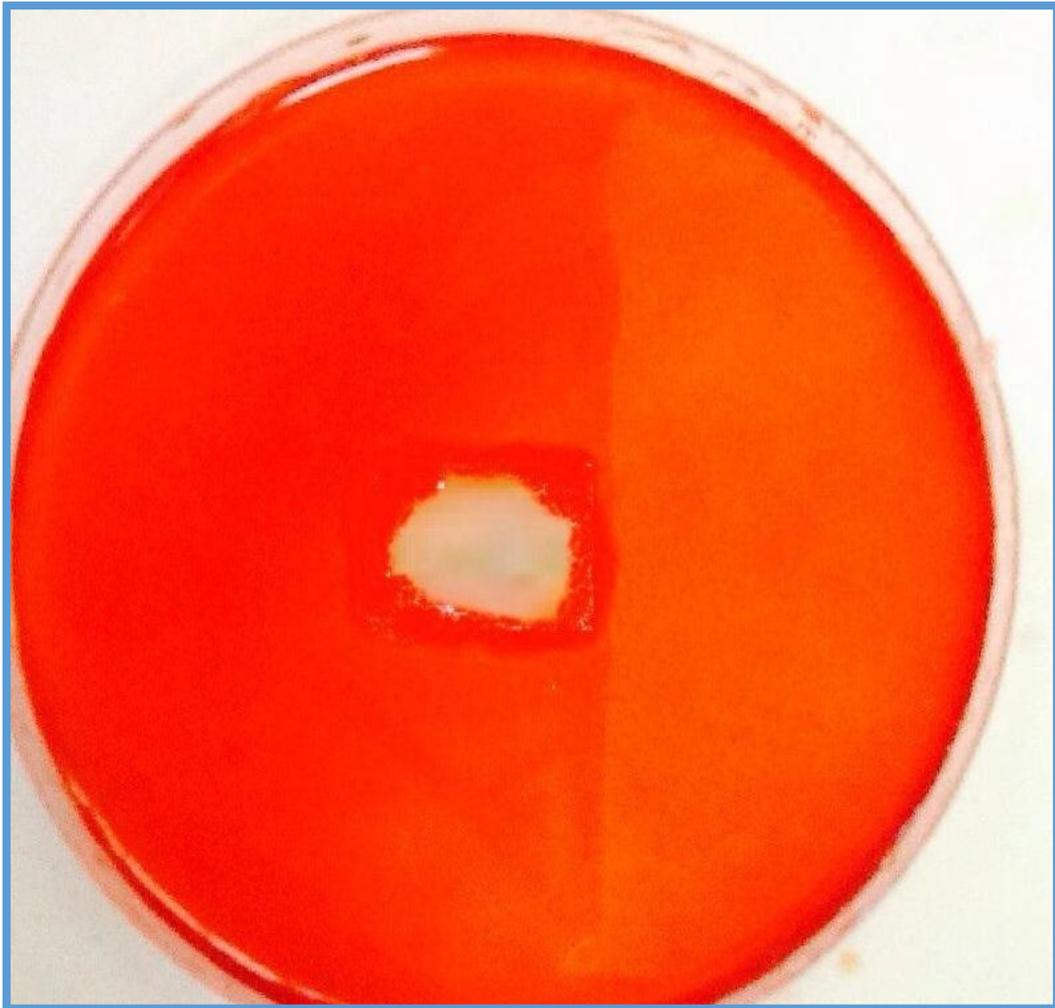


Figure 13 : La détection de zone de lyse de la maltase par *Candida sp.* cultivée sur milieu YPMA en boîte de Pétri.

L'observation de la boîte de pétri présentée dans la figure 13 indique l'apparition d'une zone claire autour de la colonie correspondant à une zone de lyse avec un diamètre de 18 mm.

Ce résultat s'explique par la dégradation du maltose sous l'action de la maltase excrétée par la levure *Candida sp.*

La coloration avec rouge Congo est utilisée pour la détection des activités enzymatiques. Ce colorant est un indicateur puissant par ce qu'il possède une forte interaction avec les liaisons α (1 \rightarrow 4) du maltose grâce à son groupement glycanique pour donner une coloration rouge. (Steensma, 2001).

3. Cinétique de production de la maltase par *Candida sp.*

3.1. Evolution de la biomasse et de la production de la maltase de *Candida sp.* au cours de la fermentation

La levure *Candida sp.* présente une cinétique classique de croissance avec ses 3 phases (figure 14) :

- ✓ **Phase de latence** : qui dure environ 24 heures, correspondant à la période d'adaptation de la levure au milieu de culture. Au cours de cette période, la levure synthétise l'enzyme qui lui est nécessaire pour métaboliser le substrat présent dans le milieu : le maltose. A la fin de la phase d'adaptation, on assiste à un démarrage de la phase d'accélération au cours de laquelle la concentration cellulaire, ou la teneur en biomasse, augmente de façon concomitante avec la production de l'enzyme.
- ✓ **Phase exponentielle de croissance** : Elle s'étend de 48 à 72 heures. La biomasse est nettement accélérée de façon importante où elle passe de 4,51 g/L à 6,59 g/L au bout de 72 heures de fermentation avec une activité de 41,32 μ moles/min/ml à 72,56 μ moles/min/ml. Ce mécanisme d'activité s'explique probablement par les changements morphologiques et physiologiques de la souche levurienne influençant la production de la maltase. Ce type est rapporté pour les levures ascomycètes cultivées sur des milieux à base de blé (Tatsinkou et al., 2005)

La superposition des courbes de cinétique de biomasse et de maltase (figure 14) indique un mécanisme de synthèse associé.

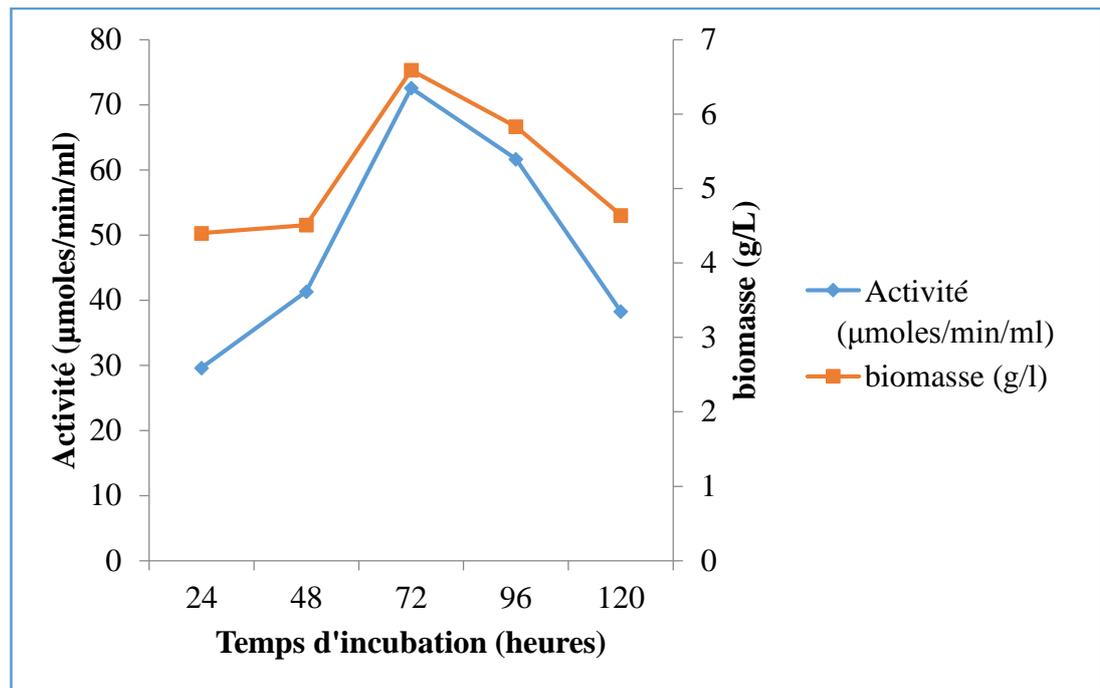


Figure 14 : Profils cinétiques de la croissance, de la production de la maltase au cours de la fermentation de *Candida sp.* (Température 40°C, pH 5, agitation 100 rpm).

- ✓ **Phase de décroissance :** durant cette phase (appelée également phase de déclin) allant de 72 à 120 heures, la concentration cellulaire viable diminue progressivement du fait de la lyse cellulaire par des protéases intracellulaires (Scriban et al, 1999) libérées lors de la phase de déclin (Siso et al., 1998). Cette phase est en effet caractérisée par une diminution du poids sec qui passe de 6.83 g/L à 4.64 g/L avec une activité minimale de 38.25 µmoles/min/ml à la fin de la fermentation. Cette diminution est attribuée à la pénurie de nutriments disponibles pour la croissance ou probablement à l'accumulation de produits d'excrétions métaboliques toxiques. (Romero et al., 1998 ; Hesseltine et al., 1976 ; Nehme, 2008).
- ✓ Pour la fabrication de boissons alcoolisées (vin et bière) La synthèse de l'alcool par *Saccaromyces sp.* ou par *candida sp.* atteint un maximum au bout de 3-5 semaines (Claude, 1985 ; Sablayrolles et al., 2007 ; Blanc, 2008).

La production de l'alcool est lente par rapport à la production de la maltase par *Candida sp.* L'enzyme est un métabolite primaire nécessaire à la biotransformation du maltose en glucose ; source d'énergie pour la croissance de la levure. L'alcool est un métabolite secondaire recherché dans les boissons alcoolisées.

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

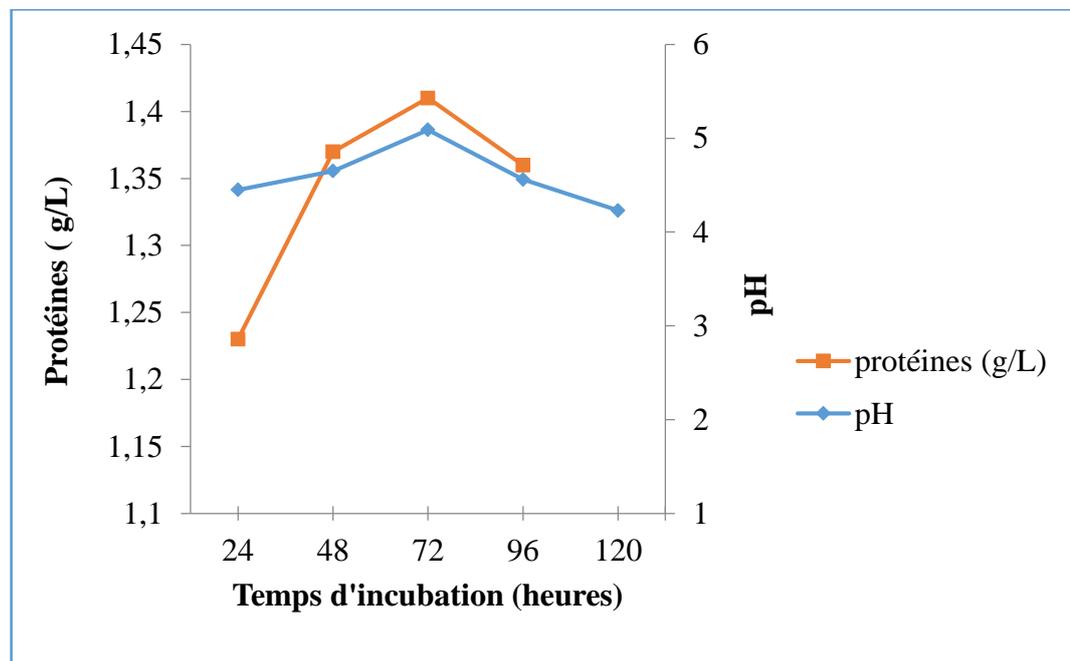


Figure 15 : Profils cinétiques des protéines et du pH au cours de la fermentation de la maltase thermostable par *Candida sp.*

la production des enzymes par les souches microbiennes dépend fortement du pH extracellulaire car le pH de la culture influe fortement sur de nombreux processus enzymatiques et sur le transport des différents composants à travers les membranes cellulaires, ce qui à son tour, favorise la croissance cellulaire et la production de métabolites (Ellaiah et al., 2002). Les variations de pH sont donc indicatrices de changements dans les activités métaboliques des microorganismes (Bellon- Maurel et al., 2003).

Le pH du milieu de production de *candida sp* est ajusté à 5. La figure 15 nous renseigne sur l'évolution du pH au cours de la fermentation. Le pH de la maltase évolue très peu (pratiquement constant). Il prend une légère hausse jusqu'à atteindre une valeur maximale de 5,09 après 72 heures d'incubation. Cette légère augmentation du pH est due à la neutralisation des acides organiques libérés par la levure lors de la phase exponentielle (Botton et al., 1990). A la fin de la fermentation, le pH reprend sa diminution à partir de 72 heures pour atteindre une valeur de 4,23. Cette baisse est due probablement à la consommation des substrats carbonés et azotés contenus dans le milieu qui s'accompagne à la production des métabolites acides ou alcools, (Gancedo et Seranno, 1989).

Par ailleurs, le taux de protéines augmente rapidement durant la phase exponentielle (de 1,23 à 1,41g/L), expliquée par la synthèse d'enzymes et en particulier les hydrolases (Arnaud et Guiraud, 1999). Ensuite il décroît et se stabilise à une concentration minimale évaluée à 1.35g /L. Cette baisse des protéines s'explique par l'attaque des protéases libérées lors de la lyse cellulaire (Bouix et Leveau, 1999) ou par la variation du pH (figure 15) qui affecte la perméabilité membranaire entraînant un ralentissement de l'activité enzymatique et de la croissance (Boiron, 1996).

