

**RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE**  
**MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR**  
**ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE**



**Université des Frères Mentouri Constantine 1**  
**Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie**  
**Département de Biochimie et Biologie Moléculaire et Cellulaire**  
**Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master**  
**Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie**  
**Filière : Sciences Alimentaires**  
**Spécialité : Biochimie de la Nutrition**

**Intitulé :**

---

***Contribution à l'isolement et la sélection des souches de  
levuriennes, productrices d'enzymes d'intérêt  
biotechnologique, à partir d'aliments végétaux sucrés.***

---

**Présenté et soutenu par : CHAOUR Abir**

**Le: 03 /10/2019**

**MORDJANA Rayene**

**Jury d'évaluation :**

**Président : DAKHMOUCHE S.** M.C.A. Ecole Normale Supérieure Assia Djébar -

Constantine **Rapporteur : LABBANI F-Z. K.** M.C.B. Ecole Normale Supérieure Assia  
Djébar - Constantine

**Examineur : BENNAMOUN L.** M.C.B. Université Frères Mentouri - Constantine 1

***Année universitaire : 2018 - 2019***

## *Remerciements*

*Nous adressons nos remerciement, en premier lieu, à le bon Dieu pour la volonté, la santé, le courage et la patience qui nous a donné pour mener ce travail à terme.*

*Nous voudrions exprimer, par ce modeste travail, notre gratitude, notre reconnaissance, notre considération et les grands remerciements à notre encadreur Docteur **LABBANI Fatima-Zohra Kenza** d'avoir proposé, suivi et corrigé ce travail, nous vous remercie chaleureusement pour le savoir que vous nous avez enseigné.*

*Nous exprimons également nos remerciements aux membres du jury, Mme. **DAKHMOUCHE Scheherazad** et Mme. **BENNAMOUN Leila** pour avoir accepté d'examiner et de juger ce travail. Nous remercions chaleureusement nos parents qui nous ont soutenus tout au long des études, parfois au prix de quelques sacrifices, et sans qui nous n'aurions pas pu atteindre ce niveau.*

*Enfin, nous exprimons notre profonde reconnaissance à nos frères et sœurs, nos familles, nos amis et tous ceux qui ont contribué à réaliser ce travail.*

*RAYEN et ABIR.*

## *Dédicaces*

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

*Je dédie ce travail à **mon cher père**, pour ton amour, ton soutien et ta stimulante fierté.*

*Que Dieu te garde et te procure santé et longue vie...*

*À la lumière de ma vie et l'espoir de mon existence, de celle qui m'a indiqué la bonne voie en me rappelant que la volonté peut réaliser l'impossible **Ma mère**, que ce travail soit pour le témoignage de mon infinie reconnaissance pour ton aide précieuse et toutes ces années de compréhension. Pour tous les peines et les sacrifices qu'elle m'avait consentis pour mon éducation. Que Dieu, le tout puissant, te donne santé et longue vie.*

*À mes chers frères Akram et Joud*

*À mes chers sœurs : Fatima, Chourouk et Chahid*

*À mon encadreur Mme LABBANI Fatima-Zohra Kenza.*

*A mon fiancé Nouceir pour son soutien moral, sa générosité, sa patience et ses encouragements.*

*A mes très chères amies, Abir, Hadjer et Lamia pour tous les moments que nous avons partagés.*

*A tous mes chers amis, j'espère que vos rêves se réaliseront !*

*A toute la famille MORDJANA et BENMERZOUGA*

*Je ne peux exprimer à travers ses lignes tous mes sentiments d'amour et de tendresse envers vous. Je vous souhaite la réussite dans votre vie.*

*Et tous ceux qui m'aiment et que j'aime*

*Je vous dis Merci !*

*MORDJANA Rayen.*

## *Dédicaces*

*Tous d'abord, louangent au bon Dieu qui nous a offert la chance et la force de poursuivre nos études.*

- *C'est avec profonde gratitude et sincères expressions que je dédie cet humble et modeste travail de fin d'études à : Ma très chère maman «Fatima » source de tendresse, de joie et d'affection, celle qui a toujours été là pour moi. Ainsi que mon cher père «Djamel» qui a toujours été à mes côtés et m'a épaulé dans les moments difficiles.*
- *A mes très chères sœurs et frère: Rima, Amira, Mohamed Amine.*
- *A tous ceux qui portent le nom : CHAOUR et ALILI.*
- *Mon plus beau cadeau de ma vie mon mari pour son soutien moral, sa patience et ses encouragements.*
- *A mon amie proche et ma chère sœur « Rayene », je suis heureuse d'avoir complété la dernière lettre de mon étude avec vous.*

*Nos derniers remerciements, mais non les moindres, vont à tous ceux qui ont participé de près ou de loin pour l'aboutissement de ce travail, à toute la promotion de Biochimie de la Nutrition de l'année universitaire 2018 - 2019.*

*CHAOUR Abir*

### Résumé

Dans cette étude, nous nous sommes intéressés à l'isolement et la sélection des levures productrices d'enzymes d'intérêt biotechnologique. L'isolement qui a été réalisé à partir d'aliments végétaux sucrés (pelures de pommes, de betteraves, d'oranges et des fraises entières) a permis de répertorier 42 souches de levures sur milieu YGCA. Toutes les souches isolées font l'objet d'un screening primaire et secondaire pour la production d'enzymes :  $\alpha$ -amylase, CMCCase, pectinase et protéase. Le screening de l'activité amylolytique sur milieu AAM a montré que les souches A1, A3, A5, A6, B9 et O7 sont productrices d' $\alpha$ -amylase. L'évaluation de leur l'activité par la méthode de puits a révélé que la souche B9 est la plus active avec un diamètre de zone d'hydrolyse de 32 mm. La mise en évidence de la production de la CMCCase a été effectuée sur milieu CAM. Les souches A2, A5, A7, B9, B15 et O7 ont été sélectionnées comme étant productrices de cette enzyme hydrolytique extracellulaire. Parmi ces dernières, la souche B15 a été signalé la plus intéressante avec une zone claire de 55 mm de diamètre. En outre, le criblage de l'activité pectinolytique et protéolytique des souches isolées a été fait sur milieux PAM et SMA respectivement. Huit souches pectinolytiques : A1, A3, A4, A5, A6, B10, O7 et S13 et sept souches protéolytiques, A1, A3, A5, B7, B9, B15 et O7 ont été sélectionnées. Le screening secondaire de ces activité enzymatiques a montré que les souches A1 et O7 possèdent respectivement une activité pectinase (diamètre d'hydrolyse de 32 mm) et activité protéase (50 mm de diamètre) élevée par rapport aux autres.

Par leurs activités enzymatiques élevées, les isolats de levures B9, B15, A1 et O7, isolées à partir des échantillons biologiques, peuvent ainsi être qualifiées de « souches performantes » pour la production des enzymes :  $\alpha$ -amylase, CMCCase, pectinase et protéase respectivement. Elles présentent donc un intérêt biotechnologique.

**Mots clés :** Levures, isolement, aliments végétaux sucrés, enzymes extracellulaires, applications biotechnologiques.

**Abstract**

The present study aimed to isolate and to select yeast producing enzymes of biotechnological interest. The isolation was carried out from sweet plant foods (apple peels, beet peels, orange peels and whole strawberries). In total 42 yeasts strains was isolated on YGCA medium. All isolated strains are screened for the production of enzymes:  $\alpha$ -amylase, CMCase, pectinase and protease. The screening of amylase producing yeasts on AAM medium showed that the strains A1, A3, A5, A6, B9 and O7 possesses amylolytic activity. The evaluation of their activity using the well plate method revealed that the strain B9 has highest amylolytic activity with a hydrolysis zone diameter of 32 mm. The CAM medium was used for *screening cellulase producing yeasts*. The result showed that the strains A2, A5, A7, B9, B15 and O7 are CMAase producing. Among them, the strain B15 has been reported as the most interesting with a clear area diameter of 55 mm. In addition, the screening of pectinolytic and proteolytic activity of the isolated strains was performed on PAM and SMA media respectively. Eight pectinase producing strains: A1, A3, A4, A5, A6, B10, O7, S13 and seven protease producing strains: A1, A3, A5, B7, B9, B15, O7 were selected. The secondary screening of these enzymatic activities showed that the strains A1 and O7 possess respectively the highest pectinolytic (32 mm in diameter) and proteolytic (50 mm in diameter) activities compared to the others strains.

By their high enzymatic activities, the yeast strains B9, B15, A1 and O7, isolated from biological samples, could be qualified as "performing strains" for the production respectively of the enzymes:  $\alpha$ -amylase, CMCase, pectinase and protease. Thus, they can present a biotechnological interest.

**Keywords:** Yeasts, isolation, sweet plant food, extracellular enzymes, biotechnological applications.

## الملخص

تهدف هذه الدراسة إلى عزل واختيار خمائر منتجة لإنزيمات ذات أهمية بيوتكنولوجية. سمحت عملية العزل من عينات أطعمة نباتية حلوة (قشور التفاح، قشور الشمندر، قشور البرتقال والفراولة الكاملة) بالحصول على 42 سلالة خميرة في الوسط الزراعي YGCA. تم إجراء عملية الكشف عن إنتاج الإنزيمات: ألفا أميليز ، سيليلاز ، البكتيناز والبروتياز لجميع عزلات الخميرة. إن الكشف عن النشاط الاميلازي في وسط AAM أظهر أن السلالات A1، A3، A5، A6، B9 و O7 منتجة لإنزيم الـ  $\alpha$ -amylase. تم كذلك تقييم هذا النشاط باستعمال طريقة البئر، و الذي أظهر أن السلالة B9 هي الأكثر نشاطاً، حيث بلغ قطر دائرة تحلل النشاء 32 ملمتر. عملية البحث عن عزلات الخميرة المنتجة لإنزيم السيليلاز قد تمت في وسط CAM. النتائج كشفت أن السلالات A2 و A5 و A7 و B9 و B15 و O7 منتجة لإنزيم الـ CMCase. من بين هذه العزلات النشطة، أظهرت الدراسة أن السلالة B15 هي الأكثر نشاطاً، حيث بلغ قطر دائرة تحلل السيليلوز 55 ملم. بالإضافة إلى ذلك، تم إجراء الكشف عن نشاط التحلل البكتيني و التحلل البروتيني للسلالات المعزولة في الأوساط الزراعية PAM و SMA على التوالي. النتائج سمحت بتحديد ثماني سلالات محللة للبكتين: A1، A3، A4، A5، A6، B10، O7، S13 وسبع سلالات محللة للبروتين: A1، A3، A5، B7، B9، B15، O7. عملية الكشف الثانوي لهذه الأنشطة الأنزيمية أوضحت أن السلالات A1 و O7 تملك على التوالي قدرة عالية على إنتاج إنزيم البكتيناز (قطر هالة التحلل 32 ملم) و إنزيم البروتياز (50 ملم) مقارنة بالسلالات الأخرى. من خلال أنشطتهم الأنزيمية العالية، يمكن لسلالات الخميرة A1، B9، B15 و O7، المعزولة من عينات بيولوجية ، على أنها "سلالات ذات كفاءة" في إنتاج إنزيمات: الـ  $\alpha$ -amylase، الـ CMCase، الـ perctinase و الـ protease على التوالي، وبالتالي فهي ذات أهمية بيوتكنولوجية.

**الكلمات المفتاحية:** الخمائر ، عزل ، أطعمة نباتية حلوة ، الإنزيمات خارج خلوية ، التطبيقات البيوتكنولوجية.

# Sommaire

**Remerciements**

**Dédicaces**

**Résumés**

**Liste des figures**

**Liste des tableaux**

**Liste des abréviations**

**Introduction** .....1

## **Chapitre I. Etude bibliographique**

<b>1 - Généralités sur levures</b> .....	3
1 – 1 - Morphologie des levures .....	4
1 – 2 – Structure cellulaire des levures .....	4
1 – 3 - Besoins nutritifs des levures .....	6
1 – 3 – 1 – Carbone .....	6
1 – 3 – 2 – Azote .....	7
1 – 3 – 3 – Minéraux, oligominéraux et vitamines .....	7
1 - 4 - Conditions physicochimiques de croissance .....	7
1 – 4 – 1 - Oxygène .....	8
1 - 4 – 2 – Température.....	8
1 - 4 – 3 – pH .....	8
1 – 4 – 4 - Pression osmotique et activité d'eau .....	8
1 – 5 - Métabolisme de la levure .....	9
1 – 5 – 1 - Métabolisme oxydatif .....	9
1 – 5 – 2 - Métabolisme fermentaire .....	9
1 – 6 – Classification des levures .....	10

<b>2 – Biotechnologies des levures</b> .....	11
2 – 1 – Production de boissons alcoolisées .....	11
2 - 1 – 2 – Panification .....	12
2 - 1 - 3 - Affinage des fromages .....	12
2 –1 – 4 – Production de produits carnés .....	13
2 – 1 – 5 - Production des enzymes .....	13
2 – 1 – 5 – 1 – Alpha-amylases ( $\alpha$ -amylases) .....	13
2 – 1 – 5 – 2 – Cellulases .....	14
2 – 1 – 5 – 3 – Protéases .....	16
2 – 1 – 5 – 4 – Lipases .....	16
2 – 1 – 5 – 5 – Pectinases .....	17
2 – 1 – 5 – 6 – Xylanases .....	18
2 – 1 – 5 – 7 – Invertases .....	18
2 – 1 – 5 – 8 – Inulinases .....	19
2 – 1 – 5 – 9 – Laccases .....	19
2 – 1 – 5 – 10 – Lactases .....	19
2 – 1 – 5 – 11 – Rhamnosidases .....	20

## **Chapitre II: Matériel et méthodes**

1 – Echantillonnage.....	21
2 – Isolement des levures.....	21
3 - Purification et conservation des levures isolées.....	23
4 - Screening des activités enzymatiques chez les souches isolées.....	23
4 – 1 – Mise en évidence de la production de l' $\alpha$ -amylase.....	23
4 – 2 – Détermination de l'activité cellulolytique (CMCase).....	23
4 – 3 – Mise en évidence de la production de la pectinase.....	24
4 – 4 - Mise en évidence de la production de protéase.....	24
5 - Screening secondaire des activités enzymatiques étudiées.....	24

## **Chapitre III: Résultats et discussions**

1 – Isolement des souches de levures.....	25
1 – 2 – Pré-identification des souches de levures isolées.....	26

2 – Mise en évidence des activités enzymatiques chez les souches levuriennes isolées.....	33
2 – 1 – Screening des souches productrices de l' $\alpha$ -amylase.....	33
2 – 2 – Screening des souches productrices de la CMCase.....	35
2 – 3 – Screening des souches productrices de la pectinase.....	37
2 – 4 – Screening des souches productrices de la protéase.....	39
<b>Conclusion générale.....</b>	<b>42</b>
<b>Références bibliographiques.....</b>	<b>44</b>
<b>Annexes.....</b>	<b>57</b>