4. Purification partielle de la maltase de *Candida sp.*

La purification de l'enzyme à partir d'un extrait brut consiste à éliminer toutes les protéines étrangères, tout en perdant le moins d'enzyme possible.

Les étapes consécutives de la purification sont décrites dans le tableau 8. La dernière se termine par un profil chromatographique représenté par la figure 11.

La purification de la maltase de *Candida sp.* est certainement partielle au vu du nombre d'étapes classiques (précipitation par le sulfate d'ammonium $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, dialyse et chromatographie d'exclusion moléculaire sur Séphacryl (S-200).

La précipitation par le sulfate d'ammonium nous a révélé deux fractions de saturation de la maltase de *Candida sp.* : 40% et 60%. Ce fractionnement à 2 seuils de saturation est déjà évalué pour la maltase acide de *Malbranchea cinnamomea* par l'équipe de (Yan et al., 2015).

Le précipité à 60% contient plus d'activité spécifique par rapport à celui de 40% avec une valeur de 52,53 $\mu\text{moles}/\text{min}/\text{ml}/\text{mg}$ Vs 40.87 $\mu\text{moles}/\text{min.}/\text{ml}/\text{mg}$ (Tableau 8). Cette étape conduit à une perte de 59,71% et 65,09 % pour les fractions 40% et 60 % et en revanche à une variation positive du taux d'enrichissement qui passe de 1 à 10.62.

La précipitation de la maltase par le sulfate d'ammonium à 40% et 60 % de saturation donne un taux faible de purification, mais elle offre l'avantage de concentrer l'enzyme.

La fraction à 40 % a un rendement de 40,28 % et un degré de purification de 7,51. La fraction à 60% a un rendement de 34.90 % et un degré de purification de 9,65. Pour son activité spécifique et son taux d'enrichissement meilleur, la fraction à 60 % sera retenue pour la suite des étapes de purification.

Tableau 8 : Différentes étapes de purification de la maltase produite par *Candida sp.*

Étapes de la purification	Extrait enzyme (ml)	Activité totale (μ moles/min/ml)	Protéines totales (mg/ml)	Activité spécifique (μ moles/min/mg)	Rendement (%)	Taux d'enrichissement
Extrait brut	330	47352.97	8699.22	5.44	100	1
Précipitation par sulfate d'ammonium 40%	20	19077.69	466.72	40.87	40.28	7.51
Précipitation par sulfate d'ammonium 60 %	20	16528.51	314.60	52.53	34.90	9.65
Dialyse	20	15994.01	276.57	57.82	33.77	10.62
Chromatographie fraction 60% sur Séphacryl S-200 (Pic 1)	16	9900.66	113.39	87.31	20.90	16.04
Chromatographie fraction 60% sur Séphacryl S-200 (Pic 2)	20	12951.53	138.98	93.18	27.35	17.13

Comme toutes les chromatographies, la filtration sur gel dont la résolution est modeste peut servir comme dernière étape de la purification de la maltase par *Candida sp.*

L'analyse du profil chromatographique montre 2 pics : **le premier pic** avec une activité spécifique de 87,31 μ moles/min/mg et **un 2^{ème} pic** avec une activité spécifique relativement élevée soit, 93,18 μ moles/min/mg, avec un taux d'enrichissement de 16.04 Vs 17.13 pour les 2 pics respectivement.

Néanmoins, avec le taux de purification faible, les fractions des deux pics sont probablement partiellement purifiées au vu du nombre réduit des étapes de purification.

D'autres étapes sont nécessaires pour aboutir à une purification plus avancée : l'échangeur anionique DEAE ou la chromatographie d'affinité. Néanmoins, la purification doit être vérifiée par l'électrophorèse PAGE.

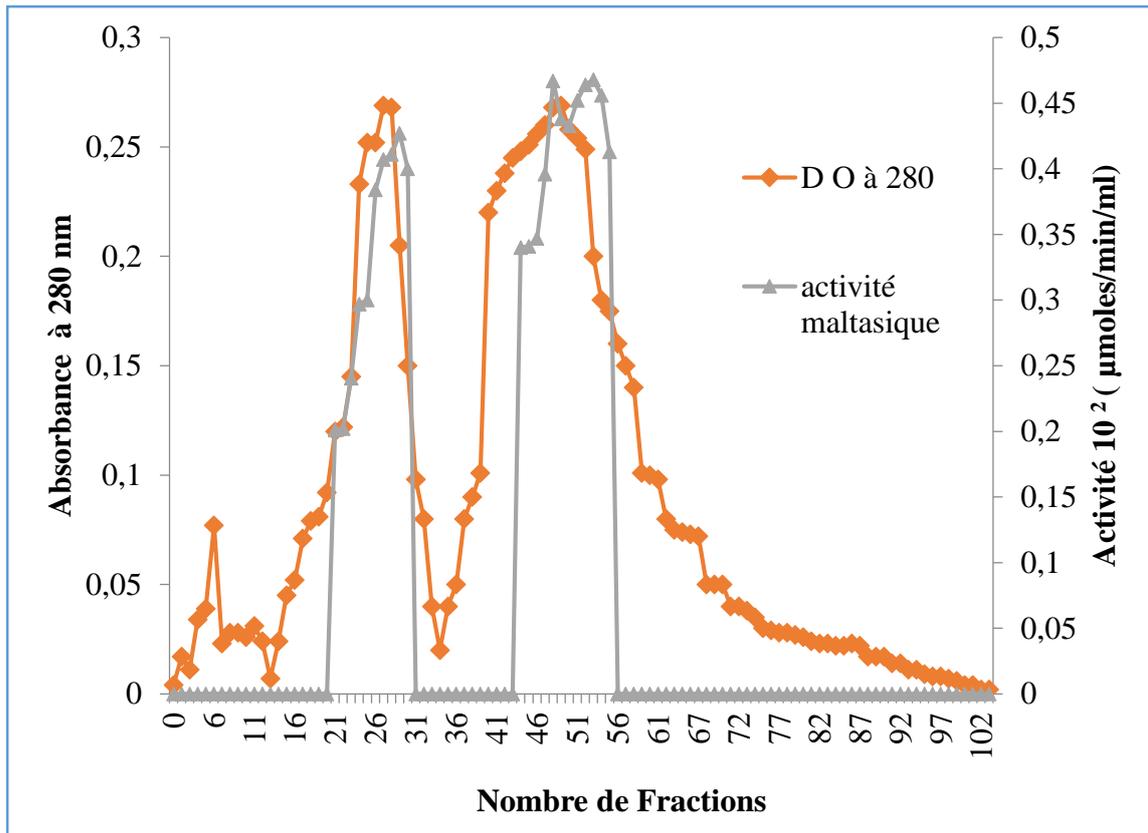


Figure 16 : Profil chromatographique de la maltase de *Candida sp.* Sur Séphacryl S-200 (diamètre colonne 1 cm, hauteur gel 50 cm, tampon d'éluion phosphate 0.1 M, pH 5,0 ; volume fraction 2 ml, débit d'éluion 1ml/min, température ambiante 18°C).

La fraction précipitée par 60 % de saturation par le sulfate d'ammonium, est fractionnée en 2 pics d'activité. (Figure 16) :

- Un premier pic 1 : élué à partir de la fraction 21 jusqu'à la fraction 29 avec un maximum à la fraction 24, soit un volume d'éluion de 48 ml.
 - Un deuxième pic 2 : élué à partir de la fraction 41 jusqu'à la fraction 59 avec un maximum à la fraction 52, soit un volume d'éluion de 104 ml (Figure 16).
- La fraction précipitée par 60 % de saturation par le sulfate d'ammonium est constitué donc de 2 isoenzymes avec deux masses moléculaires différentes car éluées par 2 volumes d'éluion différents.

Malheureusement, nous **ne disposons pas d'étalon de poids moléculaire pour en tirer les masses moléculaires des pics 1 et 2.**

5. Caractérisation de la maltase de *Candida sp.* de l'extrait brut et de l'enzyme partiellement purifiée

Les facteurs physico-chimiques, éléments de base pour les enzymes, ont une influence importante sur l'activité enzymatique. Pour cela, les effets du pH, de la température sur l'activité de la maltase sont déterminés.

5.1. Etude de l'effet de pH de la maltase de *Candida sp.*

Les réactions enzymatiques sont sensibles au pH du milieu car ce facteur influence le degré d'ionisation du site d'actif pour fixer, par des liaisons ioniques, le substrat de la molécule enzymatique (Soro, 2007). Selon le même auteur, l'effet du pH intervient au maintien des structures secondaire et tertiaires des protéines, ce qui peut être favorable ou défavorable à l'activité enzymatique.

La maltase de *Candida sp.* agit dans un intervalle de pH large : pH 3 à pH 10 (Figure 17)

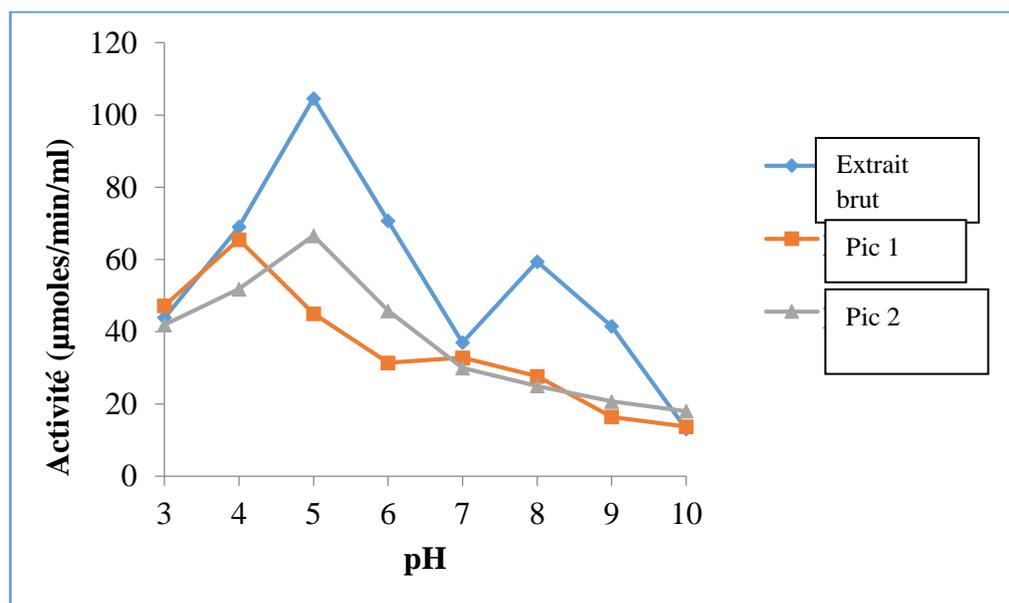


Figure 17 : Effet du pH sur l'activité de la maltase de *Candida sp.*

La figure 17 montre 2 pH optimums pour les deux pics : pH 4 pour le pic 1 et pH 5 pour le pic 2 avec des activités correspondantes de 68,17 $\mu\text{moles}/\text{min}/\text{ml}$ Vs 66,54 $\mu\text{moles}/\text{min}/\text{ml}$ respectivement. Le pH optimal de 5 du pic 2 est équivalent à celui du pH optimum de l'extrait brut qui affiche une activité de 104,83 $\mu\text{moles}/\text{min}/\text{ml}$.

La maltase partiellement purifiée de *Candida sp.* est active à pH acide (pic 1 pH 4 et pic 2 pH 5), un comportement qui permet de préserver de la plupart des contaminations bactériennes (Gasmi, 2013). La maltase de la levure *Mortierella alliacea* (Tanaka et al., 2002) –(à également 2 isoenzymes mais avec des pH optimaux différents (pH 5, pH 6) des isoenzymes de la maltase de *Candida sp.* de la présente étude.

Le pH optimal des 2 pics de la maltase de notre souche est semblable aux pH optimales d'autres souches de levures : pH 4.5 de *Schizosaccharomyces pombe* (Okuyama et al., 2001), pH 5,5 de *Xanthophyllomyces dendrorhous* et de *Saccharomyces fibuligera* (Hostinova et al., 2005 ; Marin et al., 2006)

Cependant des études récentes en 2015 ont mis en évidence un pH optimum supérieur de la maltase de *Candida sp.* chez *Saccharomyces cerevisiae* le optimum est 7 (Zhang et al., 2015).

Une étude des propriétés de la maltase chez autres microorganismes comme pour la bactérie *Malbranchea cinnamomea*, montre un optimum d'activité enzymatique à pH 6 (Yan et al., 2015)) le même optimum est observé pour l'enzyme de *Bacillus licheniformis* (Nimpiboon et al., 2011) et un de pH 6,5 pour la maltase de la bactérie *Thermus caldophilus*. Pour les maltases d'origine fongique : pH 4,5 pour *Thermoascus aurantiacus* (Carvalho et al., 2009) est similaire à celui de *Trichoderma longibrachiatum* (Akinloye et al., 2012). Ces différences sont probablement dues à une variation de la composition en acides aminés qui diffère d'une souche à une autre où chaque enzyme pour une activité optimale, développe un état de protonation spécifique (Save, 2011).

Par ailleurs, l'extrait brut, présente 2 pH optimum : pH optimal à 5 et pH optimal à 8. Ces observations ne sont pas en accord avec les résultats enregistrés par d'autres études qui ont travaillé sur la même souche de *Candida sp.* (Kusmarinah et al., 2006)). Par contre, ce pH optimum de 5 est compatible avec l'enzyme d'une autre levure, *Pichia sp.* (Rungarun et al., 2015) Ces deux pH optimums des zones extrêmes à l'échelle de pH (acide ou basique) est une propriété recherchée industriellement (Bellon- Maurel et al., 2003).

En conclusion :

- ✓ **Dans la fraction à 60%, il existe 2 isoenzymes avec des masses moléculaires différentes et des pH optimums différents : pH 4 et pH 5.**

- ✓ L'extrait brut de la maltase de *Candida sp.* contient 2 isoenzymes avec 2 pH optimums différents : pH 5 et pH 8.

5.2. Etude de l'effet de la température de la maltase acide de *Candida sp.*

La température optimale est un compromis entre l'effet de la température sur l'activité catalytique et la stabilité de la protéine enzymatique (Nelsen et al., 2003). Dans le cas de la maltase, l'influence de la température est testée sur une gamme de 30°C à 80°C.

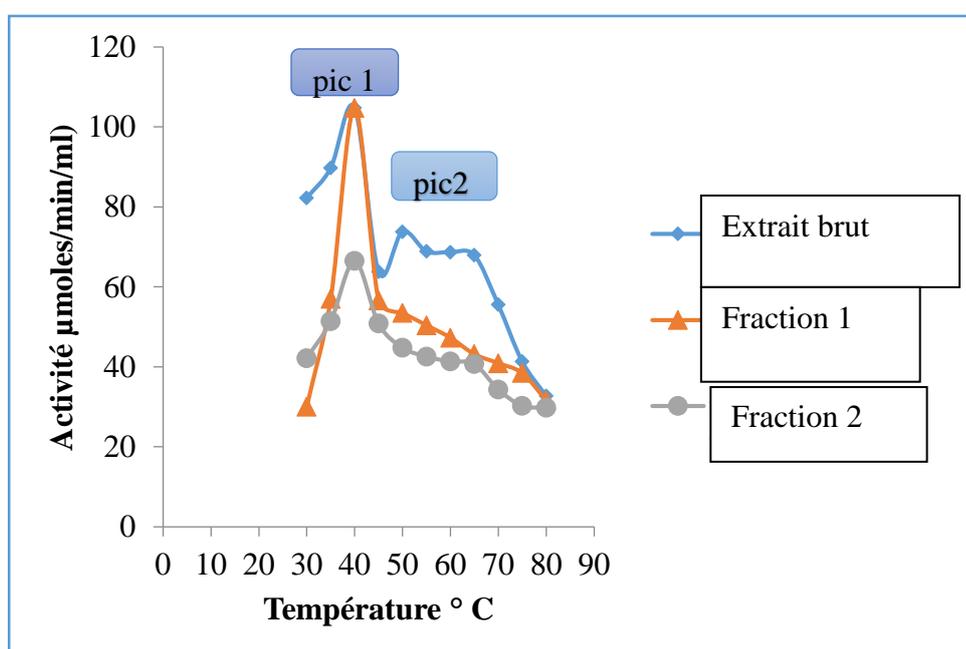


Figure 18 : Effet de la température sur l'activité de la maltase de *Candida sp.*

La maltase du pic 2 a un pH optimal de 5 et une température optimale de 40°C, caractéristiques qui correspondent au premier isoenzyme contenu dans l'extrait brut (Figure 18). Cependant le pic 1 avec une activité de 105.76 $\mu\text{moles}/\text{min}/\text{ml}$ et le pic 2 dont l'activité est égale à 71.58 $\mu\text{moles}/\text{min}/\text{ml}$ ont la même température optimale 40°C, identique à celle l'isoenzyme 1 de l'extrait brut qui présente une activité de 106.32 $\mu\text{moles}/\text{min}/\text{ml}$. L'isoenzyme 2 de l'extrait brut avec une température optimale de 50°C affiche une activité de 51.18 $\mu\text{moles}/\text{min}/\text{ml}$.

Par ces caractéristiques thermiques, les isoenzymes 1 et 2 se classent parmi les enzymes moyennement thermophiles 38°C à 60°C (Kwon et al., 1988). Ces résultats corroborent avec

les travaux de (Kelly et Fogarty, 1998) indiquant que les α -glucosidases sont des enzymes modérément thermostables.

La propriété thermique pour les deux pics n'est pas en accord avec celle rapporté par (Tanaka et al., 2002) qui ont signalé que les 2 isoenzymes de la levure *Mortierella alliacea* avec deux températures optimales différentes et particulièrement élevées : 55°C (pic 1), 50 °C (pic 2). Ces performances thermiques sont par ailleurs équivalentes aux maltases produites par certaines levures : *Saccharomyces cerevisiae* 40°C (Zhang et al., 2015) et *Xanthophyllomyces dendrorhous* : 45°C (Marin et al., 2006)

L'isoenzyme 2 de l'extrait brut de *Candida sp.* a une performance thermique compatible à la maltase de la levure *Malbranchea cinnamomea* avec une température de 50°C (Yan et al., 2015) mais inférieure à celle de la levure *Thermoascus aurantiacus* qui montre une activité optimale à 70°C (Carvalho et al., 2010). L'influence de la température sur la maltase chez autres microorganismes dépasse largement celle de *Candida sp.* : 65°C pour la moisissure *Aspergillus niveus* (Da Silva et al., 2009), 60°C chez *Geobacillus sp. A333* et *thermophilic bacterium A343* (Cihan et al., 2009). Par ailleurs un optimum de 90°C est observé chez la bactérie *Pyrobaculum aerophilum* (Hyeyeon et al., 2015).

La température élevée de la maltase de *condida sp.* est directement corrélée à la source de croissance de la levure (Daniel et al., 2009) ; Biskra, Sahara, Sud Algérie dans la présente étude. cette propriété thermique (particulièrement élevée) permet l'accélération de la vitesse de la réaction enzymatique et des rendements de procédé suite à une diminution de la viscosité, ou à l'augmentation de coefficient de diffusion et la solubilité de substrats (Haki et Rakshit, 2003) En outre, le risque de contamination par des bactéries mésophiles communes diminue ; un avantage important du point de vue de la production de l'enzyme ainsi sa purification (Vieille et Zeikus, 2001).

Conclusion :

- ✓ **La fraction précipité par 60% de sulfate d'ammonium contient 02 isoenzymes après tamisage moléculaire et présentant les caractéristiques suivantes : - un pic 1 avec un pH optimal de 4 et une température de 40°C un pic 2 avec un pH optimal de 5 et une température de 40°C.**

5.3. Etude de la thermostabilité de la maltase de Candida sp.

Une température élevée est reconnu pour avoir des effets néfastes sur les activités métaboliques des micro-organisme (Tunga, 1995). La dénaturation des enzymes par la chaleur s'accompagne le plus souvent d'une perte d'activité qui est d'autant plus grande que la structure tertiaire de la protéine est complexe (Soro, 2007), Ceci due à l'étirement et de la rupture des liaisons hydrogènes faibles dans la structure de l'enzyme (Conn et coll, 1987).

L'étude de la dénaturation de l'extrait brut de *Candida sp.* est reprise pour différentes températures (de 50 °C à 100°C) à 2 pH (figure A à pH 5 et figure B à pH 8) car nous avons démontré, dans la figure 19, l'extrait brut de notre souche contient 2 isoenzymes avec 2 pH optimums différents : pH 5 et pH 8.

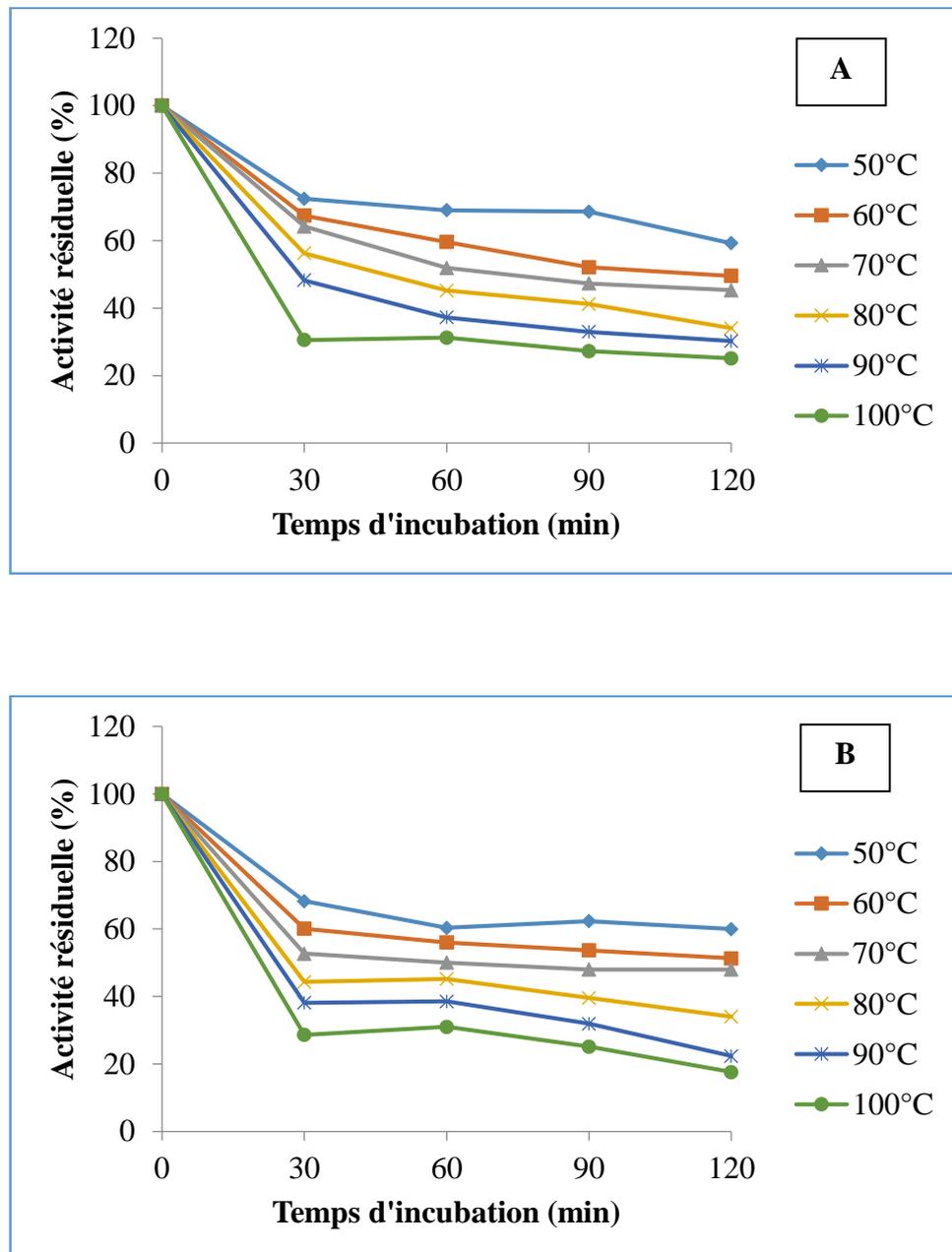


Figure 19 : Etude de la thermostabilité de la maltase de l'extrait brut De *Candida sp.* (A : à pH 5, B : à pH 8).

Avec un traitement thermique à 100°C et quelque soit le pH du milieu, la maltase de l'extrait brut perd 70 % de son activité initiale au bout de 30 min. à pH 5 et à 70 °C (figure 19 A), la demi-vie est de 120 min. La demi-vie à pH 8 est réduite et passe à 90 min (figure 19 B) pour le même traitement thermique. Pour un processus industriel à 70°C, la maltase acide avec un pH optimum 5 convient mieux d'une utilisation de l'extrait brut de la maltase.

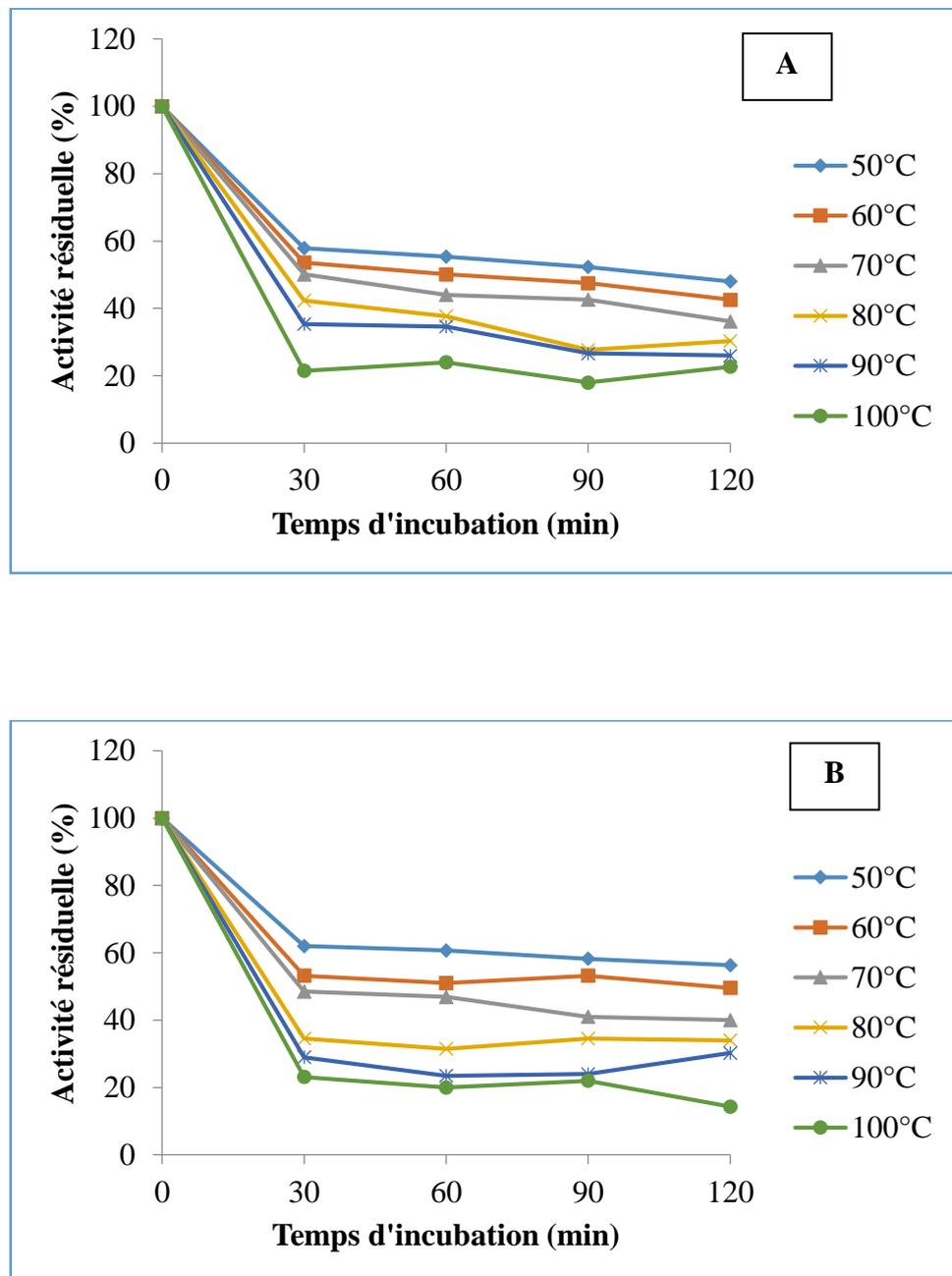


Figure 20 : Etude de la thermostabilité de la maltase de *Candida sp.*

(A : pic 1 à pH 4, B pic 2 : à pH 5).