## Liste des figures

<b>Figure 1.</b> Schéma de la reproduction asexuée de la levure (A) : reproduction par bourgeonnement ; (B) : reproduction par scissiparité.....	3
<b>Figure 2.</b> Schéma de la reproduction sexuée d'une levure.....	4
<b>Figure 3.</b> Filamentisation des levures (A) : Pseudomycélium. (B) : Vrai mycélium. Barre = 10 $\mu$ m.....	5
<b>Figure 4.</b> Représentation idéalisée d'une cellule de levure .....	5
<b>Figure 5.</b> Applications biotechnologiques des levures .....	11
<b>Figure 6.</b> Dégradation de l'amylose (A), et de l'amylopectine (B) par les $\alpha$ -amylases. Les cercles colorés indiquent les unités glucose liées en ( $\alpha$ -1,6) .....	14
<b>Figure 7.</b> Hydrolyse de la cellulose par les trois types d'enzymes : l'endoglucanase coupe aléatoirement les chaînes de cellulose au niveau des zones amorphes générant de nouvelles extrémités de chaînes. La cellobiohydrolase agit sur les extrémités libres des chaînes de cellulose libérant du cellobiose. La $\beta$ -glucosidase hydrolyse le cellobiose en glucose.....	15
<b>Figure 8.</b> Préparation des échantillons pour l'isolement des levures: (A) Pelures de pommes; (B) Pelures de betteraves ; (C) Pelures d'oranges; (D) Fraises entières.....	21
<b>Figure 9.</b> Isolement des levures à partir des échantillons biologiques.....	22
<b>Figure 10.</b> Répartition des souches de levures isolées en fonction de leur origine.....	26
<b>Figure 11.</b> (I) Aspect macroscopique et (II) microscopique (Grossissement x 100) des colonies des levures isolées après 3 jours de culture à 25°C sur milieu YPG Agar.....	29
<b>Figure 12.</b> Mise en évidence de la production de l' $\alpha$ -amylase chez les souches isolées : A1, A3, A5, A6, B9 et O7 après 5 jours d'incubation à 25°C sur milieu AAM.....	33
<b>Figure 13.</b> Illustration des diamètres des zones d'hydrolyse formées autour des colonies des souches A1, A3, A5, A6, B9 et O7, après 5 jours d'incubation à 25°C sur milieu AAM.....	34
<b>Figure 14.</b> Test de la mise en évidence de la production de la CMCase chez les souches isolées après 5 jours d'incubation à 25°C sur milieu CAM (z) : Zone d'hydrolyse.....	35
<b>Figure 15.</b> Illustration des diamètres des zones d'hydrolyse formées autour des colonies des souches A2, A5, A7, B9, B15 et O7, après 5 jours d'incubation à 25°C sur milieu CAM.....	36
<b>Figure 16.</b> Test de la mise en évidence de la production de la pectinase chez les souches A1, A3, A4, A5, A6, B10, O7, et S13, après 5 jours d'incubation à 25°C sur PAM (z) : Zone d'hydrolyse.....	37

<b>Figure17.</b> Illustration des diamètres des zones d'hydrolyse formées autour des colonies des souches pectinolytiques A1, A3, A4, A5, A6, B10, O7 et S13 après 5 jours d'incubation à 25°C sur milieu PAM.....	38
<b>Figure 18.</b> Test de la mise en évidence de la production de la protéase chez les souches A1, A3, A5, B7, B9, B15 et O7 après 5 jours d'incubation à 25°C sur milieu SM (z) : Zone d'hydrolyse.....	40
<b>Figure 19.</b> Illustration des diamètres des zones de lyse formées autour des colonies des souches protéolytiques A1, A3, A5, B7, B9, B15 et O7 après 5 jours d'incubation à 25°C sur milieu SMA.....	41

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1.</b> Les sources de carbone pouvant être utilisées par les levures.....	6
<b>Tableau 2.</b> Importance de certains oligoéléments et vitamines pour la croissance des Levure.	7
<b>Tableau 3.</b> Levures pour applications boulangères différentes.....	12
<b>Tableau 4.</b> Résultats de l'isolement des souches de levures à partir des pelures de pommes, d'oranges, de betteraves et des fraises entières.....	25
<b>Tableau 5.</b> Caractéristiques des colonies sur milieu YPG Agar après 3 jours d'incubation à 25°C.....	27
<b>Tableau 6.</b> Aspect microscopique (Grossissement x 100) des colonies sur milieu YPG Agar après 3 jours d'incubation à 25°C.....	28

## Liste des abréviations

**YGCA:** Yeast Glucose chloramphenicol Agar

**YPG:** Yeast peptone Glucose

**YPGA:** Yeast Peptone Glucose Agar

**AAM:** Amylase Activity Medium

**PAM:** Pectinase Activity Medium

**CMC:** Carboxymethylcellulose Agar

**CAM:** Cellulase Activity Medium

**SMA:** Skimmed Milk Agar

**YPPA:** Yeast peptone pectin Agar

**PG:** polygalacturonase

**PL:** pectine lyase

**PAL:** pectate lyase

**PE:** pectine estérase

## Introduction

Les enzymes, substances vitales dans le système biologique, ont été exploitées depuis l'Antiquité pour la production d'alcool ainsi que pour d'autres boissons (**Singh *et al.*, 2016**). Elles sont actuellement utilisées dans plusieurs applications industrielles : dans l'industrie des détergents, des papiers, de textile, de brasserie, dans l'industrie alimentaire, etc. (**Admasu *et al.*, 2015**). Ainsi, les enzymes produites à grande échelle sont principalement des enzymes extracellulaires qui dégradent des polymères naturels tels que les amidons, les pectines, les celluloses et les protéines (**Bouhadi, 2016**).

Ces dernières années, l'utilisation des microorganismes comme source biotechnologique des enzymes d'importance industrielle a stimulé l'intérêt pour l'exploration des activités enzymatiques extracellulaires (**Admasu *et al.*, 2015**).

Par ailleurs, les enzymes produites par les levures sont de plus en plus utilisées dans différentes industries, et la recherche de nouvelles enzymes synthétisées par ces microorganismes possédant un potentiel d'application industrielle ne cesse de se développer (**Johnson et Echavarri-Erasum, 2011**).

Aujourd'hui, plusieurs espèces de levures sont explorées pour des applications industrielles. En fait, ce sont des acteurs essentiels intervenant dans divers domaines et l'intérêt qu'elles suscitent aujourd'hui est dû à leur grande diversité (**Boulal *et al.*, 2016**). De plus, l'état unicellulaire, la capacité à se multiplier rapidement et la rusticité des exigences nutritionnelles confèrent à ces eucaryotes des qualités qui permettent de les cultiver, de les étudier et de les utiliser aussi facilement que des microorganismes procaryotes (**Pol, 1999**).

D'autre part, un grand nombre de levures communément utilisées en biotechnologie a été obtenu à partir d'habitats naturels où développer une faculté d'adaptation à un grand nombre de niches écologiques grâce à leurs propriétés physiologiques caractéristiques (**Boulal *et al.*, 2016**). En effet, leurs habitats préférés sont les fruits, les tissus végétaux, les feuilles et les fleurs, les produits fermentés, le sol et l'eau salée (**Naiman Ali et Mazharuddin Khan, 2013**). Les fruits contiennent une forte concentration en sucres. Les espèces de levure y sont donc naturellement présentes et peuvent être facilement isolées des fruits (**Zahida *et al.*, 2014**).

C'est dans ce contexte que s'intègre le présent travail dans lequel des levures ont été isolées à partir des pelures d'aliments végétaux sucrés afin d'évaluer leur capacité à produire des certaines activités enzymatiques d'intérêt biotechnologique à savoir: l' $\alpha$ -amylase, la cellulase (ou CMCase), la pectinase et la protéase.

Le présent mémoire est divisé en trois chapitres. Le premier présente une étude bibliographique qui rapporte des généralités sur les levures ainsi que leurs applications biotechnologiques.

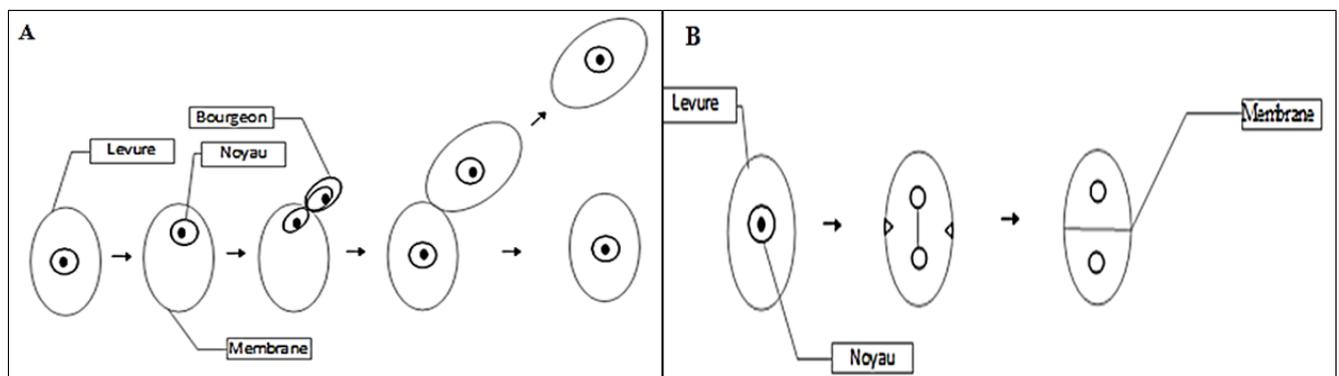
Le deuxième chapitre est consacré aux Matériel et Méthodes utilisés et pour réaliser ce travail.

Le troisième chapitre représente et discute les résultats obtenus.

## 1 - Généralités sur les levures

Les levures sont des micro-organismes eucaryotes, champignons à thalle unicellulaire immobile, non photosynthétiques, chimio-hétérotrophes c'est à dire qu'elles sont capables de tirer leur énergie à partir des réactions d'oxydo-réduction ou de fermentation de composés chimique tels que les sucres (Guiraud et Galzy, 1998 ; Belmaziz et Djalal, 2017 ; Kurtzman *et al.*, 2011 ; Bennamoun, 2017). Le terme levure provient du mot latin « *levare* » qui se traduit par le verbe « lever » comme levain, rappelle l'attitude de certaines d'entre elles à provoquer la levée des pâtes panifiables (Bouchet *et al.*, 2005 ; Berber, 2017).

Le mode de reproduction des levures peut varier selon les espèces. Elles se reproduisent aussi bien par un cycle asexué (végétatif) que par un cycle sexué (sporulation) en fonction des conditions favorables ou défavorables du milieu (Belmaziz et Djalal, 2017). Le mode le plus fréquent de reproduction végétative est le bourgeonnement. Il est représenté par une évagination qui apparait à un point de la cellule mère, le bourgeon grandit peu à peu en formant une nouvelle cellule qui se détache de la cellule mère (Figure 1A). Un autre mode de reproduction végétative peut être rencontré : la fission (ou scissiparité), caractéristique du genre *Schizosaccharomyces*, se manifeste par la formation d'une paroi transversale au grand axe de la levure (Figure 1B) (Rezki-Bekki, 2014 ; Labbani, 2015).

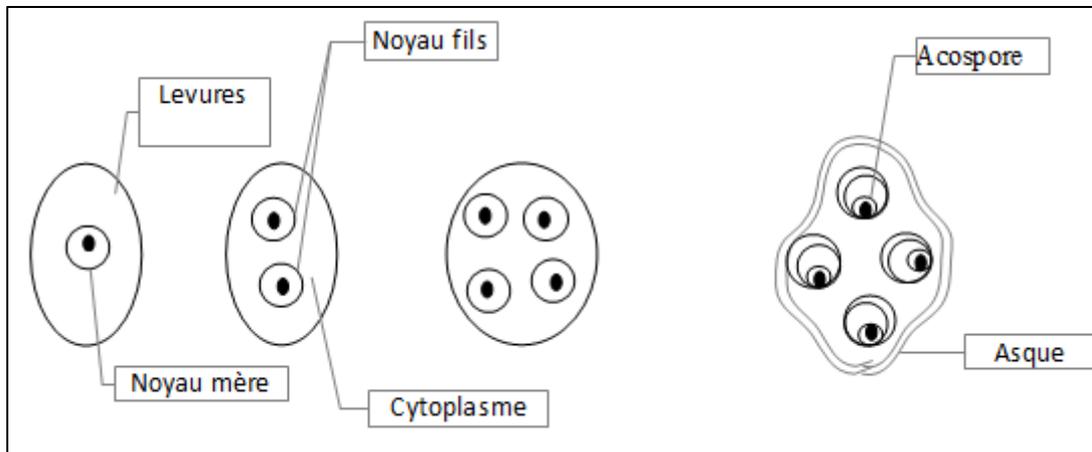


**Figure 1.** Schéma de la reproduction asexuée de la levure. (A) : reproduction par bourgeonnement ; (B) : reproduction par scissiparité (Thuriaux, 2004).

Certaines levures, comme *Saccharomyces cerevisiae*, ont une reproduction sexuée qui correspond à une phase de leur cycle biologique avec une alternance des phases haploïde et diploïde (Labbani, 2015).

Lorsque les conditions de milieu deviennent défavorables, la levure cesse de se multiplier. Elle produit alors des ascospores. Le noyau subit deux divisions successives, chacun des noyaux fils s'entoure de cytoplasme et la levure mère devient un asque. Ce dernier renferme 2 à 4

ascospores (Figure 2). Les ascospores représentent le mode de survie durant la mauvaise saison (Thuriaux, 2004).



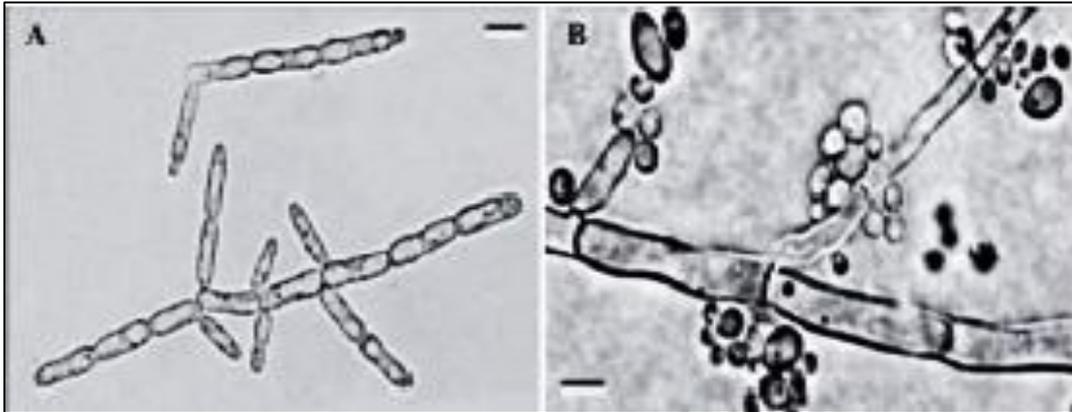
**Figure 2.** Schéma de la reproduction sexuée d'une levure (Thuriaux, 2004).

Les levures sont des microorganismes ubiquitaires, largement distribuées dans la nature. Elles se rencontrent sur les végétaux riches en sucre directement assimilables (les pommes, les raisins, etc.). On trouve également des levures à la surface ou à l'intérieur d'autres êtres vivants, dans les eaux, dans l'atmosphère et dans le sol. Par ailleurs, le sol constitue un large réservoir assurant leur survie dans les conditions défavorables (Berber, 2017).

### 1 – 1 - Morphologie des levures

Les cellules de levures sont généralement ovoïdes ou sphériques, parfois cylindriques, mais il existe d'autres formes spécifiques : triangulaires, ogivales, en forme de citron ou même en forme de bouteille. Leur taille varie de 2 à 3 microns et même jusqu'à 5 microns chez certaines espèces de levures (Guiraud, 1998 ; Belmaziz et Djalal, 2017).

Certaines cellules des levures peuvent après bourgeonnement rester liées les unes aux autres et constituer aussi un pseudomycélium plus ou moins différencié suivant les genres ou les espèces (Figure 3A). Dans certaines conditions, d'autres levures peuvent produire de mycéliums caractéristiques de champignons filamenteux, comportant des cloisons transversales (ou septa) et présentant une croissance apicale (Figure 3B) (Bouzegag, 2007). Les colonies des levures sont, en général, blanches (très rarement roses ou rouges) et régulières (Guiraud, 1998 ; Belmaziz et Djalal, 2017).