Le premier isoenzyme (pic 1 à pH 5) et le deuxième isoenzyme (pic 2 à pH 8) de la maltase de l'extrait brut de *Candida sp.* sont relativement plus stables par rapport aux deux isoenzymes partiellement purifiés après un traitement thermique à 100°C pendant 30 min : l'enzyme de l'extrait brut perd 70% de son activité initiale quelque soit le pH et alors

l'enzyme partiellement purifiée perd 80% (figures 19-20). Les demi-vies pour les pic1 et 2 de la maltase partiellement purifiée sont 90 min, 60 min. A 70°C, les isoenzymes de l'extrait brut sont plus thermostables (leur demi-vie 120 min) Vs 90 min , 60 min respectivement pour les isoenzymes partiellement purifiées (figures 19-20).

Les mêmes résultats sont observés dans les autres températures qui sont relativement élevées comme à 70°C, 80°C, 90°C, 100 °C dont les activités résiduelles des isoenzymes de l'extrait brut sont largement supérieures aux activités résiduelles des isoenzymes partiellement purifiés.

La performance thermique de la maltase de la levure *Saccharomyces cerevisiae* ne dépasse guère 45°C à 50°C, elle perd complètement son activité (Zhang et al., 2015).

L' α -glucosidase de la levure *Xanthophyllomyces dendrorhousse* montre stable et sa demi- vie est de 3 h à 50°C (Marin et al., 2006) alors que l'enzyme l'extrait brut de notre souche conserve 60 % au bout d'un traitement de 2 h.

Ces différences de thermostabilité s'expliquent probablement par l'influence du biotope de la levure et son adaptation physiologique. L'adaptation de la maltase est due probablement à une hyperglycosylation, ou à la présence des ponts S-S qui stabilisent l'enzyme (Prakash et Jaiswal, 2010).

Par ailleurs, un pH optimal acide (pH 5) sa haute thermostabilité (demi-vie de 2h à 70 °C) indique que la maltase de la levure de *Candida sp.* peut attirer beaucoup d'attention en matière de biotechnologie et de l'industrie. Sa stabilité accrue par rapport à des enzymes mésophiles la rend plus appropriée pour des procédés industriels difficiles. En outre, sa stabilité thermique est généralement associée à une résistance plus élevée à des dénaturants chimiques couramment utilisés dans de nombreuses réactions industrielles. (De Miguel et al., 2006).

Ces caractéristiques ouvrent les portes de nombreuses applications, d'où l'optimisation de sa production en fermentation solide à l'échelle du laboratoire en vue de définir une ligne de conduite pour la transposition industrielle ultérieure.

Conclusion

L'objectif principal de cette étude est la production d'une enzyme glycolytique ; la maltase thermostable EC (3.2.1.20) par la levure *Candida sp.* (isolée du blé stockée à Biskra, située au Nord Est du Sahara Algérienne), sa purification, sa caractérisation (pH optimum, température optimale) et l'étude de sa thermostabilité.

La culture de *Candida sp.* (auparavant sous forme lyophilisée et conservée dans des cryobilles à -80°C pendant 48h sur un milieu YPMA solide préparé à 5 % de maltose a révélé après coloration avec rouge congo à 1 % une zone de lyse avec 18 mm de diamètre expliquée par la dégradation du maltose sous l'action de la maltase excrétée par la levure *Candida sp.*

Dans le but de déterminer le temps optimum nécessaire à la production de la maltase, une fermentation est réalisée sur un milieu liquide dans des Erlen-Meyers de 250 ml (conditions de culture : pH 5, température d'incubation 40°C , une agitation de 100 rpm).

Le profil cinétique de production de la maltase et de la biomasse de la souche *candida sp* indique, qu'au bout de 72 heures de fermentation, la levure *Candida sp.* montre un taux de croissance optimal (biomasse) de 6,59 g/L, pour la même durée de fermentation, l'activité maltasique maximale affiche 72,56 $\mu\text{moles}/\text{min}/\text{ml}$. La superposition des profils cinétiques indique un mécanisme de production de type associé.

La purification partielle de la maltase réalisée par les étapes classiques ; précipitation par le sulfate d'ammonium, dialyse et chromatographie sur gel Séphacryl S-200 montre 2 pics : un pic1 montre une activité spécifique de 87,31 $\mu\text{moles}/\text{min}/\text{mg}$ et un volume d'élution de 48 ml et un pic 2 avec une activité spécifique relativement élevée soit 93,18 $\mu\text{moles}/\text{min}/\text{mg}$ dont sa fraction est éluee avec un volume correspond à 104 ml. Le taux d'enrichissement déterminé pour les 2 pics est : 16.04 Vs 17.3 respectivement. Ce résultat laisse supposer que la fraction précipité à 60 % est constituée de 2 isoenzymes avec deux masses moléculaires différentes car élués par 2 volumes d'élution différents. Néanmoins, avec le taux de purification faible, les fractions des deux pics sont probablement partiellement purifiées au vu du nombre réduit des étapes de purification.

Pour l'applicabilité de l'enzyme, l'étude des caractéristiques physico-chimiques de la maltase de l'extrait brut et de l'enzyme partiellement purifiée s'impose.

L'extrait brut de *Candida sp.* possède deux isoenzymes présentant deux pH optimums : pH 5 Vs pH 8 respectivement avec deux températures optimales respectives 40°C Vs 50°C. Les deux isoenzymes partiellement purifiés (après la chromatographie sur Sephacryl-S200) possèdent deux pH optimums de pH 4 et 5 respectivement et une température optimale respective de 40°C.

La maltase a une résistance remarquable vis-à-vis les traitements thermiques. A 100°C pendant 30 min, les enzymes de l'extrait brut de *Candida sp.* gardent 30% de leurs activités initiales tandis que les deux isoenzymes partiellement purifiés en gardent 20%. A 70°C, les isoenzymes de l'extrait brut sont plus thermostables (demi-vie 120 min Vs 90 ,60 min) pour les isoenzymes partiellement purifiés. La haute thermostabilité de la maltase (demi-vie de 2h à 70 °C), son pH optimal acide (pH 5) ; deux propriétés lui confèrent d'être appliquée dans des domaines industriels.

Perspectives

Les résultats ouvrent d'autres perspectives qui consistent en :

- L'optimisation du milieu de production de la souche *Candida sp* pour un meilleur rendement.
- Des recherches supplémentaires à l'échelle physiologique et moléculaire pour l'identification de l'espèce de la souche *Candida sp.*
- Une purification plus avancée des deux isoenzymes est nécessaire pour une application dans les IAA (passage sur un échangeur anionique DEAE ou la chromatographie d'affinité). Néanmoins, la purification doit être vérifiée par l'électrophorèse PAGE.

الهدف الرئيسي من هذه الدراسة: دراسة حركية Maltase من سلالة الخميرة *Candida sp.* (المعزولة من حبوب القمح القاحلة من منطقة بسكرة) تنقيته الجزئية، وتحديد خصائصه (درجة الحموضة المثلى، ودرجة الحرارة المثلى) ودراسة الاستقرار الحراري.

النشاط المالتازي من سلالة *Candida sp.* (في البداية في شكل مجفف بالتجميد) اختبر على وسط معيشة YPMA صلب يحتوي على 5٪ من Maltose (بعد الحضانة عند 40 درجة مئوية لمدة 48 ساعة).

الدراسة الحركية للإنتاج Maltase من الخميرة *Candida sp.* يظهر أفضل النمو عند كتلة حيوية أقصاها 6.59 غ/ل وأقصى النشاط المالتازي قدر ب 72.56 ميكرومول/دقيقة/مل، بعد 72 ساعة من التخثير. هذا يدل على أن أليتين الاصطناعية من انتاج Maltase ونمو الكتلة الحيوية ل *Candida sp.* تطورا في وقت واحد، وبالتالي الأليتين مرتبطتين.

التنقية الجزئية ل Maltase تمت في 3 خطوات متتالية. الترسيب بالسولفات الأميوم عند درجتين (40٪ و 60٪)، الميزو كروماتوغرافيا الإقصاء الجزئي على Sephacryl S-200 أظهر التحليل الكروماتوغرافي عند درجة 60٪ قمتين: ذروة 1 مع نشاط 87.31 ميكرومول/دقيقة/ملغ وذروة 2 مع نشاط معين 93.18 ميكرومول/دقيقة/ملغ، بمعدل نقاوة 16.014 مقابل 17.13 على التوالي. الجزء المرسيب عند التشبع 60٪ اظهر احتواءه على اثنتين من متشابهات الانزيم مع اثنتين من الأوزان الجزئية المختلفة. ومع ذلك معدل تنقية منخفضة، وأجزاء من القمتين هما على الأرجح منقيان جزئيا نظرا لعدد صغير من خطوات تنقية التقليدية.

تأثير درجة الحموضة ودرجة الحرارة على الإنزيم الخام والإنزيم المنقى جزئيا اظهر على أن الإنزيم الخام يحتوي على اثنتين من متشابهات الانزيم مع درجة حموضة مختلفة: 5 و 8 على التوالي المقابلة ل درجات الحرارة المثلى ل40 و 50 درجة مئوية. و متشابهات الانزيم المنقى جزئيا أيضا خصائص مختلفة: 1 الذروة مع درجة الحموضة المثلى 4 ودرجة حرارة 40 درجة مئوية، ذروة 2 درجة الحموضة المثلى 5 و 40 درجة مئوية.

بعد المعالجة الحرارية عند 100 درجة مئوية لمدة 30 دقيقة، استخراج الانزيم الخام من *Candida sp.* احتفظ ب 30٪ من النشاط الأولي معالجة متشابهات الانزيم المنقى جزئيا. احتفظ 20٪ من النشاط الأولي، عند 70 درجة مئوية، متشابهات الانزيم من الانزيم الخام أكثر مقاوم للحرارة (نصف العمر 120 دقيقة مقابل 60-90 دقيقة) للمتشابهات الانزيم المنقى جزئيا.

كما يتم تنفيذ العديد من التفاعلات الإنزيمية الصناعية في درجات حرارة مرتفعة، يمكن ل Maltase المقاوم للحرارة جذب الانتباه في مجال التكنولوجيا الحيوية والصناعة، وزيادة استقرارها مقارنة مع الانزيمات متوسطة الحرارة يجعلها مناسبة للعمليات الصناعية القاسية.

الكلمات المفتاحية: الخميرة، *Candida sp.*، Maltase، انزيم خام، تنقية، متشابهات الانزيم. الاستقرار الحراري.

Abstract

This present study has main objective: the study of the kinetics production of maltase of *Candida sp.* (isolated from wheat grains arid region of Biskra) its partial purification, the determination of its characteristics (optimum pH, optimum temperature) and the study of its thermal stability.

The maltasique activity of *Candida sp.* (initially in lyophilized form) is highlighted on a solid YPMA medium containing 5% maltose (after incubation at 40 ° C for 48 h)

The kinetic study of the production of maltase indicates that the yeast *Candida sp.* shows better growth with a maximum biomass of 6, 59 g / L and a maximum maltasique activity corresponding to 72.56 µmoles/min/ml/ after 72 hours of fermentation. These results demonstrates that the two synthetic mechanisms of maltase Activity and growth of *Candida sp.* are simultaneous and therefore associated.

Partial purification of maltase is performed in 3 consecutive steps; precipitation with ammonium sulfate (40% and 60%), dialysis and chromatography on Sephacryl S-200 gel filtration . Analysis of the chromatographic profile of the 60% fraction showed two peaks: a peak1 with a specific activity of 87.31 µmoles/min/mg and a peak 2 with a specific activity 93.18 µmoles/.min/mg, with an enrichment rate 16,014 Vs 17.13, respectively. The fraction precipitated by 60% saturation thus contains two isoenzymes with two different molecular weights. Nevertheless, with the rate of low purification, fractions of the two peaks are probably partially purified given the small number of conventional purification steps.