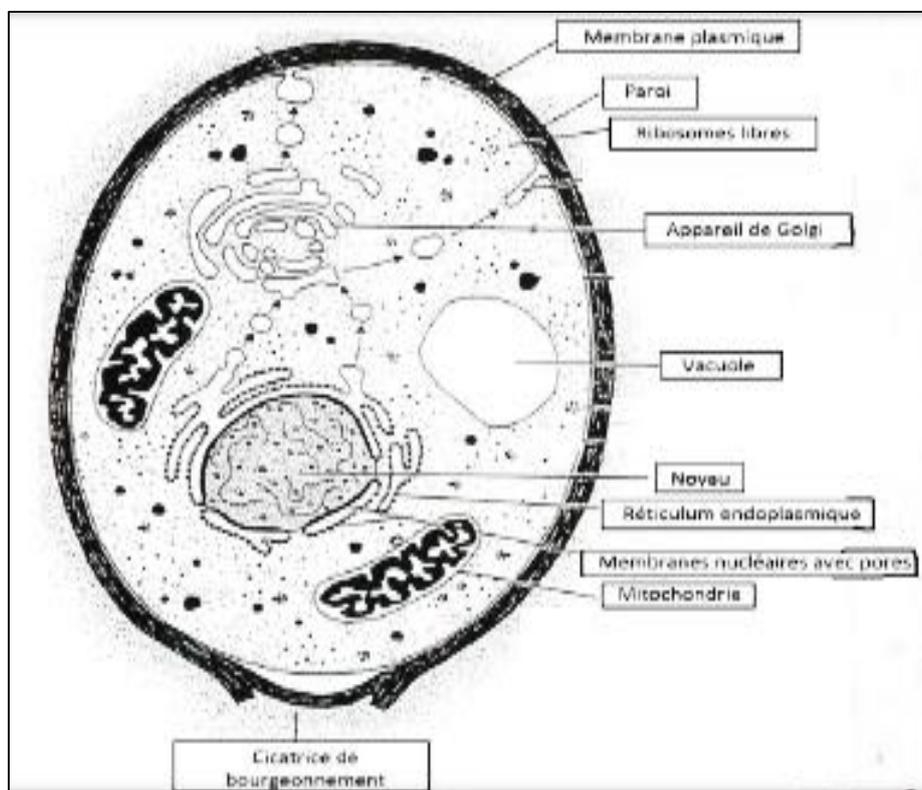


**Figure 3.** Filamentation des levures. (A) : Pseudomycélium. (B) : Vrai mycélium.

Barre = 10 µm (Labbani, 2015).

### 1 – 2 – Structure cellulaire des levures

Les levures possèdent toutes une membrane plasmique protégée des agressions extérieures par une paroi cellulaire. En tant qu'eucaryotes, elles possèdent un noyau clairement délimité et différents chromosomes. On y trouve aussi des mitochondries, organites cellulaires capables de fournir de l'énergie à partir du dioxygène (Figure 4) (Guiraud, 2003 ; Djelti et Lassal, 2017).



**Figure 4.** Représentation idéalisée d'une cellule de levure (Thuriaux, 2004).

### 1 – 3 - Besoins nutritifs des levures

Les nutriments sont apportés au milieu de culture de façon graduelle pour maintenir une faible concentration de glucose afin d'encourager la respiration et la reproduction cellulaire des levures. Les éléments chimiques nécessaires à la croissance des levures sont :

#### 1 – 3 – 1 - Carbone

Les levures étant hétérotrophes ont besoin pour leur croissance d'une source de carbone qui est également leur source d'énergie. Le carbone constitue 50% du poids sec de la levure (**Leveau et Bouix, 1993 ; Bennamoun, 2017**). Cependant, leur croissance sur des substrats non-glucidiques les oblige à synthétiser des sucres exigés pour la biosynthèse macromoléculaire, en particulier celle des polysaccharides complexes (**Belmaziz & Djalal, 2017**). En fermentation industrielle, le sucre utilisé est majoritairement le glucose même si d'autres sucres peuvent le remplacer comme substrat de croissance : fructose, galactose, maltose, etc. Des résidus de l'industrie sucrière (mélasse par exemple) sont également exploités en tant que substrat pour les levures (**Henes et Sonnleitner, 2007 ; Bennamoun, 2017**) leur oxydation fournit l'énergie à la cellule (**Larpent, 1991 ; Berber, 2017**).

Certaines levures peuvent utiliser une large gamme de substrats carbonés, mais d'autres assimilent seulement un petit nombre de composés (Tableau 1) (**Bourgeois et Leveau, 1991 ; Berber, 2017**).

**Tableau 1.** Les sources de carbone pouvant être utilisées par les levures (**Berber, 2017**).

Sources de carbone	Exemples
Hexoses	D-glucose, D-galactose, D-fructose, D-mannose
Disaccharides	Maltose, saccharose, lactose, tréhalose, mélibiose, cellobiose, mélézitose
Tri saccharides	Raffinose, maltotriose
Polysaccharides	Inuline, cellulose hemicellulose, chitine
Oligosaccharides	Maltotetraose, maltodextrines
Pentoses	L-arabinose, D-xylose, D-xylulose, L-rhamnose
Alcools	Méthanol, éthanol, glycérol
Acides organique	Acétate, citrate, lactate, malate, pyruvate, succinate

### 1 – 3 – 2 - Azote

La plupart des levures sont capables d'assimiler différentes sources d'azote organiques (peptone, extrait de levure, glutamine, bases puriques et pyrimidiques, etc.), l'extrait de levure constitue le principal stimulateur de la croissance microbienne, en particulier pour les levures (Walker, 1998 ; Deak, 2006 , Aougeub 2018, Lahreche, 2018), et des sources inorganiques pour la biosynthèse d'acides aminés, de protéines, d'acides nucléiques et de vitamines (Larpen et Larpen-Gourgaud, 1997 ; Guiraud, 1998 ; Kara-Ali, 2014). La synthèse des composés azotés structuraux et fonctionnels de la cellule, dépend de l'assimilation des formes oxydées ou réduites car les levures ne peuvent pas fixer l'azote libre. Par ailleurs, l'assimilation des ions d'ammoniums ( $\text{NH}_4^+$ ) est largement répandue chez ces dernières. Cependant, d'autres espèces levuriennes se caractérisent par une capacité à utiliser les nitrates ( $\text{NO}_3^-$ ) et d'autres composés, tels que les acides aminés, l'urée, la biotine et les bases puriques et pyrimidiques, comme source d'azote (Bouix et Leveau, 1991 ; Berber, 2017).

### 1 – 3 – 3 - Minéraux, oligoéléments et vitamines

Les minéraux sont des éléments indispensables aux levures. Ils agissent en complément des protéines comme activateurs ou stabilisateurs d'enzymes et peuvent stimuler la croissance. Parmi les métaux alcalins indispensables on trouve les cations monovalents :  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Li}^+$ ,  $\text{Cs}^+$ ,  $\text{Rb}^+$ , ainsi que les cations bivalents :  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  et  $\text{Mn}^{2+}$  (Tableau 2).

**Tableau 2.** Importance de certains oligoéléments et vitamines pour la croissance des Levures (Walker, 2000 ; Lourens et Reid, 2002 ; Merabti, 2006).

Oligoélément et vitamines	Rôle joué
<b>Manganèse</b>	Synthèse de la thiamine et des protéines.
<b>Magnésium</b>	Stabilité et perméabilité des membranes. Protection de la cellule contre les facteurs négatifs, tel que le choc thermique et la toxicité de l'éthanol.
<b>Zinc</b>	Coenzymes pour certains enzymes. Contribution à la synthèse de la riboflavine et certaines protéines.
<b>Biotine</b>	Essentielle dans les réactions de carboxylation et de décarboxylation. Production des alcools et des esters.
<b>Thiamine</b>	Synthèse de l'isoleucine et de la valine.
<b>Acide pantothénique</b>	Synthèse de l'Acétyl-CoA. Production des acides gras et des acides aminés.

Les ions  $\text{Ca}^{2+}$  ont un rôle dans le fonctionnement des microfilaments, dans l'activité des enzymes et dans la maintenance de l'intégrité structurale des membranes (Leveau et Bouix, 1993 ; Leila Bennamoun, 2017). D'autres facteurs comme les vitamines (la biotine, la thiamine et l'inositol) peuvent être des éléments constitutifs de coenzymes variés ou des groupements prosthétiques d'enzymes essentiels à la croissance des levures (Tableau 2) (Kurtzman *et al.*, 2011 ; Bennamoun, 2017).

#### **1 - 4 - Conditions physicochimiques de croissance**

##### **1 - 4 - 1 - Oxygène**

Les levures sont des organismes essentiellement aérobies. Bien que la fermentation soit la caractéristique (fonction) la plus considérable pour *Saccharomyces* et beaucoup d'autre espèce, environ moitié de toute l'espèce de levure est aérobies strictement non fermentaire même les levures fermentaires sont facultativement anaérobies et dans des conditions aérobies ils commutent (changent) à la respiration conformément au règlement métabolique célèbre, l'effet de Pasteur (Deak, 2008 ; Ferhat et Laklouka, 2015).

##### **1 - 4 - 2 - Température**

La température optimale de culture des levures se situe en général entre 25 °C et 30 °C, mais comme les autres micro-organismes, les levures peuvent être classées en levures psychrophiles, mésophiles et thermophiles. D'une façon générale, les levures ne sont pas thermorésistantes. La destruction cellulaire commence dès 52 °C (contre 120 °C pour les bactéries thermophiles hors archées). Les levures sont aussi sensibles à la congélation et à la lyophilisation avec une grande variabilité selon les genres et espèces, et selon la phase de croissance (les cellules en phase exponentielle résistent moins que les cellules en phase stationnaire) (Djelti et Lassal, 2017).

##### **1 - 4 - 3 - pH**

Le pH a une influence sur le développement des levures qui ont généralement tendance à coloniser des environnements acides (leurs enveloppes cellulaires sont imperméables aux ions  $\text{H}_3\text{O}^+$  et  $\text{OH}^-$  et par leurs activités métaboliques (la respiration et la sécrétion d'acide organique) acidifiant encore plus le milieu. Les levures tolèrent une large gamme de pH allant de 2.4 à 8.6. Leur croissance optimale se fait à des pH allant de 4 à 6.5 et beaucoup d'espèces tolèrent de grandes variations de pH comme les levures du genre *Candida* qui se multiplient activement en milieu acide, de pH 2 à pH 6 mais peuvent survivre à pH 9. Les levures sont fortement inhibées

par les acides acétique, lactique citrique, l'acide ascorbique et propionique (**Bouix et Leveau, 1991 ; Bourgeois et Larpent, 1996 ; Aougeub 2018 ; Lahreche, 2018**).

#### 1 – 4 – 4 - Pression osmotique et activité d'eau

La plupart des souches ne peuvent se développer à des activités de l'eau inférieure à 0.90. Généralement, les levures résistent mieux que les bactéries à la pression osmotique, en accumulant des polyols comme osmoprotecteurs (bétaine, glycérol). Par conséquent, certaines espèces sont osmophiles mais avec un métabolisme lent. Ces levures sont dites xérotolérants (**Bourgeois et Larpent, 1996 ; Berber, 2017**).

#### 1 – 5 - Métabolisme de la levure

Les levures présentent une diversité métabolique dans la façon de production et de consommation de l'énergie à partir de substrats dégradés. Toutes les levures sont capables de dégrader le glucose, le fructose et le mannose en présence d'oxygène, par un métabolisme oxydatif conduisant à la formation de CO<sub>2</sub> et H<sub>2</sub>O (**Pol, 1996 ; Berber, 2017**). La voie de dégradation des glucides étant la glycolyse qui convertit les sucres en pyruvate. En se référant au catabolisme du pyruvate formé à partir du glucose, on peut distinguer deux types de métabolisme (**Larpent, 1991**).

##### 1 – 5 – 1 - Métabolisme oxydatif

Les levures utilisant les sucres simples en présence d'oxygène, par conséquent, leurs métabolismes est exclusivement respiratoire et le pyruvate est oxydé par le cycle de Krebs. Au cours du métabolisme oxydatif, une partie du glucose métabolisé génère des intermédiaires pour l'élaboration de nouvelles cellules, en consommant l'énergie fournit par la chaîne respiratoire. En plus des sucres simples, certaines levures utilisent d'autres glucides (mono, di ou tri saccharides et des polysaccharides comme l'amidon), mais aussi des alcools, des acides et des alcanes (**Marlène, 2006**). Dans ce cas l'oxydation du sucre est complète et le bilan énergétique théorique de cette voie métabolique est décrit par l'équation suivante :



##### 1 – 5 – 2 – Métabolisme fermentaire

En anaérobiose, les levures sont capable de fermenter le glucose en éthanol, en dioxyde de carbone, avec coproduction de glycérol, de certains acides et esters (**Leyral et vierlin, 2007 ; Lai, 2010**). Dans ce métabolisme, la fonction d'accepteur final d'électrons est assurée par des molécules organiques ou la levure utilise d'abord le NAD comme accepteur intermédiaire d'électrons qui est réduit en NADH. la réduction finale de l'acétaldéhyde en éthanol et en dioxyde de carbone permet ainsi de maintenir l'équilibre de la balance redox en réoxydant les NADH

produit au cours de la glycolyse, voie principale de dégradation du sucre en pyruvate. Le bilan énergétique de cette transformation est décrit par l'équation qui suit (Rezki, 2014) :



### 1 – 6 – Classification des levures

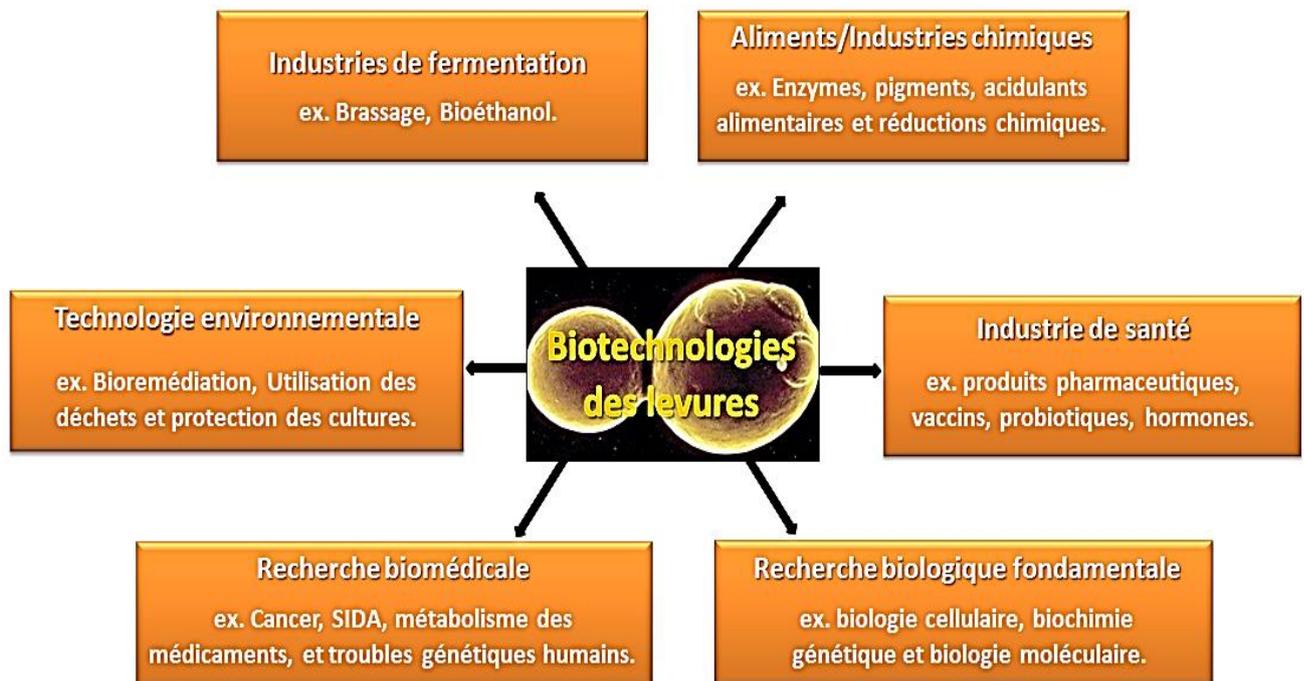
La classification des levures est naturellement une partie intégrante de celle des champignons. Elle est basée au moins au départ sur des caractères morphologiques mais fait intervenir de nombreux caractères biochimiques (Guiraud, 2003 ; Berber, 2017).

La classification de référence est actuellement celle de Kreger-Van, (1984) qui présente des changements sensibles par rapport à la précédente classification de Lodder, (1971). En particulier, de nouveaux critères taxonomiques sont pris en considération pour permettre des études plus rigoureuses. Il s'agit d'un groupe hétérogène, qui d'un point de vue taxonomique, comprend une soixantaine de genres et près de 500 espèces (Kreger-Van, 1984 ; Djelti et Lassal, 2017). Les levures se divisent en 3 grandes classes :

- \_ **Les Ascomycètes** : se reproduisent par un processus sexué dans un asque résultant de la transformation d'une cellule après méiose.
- \_ **Les Basidiomycètes** : réalisent une reproduction sexuée avec formation de basidiospores sur une baside.
- \_ **Les Deutéromycètes** : regroupent l'ensemble des levures ne présentant pas de mode connu de reproduction sexuée, ne se multipliant que par reproduction végétative (Benaouida, 2008 ; Ferhat et Laklouka, 2015).

## 2 – Biotechnologies des levures

Les levures possèdent une grande activité métaboliques et sont donc très utilisées dans les domaines agricoles et alimentaires,...etc. (Figure 5). Par leur métabolisme diversifié, les levures occupent une place essentielle dans l'industrie alimentaire. Elles participent à l'élaboration de nombreux produits alimentaires (panification, fromagerie, brasserie, etc.) et dans la production des enzymes (invertase, lactase, lipase, amylase, etc.), du glycérol ainsi que certaines vitamines et solvants, mais aussi à la revalorisation des déchets agricoles et industriels (**Rezki-Bekki, 2014**).



**Figure 5.** Applications biotechnologiques des levures (**Gut et al., 2018**).

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

### 2 – 1 - Production de boissons alcoolisées

Le rôle, le plus ancien des levures est la fabrication de boissons alcoolisées (bière, vin, cidre). Cette fabrication repose sur la fermentation alcoolique, qui consiste à transformer les sucres simples en alcool. Ainsi, elles interviennent au cours de la vinification et de l'élaboration de la bière. L'espèce la plus utilisée par l'homme est *S. cerevisiae*, appelée aussi « levure de bière » pour son innocuité (**Ferhat et Laklouka, 2015**).

## 2 – 2 - Panification

La levure de boulangerie est caractérisée par le fait qu'elle est composée de cellules vivantes de l'espèce *S. cerevisiae*. Le pain traditionnel correspond au produit résultant de la cuisson dans un four d'une pâte pétrie et composée uniquement de farines panifiables, en mélange ou non d'eau potable et de sel de cuisine. Cette pâte est fermentée par des agents de fermentation autorisés, employés simultanément ou non: levure de panification, levain. On ajoute éventuellement des additifs ou adjuvants dont l'emploi est limité et autorisé (Belmaziz et Djalal, 2017).

**Tableau 3.** Levures pour applications boulangères différentes (Belmaziz et Djalal, 2017).

Application	Genre	Espèce
Multiusage	<i>Saccharomyces</i>	<i>S. cerevisiae</i>
Pâtes très sucrées	<i>Saccharomyces</i> <i>Saccharomyces</i>	<i>S. Rosei</i> <i>S. Rouxii</i>
Renforcement flaveur	<i>Saccharomyces</i> <i>Candida</i>	<i>S. delbrukii</i> <i>C. Lusitania</i>
Starters Levin	<i>Saccharomyces</i> <i>Torulopsis</i> <i>Candida</i>	<i>S. exigus</i> <i>T. holmii</i> <i>C. milleri</i>

## 2 – 3 - Affinage des fromages

Les levures ont la capacité d'utiliser les acides organiques comme source d'énergie et de carbone (Aougueb et Lahreche, 2018). Les fromages affinés en moule se divisent en deux types principaux: les fromages affinés en surface (tels que le camembert et le brie, affinés généralement par *Penicillium camemberti*, formant une croûte blanche et veloutée) et les fromages affinés en moule interne (ou fromages à pâte persillée, affinés par *Penicillium roqueforti*, comme Danablu, Roquefort, Stilton et Gorgonzola). Fondamentalement, la fabrication et la maturation des fromages affinés par la moisissure font intervenir les bactéries lactiques, en plus des levures et des moisissures. Le biote fongique est notamment impliqué dans la consommation d'acide lactique produit par les bactéries lactiques, l'élévation du pH, ainsi que dans la protéolyse et la lipolyse, processus fondamentaux de la maturation. Le type et la concentration d'acides, d'alcools primaires et secondaires, de composés carbonylés, d'esters et d'hydrocarbures déterminent l'arôme/la saveur particuliers de ces fromages. Les interactions entre les microorganismes et leurs facteurs environnementaux et entre les microorganismes eux-mêmes jouent un rôle déterminant dans le contrôle des propriétés d'affinage et de détection des fromages (Venturini Copetti, 2019)

## 2 – 4 - Production de produits carnés

A la surface des boyaux de viande fermentée (saucisses) se développent de petits points blancs, la fleur, composée de cristaux de sel, de microcoques et de levures dont les plus représentatives sont *Candida deformans*, *C. zeylanoïdes*, *Debaryomyces hansenii*, *Rhodotorula rubra*, etc. (Belmaziz et Djalal, 2017), produisent de nombreuses enzymes lipolytiques et protéolytiques impliquées dans le développement d'arômes spécifiques dans les viandes sèches. *D. hansenii* est l'une des levures prédominantes dans les produits carnés (Copetti, 2019).

## 2 – 5 - Production des enzymes

Les enzymes sont des molécules catalyseurs très importantes utilisées dans plusieurs industries comme les industries alimentaires, pharmaceutiques, cosmétiques et de textiles.

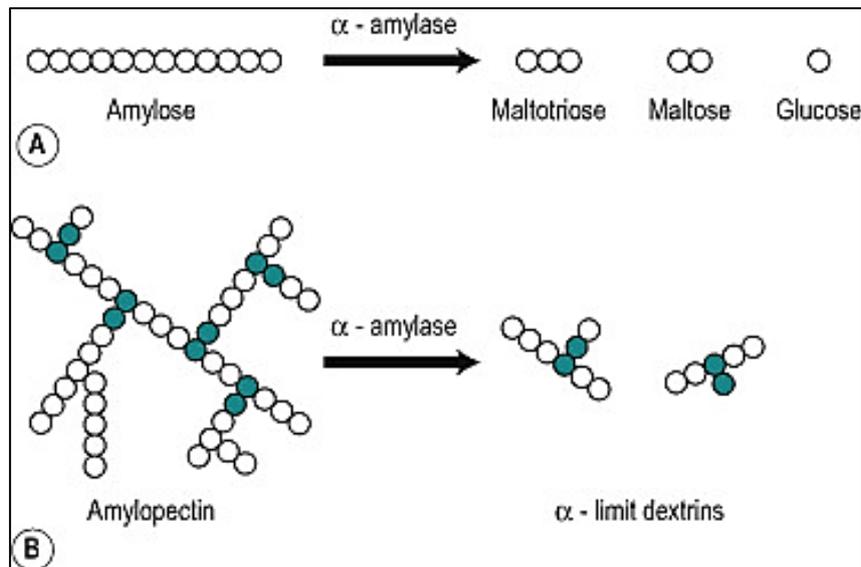
Certaines levures ont été développées pour produire des protéines hétérologues, notamment *Kluyveromyces pastoris*, *K. lactis*, *S. cerevisiae*, *Blastobotrys adenivorans*, *Ogataea polymorphon*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Yarrowia lipolytica*, *Pseudozyma* spp. Les levures sont des hôtes souhaitables des enzymes à usage alimentaire en raison de l'absence de production de métabolites secondaires toxiques (Olempska-Beer et al., 2006).

### 2 – 5 – 1 - Alpha-amylases ( $\alpha$ -amylases)

Les  $\alpha$ -amylases (E.C.3.2.1.1 : 1,4- $\alpha$ -D-glucan glucanohydrolases) catalysent l'hydrolyse des liaisons  $\alpha$ -1,4 glycosidiques des polymères d' $\alpha$ -D-glucose (amidon, glycogène, amylose, amylopectine, et d'autres polysaccharides apparentés) (Figure 6) (Biomnis, 2011 ; Dongyou, 2015 ; Meshram et al., 2019).

Au niveau industriel, les  $\alpha$ -amylases sont parmi les enzymes les plus importantes occupant approximativement 25% du marché mondial des enzymes (Dongyou, 2015). Elles trouvent des applications à grande échelle dans l'industrie alimentaire (Industrie de panification et de biscuiterie, glucoiserie, sucrerie, etc.), textile, pharmaceutique, du papier, des détergents, etc. (Christopher et Kumbalwar, 2015 ; Kumar et al., 2016 ; Meshram et al., 2019).

Les  $\alpha$ -amylases halophiles peuvent être particulièrement résistantes aux solvants organiques car elles fonctionnent dans des conditions où l'activité de l'eau est faible. L'activité et la stabilité de ces enzymes sont maintenues dans divers solvants organiques tels que le n-décane, le n-nonane, le n-octane, le xylène, le styrène, le toluène, le benzène et le chloroforme. Cependant, l'activité est perdue en présence des solvants hydrophiles (Kumar et al., 2016).



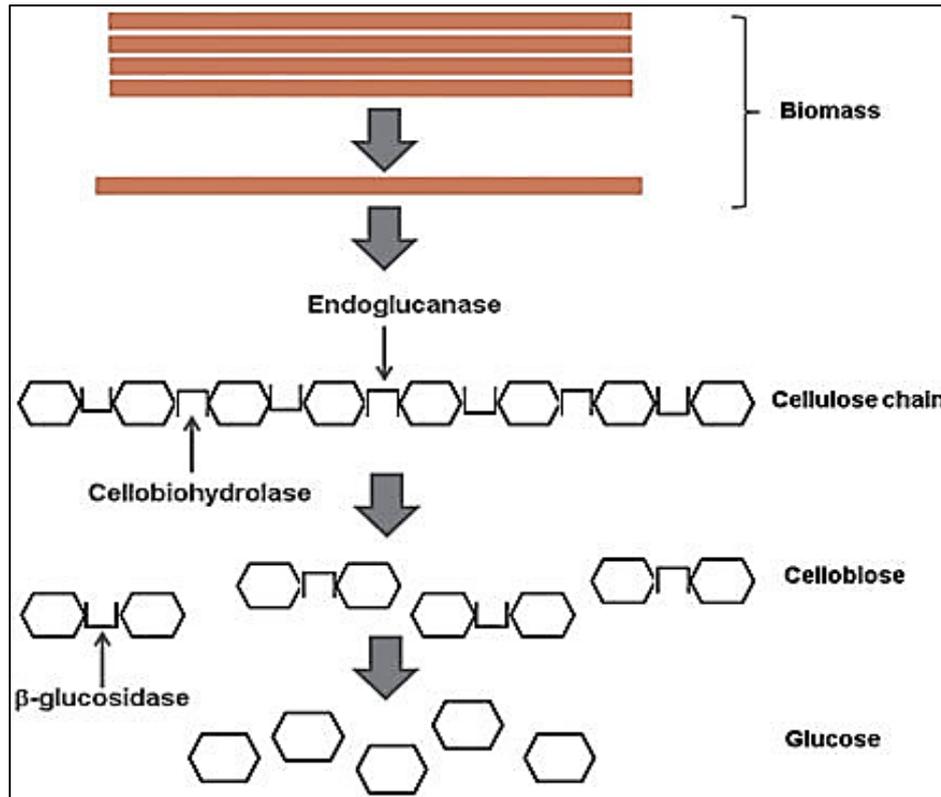
**Figure 6.** Dégradation de l'amylose (A), et de l'amylopectine (B) par les  $\alpha$ -amylases. Les cercles colorés indiquent les unités glucose liées en ( $\alpha$ -1,6) (Dongyou, 2015).

Une  $\alpha$ -amylase thermostable avec une activité optimale à 55°C conserve une activité de 44% entre 90-100°C. Cette  $\alpha$ -amylase est active à des concentrations allant de 0.5 à 3 M en NaCl et son activité à faible teneur en sel pourrait être bénéfique pour des applications industrielles (Benhamouche et Messadi, 2017 ; Singh et Singh, 2017).

### 2 – 5 – 2 - Cellulases

Les cellulases sont des enzymes qui hydrolysent les liaisons  $\beta$ -1,4 D-glucosidiques dans la cellulose (ShaoMin et Guang, 2013). Dans la nature, l'hydrolyse complète de la cellulose en glucose nécessite l'action synergique de trois types principaux de cellulase : les endoglucanases (E.C 3.2.1.4), les exocellulases ou cellobiohydrolases (CBHs) (E.C 3.2.1.91) et les  $\beta$ -glucosidases (E.C 3.2.1.21) (Figure 7) (Zhang et Zhang, 2013).

Des microorganismes, principalement les bactéries, les moisissures et certaines levures sont capables de produire des carboxyméthylcellulases (CMC) et des  $\beta$ -glucosidases. Aussi, des souches appartenant aux genres *Trichosporum*, *Cryptococcus*, *Candida*, *Debaryomyces* et *Kluyveromyces* ont été constitutivement décrites comme productrices de cellulases et des  $\beta$ -glucosidases, lorsqu'elles sont cultivées sur milieux contenant des substrats inducteurs (Giese et al., 2017).



**Figure 7.** Hydrolyse de la cellulose par les trois types d'enzymes : l'endoglucanase coupe aléatoirement les chaînes de cellulose au niveau des zones amorphes générant de nouvelles extrémités de chaînes. La cellobiohydrolase agit sur les extrémités libres des chaînes de cellulose libérant du cellobiose. La  $\beta$ -glucosidase hydrolyse le cellobiose en glucose (**Gomez del Pulgar et Saadeddin, 2013**).

Les cellulases d'origine microbienne présentent des potentiels d'applications dans différentes industries y compris l'industrie du papier, textile, production du bioéthanol, du vin, d'huile d'olive, des détergents, de biocarburants, brasseries, et dans la gestion des déchets (**Arevalo-Villena et al., 2017 ; Touijer et al., 2019**).

De nos jours, les cellulase d'origine levurienne gagnent plus d'intérêt, du fait qu'elles sont actives sur une large gamme de pH et à des températures élevées. En effet, les levures peuvent produire des cellulases thermostables qui ne sont pas dénaturées à des températures supérieures ou égale à 70°C. Elles trouvent par conséquent, des utilisations dans le processus de saccharification de la lignocellulose en sucres fermentescibles pour la production du bioéthanol (**Touijer et al., 2019**).

### 2 – 5 – 3 - Protéases

Les protéases constituent l'un des plus importants groupes des enzymes industrielles et elles représentent environ 60% du marché total des enzymes. Elles différentes applications dans les industries alimentaires, pharmaceutique et des détergents, avec une large gamme d'utilisations.

L'utilisation de protéases dans l'industrie alimentaire remonte à l'Antiquité. Ils ont été régulièrement utilisés à plusieurs fins, telles que la fabrication des fromages, la préparation d'hydrolysats de soja, l'attendrissage de la viande, et pour modifier les propriétés du gluten de blé en limitant la protéolyse et en améliorant l'extensibilité et la résistance de la pâte (**Arevalo-Villena et al., 2017**).

Les protéases végétales sont utilisées dans la science alimentaire, la fabrication de médicaments et la fabrication de détergents depuis plusieurs années, mais en raison de leurs coûts de production plus élevés, leur production diminue par rapport à celles d'origine microbienne. Ces dernières, sont produites par une grande diversité de bactéries et des moisissures (**Guendouz et Belibel, 2014 ; (Feijoo-Siota et Villa, 2011 ; Meshram et al., 2019 )**).

Certaines levures produisent aussi des enzymes protéolytiques, il s'agit essentiellement des genres *Candida*, *Debaryomyces*, *Rhodotorula* et *Saccharomyces* ; ce dernier peut produire trois types de protéases ; une aspartylprotéase, une sérine protéase et une métalloprotéase. L'activité protéolytique de ces genres est utilisée particulièrement pour l'affinage des fromages (**Guendouz et Belibel, 2014**).

#### **2 – 5 – 4 - Lipases**

Les lipases sont des triacylglycerol-acylhydrolases (EC 3.1.1.3), d'origine animale, végétale ou microbienne. Ce sont des enzymes qui effectuent une large gamme de réaction de biotransformation, telles que l'hydrolyse, l'inter-estérification, l'estérification, l'alcoolyse, l'acidolyse et l'aminolyse. L'utilisation la plus importante dans les industries alimentaires concerne le développement d'agents aromatisants dans les produits laitiers (lait, fromage et beurre), dans les boissons alcoolisées telles que le saké ou le vin, ainsi que dans les industries de la viande et du poisson. Une autre application des lipases est la modification des matières grasses pour l'amélioration de la qualité et la durée de conservation (vinaigrettes et produits de boulangerie) et pour l'obtention d'aliments plus sains (processus de transe-estérification dans les huiles, le beurre de cacao, la margarine, etc.) (**Arevalo-Villena et al., 2017**).