The influence of pH and temperature on crude extract and partially purified enzyme shows that the crude extract contains two isoenzymes with two different pH optimum: pH 5 and pH 8 respectively corresponding optimal temperatures of 40 ° C and 50 ° C 2 .The partially purified isoenzymes also have different characteristics: peak 1 with an optimum pH of 4 and a temperature of 40 ° C a peak 2 with an optimum pH of 5 and a temperature of 40 ° C.

After heat treatment of 100 ° C for 30 min, the maltase of the crude extract of *Candida sp.* retain 30% of initial activity however the two partially purified isoenzymes retain 20% of their initials activity. At 70 ° C, the isoenzymes of the crude extract are more thermostable (half-life 120 min vs 60-90 min) for partially purified isoenzymes.

As many industrial enzymatic reactions are performed at elevated temperatures, the thermostable maltase can attract attention in biotechnology and industry, its increased stability compared to mesophilic enzymes makes it suitable for harsh industrial processes.

Key words: Yeast, *Candida sp.*, maltase, crude extract, purification, isoenzymes, Thermo stability

Références bibliographiques

- Adekunle Odunayo Adejuwon¹, Olajumoke Elizabeth Abe., Bukola Ayodeji Bamkefa., Adesola Adetutu Ajayi., Kehinde Olusayo Awojobi., Mary Ajibola Adejuwon., Oluwatosin Ologbosere. (2013).** Alpha-amylases by strains of *Candida albicans* and *Fusarium sp.*: Expression and characterization. Report and Opinion. 5: 6.
- Akinloye Oluseyi A., Balogun Elizabeth A., Kareem Sarafadeen O., Mosaku¹ Olakunle S. (2012).** Partial purification and some properties of alpha–glucosidase from *Trichoderma longibrachiatum*. International Journal of the Nigerian Society for Experimental Biology. 24: 31 – 37.
- Albert J. J., Van Ooyen., Peter Dekker., Huang Michael., Maurien M. A., Olsthoorn., Denise Jacobs I., Colussi Paul A., Taron Christopher H. (2006).** Heterologous protein production in the yeast *Kluyveromyces lactis*. Federation of European Microbiological Societies. 6: 381–392
- Arnaud Galichet., Belarbi Abdel. (1999).** Cloning of an alpha-glucosidase gene from *Thermococcus hydrothermalis* by functional complementation of a *Saccharomyces cerevisiae* mal 11 mutant strain. Febs Letters. 458: 188-192.
- Arnaud A. et Guiraud J. P. (1999).** Le Metabolisme microbien. In : Scriban. R. Biotechnologie. ⁵ème Ed. Technique et Documentation - La Voisier. 91-96.
- Babjeva I. P., Moavad K. H., Marchenko A. I. (1977).** Microbiologia. 46: 270.
- Baig I (2002).** Phytochemical studies on ferula mongolica and other mongolian medicinal plants. Ph.D, University of Karachi, Karachi, Sindh, Pakistan.
- Balasubramanian K. Mohan., Erfei Bi., Glotzer Michael. (2004).** Comparative analysis of cytokinesis review in budding yeast, fission yeast and animal cells. Current Biology.14: 806–818.
- Bansal S., Oberoi H. S., Dhillon G. S., Patil R. T. (2008).** Production of alpha – glucosidase by *Kluyveromyces marxianus* MTCC 1388 using whey and effect of four different methods of enzyme extraction on alpha- glucosidase activity. Indian Journal of Microbiology. 48: 337-341.
- Barnett L. A. (1976).** In “Advances in carbohydrates chemistry and biochemistry (R. S. Tipson D Horton, eds), Academic Press, New York. 32: 125-234.
- Barnett L. A., Payne R. W., Yarrow D. (1990).** Yeasts, characteristics and identification. Cambridge University Press. Cambridge. 752-758.
- Baron A. D. (1998).** Postprandial hyperglycaemia and alpha-glucosidase inhibitors. Diabetes Research and Clinical Practice. 40: 51–55.
- Bekatorou Argyro., Psarianos Costas., Koutinas Athanasios A. (2006).** Food grade yeasts. Food Technology and Biotechnology. 44: 407–415.

- Beldjil Ali Asmaa Fatima., Benlahcen Kheira., Guessas Bettache., Aggad Habib., Kihal Mebrouk. (2013).** Evaluation of microbiological and sanitary quality of ewe's raw milk in western of Algeria and detection of antibiotic residue by delvotest. *Advances in Environmental Biology*. 7: 1027-1033.
- Bellon-Maurel V., Orliac O., Christen P., (2003).** Sensors and measurements in solid-state fermentation : a Review. *Process Biochemistry*. 38: 881-896.
- Benedict S., Colagreco J. (1994).** Fungal infections associated with malignancies, treatments and AIDS. *Cancer Nursing*. 17: 411-417.
- Bitter G. A., Kevin M. E. (1984).** Expression of heterologous genes in *Saccharomyces cerevisiae* from vectors utilizing the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene promoter. *Gene*. 32: 263-274.
- Blanc A. (2008).** Fermentation. *Ensmic, Alimentation Humaine*. 4-17.
- Blin C. P. (2002).** Etude comparative du catabolisme de l'acide cinoléique chez les levures du genre *Oridiobolus sp.* : mise en évidence et caractérisation du système bêta-oxydase impliqué. Thèse de Doctorat, Ecole Nationale Supérieure de Biologie Appliquée à la Nutrition et à l'Alimentation. Université de Bourgogne, France.
- Bodey G. P. (1984).** Candidiasis in cancer patients, *American Journal of Medicine*. 77:13-19.
- Boekhout T., Cletus P., Kurtzman C. O., O'donnell K., Maudy T., Smith M. T. (1994).** Phylogeny of the yeast genera *Hanseniaspora* (Anamorph *kloeckera*), *Dekkera* (Anamorph *Brettanomyces*) and *Eeniella* as inferred from partial 26S ribosomal DNA nucleotide sequences. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 44: 781-786.
- Boiron P. (1996).** Organisation et biologie des champignons. Edition Nathan.149.
- Bonaly R. (1991).** Morphologie et reproduction asexuée des levures Ds : Larpent J. P., *Biotechnologie des levures*. Masson, Milan Barcelone Bonn. Paris. 4-18.
- Botton B., Breton A., Fevre M., Gauthier S., Guy P. L., Larpent J. P., Reymont P., Sanglier J. J., Vayssier Y., Veau P. (1990).** Moisissures utiles et nuisibles d'importance industrielle. 2^{ème} édition. Masson. Collection Biothechnologies. 35 -419.
- Bouix M., Leveau J .Y. (1991).** Les levures dans : Bourgeois C. M., Leveau J.Y., *Techniques d'analyse et de contrôle dans les industries agroalimentaires*, édition 2 Lavoisier-Tec & Doc, Paris. 3: 206-229.
- Bouix M., Leveau J. Y. (1999).** Production des Enzymes. In : Scriban R. (Ed) : *Biotechnologies*. Ed. Lavoisier. 344-400.
- Bourgeois C. M., Larpent J. P. (1996).** Microbiologie alimentaire Tome 2 : Aliments fermentés et fermentations alimentaires - 2^{ème} édition Ed. Tec &Doc. 523.

- Bourgeois C. M., Mescle J. F., Zucca J. (1996).** Microbiologie Alimentaire Tome 1 : Aspect microbiologique de la sécurité et de la qualité des aliments l'Ille édition Ed. Tec & Doc. 672.
- Branduardi Paola., Longo Valeria., Berterame Nadia Maria., Rossi Giorgia., Porro Danilo. (2013).** A novel pathway to produce butanol and isobutanol in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology for Biofuels* .6: 68.
- Brondijk T., Konings demir N., Poolman B. (2001).** Regulation of maltose transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Archives of Microbiology*. 176: 96–105.
- Busturia A., Lagunas R. (1985).** Identification of two forms of the maltose transport systems In *Saccharomyces cerevisiae* and their regulation by catabolite inactivation. *Biochimica et Biophysica Acta*. 820: 324-326.
- Cahagnier B. (1998).** Moisissure des aliments peu hydratés. Lavoisier-Tec &Doc, Paris. 8: 96-135.
- Cai J., Roberts I. N., Collins M. (1996).** Phylogenetic relationships among members of the ascomycetous yeast genera *Brettanomyces*, *Debaryomyces*, *Dekkera* and *Kluyveromyces*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 46: 542-549.
- Camille M. Barr., Maurine Neiman., Douglas R. Taylor. (2005).** Inheritance and recombination of mitochondrial genomes in plants, fungi and animals. *New Phytologist*. 168: 39–50.
- Carvalho Ana Flávia Azevedo., Boscolo Maurício., Da Silva Roberto, Gomes Henrique Ferreira Eleni. (2010).** Purification and characterization of the alpha-glucosidase produced by thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus* CBMAI 756. *Journal of Microbiology*. 48: 452-459.
- Chen Y .G., Li P., Li P., Yan R., Zhang X Q., Wang Y., Zhang X. Q., Ye W. C., Zhang Q.W. (2013).** Alpha-glucosidase inhibitory effect and simultaneous quantification of tree major flavonoid glycosides in *microctis folium*. *Molecules*. 18: 4221–4232.
- Cihan Arzu Coleri., Ozcan Birgul., Cokmus Cumhur. (2009).** Characterization of thermostable alpha-glucosidases from newly isolated *Geobacillus sp.* A333 and Thermophilic *Bacterium* A34. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. 25: 2205-2217.
- Claude A. (1985).** Les aliments fermentés traditionnels: une richesse méconnue. *Terre Vivante*. 261.
- Clementi Frances., Jone Rossi., Lucia Costamagna., Jolanda Rosi. (1980).** Production of amylase(s) by *Schwanniomyces castellii* and *Endomycopsis fibuligera*. *Antonie van Leeuwenhoek*. 46 :399-405.

Cohen J. D., Goldenthal M. J., Chow T., Buchferer B., Marmur J. (1985). Organization of the MAL loci of *Saccharomyces*. Physical identification and functional characterization of three genes at the MAL6 locus. *Molecular Genetics and Genomics*. 200: 1–8.

Conn E. et coll G, (1987). Outlines of biochemistry. 5th Ed. John Wiley and Sons, Inc. Singapore. 115–64.

Cuadros-Orellana Sara., Leite Laura Rabelo., Smith Ash., Medeiros Julliane Dutra., Badotti Fernanda., Fonseca Paula., Vaz Aline, Oliveira Guilherme., Neto Aristóteles Góes. (2013). Assessment of fungal diversity in the environment using metagenomics. *Fungal Genomics Biology*. 3: 110.

Daniel R. M., Peterson M. E., Danson M. J., Price N. C., Kelly S. M., Monk C.

R., Weinberg C. S., Oudshoorn M. L., Lee C. K. (2009). The molecular basis of the effect of temperature on enzyme activity. *Biochemical Journal*. 425:353-60.

Da Silva Tony Marcio., Michelin Michele., de Lima Damasio Andre Ricardo., Maller Alexandre., Dos Reis Almeida Fausto Bruno., Ruller Roberto., Ward Richard John., Rosa José Cesar., Jorge Joao Atilio., Terenzi Héctor Francisco., de Lourdes Teixeira de Moraes.olizeli Maria. (2009). Purification and biochemical characterization of a novel alpha –glucosidase from *Aspergillus niveus*. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 96: 569–578.

De Bales Sonia A., Castillo Francisco J. (1979). Production of lactase by *Candida pseudotropicalis* grown in Whey. *Appllied Environemntal Microbiology*. 37: 1201–1205.

Deive F. J., Costas M., Longo M. A. (2003). Production of a thermostable extracellular lipase by *Kluyveromyce smarxianus*. *Biotechnology Letters*. 25: 6-1403.

De Melo E. B., Da Silveira Gomes A., Carvalho I. (2006). Alpha- and beta -glucosidase inhibitors: chemical structure and biological activity. *Tetrahedron*. 6 :10277–10302.

De Miguel Bouzas T., Barros-Velazquez J., Villa T. G. (2006). Industrial applications of hyperthermophilic enzymes: A Review. *Protein and Peptide Letters*. 13: 645-651.

Demirjian C. D., Moris-V. D., Cassidy S. C. (2001). Enzymes from extremophiles. *Current Opinion in Chemical Biology*. 5: 144-151.

Demir A., Topkaya R., Baykal A. (2013). Green synthesis of superparamagnetic Fe³⁺ O₄ on nanoparticles with maltose : its magnetic investigation. *Polyhedron*. 65: 282–287.

Derynck R., Sing A., Goeddel D.V. (1983). Expression of the human interferon-gamma cDNA in yeast. *Nucleic Acids Research*. 11: 1819–183.

Devin Scannell1 R., Geraldine Butler., Kenneth. Wolfe H. (2007). Yeast genome evolution the origin of the species. *Yeast*. 24: 929–942.

Dingeon B., Ferry J. P., Roulet A. (1975). Automatic Assay of blood sugar by Trinder's method. *Annales de Biologie Clinique*. 33: 3-13.

Dordick J. S. (1991). Biocatalysts for industry. Plenum Press. New York. 330.

Dujon B., Sherman D., Fischer G., et al. (2004). Genome evolution in yeasts. *Nature*. 430: 35–44.

Durfee Steven., Tedesco John., Stetler Gary. (1991). Synthesis of wild type and mutant human hemoglobins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature Biotechnology* 9: 57 – 61.

E**da Celik., Pinar Calik. (2011).** Production of recombinant proteins by yeast cells. *Biotechnology Advances*. 30:1108–1118.

Edwards J. E. (1991). Invasive *Candida* infections. *The New England Journal of Medicine*. 324: 1060-1062.