Les lipases qui sont stables dans des conditions extrêmes peuvent trouver des applications dans la production de biocarburants, les industries textiles, des détergents et dans le traitement des eaux usées (**Schreck et Grunden, 2014 ; Singh et Singh, 2017**).

Les lipases sont largement ré pondues chez les bactéries, les actinomycètes, moisissures et levures) sécrètent des lipases dans le milieu de culture. Elles sont également largement répandues chez les levures du genre *Candida* ou *Geotrichum* (Tighzet, 2012). La majorité des lipases secrétées par les levures sont des monoglycoprotéines extracellulaires avec une masse moléculaire entre 33 et 65 kDa. Certaines levures produisent un mélange de lipases extracellulaires (Najjar, 2010).

Les lipases microbiennes présentent plus d'avantages par rapport aux lipases d'origine animale et d'autre part, du fait qu'elles ont une plus grande stabilité vis-à-vis de la température, des détergents et des enzymes protéolytiques (Tighzet, 2012).

Parmi les lipases commerciales, celles de *Candida antarctica*, *Thermomyces lanuginosus* (*Humicola lanuginosa*), *Geotrichum candidum*, and *Candida rugosa* sont les plus utilisées en biotechnologie (Najjar, 2010).

### 2 – 5 – 5 - Pectinases

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

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

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

- Les dépolymérase, les estérase (polygalacturonases) agissent au niveau des zones lisses des pectines (Combo *et al.*, 2011).

- Les rhamnogalacturonases, les arabinanases, les galactanases et parfois les férulatestérases interviennent au niveau des zones hérissées (**Voragen et al., 2013**).

Les polygalacturonases (Pgases) classés en deux endopolygalacturonase (EC 3.2.1.15) ou exopolygalacturonase (EC 3.2.1.67) hydrolysent de façon aléatoire les liaisons  $\alpha$ -D 1,4 de l'acide galacturonique dans les régions lisses de la pectine (**Parenicova et al., 2000 ; Torres et al., 2013**) et sont d'une importance particulière par leur implication dans la biodégradation aisée des liaisons glycosidiques internes et externes présentes dans la pectine, ce qui réduit sa taille moléculaire et diminue ainsi la viscosité et le rendement industriel du produit fini (**Torres et al., 2013**).

Différentes espèces de levures productrices de polygalacturonases sont utilisées industriellement pour améliorer la qualité des jus de fruits, telles que : *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Candida*, *Cryptococcus* et *Geotrichum* sont citées par plusieurs auteurs (**Merín María Gabriela et al., 2015 ; Naumov et al., 2016 ; Pagani et al., 2016 ; Belda et al., 2016 ; Moubasher et al., 2016**).

#### 2 – 5 – 6 - Xylanases

Les xylanases jouent un rôle central dans la dégradation du xylane. Elles sont largement utilisées dans l'industrie boulangère pour améliorer les propriétés de la pâte et dans le bioblanchiment du papier. Cependant une application efficace des xylanases dans le bioblanchiment exige qu'elles soient alcaliphiles et thermotolérantes (**Aiadi et Touati, 2018**).

#### 2 – 5 – 7 - Invertases

L'invertase (EC 3.2.1.26) est une enzyme qui se produit à l'intérieur et à l'extérieur de la cellule. Elle est produite par une fermentation aérobie contrôlée submergée d'une souche de *S. cerevisiae* non toxigène et non pathogène. L'enzyme est extraite après lavage et autolyse (**Uma et al., 2010**). Les noms alternatifs pour l'invertase comprennent la saccharase, la glucosaccharase, la bêta-fructosidase, la bêta-h-fructosidase, la sucrase, l'invertin, la fructosylinvertase, le maxinvert L 1000, l'invertase acide et l'invertase alcaline. Le nom systématique est la bêta-fructofuranosidase. L'enzyme a une large gamme d'applications industrielles, telles que la production de confiseries à contenu liquide, comme dans le cas de certaines gommages à mâcher. Elle facilite également la formation d'éthanol à partir de mélasse de canne. Cependant, l'utilisation de l'invertase est très limitée car une autre enzyme, la glucose isomérase, peut contribuer à la conversion du glucose en fructose à un coût inférieur (**Uma et al., 2010**). Pour des raisons de goût et de santé, l'industrie alimentaire requiert une invertase hautement purifiée. Il est également utilisé dans la préparation de comprimés d'aide à la digestion, de chocolats, de préparations pour nourrissons, dans l'assimilation de vins enrichis, etc. (**Meshram, 2019**).

### 2 – 5 – 8 - Inulinases

Les inulinases catalysent l'hydrolyse de l'inuline en fructose et en glucose; ensuite, ces molécules peuvent être utilisées comme sources de carbone pour produire de nombreux produits utiles appartenant à la famille des fructo-oligosaccharides (FOS). Les FOS sont en train de devenir des ingrédients importants dans les industries alimentaire et pharmaceutique. Les fructo-oligosaccharides ont de bonnes propriétés fonctionnelles et nutritionnelles telles que l'aide au régime hypocalorique, ils constituent une source de fibres alimentaires lors de la préparation des aliments (**Vela Sebastiao *et al.*, 2013**). Toutefois, le fructose est un édulcorant GRAS qui améliore la saveur, la couleur et la stabilité du produit. Il est considéré comme un édulcorant de remplacement sans danger pour le saccharose, car il a des effets bénéfiques chez les patients diabétiques, augmente l'absorption du fer chez les enfants et a un pouvoir sucrant plus élevé (**Arevalo-Villena *et al.*, 2017**).

### 2 – 5 – 9 - Laccases

Les laccases catalysent la réduction de l'oxygène en eau. Elles sont aussi parfois appelées «catalyseurs verts» car au cours de la réaction, l'oxygène de l'air est consommé. L'eau est le seul sous-produit et aucun produit secondaire toxique n'est formé (**Riva 2006**).

Dans l'industrie alimentaire, elles sont utilisées pour l'élimination sélective des dérivés du phénol afin de stabiliser les boissons, telles que la bière, le vin et les jus de fruits. Une nouvelle application potentiellement importante des laccases concerne l'oxydation des polysaccharides végétaux, qui sont de plus en plus utilisés dans un nombre croissant de domaines industriels pour générer des groupes réactifs (comme le carbonyle ou carboxyle) sur la cellulose, l'amidon et le pullulan (**Arevalo-Villena *et al.*, 2017**).

### 2 – 5 – 10 - Lactases

Les  $\beta$ -galactosidases (Lactases) trouvent de nombreuses applications dans de nombreuses industries, en particulier dans le pré-traitement du lait afin d'abaisser la teneur en lactose pour les consommateurs intolérants au lactose. Cependant, d'autres applications industrielles des lactases peuvent également être également trouvées dans divers domaines, par exemple, pour obtenir des produits plus sucrés (en hydrolysant le lactose en glucose et en galactose) afin d'obtenir des sirops tels que le glucose ou le maïs. Elles sont également utilisées dans les produits laitiers congelés, car elles empêchent la cristallisation du lait améliorant ainsi la texture (**Panesar *et al.*, 2010 ; Arevalo-Villena *et al.*, 2017**).

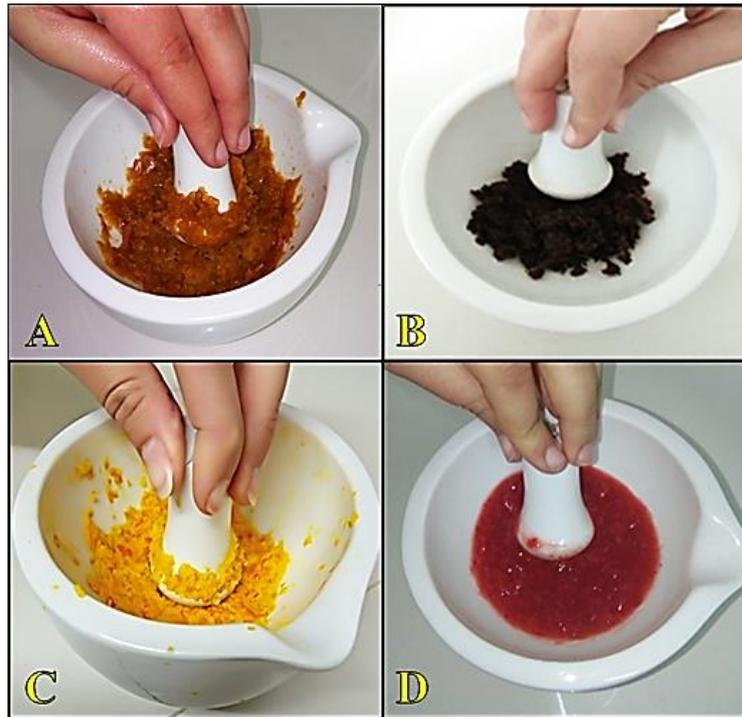
**2 – 5 – 11 - Rhamnosidases**

Cette enzyme est utilisée pour hydrolyser des composés naturels, par exemple la naringine, la rutine, l'hespéridine, le terpényl-glycoside et d'autres glycosides naturels. Cela peut renforcer les arômes de jus de raisin et de vin grâce à l'hydrolyse enzymatique des terpényl-glycosides et peut éliminer les cristaux d'hespéridine du jus d'orange. L'enzyme peut également être utilisée pour produire des produits de stevia naturels plus sucrés avec un arrière-goût moins amer (**Arevalo-Villena *et al.*, 2017**).

### 1 – Echantillonnage

Quatre échantillons d'oranges, de pommes, de fraises et de betterave, achetés à partir de marchés locaux à Constantine (Nord-Est algérien), sont utilisés pour l'isolement des levures.

Une quantité de 1kg de chacun des différents échantillons est rincée avec l'eau distillée. Les pelures des pommes, des oranges et des betteraves, et les fraises entières sont ensuite écrasées à l'aide d'un mortier et un pilon jusqu'à l'obtention d'une mouture homogène (Figure8).



**Figure 8.** Préparation des échantillons pour l'isolement des levures : (A) Pelures de pommes; (B) Pelures de betteraves ; (C) Pelures d'oranges; (D) Fraises entières.

### 2 – Isolement des levures

Une quantité de 10 g de chaque échantillon est pesée puis introduite dans 90 ml d'eau distillée stérile (solution mère). Les suspensions sont agitées pendant 20 min à l'aide d'un agitateur vortex. Une série de dilutions décimales ( $10^{-1}$  jusqu'à  $10^{-5}$ ) est ensuite préparée à partir de chaque solution mère. Un échantillon de 1 ml de chaque dilution est ensuite étalé à la surface du milieu YGCA (**Annexe 1**) (Figure9).

Les boîtes de Pétri sont incubées à 25°C pendant 5 jours. Les colonies bien isolées sont observées au microscope à l'objectif 100 X, pour vérifier la morphologie.

10 g de chaque échantillon biologique



Introduit dans 90 ml d'eau distillée stérile (Solution mère)

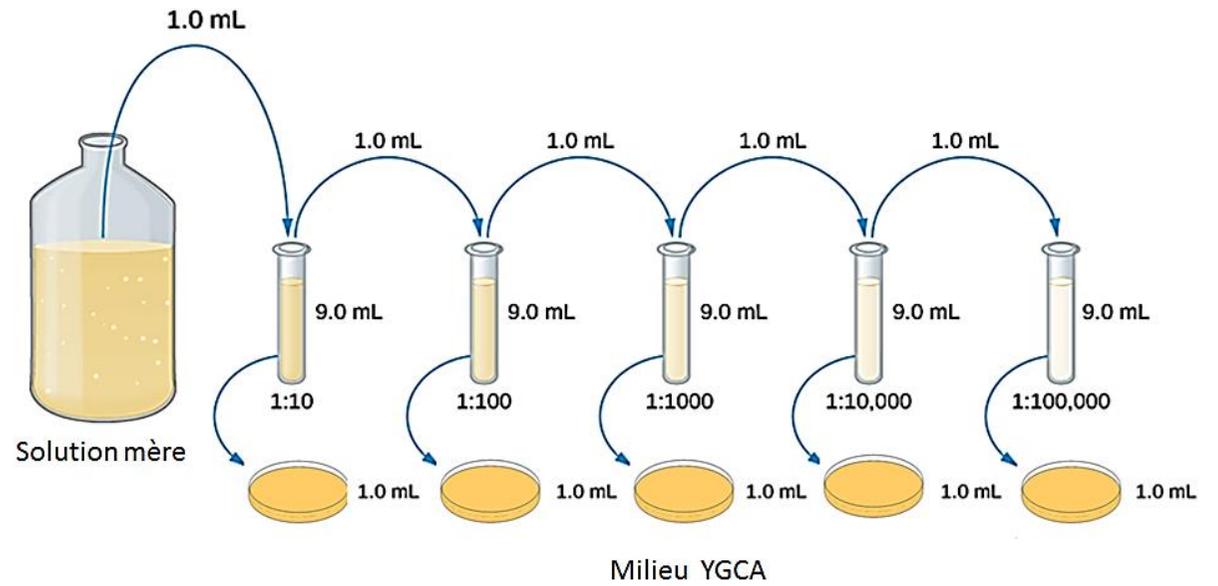


Figure 9. Isolement des levures à partir des échantillons biologiques.

### 3 - Purification et conservation des levures isolées

Après isolement, les isolats de levures sont purifiés par stries d'épuisement sur milieu YPGA (**Annexe 1**). L'incubation est réalisée à 25°C pendant 72 h. Les aspects macroscopiques et microscopiques sont ensuite examinés afin de vérifier la pureté de la souche. Les cultures pures sont conservées sur le même milieu en gélose inclinée puis stockée à 4°C.

### 4 - Screening des activités enzymatiques chez les souches isolées

L'ensemble des souches isolées sont testées pour leur capacité à produire les activités enzymatiques :  $\alpha$ -amylase, cellulase (CMCase), pectinase et protéase. Pour ce faire, un inoculum de 10  $\mu$ l de chaque suspension de levure isolée est déposé sur la surface des milieux gélosés adéquats. Après croissance des colonies, la production des activités enzymatiques étudiées est mise en évidence par l'observation de zones d'hydrolyse directement ou bien après l'utilisation des colorants spécifiques.

#### 4 – 1 – Mise en évidence de la production de l' $\alpha$ -amylase

La présence de l'activité amylolytique est déterminée qualitativement selon la méthode décrite par (**Amoozegar et al., 2003**), en utilisant le milieu « Amylase Activity Medium » (AAM) additionné de 0.5% d'amidon soluble (**Annexe 2**) (**Yalçın et Çorbacı, 2013**). Après 5 jours d'incubation à 25°C, les boîtes sont inondées avec une solution de lugol 1 (**Annexe 3**). L'apparition d'une zone claire autour de la colonie est considérée comme un résultat positif. A l'inverse, les zones contenant de l'amidon se colorent en brun. Ainsi, les isolats présentant des zones claires d'hydrolyse sont considérés comme producteurs d'  $\alpha$ -amylase.

#### 4 – 2 – Détermination de l'activité cellulolytique (CMCase)

Les souches sont testées sur un milieu « Cellulase Activity Medium » (CAM) (**Annexe 2**) (**Goldbeck et al., 2012**). Après croissance des cellules, les boîtes sont colorées avec une solution au Rouge de Congo (0.1%) (**Annexe 3**) pendant 30 minutes (permettant au colorant de se fixer). Cette solution est remplacée par une solution de NaCl 1M (**Annexe 3**) durant 15 minutes et laissées à température ambiante. L'apparition de zones claires (couleur jaune-orange) autour des colonies est un résultat positif indiquant la présence de CMCase (**Romano Mwirichia et al., 2010**).

L'apparition des plages de lyse décolorées (jaune-orange) indique la production de CMCase et donc la dégradation de la CMC (**Labani, 2008 ; Bennamoun, 2017**).

#### 4 – 3 - Mise en évidence de la production de la pectinase

La recherche de l'activité pectinolytique des isolats de levures est effectuée sur milieu « Pectinase Activity Medium » (PAM) (**Annexe 2**). Après 5 jours d'incubation à 25°C, les boîtes sont recouvertes par une solution lugol 2 (**Annexe 3**) et laissées à température ambiante pendant 20 minutes. L'apparition d'un halo clair autour de la colonie indique une dégradation de la pectine (**Bennamoun, 2017**).

#### 4 – 4 - Mise en évidence de la production de protéase

L'hydrolyse de la caséine a été étudiée sur un milieu « Skimmed Milk Agar » (SMA) (**Annexe 2**). Après 5 jours d'incubation à 25°C, la présence de l'activité protéolytique est détectée par l'apparition d'un halo clair autour de la colonie indiquant l'hydrolyse de la caséine, par contre un résultat négatif ne montre aucune zone d'hydrolyse autour de la colonie (**De VOS et al., 2009**).

#### 5 - Screening secondaire des activités enzymatiques étudiées

Le principe de ce screening est similaire au précédent. Néanmoins, des puits de 8 mm de diamètre sont creusés dans chacun des milieux gélosés AAM, CAM, PAM et SMA. Un inoculum de 100 µl de suspension de chaque souche active, est ensuite introduit dans les puits d'agar perforés. Les essais sont répétés deux fois. Après incubation à 25°C pendant 5 jours, les diamètres des zones d'hydrolyse sont mesurés.

L'utilisation de cette méthode, a permis de classer les souches productrices d'enzymes recherchées en deux groupes : des souches fortement productrices et faiblement productrices des enzymes recherchées. Elle considérée donc comme une évaluation semi-quantitative de l'activité enzymatique des souches de levures isolées.

### 1 - Isolement des souches de levures

Quatre échantillons, à savoir pelures de pommes, d'oranges, de betteraves et des fraise entières ont été sélectionnés comme sources naturelles pour l'isolement des levures.

Au total, 42 souches de levures ont été isolées sur milieu YGC Agar. Les résultats de l'isolement sont récapitulés dans le (Tableau 4).

**Tableau 4.** Résultats de l'isolement des souches de levures à partir des pelures de pommes, d'oranges, de betteraves et des fraises entières.

Origine des souches isolées	Dilutions	Code des isolats de levures
<b>Pelures de Pommes</b>	$10^{-1}$ (R')	A1
	$10^{-1}$ (R'')	A3 ; A4 ; A5
	$10^{-3}$ (R')	A6
	$10^{-4}$ (R')	A7 ; A8
<b>Pelures de Betteraves</b>	$10^{-1}$ (R')	B12
	$10^{-1}$ (R'')	B1 ; B2 ; B11
	$10^{-2}$ (R')	B3 ; B4 ; B5 ; B14
	$10^{-2}$ (R'')	B6 ; B15
	$10^{-3}$ (R')	B7 ; B16
	$10^{-4}$ (R'')	B8 ; B10
	$10^{-5}$ (R'')	B9
<b>Pelures d'Oranges</b>	$10^{-1}$ (R'') **	O1 ; O2 ; O3 ; O5 ; O7
	$10^{-1}$ (R')*	O4 ; O6
<b>Fraises entières</b>	$10^{-1}$ (R')	S6 ; S9
	$10^{-1}$ (R'')	S1 ; S11
	$10^{-2}$ (R')	S7 ; S13
	$10^{-2}$ (R'')	S2 ; S3
	$10^{-3}$ (R')	S8 ; S12
	$10^{-3}$ (R'')	S4
	$10^{-4}$ (R'')	S5 ; S10

(R')\*: 1<sup>ère</sup> répétition ; (R'') \*\*: 2<sup>ème</sup> répétition.

Les levures sont très largement répandues dans l'environnement. Ce sont des microorganismes eucaryotes généralement saprophytes et elles sont présentes dans des habitats terrestres, aquatiques et aériens.

En effet, les levures ont été isolées à partir de diverses sources naturelles telles que les fruits sucrés, les feuilles, les fleurs, les graines, les insectes, les exsudats d'arbres et le sol (Ali et Khan, 2013 ; Jangra *et al.*, 2018). Leurs habitats préférés sont les tissus végétaux, les fruits, les feuilles et les fleurs, les produits fermentés, le sol et l'eau salée (Ali et Khan, 2013).

Les fruits contiennent une forte concentration en sucres et les espèces des levures y sont donc naturellement présentes et peuvent être facilement isolées des fruits (Zahida *et al.*, 2014). Ainsi donc, la présence des différentes souches de levures dans les échantillons biologiques étudiés, pelures de pommes, d'oranges, de betteraves et des fraises entières n'était pas étonnante.

L'analyse des résultats obtenus montrent que les pelures de betteraves et les fraises entières renferment plus de souches de levures (37% et 30% respectivement) par rapport aux pelures d'oranges et de pommes (17% et 16% respectivement) (Figure 10). Ce résultat s'explique probablement par la différence de composition en éléments nutritionnels (teneur en sucres, minéraux, eau, etc.) entre les échantillons étudiés ainsi que les différentes exigences nutritionnelles des souches qui leur sont propres.

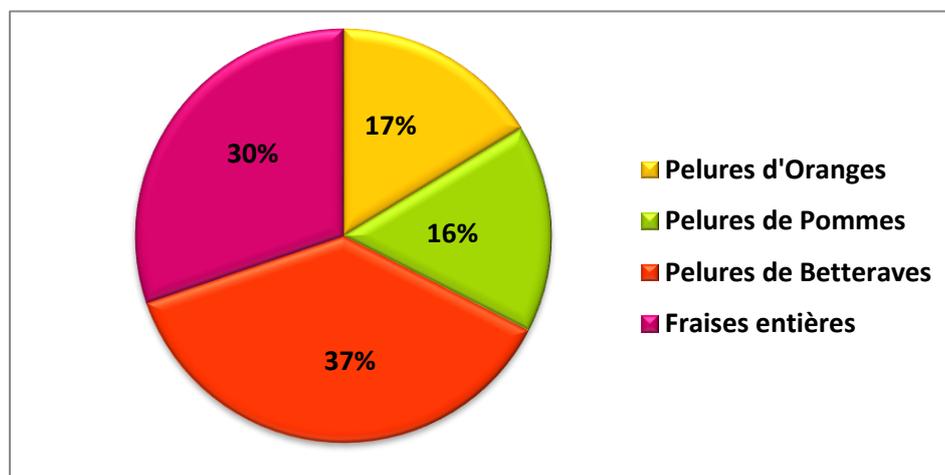


Figure 10. Répartition des souches de levures isolées en fonction de leur origine.

## 2 – Pré-identification des souches de levures isolées

Les cultures sont identifiées comme levures en se basant sur l'observation des caractères morphologiques (macroscopique et microscopique) des colonies isolées et la formation des bourgeons.

L'ensemble des levures isolées forment des colonies de couleur blanc-crème à beige claire sur milieu YPG Agar. La forme des colonies est ronde avec marge régulière. Cependant, on note des différences d'aspects qui sont résumés dans le (Tableau 5) et représentés dans la Figure (11).

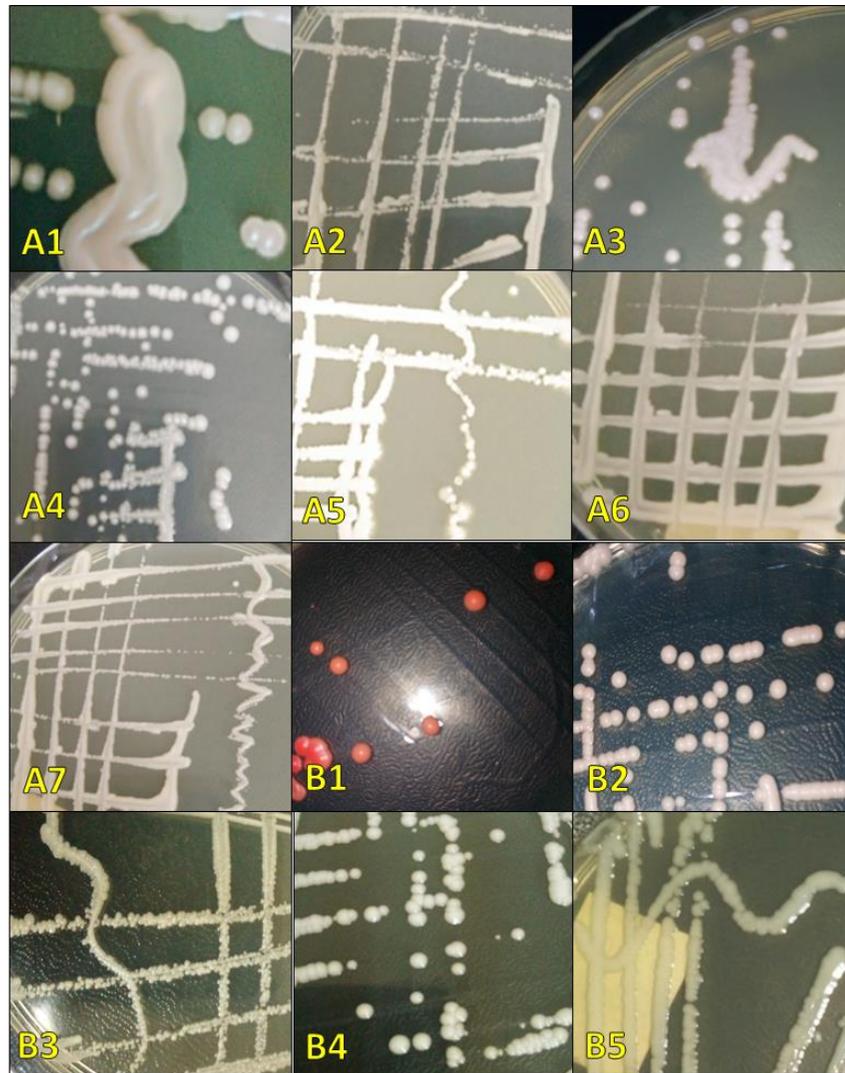
**Tableau 5.** Caractéristiques des colonies sur milieu YPG Agar après 3 jours d'incubation à 25°C.

Souches isolées	Couleur	Surface	Forme	Marge
<b>A1 ; A3 ; A5</b>	Beige rosée	Lisse, bossue	Circulaire	Filamenteuse
<b>A2 ; A4 ; A6 ; A7</b>	Crème	Lisse, brillante	Circulaire	Régulière
<b>B1</b>	Rouge rosée	Lisse, brillante et bombée	Circulaire	Régulière
<b>B2</b>	Beige rosé	Lisse, brillante et bombée	Circulaire	Régulière
<b>B3 ; B7</b>	Beige clair	Lisse	Circulaire et punctiforme	Régulière
<b>B4</b>	Blanc-crème	Lisse, brillante	Circulaire	Régulière
<b>B5 ; B6</b>	Beige clair	Lisse, brillante	Circulaire	Régulière
<b>B8 ; B9 ; B10</b>	Beige rosé	Mate et bombée	Circulaire	Régulière et/ou filamenteuse
<b>B11</b>	Beige	Lisse, bossue	Circulaire	Régulière
<b>B12 ; B13 ; B14 ; B15</b>	Blanche	Mate, sèche	Circulaire	Ondulée
<b>O1 ; O4</b>	Blanc-crème	Lisse, brillante	Circulaire	Régulière
<b>O2</b>	Blanche	Lisse, brillante et bossue	Circulaire	Régulière
<b>O3 ; O6</b>	Beige clair	Lisse, brillante	Circulaire	Régulière
<b>O5</b>	Rouge rosée	Lisse, brillante	Circulaire	Régulière
<b>O7</b>	Beige clair	Lisse, brillante	Circulaire et punctiforme	Filamenteuse
<b>S1 ; S2 ; S4 ; S5 ; S11</b>	Crème	Lisse, brillante et convexe	Circulaire	Régulière
<b>S3 ; S6 ; S7 ; S8 ; S12</b>	Crème	Lisse, brillante et bossue	Circulaire	Régulière
<b>S9 ; S10 ; S13</b>	Beige	Lisse, brillante et muqueuse	Circulaire	Régulière

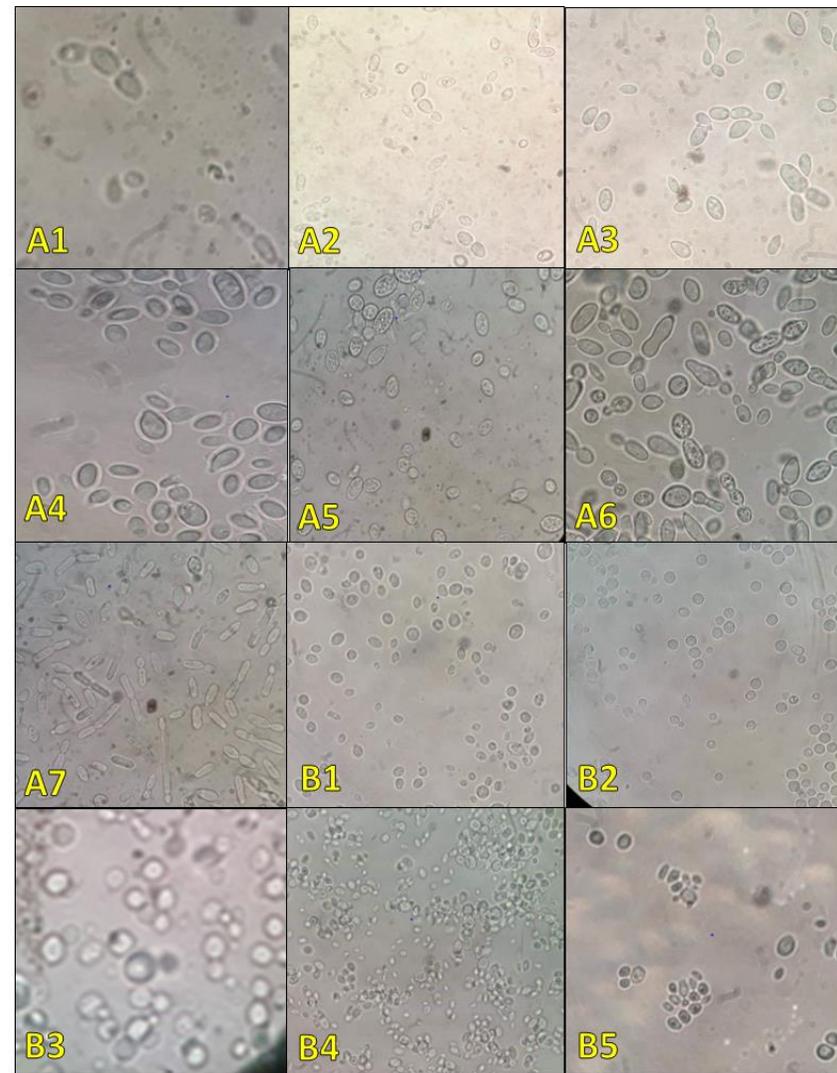
L'observation des colonies au microscope optique (grossissement x 100) montre que les cellules présentent différentes formes telles que la forme sphérique, ovale, et ellipsoïde (Tableau 6) et (Figure 11.II).

**Tableau 6.** Aspect microscopique (Grossissement x 100) des colonies sur milieu YPG Agar après 3 jours d'incubation à 25°C.