Ellaiah P., Adinarayana K., Bhavani Y., Padmaja P., Srinivasulu B. (2002). Optimization of process parameters for glucoamylase production under solid state fermentation by a newly isolated *Aspergillus sp.* *Process Biochemistry*. 38: 615- 620.

Ernst Heidi A., Lo Leggio Leila., Willemoes Martin., Leonard Gordon Blum Paul., Larsen Sine. (2006). Structure of the *Sulfolobus solfataricus* alpha-glucosidase: implications for domain conservation and substrate recognition in GH31. *Journal of Molecular Biology*. 358:1106–1124.

F**itzpatrick D. A., Logue M. E., Stajich J. E., Butler G. (2006).** A fungal phylogeny based on 42 complete genomes derived from supertree and combined gene analysis. *BMC Evolutionary Biology* 6: 99.

Francisco Terenzi Héctor., Jorge Joao Atilio. (2006). A novel alpha-glucosidase from *Thermophilum var. Coprophilum* that converts maltose into trehalose : purification and partial characterisation of the enzyme. *Process Biochemistry* 41 :1729–1735.

G**aëlle Fleitour. (2012).** Les génériques des biotechs débarquent. L'Usine Nouvelle n° 3277. <http://www.usinenouvelle.com/>.

Gancedo C et Serrano R. (1989). Energy- Yielding Metabolism. In:Rose A.H., Harrison J.S.(Eds), *The yeasts, metabolism and physiology of yeasts* . 2 61nd Edition Academic Press. Londres. 3: 205 -25

Gasmi Boubaker. A., Ben Ismail H., Ben Hmida I., L Yahyaoui. (2013). Qualites physico-chimiques et microbiologiques du lait de deux races ovines (Comisana et Sicilo-sarde) Elevees en Tunisie. *Livestock Research for Rural Development*. 2 : 25.

Gao J., Xu P., Wang Y., Y., Hochstetter D. (2013). Combined effects of green tea Extracts, green tea polyphenols or epigallocatechin gallate with Acarbose on inhibition against alpha-amylase and alpha-glucosidase in Vitro. *Molécules*. 18 : 11614–11623.

Giannesi Giovana Cristina., de Lourdes Teixeira de Moraes Polizeli Maria., Francisco Héctor Tierenz ., Gournier-Chateau N., Larpent J.P., Castellanos M.I., Larpent J.L (1994). Les Probiotiques en alimentation animale et humaine, Ed. Tee & Doc – Lavoisier. 192.

Giannesi G. C., de Lourdes Teixeira de Moraes Polizeli M., Terenzi H. F., Jorge J. A (2006). A novel Alpha-glucosidase from *Chaetomium thermophilum var. coprophilum* that converts maltose into trehalose : purification and partial characterisation of the enzyme. Process Biochemistry. 41:1729–1735.

Guinet R., Godon B. (1994). La Panification française Ed. Tec & Doc. 1994-521.

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

Guiraud J. P., Rosec J. P. (2004). Pratique des normes en microbiologie alimentaire. Afnor. 23:228.

Hagler A. N., Mendonca-Hagler L. C. (1979). Taxonomic implications of *Rhodotorula rubra* isolates from polluted sea water in Rio De Janeiro, Brazil. Revolution Brasil Pesqui Methodology Biology.12: 63–66.

Haki G. D., Rakshit, S. K. (2003). Developments in industrially important thermostable enzymes. Bioresour Technology. 89:17-34.

Hancock M. S., Vaughan D. M., Withers G. S. (2006). Engineering of glycosidases and glycosyltransferases. Current Opinion in Chemical Biology.10: 509-519.

Hansen A., Schieberle P. (2005). Generation of aroma compounds during sourdough fermentation: Applied and fundamental aspects, Trends in Food Science & Technology. 16 : 85–94.

Hesclot H., Vladescu B. (1994). La Levure dans les Industries alimentaires Ed. Tec & Doc, Lavoisier : 56.

Hesseltine C. W., Smith M., Wang H. L. (1976). Product of fungal spore as inocula for oriental fermented food. Developments in Industrial Microbiology. 17: 101-115.

Hostinova E., Solovicova A., Gasp.erik J. (2005). Cloning and expression of a gene for an alpha-glucosidase from *Saccharomycopsis fbuligera* homologous to family GH31 of yeast glucoamylases. Appllied Microbiology Biotechnology. 69: 51–56.

Huaxin Chen., Chu Ju., Zhang Siliang., Zhuang Yingping., Qian Jiangchao., Wang Yonghong., Hu Xiaoqing . (2007). Intra Cellular expression of *vitreoscilla* hemoglobin improves S –Adenosyl methionine production in a recombinant *Pichia pastoris*. Applied Microbiology and Biotechnology.74: 1205-121.

Hyejeon Jeon., Hyewon Lee., Dahye Byun., Hyejeong Choi., ShimJae-Hoon. (2015). molecular cloning, characterization, and application of a novel thermostable alpha-glucosidase from the hyper thermophilic archaeon *Pyrobaculum aerophilum* strain IM2. Food Science and Biotechnology. 24: 175-182 .

Ivaramakrishnan S. D., Gangadharan K. M., Nampoothiri C. R., Soccol A. Pandey. (2006). Alpha amylases from microbials : an overview on recent developments. *Food Technol.Biotechnol.* 44: 173-184.

Iwata H., Suzuki T., Aramaki I. (2003). Purification and characterization of rice alpha – glucosidase, a key enzyme for alcohol fermentation of rice polish. *Journal of Bioscience and Bioengineering.* 95:106-108

Jamess. A., Cai J., Roberts I. N., Collins M. D. (1997). A phylogenetic analysis of the genus *Saccharomyces* based on 18S rRNA sequences: description of *Saccharomyces Kunashirensis* sp. Nov. and *saccharomyces Martiniae* sp. Nov. *International journal of Systematic Bacteriology.* 47: 453-460.

Jannavi R. Srinivasan, Ph.D., Ingemeyland, Msc. (2013). Glucoamylase from *Trichoderma reesei* expressed in *Trichoderma reesei*. *Chemical and Technical Assessment (CTA).*

Jansen M. L. A., Krook D. J. J., De Graaf K., Van Dijken J. P., Pronk J. T., De Winder J. H. (2006). Physiological characterization and fed-batch production of an extracellular maltase of *Schizosaccharomyces pombe* CBS 356. *FEMS Yeast Research.* 6: 888–901.

Jens Houghton-Larsen., Brandt Anders. (2006). Fermentation of high concentrations of maltose by *Saccharomyces cerevisiae* is limited by the compass methylation complex. *Applied and Environmental Microbiology.* 72: 7176–7182.

Jones A. M., Ingledew W. M. (1994). Fuel alcohol Production optimisation of temperature for efficient very high-gravity fermentation and others variable. *Process Biochemistry.* 16: 42-49.

Jones R. P., Pamment N., Greenfield P. F. (1981). Alcohol fermentation by yeasts –the effect of environmental and other variables. *Process Biochemistry.* 16: 42-49.

Jorge João Atílio. (2006). A novel alpha-glucosidase from *Chaetomium thermophilum* var. coprophilum that converts maltose into trehalose: purification and partial characterisation of the enzyme. *Process Biochemistry.* 45: 1729–1735.

Judith Berman.et Sudbery Peter. (2002). *Candida albicans*: a molecular revolution built on lessons from budding yeast. *Nature Publishing Group.* 3:6–160.

Kamoun P. (1991). Appareils et méthodes en Biochimie. 4^{ème} édition. Flammarion
Medecine Science. Paris. 80-84.

Keller J., Loyer P. (2003). Pancreatic enzyme supplementation 25. *Current Treatment Options in Gastroenterology.* 6 :369-374.

Kelly C. T., Fogarty W. M. (1998). Bacterial alpha-glucosidases - a re- classification. *Biochemical Society Transactions*. 16: 184.

Kennedy J. F. (1987). *Biotechnology vol 7a: enzyme technology* edited by Rehm H. J. and Reed G. Newyork, Cambridge, Basel. VCH. 38 : 122-127, 551-554, 716.

Khan N. A., Eaton N. R. (1971). Genetic control of maltase formation in yeast I. strains producing high and low basal levels of Enzyme. *Molecular and General Genetics*.112: 317–322.

Kimura A., Lee J ., Lee I. S., Lee H. S., Park K. H., Chiba S., Kim D. (2004). Two potent competitive inhibitors discriminating alpha-glucosidase family I from family II. *Carbohydrate Research*. 339: 1035–1040.

Kishnani P. S., Corzo D., Nicolino M., Byrne B., Mandel H., Hwu W. L., Leslie N., Levine J., Sp.encer C., Mc Donald M., Li J., Dumontier J., Halberthal M., Chien Y. H., Hopkin R., Vijayaraghavan S., Gruskin D., Bartholomew D., Van-der-Ploeg A., Clancy J. P., Parini R., Morin G., Beck M., De la Gastine G. S., Jokic M., Thurberg B., Richards S., Bali D., Davison M., Worden M. A., Chen Y. T., Wraith J. E. (2007). Recombinant human acid alpha-glucosidase: major clinical benefits in infantile-onset pompe Disease. *Neurology*. 68: 99-109.

Kjeldsen T. (2000). Yeast secretory expression of insulin precursors. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 54 : 277-86.

Kobayashi Kaoru., Shinobu Kuwae., Tomoshi Ohya., Toyoo Ohda., Masao Ohyama., Hideyuki Ohi., Kenji Tomomitsu.,Takao Ohmura. (2000). High-level expression of recombinant human serum albumin from the yeast methylotrophic *Pichia pastoris* with minimal protease production and activation. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 89: 55–56.

Kobayashi I., Tokuda M., Hashimoto H., Konda T., Nakano H., Kitahata S.(2003). Purification and characterization of a new type of alpha-glucosidase from *Paecilomyces lilacinus* that has transglucosylation activity to produce alpha-1,3- and alpha-1,2-linked oligosaccharides. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 67: 29-35.

Krasikov V. V., Karelov D.V., Firsov L. M. (2001). A-glucosidases. *Biochemistry (Moscow)*. 66: 267-281.

Kreger-Van- N.J. (1984), *The yeasts, a taxonomic study* .Elsevier Science Publishing , Amsterdam .

Kurtzman C. P., Blanz P. A. (1998). Ribosomal RNA DNA sequence comparisons for assessing phylogenetic relationships. in the yeasts: a taxonomic study, 4th Edn Edited by C. P. Kurtzman Et J.W. Fell. *Amsterdam*. Elsevier. 69-74.

Kwong-Bun Li. et Kwong –Yu Chan. (1983). Production and properties of alpha-glucosidase from *Lactobacillus acidophilus* . Applied and Environmental Microbiology. 46: 1380-1387.

Kwon-Chung K. J. et Bennett J. E. (1992). Medical mycology. Lea & Febiger, Philadelphia. Press. Amsterdam.

Kwon- Chung K. J. et John E .Bennett. (1992). Medical Mycology; Philadelphia. Cha-
Candidiasi. 280-336.

Kwong Suk-Tae., Ichiro Terada., Hiroshi Matsuzawa., Takahisa Ohta. (1988). Nucleotide sequence of the gene for aqualysin I (a thermophilic alkaline serine protease) of *Thermus aquaticus* YT-1 and characteristics of the deduced primary structure of The enzym. European Journal Biochemistry. 173: 491 -497.

Larone D. H. (1995). Medically important fungi - a guide to identification, 3rd Ed. Asm Press, Washington, D.C.

Larpent G. M., Sanglier J. J. (1992). Biotechnologies. Principes et Méthode. 574-581.

Larpent J. P. (1991). Biotechnologie des Levures Ed. Masson, Paris. 426.

Larpent J. P., Larpent–Gourguad M. (1997). Mémento technique de Microbiologie - 3^{ème} Edition. Ed. Tec & Doc. 1039.

Leblon C. (1988). Etude des levures de vinification et des facteurs agissant sur la fermentation alcoolique. Thèse: Pharmacie: Nancy 1. n°51. 235.

Lee Der-Nan., Kuo Tsun-Yung., Chen Ming-Cheng., Tang Tsung-Yin., Liu Fu-Hwa., Weng Ching-Feng. (2006). Expression of porcine epidermal growth factor in *Pichia pastoris* and its biology activity in early-weaned piglets. Applied Biochemistry and Biotechnology.78: 649 – 654.

Leclerc H., Meyer A., Deiana J. (1995). Cours de microbiologie générale. nouveau programme. Biosciences et Techniques. doin éditeurs, Paris. : 73-92.

Lenoir J., Auberger B. (1979). Extrait de la revue « le lait », Revue Générale Des Questions Lairyères (Tome Lix), n°585-586.244-268.

Leveau J. Y., Bouix M. (1979). Etude des conditions extrêmes de croissance des levures osmophiles. industries alimentaires et Agricoles. 11: 1147-1151.

Leveau J. Y., Bouix M. (1993). Microbiologie industrielle. les micro-organismes d'intérêt industriel. Lavoisier Tec & Doc, Paris. 8 : 2-92.

Little A. D., Comité Biotechnologies de LEEM, 2 Novembre 2004.

Loiudice F. H., Silva D. P., Zanchin N.I., Oliveira C.C., Pessoa A. (2001). Over expression of glucose-6-phosphate dehydrogenase in genetically modified *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*.91: 161-169.

Lo Presti F., Riffard S., Meignier H., Reyrolle M., Lasne Y., Grimont P. A., Benson R. F, Brenner D. J., Steigerwalt A. G., Etienne J., Freney J. (2001). *Legionella gresilensis* sp. Nov and *Legionella beliardensis* sp. Nov isolated from water in France. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 51: 1949- 1957.

Lourens-Hattingh A., Viljoen B. C. (2001). Growth and survival of a probiotic yeast in dairy food. *Research International*. 34: 791–796.