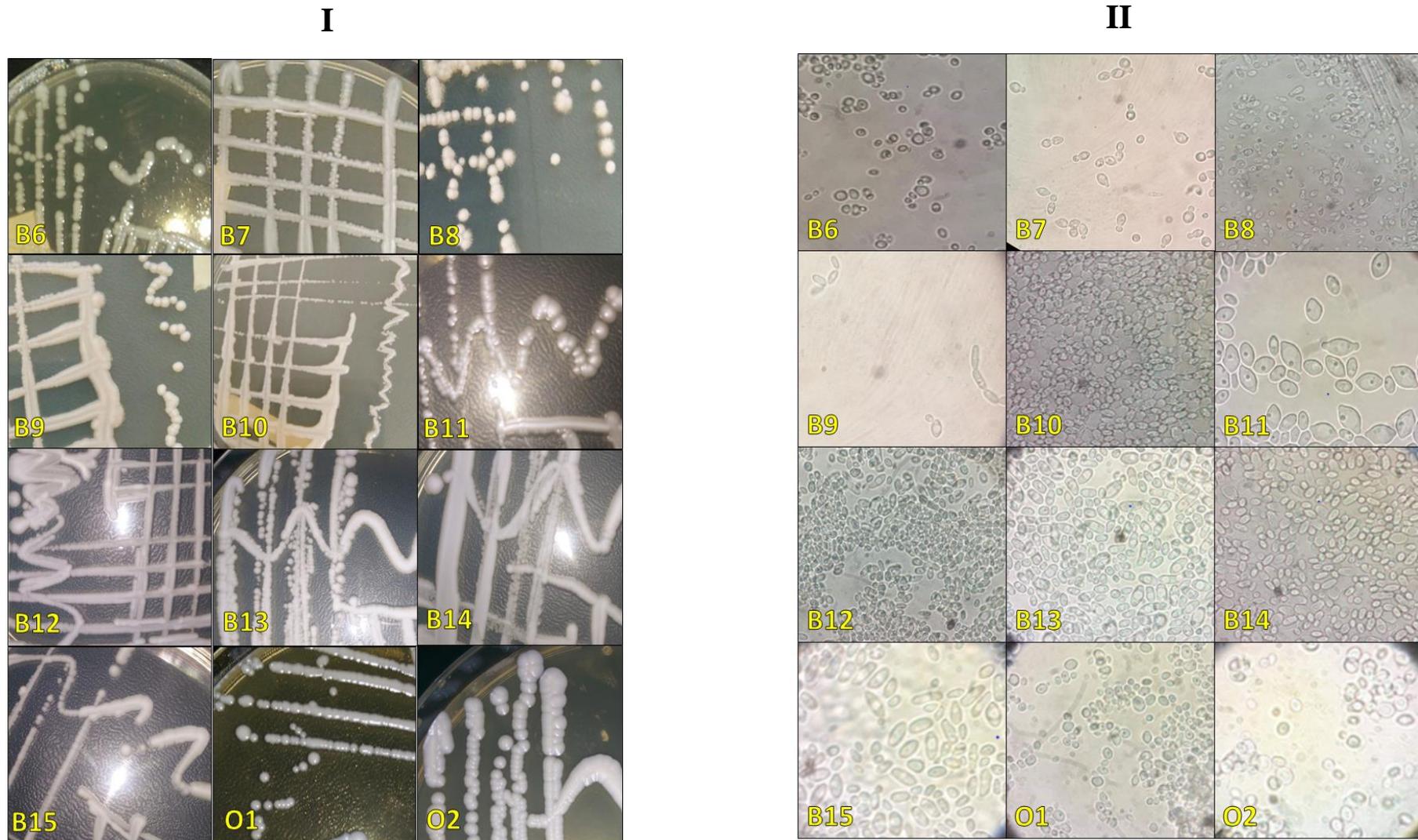
<b>Souches isolées</b>	<b>Aspect microscopique</b>
<b>A1 ; A2</b>	Cellules ovales Présence de bourgeonnement
<b>A3 ; A4 ; A5 ; A6</b>	Cellules cylindriques Présence de bourgeonnement
<b>A7</b>	Cellules allongées Présence de bourgeonnement
<b>B1 ; B2 ; B3 ; B4 ; B5 ; B6 ; B8 ; B10</b>	Cellules rondes à ovales Présence de bourgeonnement
<b>B7 ; B11</b>	Cellules en forme de citron Présence de bourgeonnement
<b>B9 ; B12 ; B13 ; B14 ; B15</b>	Cellules cylindriques Présence de bourgeonnement
<b>O1 ; O2 ; O3</b>	Cellules sphériques à ovales
<b>O4 ; O6</b>	Cellules ovales Présence de bourgeonnement
<b>O5</b>	Cellules cylindriques Présence de bourgeonnement
<b>O7</b>	Cellules ogivales Présence de bourgeonnement
<b>S1 ; S3 ; S5 ; S6 ; S7 ; S8 ; S11 ; S12</b>	Cellules ogivales Présence de bourgeonnement
<b>S2 ; S4 ; S9 ; S10 ; S13</b>	Cellules ovales Présence de bourgeonnement



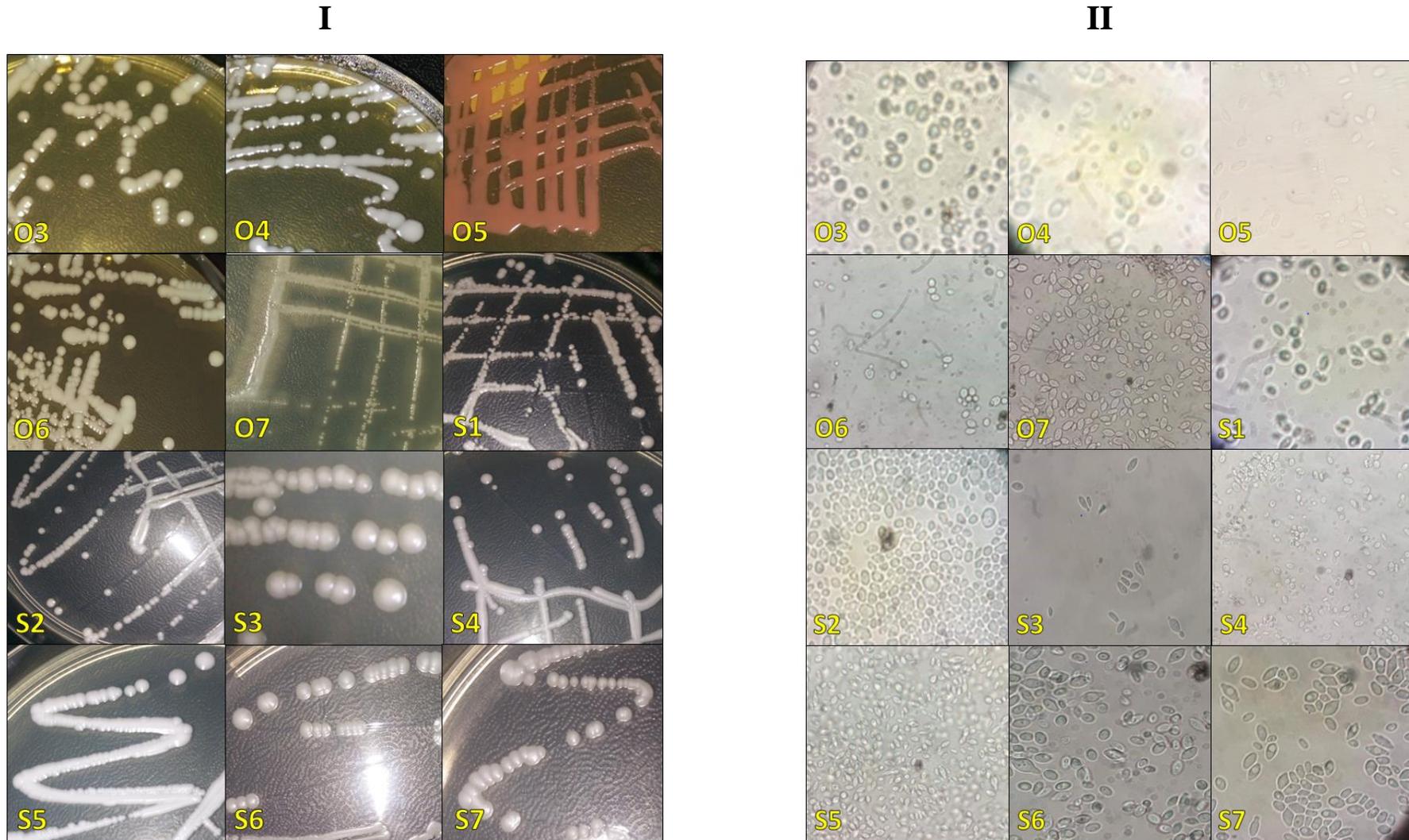
II



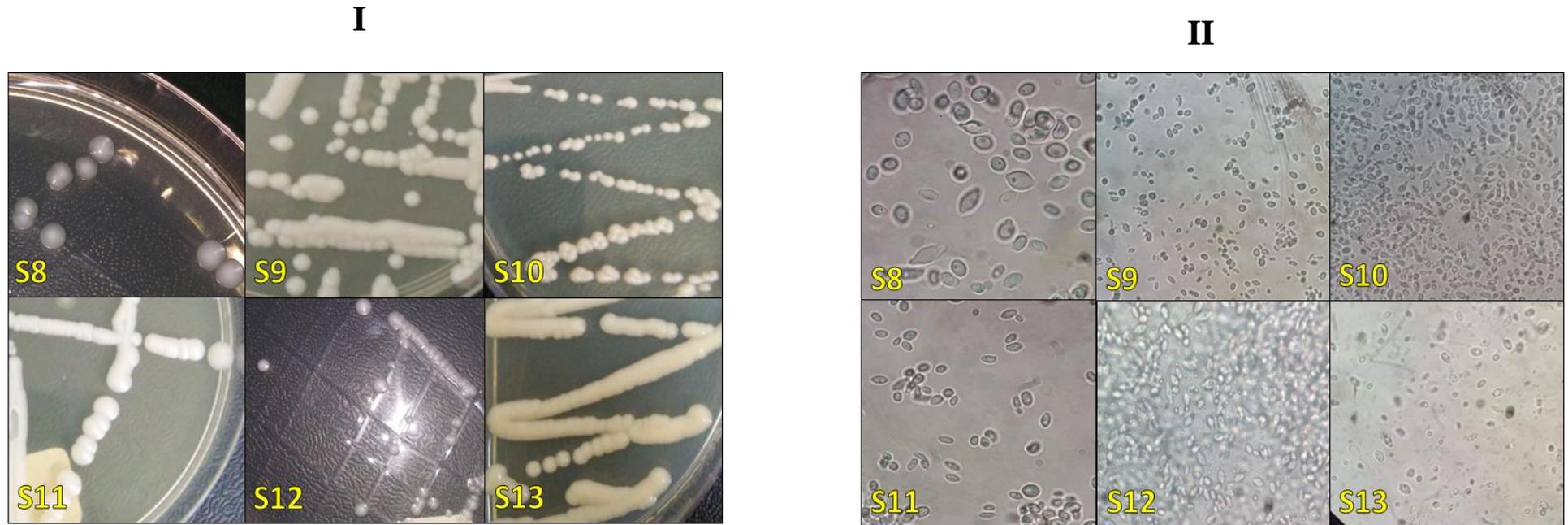
**Figure 11.** (I) Aspect macroscopique et (II) microscopique (Grossissement x 100) des colonies des levures isolées après 3 jours de culture à 25°C sur milieu YPG Agar.



**Figure 11.** (I) Aspect macroscopique et (II) microscopique (Grossissement x 100) des colonies des levures isolées après 3 jours de culture à 25°C sur milieu YPG Agar.



**Figure 11.** (I) Aspect macroscopique et (II) microscopique (Grossissement x 100) des colonies des levures isolées après 3 jours de culture à 25°C sur milieu YPG Agar.



**Figure 11.** (I) Aspect macroscopique et (II) microscopique (Grossissement x 100) des colonies des levures isolées après 3 jours de culture à 25°C sur milieu YPG Agar.

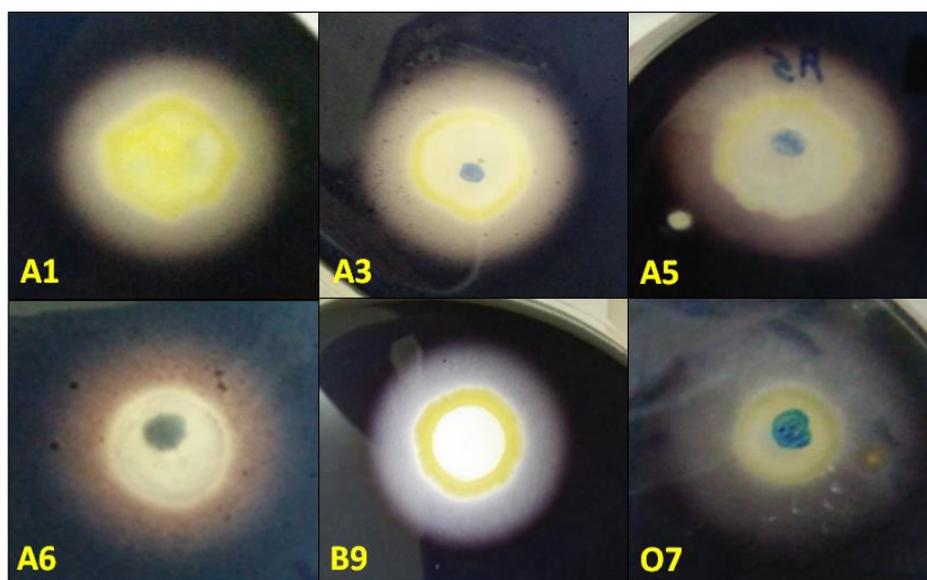
## 2 – Mise en évidence des activités enzymatiques chez les souches levuriennes isolées

Ainsi, les tests de la mise en évidence des différentes activités enzymatiques : amylolytique, cellulolytique, pectinolytique et protéolytique chez les souches de levures isolées révèlent qu'une douzaine d'isolats de levures testés ont montré au moins une activité enzymatique, tandis que les autres souches ne produisent aucune activité enzymatique (Figure 11).

Selon **Gana *et al.*, (2014)**, les microorganismes représentent une bonne source de biomolécules telles que les enzymes qui revêtent une grande importance commerciale et industrielle, ce qui a conduit à l'isolement de microorganismes importants du point de vue biotechnologique. Ajoutant à cela que les levures se sont révélées être de bonnes sources d'enzymes. De plus, **Banakar et Thippeswamy (2012)** ont rapporté que les microorganismes sont actuellement la principale source d'enzymes industrielles, dont 50% proviennent de champignons filamenteux et de levures.

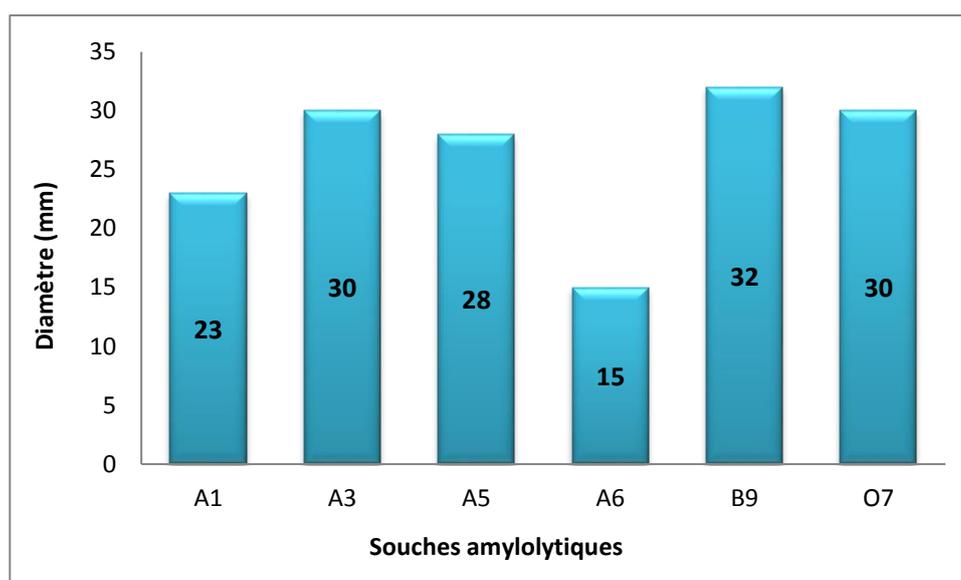
### 2 – 1 – Screening des souches productrices de l' $\alpha$ -amylase

Le résultat du test de la mise en évidence de l'activité  $\alpha$ -amylolytique chez l'ensemble des levures isolées a montré qu'après 5 jours d'incubation à 25°C sur milieu AAM un développement d'un halo clair est observé dans les boîtesensemencées avec les souches A1, A3, A5, A6, B9 et O7, avec un pourcentage de 14% (Figure 12). En revanche, aucune activité  $\alpha$ -amylolytique n'est détectée chez le reste des autres souches étudiées.