Lowry O. H, Rosebroughi N. J, Farr A. L., Randall R. J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*. 193: 265-275.

Manolakaki D., Velmahos G., Koukoumpetis T., Chang Y., Alam H B., De Moya M. M., Mylonakis E. (2010). Candida infection and colonization among trauma patients. *Virulence*, 1:367-375.

Marín D., Linde D., Lobato M. (2006). Purification and biochemical characterization of an α -glucosidase from *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Yeast*. 23:117–125.

Masayuki Okuyama., Ali Okuno., Natsumi Shimizu., Haruhide Mori., Atsuo Kimura., Seiya Chiba. (2001). Carboxyl group of residue Asp 647 as possible proton donor in catalytic reaction of α -glucosidase from *Schizosaccharomyces pombe*. *European Journal of Biochemistry*. 268: 2270–2280.

Matsuda Fumio., Furusawa Chikara., Kondo Takashi., Ishii Jun., Shimizu Hiroshi., Kondo Akihiko. (2011). Engineering strategy of yeast metabolism for higher alcohol production. *Microbial Cell Factories*. 8: 10-70.

Meng Y., Zhao M., Yang M., Zhang Q., Hao J., Meng Y. (2014). Production and characterization of recombinant glucose oxidase from *Aspergillus niger* expressed in *Pichia Pastoris*. *Letters in Applied Microbiology*. 58:393-400.

Merz W., G, Karp J. E., Schron, D., Saralr. (1986). Increased incidence of fungemia Caused by *Candida Krusei*, *Journal of Clinical Microbiology*. 24: 581-584.

Meunier-Carpentier F, Kiehnt. E, Armstrong, D. E. (1981). Fungemia in the compromised host. *American Journal of Medicine*.71: 363-370.

Modl Josef. (2004). Jilin fuel ethanol plant. *International Sugar Journal*. 106 :142–145.

Morvan Janique. (2010). Marché européen des enzymes dans les applications alimentaires. M55B. <http://www.frost.com>.

Moubasher H., Wahsh S. S., Abo El-Kassem N. (2010). Purification of pullulanase from *Aureobasidium pullulans*. *Microbiology*. 79: 759-766.

Murrayp. R., Patrick R. (1995). Manual Of Clinical Microbiology, 6th Edition. United States.

Nakano A., Lee C. Y., Yoshida A., Matsumoto T., Shiomi N., Katoh S. (2006). Effects of methanol feeding methods on chimeric alpha-amylase expression in continuous culture of *Pichia pastoris*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 101:227-31.

Nancy J. Moon. (1983). Inhibition of the Growth of acidtolerant yeasts by acetate, lactate and propionate and their synergistic mixtures. *Journal of Applied Bacteriology*. 55: 453–460.

Nehme N. (2008). Etude des interactions entre *Saccharomyces cerevisiae* et *Oenococcus oeni*: impact sur la réalisation de la fermentation malolactique en cultures séquentielles et mixtes. Thèse du Doctorat. Ecole Doctorale : Mécanique Energetique Genie Civil et Procédés. Toulouse.

Neiman A. M. (2005). Ascospore formation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 69: 565-84.

Nelsen A. D., Pusey M. L., Fugl Sang C. C., Westha P. (2003). A proposed mechanism for the thermal denaturation of a recombinant *Bacillus halmapalus* alpha-amylase and the effect of calcium ions. *Biochimica et Biophysica*. 28: 52-63.

Nguyenn. H., Suh S. O., Blakwell M. (2007). Five novel *Candida sp.* in insect-associated yeast clades isolated from neuroptera and other insects. *Mycologia*. 99: 842–858.

Nigam J. N. (2000). Cultivation of *Candida langeronii* in sugar cane bagasse hemicellulosic hydrolyzate for the production of single cell protein. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 16: 367–372.

Nimpiboon P., Nakapong S., Pichyangkura R., Ito K., Pong- Sawasdi P. (2011). Synthesis of a novel prebiotic trisaccharide by a type I alpha-glucosidase from *Bacillus licheniformis* strain TH4-2. *Process Biochemistry*. 46: 448–457.

Niuris Acosta Alejandro Beldarraín., Luis Rodríguez., Yamirka Alons. (2000).

Characterization of recombinant invertase expressed in methylotrophic yeasts biotechnology and Applied Biochemistry 32: 179–187.

Novak Sraan., Vesna Zechner-Krpan., Mari Vladimir. (2004). Regulation of maltose transport and metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. Food Technology and Biotechnology. 42: 213–218.

Ojha S., Mishra S., Kapoor S., Chand S. (2013). Synthesis of hexyl alpha- glucoside and alpha-polyglucosides by a novel microbacterium isolate. Applied Microbiology Biotechnology. 97: 5293–5301.

Ojima Teruyo, Wataru Saburi., Takeshi Yamamoto., Toshiaki Kudo. (2012).

Characterization of *Halomonas sp.* Strain H11 α -glucosidase activated by monovalent cations and its application for efficient synthesis of α -D-Glucosylglycerol. Applied Environmental Microbiology. 78: 1836–1845.

Okuyama M., Okuno A., Shimizu N., Mori H., Kimura A., Chiba S. (2001). Carboxyl group of residue Asp 647 as possible proton donor in catalytic reaction of alpha-glucosidase from *Schizosaccharomyces pombe*. European Journal of Biochemistry. 268: 2270–2280.

Ole Kirk., Torben Vedel Borchert., Claus Crone Fugl sang. (2002). Industrial enzyme applications. Current Opinion in Biotechnology. 13: 345–351.

Oyekanmi Nashiru., Koh Sukhoon., Lee See-Yon., Lee Dae-Sil. (2001). Novel alpha-glucosidase from extreme thermophile thermus caldophilus GK24. The Journal of Biochemistry Molecular Biology. 34: 347–354.

Panchal C. J. (1990). Yeasts strain ion. Marcel Dekker (Ed) USA. 189.

Pavlovic M., Dimitrijevic A., Trobolevic J., Milosavic N., Gavrovic-Jankulovic M. (2013). Study of transglucosylation kinetic in an enzymatique synthesis of benzyl alcohol glucoside by alpha-glucosidase from *S. Cerevisiae*. Russian Journal of Physical Chemistry. 87: 2285-2288.

Pavlovic M., Dimitrijevic A., Bezbradica D., Milosavic N., Gavrovic - Jankulovic M., Segan D., Dejan S., Dus V. (2014). Dual effect of benzyl alcohol on alpha-glucosidase activity : efficient substrate for high yield transglucosylation and non-competitive inhibitor of its hydrolytic activity. Carbohydrate Research. 387: 14–18.

Pfaller, M. A., Diekema, D. J. (2007). Epidemiology of Invasive candidiasis: a persistent public health problem. Clinical Microbiology Reviews . 20: 133-163.

Phaff H. J., Miller M.W., Mrak E.M. (1978). The life of yeasts. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts, USA.

- Pol D. (1996).** Travaux pratiques de biologie des levures. guide de laboratoire. Ellipses édition Marketing S. A, Paris. 15: 20-38.
- Prakash B., Vidyasagar M., Madhukumar M. S., Muralikrishna G., Sreeramulu K. (2009).** Production, purification, and characterization of two extremely halotolerant, thermostable, and alkali-stable alpha-amylases from *Chromohalobacter sp.* TVSP. 101. Process Biochemistry. 44: 210–215.
- Prakash O. et Jaiswal N. (2009).** Alpha-amylase: an ideal representative of thermostable enzymes. Applied Biochemistry Biotechnology. 160: 2401-2414.
- Praline Julien., Nadège Limousin., Anne-Marie Bergemer-Fouquet., Philippe Corcia. (2009).** La Maladie de pompe : une myopathie métabolique à l'ère de l'enzymothérapie. Neurologie. 1: 5-12.
- Prescott., Hartley., Klein. (1995).** Microbiologie 2^{ème} édition Ed. De Boeck-Wesmael SA.P. 1014.
- Rajoka M. I., Kiani M. A. T, Khan S., Awan M. S., Hashmi A. S. (2004).** Production of single cell protein from rice polishings using *Candida utilis*. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 20: 297–301.
- Rao R. S., Prakasham R. S., Prasad K .K., Rajesham S., Sarma P. N., Rao L.V. (2004).** xylitol production by *Candida sp.*: parameter optimization using taguchi approach. Process Biochemistry. 39: 951–956.
- Ren L., Qin X., Cao X., Wang L., Bai F., Bai G., Shen Y. (2011).** Structural insight into substrate specificity of human intestinal maltase-glucoamylase. Protein Cell. 2 : 827-836.
- Riviere J. (1975).** Les Applications industrielles de la microbiologie. Collection sciences Agronomiques. Masson et Cie (ed.). 31-195.
- Rocco K. A., Gallian P., Little K., Sp.urgash A. (1985).** A rapid bioluminescent ATP method for determining contamination in a carbonated beverage. Food Technology 39: 49-52.
- Romero F., Garcia L. A., Diaz M. (1998).** Protease production from whey at high concentration by *Serratia marcescens*. Resource - Environmental Biotechnology. 2: 93–115.
- Rose A. H., Harrison J. S. (1987).** The Yeast .Vol.4^{ème} édition : 297.
- Rungarun Wei., Pengfei Li, Hongbing Sun, Zao Chen, Yin Li, Taicheng Zhu (2015).** Construction of efficient xylose utilizing *Pichia pastoris* for industrial enzyme production. Microbial Cell Factories. 14: 22.
- Sablayrolles J. M., Salmon J. M. (2007).** Déroulement et contrôle de la fermentation. INRA. 1-14.

- Satyanarayama., Kunze. (2009).** Yeast biotechnology : diversity and applications. Springer Science. Newdelhi. 744.
- Save M. (2011).** Les proteines: proprietes physico-chimique et classification. Faculte De Médecine De Grenoble.
- Saxena R. K., Malhotra B., Batra A. (2004).** Commercial importance of some fungal enzymes. *In*: Arora, D.K. (ed) handbook of fungal biotechnology. Marcel Dekker, New York, USA, 287-298.
- Scriban R. (1999).** Biotechnologies. 5^{ème} édition. Techniques et Documentation-Lavoisier 149-157.
- Shankar T., Thangamathi P., Rama R., Sivakumar T. (2013).** Characterization of invertase from *Saccharomyces cerevisiae* MK obtained from toddy sample. Journal of Bioprocessing and Chemical Engineering . 1:1-6.
- Sicard P. (1982).** Applications industrielles des enzymes. In : Les enzymes production et utilisation industrielles Durand G, Monson P. (Ed):. Ed. Gauthier-Villars. 121-164.
- Sikander Ali., Hameedullah Rafi., Ikram-Al-Haq (2010).** Production of an extracellular lipase from *Candida lipolytica* and Parameter significance analysis by plackett-burman design. Engineering in Life Sciences.10: 465–473.
- Sim L., Quezada-Calvillo R., Sterchi E. E., Nichols B. L., Rose D. R. (2008).** Human intestinal maltase-glucoamylase: crystal structure of the N-terminal catalytic subunit and basis of inhibition and substrate specificity. Journal of Molecular Biology. 375 : 782–792
- Sim L., Willemsma C., Mohan S., Naim HY., Pinto BM., Rose DR. (2010).** Structural basis for substrate selectivity in human maltase-glucoamylase and Sucrase-isomaltase N-terminal domains. The journal of Biological Chemistry. 285: 17763–17770.
- Simon P., Meunier R. (1970).** Microbiologie industrielle et génie biochimique. Masson et Cie, Editeurs. Paris VIe : 385-411.
- Siso M. I., Murado M. A., Franco J. M, Miro N. J., Gonzalez M. P. (1998).** Microfungus yeast mixed cultures in the degradation of amylose wastes: interactions affecting amylolytic activity. Biotechnology Letters. 6:431-436.
- Siro M. R., Lovegren T. (1979).** Influence of glucose on alpha glucosidase permease activity of yeast. Applied Microbiology and Biotechnology. 7: 59-66.
- Spanakis E. K., Kourkoumpetis T. K., Livanis G., Peleg A.Y., Mylonakis E. (2010).** Statin therapy and decreased Incidence of positive candida cultures among patients with type 2 diabetes mellitus undergoing gastrointestinal surgery. Mayo Clinic Proceedings. Elsevier. 85 : 9-1073.

Song K. M., Okuyama M., Kobayashi K., Mori H., Kimura A. (2013). Characterization of alpha- glycoside hydrolase family 31 alpha- glucosidase involved in starch utilization in *podospira anserine*. *Bioscience Biotechnology Biochemistry*. 77: 2117–2124.

Soro Yade Rene (2007). Purification et caractérisation de l'alpha-glucosidase du Suc Digestif de *Archachatina ventricosa (Achatinidae)*. Application à la synthèse de polyglucosyl fructosides. L'institut National Des Sciences Appliquées de Toulouse. Thèse de Doctorat. N° d'ordre 890. 84.

Steensma David. P. (2001). “Congo” red out of Africa. *Archives of Pathology Laboratory Medicine*. 125 : 250–252.

Sugihara M., Holmquist T. (1995). On the interfacial activation of *Pichia burtonii* lipase and B as compared with *Humicola lanuginosa* lipase. *Biochimica et Biophysica Acta* 12:58 – 60.

Suthangkornkul R., Sirichaiyakul P., Sungvornyothin S., Thepouyporn A., Svasti J., Arthan D. (2015). Functional Expression And Molecular Characterization Of *Culex quinque fasciatus* salivary Alpha-Glucosidase (MalI). *Protein Expression and Purification*. 110 :145-150.

Tabussum Asia., Driaz Nahee., Saleem Muhammad., Ashraf Muhammad., Ahmad, Maqsood Alam Umer, Jabeen Bushra, Abdul Malik, Abdul Jabbar. (2013). A- glucosidase inhibitory constituents from *Chrozophora plicata*. *Phytochemistry letters*. 6: 614–619.

Tamaki N, Hama T. (1982). In “Methods in enzymology” (W. A. Wood, ed.), Academic Press, London. 89: 285-306.

Tanaka Y., Aki T., Hidaka Y., et al. (2002). Purification and Characterization of a novel fungal alpha-glucosidase from *Mortierella alliacea* with high starch-hydrolytic activity. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 66: 2415–2423.

Tatsinkou F. B., Taveai F., Ndjouenkeui R. (2005). Production and partial characterization of a thermostable amylase from *Ascomycetes* yeast straini from starchy soils. *African Journal of Biotechnology*. 4: 14-18.

Tsuyoshi Shirai., Hung Vo Si., Morinaka Katsuhito., Kobayashi Tohru., Ito Susumu.(2008). Crystal structure of GH13 alpha-glucosidase GSJ from one of The Deepest sea bacteria. *Proteins*.73: 126–133.

Tunga R. B. (1995). Influence of temperature on enzyme production. Tech. M. Thesis, II, T. Kharagpur, India.

- Van der Veen B. A., Uitdehaag J. C. M, Dijkstra B. W., Dijkhuizen L. (2000).** Engineering of cyclodextrin glycosyltransferase reaction and product specificity. *Biochimica et Biophysica Acta* . 1543 : 336-360.
- Van -der -walt J. P., Yarrow D. (1984).** In the yeasts, a taxonomic study, (N.J.W. Kreger-Van Rij, ed.), Elsevier Biochemical Press. Amsterdam. 45-104.
- Vanhee, L. M., Symoens, F., Jacobsen, M. D, Nelis, H. J, Coenye, T. (2009).** Comparison of multiple typing methods for *Asp.ergillus fumigatus*. *clinical microbiology and infection*. the official publication of the european society of clinical microbiology and Infectious Diseases. 15: 643-650.
- Vieille C., Zeikus G J. (2001).** Hyperthermophilic enzymes: sources, uses, and molecular mechanisms for thermostability. *Microbiology Molecular Biology*. 65: 1-43.
- Vishniac H. S., Hempfling W.P. (1979).** Evidence of an indigenous microbiota (yeast) in the dry valleys of antarctica. *Journal of General Microbiology*. 112: 301-314.
- Wagenbach M., O'Rourke K., Vitez L., Wieczorek A., Hoffman S., Durfee S., Tedesco J., Stetler G.(1991).** Synthesis of wild type and mutant human hemoglobins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Bio-Technology (New York)*. 1:57-61.
- Waldron K., Wagenbach Michael., O 'Rourke Katherine., Vitez Laura., Wieczorek Anna., Hoffman Stephen., (2010).** Bioalcohol production: biochemical conversation lignocellulotic biomass. Wood Head Publishing Limited and CRC press LLC .Cornwall : 476.
- Walker Graema M. (1997).** Yeastp and biotechnology, school of molecular and science, University Of Abertay Dundee, Scotland. 23.
- Wang Y., Ma L., Li Z., Du Z., Liu Z., Qin J., Wang X., Huang Z., Gu L., Chen A. S. (2004).** Synergetic inhibition of metal ions and genistein on alpha- glucosidase. *FEBS Letters*. 576: 46-50.
- Wang Yi., Xu Liang., Xu Lei., Li Hexing., Li Hui. (2013).** Synthesis of *Ru-B Amorphous* alloy supported on Sba-15 with excellent catalytic efficiency in maltose hydrogenation. *Chinese Journal of Catalysis*. 34:1027–1032.
- Wang Zhi Bin., Jiang Hai., Xia Yong. Gang., Yang Bing You., Kuang Hai Xue. (2012)** .alpha-glucosidase inhibitory constituents from *Acanthopanax senticosus* harm leaves. *Molecules*. 17: 6269–6276.
- Wataru Saburi., Masayki Okuyamo., Yuya Kurnagai., Atsuo Kimura., Haruhide Mori (2015).** Biochemical properites and substrate recognition mechanisms of GH31 alpha glucosidase from *Bacillus sp.* AHU 2001 with broad substrate specificity. *Biochimie*. 108 : 140-148.

Wickerham L. J et Burton K. A. (1948). Carbon assimilation tests for the classification of yeasts . Journal of Bacteriology. 56: 363.

Wickerham L. J. (1951). Taxonomy of yeasts. Technical Bulletin N° : 1029. United States. Department of Agriculture, Washington, D.C.

Wong D.W., Batt S. B., Lee C. C., Robertson G. H. (2002). Increased expression and secretion of recombinant alpha-amylase in *Saccharomyces cerevisiae* by using glycerol as the carbon source. Journal of Protein Chemistry. 21:25-419.

Xiong L., Huang C., Li X.M., Chen X. F., Wang B., Wang C., Zeng X. A., Chen X. D. (2015). Acetone - utanol-Ethanol (ABE) fermentation waste water Treatment by oleaginous yeast *trichosporon Cutaneum*. Applied Biochemistry and Biotechnology.176:71-563.

Xuan Li., lu Zhi-Rong., Dong Shen., Yi Zhan., Yon Jun-Mog., Park Doo., Hai-Meng., Zhou-Qing Lee Sheing Jinhyuk .(2014). The inhibitory role of Co²⁺ on alpha-glucosidase inhibition kinetics and molecular dynamics stimulation integration study. Process Biochemistry. 49 :1913-1919.

Yan Q. J., Han P., Yang Q. S., Jiang Z. Q. (2015). Purification and Characterization of a Novel Alpha- glycosidase from *Malbranchea innamomea*. Biotechnology Letters. 37:1279-1286.

Yamamoto Takashi., Unno Takehiro., Watanabe Yoshimi., Yamamoto M., Okuyama Mikio., Okayama Masayuki., Mori Haruhide., Chiba Seiya., Kimura Atsuo. (2004). purification and characterization of *Acremonium implicatum* alpha-glucosidase having region Selectivity for alpha-1,3-glucosidic linkage. Biochimica et Biophysica Acta.1700: 189–198.

Yokoyama K., Biswas S. K, Miyaji M., Nishimura K. (2000). Identification and phylogenetic relationship of the most common Pathogenic *Candida sp.* inferred from mitochondrial cytochrome b gene sequences. Journal of Clinical Microbiology. 38: 10-4503.

Zaldivar J., Neilsen J., Olsson L. (2001). Fuel ethanol production from lignocellulose :a challenge of metabolic engineering and process integration. Applied Microbiology and Biotechnology. 56: 34-14.

Zhang Y., Li Wei., Wu Kong-yang., Chen Gui-guang., Liang Zhi-qun. (2011). purification and characterization of an intracellular alpha-glucosidase with high transglycosylation activity from *A. niger* M-1. Preparative Biochemistry and Biotechnology. 41: 201–217.

Zhang Cui-Ying., Song Hai-Yan., Lin Xue., Bai Xiao-Wen., XiaoDong-Guang. (2015). Expression, purification and characterization of maltase from “Quick” Baker’s Yeast. *Advances in Applied Biotechnology*. 333: 265-275.

Zhang Xin., Shi Long., Xuan Li., Sheng Qing., Park Yong-Doo., Yao Ling., Jinhyuk Lee., Shen Dong., Lü Zhi-Rong., Zhang Qian., Zhou Hai-Meng. (2014). Effect of Ca²⁺ on the activity and structure of alpha-glucosidase: inhibition kinetics and molecular dynamics simulations. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 117: 696-705.

Zhu Yun-Ping., Yin Li-Jun., Cheng Yong-Qiang., Kohji Yamaki., Mori Yutaka., Su Yi-Cheng, Li Li- Te. (2008). Effects of sources of carbon and nitrogen on production of alpha-glucosidase inhibitor by a newly isolated strain of *Bacillus subtilis* B2. *Food Chemistry*. 109: 737–742.

Annexes

Annexe 1: Milieu de repiquage et de maintenance de la souche

YPGA (Yeast Peptone Glucose Agar)

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

Annexe 2: milieu de la mise en évidence de l'activité maltasique

YPMA (Yeast Peptone Maltase Agar)

- Extrait de levure: 15g
- Peptone: 20g
- Maltose : 20g
- Agar: 20g
- Eau distillée: 1000ml

Annexe 3 : milieu de production de la maltase dans les Erlen-Mayers Conduite de la fermentation

- Extrait de levure 05g /l
- Peptone 20g /l
- Maltose 20g /l
- Acide folique 0,05 mg/l

Annexe 4 : Méthodes de dosage

Dosage de l'activité maltasique

✓ *Les réactifs*

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

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

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

✓ *Le protocole*

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

✓ *Protocole courbe étalonnage du glucose*

[C] mg/ml	0	200	400	600	800	100
Volume de la solution (ml)	0	0.4	0.8	1.2	1.6	2
Réactif(ml)	1	1	1	1	1	1
Eau distillée(ml)	2	1.6	1.2	0.8	0.4	0

Dosage des protéines

✓ **Les réactifs**

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

✓ **Solution réactive**

- Solution A : Na_2CO_3 à 2% dans NaOH 0.1 mol/dm³.
- Solution B : Tartrate double de Na et K à 20g/dm³.
- Solution C : Sulfate de cuivre $\text{CuSO}_4, 5\text{H}_2\text{O}$ à 1%.

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

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

✓ **Le protocole**

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

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

Protocole courbe étalon du BSA :

Solution étalon (ml)	0	0,2	0,4	0,6	0,8	1
Eau distillée (ml)	1	0,8	0,6	0,4	0,2	0
Solutions réactives (ml)	5	5	5	5	5	5
Agiter et attendre 10 min à Température ambiante						
Réactif de Folin à 1/3 (ml)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5

✓ Agiter immédiatement chaque tube.

✓ Lire l'absorbance contre le blanc de gamme à 650 nm.

BOUKAIL Hanifa- Amina et MAAZI Asma

Intitulé : α -glucosidase thermostable de la levure *Candida sp.* : Production, purification et caractérisation

Résumé : La présente étude a pour principal objectif : l'étude cinétique de la production de la maltase thermostable de la souche levurienne *Candida sp.* (isolée à partir des grains de blé de zones arides de la région de Biskra) sa purification, la détermination de ses caractéristiques (pH optimum, température optimale) ainsi l'étude de sa thermostabilité.

L'activité maltasique de *Candida sp.* (initialement sous forme lyophilisée) est mise en évidence sur un milieu YPMA solide contenant 5% de maltose (après incubation à 40°C pendant 48 h).

L'étude cinétique de la production de la maltase indique que la levure *Candida sp.* montre une meilleure croissance avec un maximum de biomasse de 6,59 g/L et une activité maltasique maximale correspondante à 72,56 $\mu\text{moles}/\text{min}/\text{ml}$, au bout de 72 heures de fermentation. Cela prouve que les deux mécanismes de synthèse de la maltase et de la croissance de *Candida sp.* sont simultanés et par conséquent associés.

La purification de la maltase est réalisée en 3 étapes consécutives ; précipitation par le sulfate d'ammonium (à 40% et à 60%), dialyse et chromatographie sur gel Séphacryl S-200. L'analyse du profil chromatographique de la fraction 60% a montré 2 pics de deux fractions éluées avec 2 volumes d'élution différents : un pic1 avec une activité spécifique de 87,31 $\mu\text{moles}/\text{min}/\text{mg}$ et un pic 2 affiche une activité spécifique de 93,18 $\mu\text{moles}/\text{min}/\text{mg}$ avec un taux d'enrichissement de 16.014 Vs 17.13 pour les 2 pics respectivement. La fraction précipitée par 60 % de saturation contient donc 2 isoenzymes avec deux masses moléculaires différentes. Néanmoins, avec le taux de purification faible, les fractions des deux pics sont probablement partiellement purifiées au vu du nombre réduit des étapes classiques de purification.

L'influence du pH et de la température sur l'extrait brut et sur l'enzyme partiellement purifiée montre que l'extrait brut contient 2 isoenzymes avec deux pH optimums différents : pH 5 et pH 8 correspondant aux températures optimales respectives de 40°C et 50°C. Les 2 isoenzymes partiellement purifiés présentent également des caractéristiques différentes : un pic 1 avec un pH optimal de 4 et une température de 40°C, un pic 2 avec un pH optimal de 5 et une température de 40°C.

Après un traitement thermique à 100°C pendant 30 min, l'extrait brut de la maltase de *Candida sp.* garde 30% de son activité initiale alors que les deux isoenzymes partiellement purifiés en perdent 80%. A 70°C, les isoenzymes de l'extrait brut sont plus thermostables (demi-vie 120 min Vs 60-90 min) pour les isoenzymes partiellement purifiés.

Comme de nombreuses réactions enzymatiques industrielles sont exécutées à des températures élevées, la maltase thermostable peut attirer une attention en matière de biotechnologie et de l'industrie, sa stabilité accrue par rapport à des enzymes mésophiles la rend plus approprié pour des procédés industriels difficiles.

Mots clés : *Candida sp.* , Maltase , Extrait brut , Isoenzymes , Purification , Thermostabilité.**Laboratoire de recherche :** Laboratoire de Génie Microbiologie et Applications (GMA)**Devant le Jury :****Président :** BENHAMDI A.**Rapporteur :** MERAIHI Z.**Co-rapporteur :** DAKHMOUCHE S.**Examinatrice :** BENNAMOUN L.**M. C. B., Université Frères MENTOURI Constantine.****Professeur Université Frères MENTOURI Constantine.****M. A. A., ENS Université Constantine 3.****M. A. A., Université Frères MENTOURI Constantine.**