**Figure 12.** Mise en évidence de la production de l'  $\alpha$ -amylase chez les souches isolées : A1, A3, A5, A6, B9 et O7 après 5 jours d'incubation à 25°C sur milieu AAM.

Les résultats du screening des six souches productrices d'amylase extracellulaire en utilisant la méthode des puits sur milieu AAM ont montré que la zone d'hydrolyse d'amidon la plus intéressante est développée par la souche B9 avec un diamètre de 32 mm. Les souches A3, A5 et O7 ont également présenté des activités plus au moins importantes avec des diamètres qui se situent entre 28 mm et 30 mm. La plus faible zone d'hydrolyse est observée chez les souches A1 et A6 avec des diamètres de 23 mm et 15 mm respectivement (Figure 13). La souche B9 s'est avérée donc la plus performante pour la production de l'amylase extracellulaire.



**Figure 13.** Illustration des diamètres des zones d'hydrolyse formées autour des colonies des souches A1, A3, A5, A6, B9 et O7, après 5 jours d'incubation à 25°C sur milieu AAM.

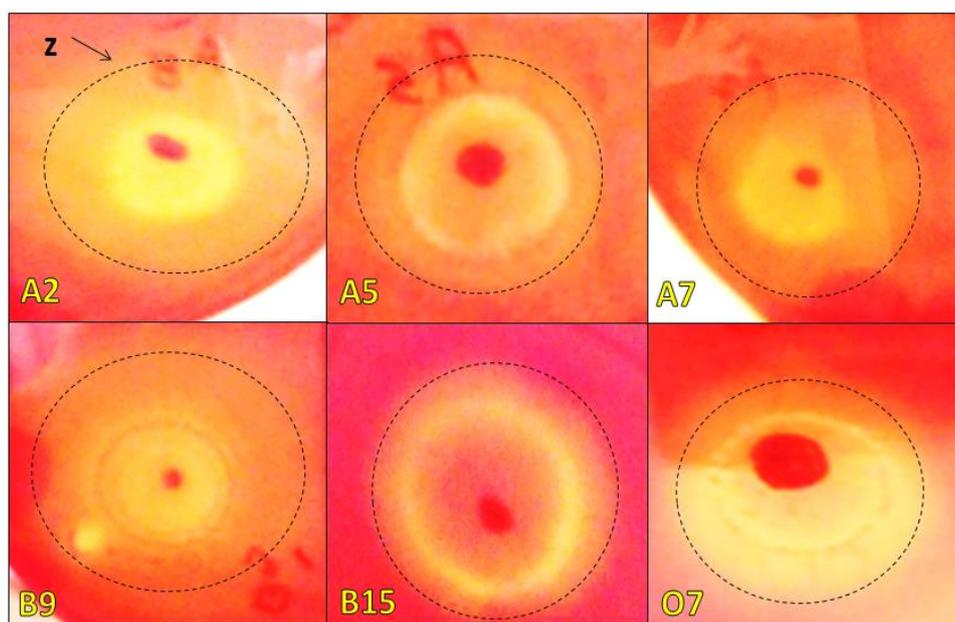
En effet, les amylases font partie des enzymes les plus importantes utilisées en biotechnologie, et plus particulièrement dans les processus impliquant l'hydrolyse de l'amidon en sucres simples. Bien que les amylases proviennent de différentes sources (végétale, animale et microbienne), les amylases d'origine microbienne sont les plus produites et les plus utilisées dans les industries, due à leur productivité et thermostabilité (Toumi *et al.*, 2016).

D'autre part, l'utilisation des levures dans la production d'enzymes amylolytiques est de plus en plus sollicitée à cause de la facilité, de leur culture et l'absence de risques pathogènes. Étant donné que la plupart des levures ont obtenu le statut de microorganismes GRAS (*Generally Recognized as Safe*) par rapport aux bactéries, l'intérêt pour les levures productrices d'amylases a augmenté ces dernières années, du fait que leur potentiel de bioconversion de la biomasse amylacée en protéine d'organismes unicellulaire (POU) et en éthanol a été reconnu (Sujeeta *et al.*, 2017).

Selon la littérature, la production des amylases extracellulaires est déjà signalée chez plusieurs souches de levures appartenant aux espèces de *Arxula adenivorans*, *Candida japonica*, *Filobasidium capsuligenum*, et aux genres de *Lipomyces*, *Saccharomycopsis*, *Schwanniomyces* (Sujeeta *et al.*, 2017). D'autre part, Merabti (2006) a pu isoler une souche de levure, appartenant au genre *Lipomyces* sp., qui est capable de produire une activité amylolytique élevée sur milieu PDA à 1% d'amidon. De manière similaire, Benaouida (2008) a isolé à partir des échantillons de sol, une levure *Schwanniomyces* sp. qui produit une bonne activité amylolytique sur le même milieu. En outre, Dakhmouche (2016) a rapporté l'isolement d'une vingtaine de souches de levures amylolytiques à partir des grains de blé par la méthode de plate-test-agar, avec la sélection de *Clavispora lusitaniae* ABS7 comme la souche la plus performante.

## 2 – 2 – Screening des souches productrices de la CMCase

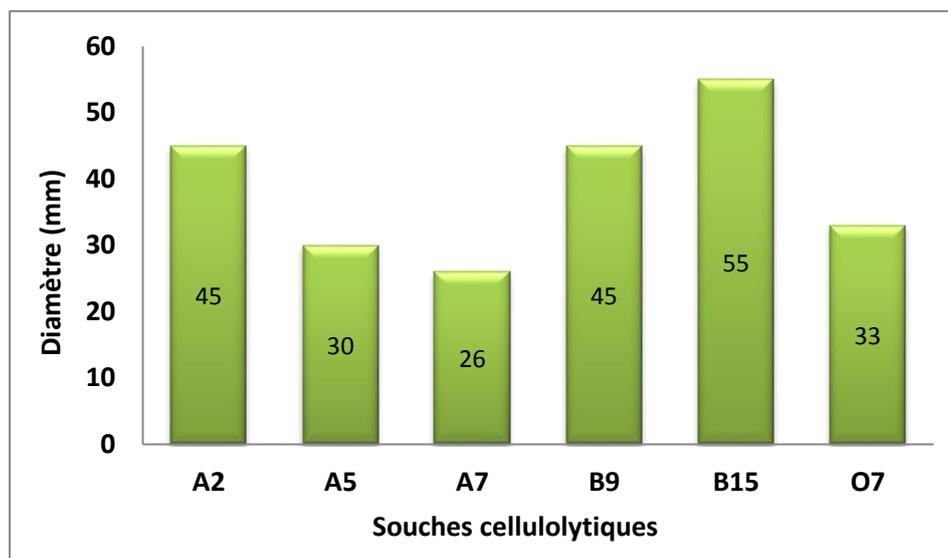
Les résultats de la mise en évidence de la production de la CMCase ont montré qu'après 5 jours d'incubation à 25°C sur milieu CAM, les souches A2, A5, A7, B9, B15 et O7 ont développé un halo clair autour des colonies (Figure 14). Elles présentent donc une activité cellulolytique avec un pourcentage de 14%, tandis que les autres souches isolées n'en possèdent pas.



**Figure 14.** Test de la mise en évidence de la production de la CMCase chez les souches isolées après 5 jours d'incubation à 25°C sur milieu CAM. (z) : Zone d'hydrolyse.

Les résultats du screening par la méthode de puits sur le même milieu révèlent que la souche B15 est la plus active avec un diamètre de zone de lyse de 55 mm. Les souches A2 et B9 présentent

également une bonne activité cellulolytique avec un diamètre de 45 mm. La plus petite zone de lyse est produite par la souche A7 avec un diamètre de 26 mm (Figure 15).



**Figure 15.** Illustration des diamètres des zones d'hydrolyse formées autour des colonies des souches A2, A5, A7, B9, B15 et O7, après 5 jours d'incubation à 25°C sur milieu CAM.

Les cellulases sont responsables de l'hydrolyse de la cellulose en sucres simples dans l'environnement, et la cellulose est la plus grande source d'énergie renouvelable dans la planète. Ces enzymes ont un grand potentiel d'application dans différentes industries telles que l'industrie alimentaire, des détergents, de textile, et dans la production des biocarburants (Carrasco *et al.*, 2016).

La plupart des champignons filamenteux, certaines bactéries et levures sont des producteurs potentiels de cellulases extracellulaires (Carrasco *et al.*, 2016; Giese *et al.*, 2017; Touijer *et al.*, 2019). Selon la bibliographie, des levures appartenant aux genres *Trichosporum*, *Cryptococcus*, *Candida*, *Debaryomyces*, *Kluyveromyces* ont été décrites pour la production de cellulases et de xylanases de manière constitutive, ainsi que les  $\beta$ -glucosidases (Barbosa, 2010).

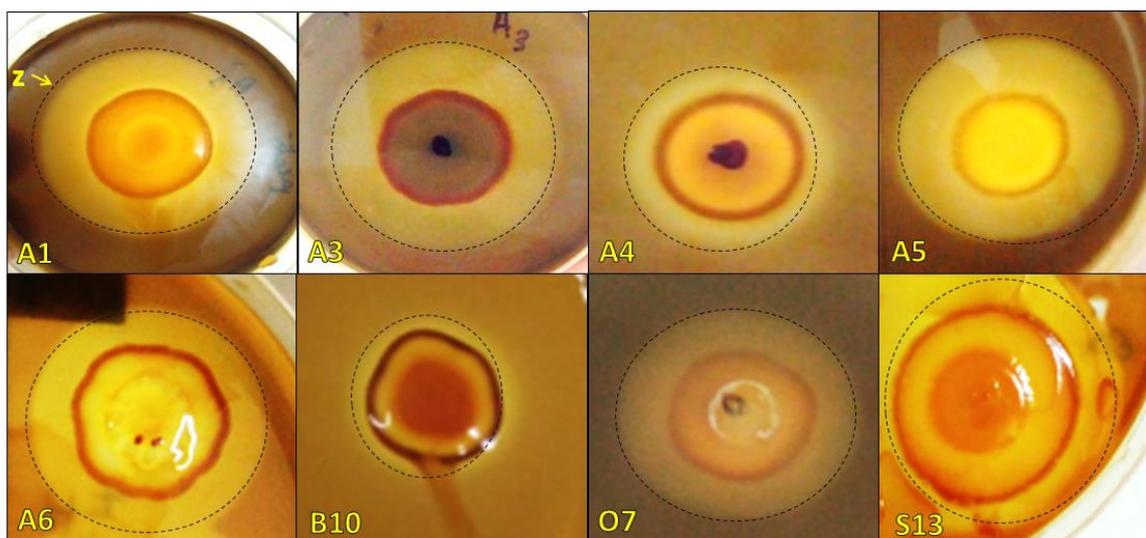
D'autre part, l'isolement de souches levuriennes cellulolytiques à partir de divers habitats a été rapporté dans différentes études. En effet, Korish (2003) rapporte que la levure *Trichosporon cutanum*, isolée à partir du tube digestif de l'insecte *Pyrrhocoris apterus*, est capable d'hydrolyse la CMC sur un milieu à base de CMC (2%). De manière similaire, Labbani (2008) a sélectionné une souche levurienne productrice de CMCcase sur milieu CMC Agar à 2% de CMC. La souche cellulolytique a été isolée à partir du sol environnant les sources thermales (Nord-est Algérien) et

elle appartient au genre *Sporobolomyces* sp. De plus, une trentaine d'isolats de levures cellulolytiques ont été isolées par **Touijer et al., (2019)** à partir du tube digestif d'un coprophage *Gymnopleurus sturmi*. Les enzymes produites par l'isolat *Trichosporon* sp. ont présenté la propriété d'hydrolyser différents substrats: la carboxyméthylcellulose (CMC), la cellulose cellulosique et le papier filtrant (FP) (**Touijer et al., 2019**).

De nos jours, les cellulases d'origine levurienne gagnent un intérêt, car elles sont actives dans une large gamme de pH et à des températures élevées (**Touijer et al., 2019**). En outre, **Giese et al., (2017)** ont rapporté qu'au cours de ces dernières années, l'exploration de nouveaux aspects biotechnologiques liés à la production de biocarburants renouvelables a stimulé l'utilisation de ces microorganismes pour la production d'enzymes cellulolytiques et d'éthanol. Ainsi donc, l'identification des microorganismes cellulolytiques est d'un grand intérêt pour l'hydrolyse de la biomasse cellulosique.

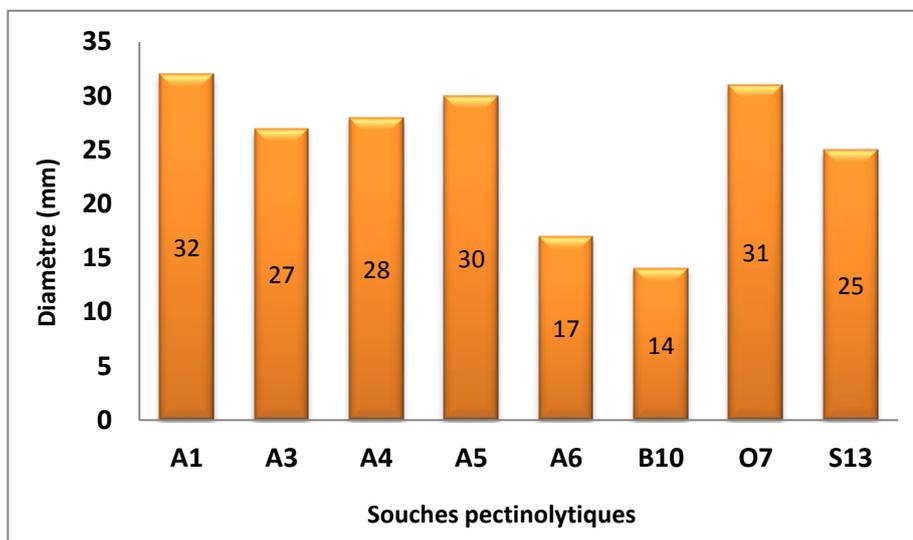
### 2 – 3 – Screening des souches productrices de la pectinase

Le résultat du test de la mise en évidence de la production de la pectinase chez l'ensemble des levures isolées a montré qu'après 5 jours d'incubation à 25°C sur milieu PAM un développement d'un halo clair est observé dans les boîtes ensemencées avec les souches A1, A3, A4, A5, A6, B10, O7 et S13 avec un pourcentage de 19% (Figure 16). En revanche, aucune activité pectinolytique n'est détectée chez le reste des autres souches étudiées.



**Figure 16.** Test de la mise en évidence de la production de la pectinase chez les souches A1, A3, A4, A5, A6, B10, O7, et S13, après 5 jours d'incubation à 25°C sur PAM. (z) : Zone d'hydrolyse.

La mise en évidence de l'activité pectinolytique chez les 8 souches sélectionnées est également réalisée par la méthode de puits sur le même milieu afin de mesurer le diamètre de la zone d'hydrolyse. Les résultats sont illustrés dans la (Figure17).



**Figure 17.** Illustration des diamètres des zones d'hydrolyse formées autour des colonies des souches pectinolytiques A1, A3, A4, A5, A6, B10, O7 et S13 après 5 jours d'incubation à 25°C sur milieu PAM.

L'analyse des résultats révèle que la souche A1 est la plus active avec une apparition d'une zone d'hydrolyse de pectine de 32 mm de diamètre, suivie par les souches O7 et A5 avec des diamètres de 31 mm et 30 mm respectivement (Figure 17). Les souches B10 et A6 semblent être les moins actives, car elles développent des zones d'hydrolyse de 14 et 17 mm de diamètre respectivement. Ainsi, la souche A1 est avérée la plus performante pour la production de la pectinase.

Les pectinases sont responsables de la dégradation des substances pectiques qui se présentent sous forme de polysaccharides structuraux dans la lamelle moyenne et les parois cellulaires primaires des tissus végétaux. Selon leur mode d'action, ces enzymes comprennent la polygalacturonase (PG), la pectine lyase (PL), la pectate lyase (PAL) et la pectine estérase (PE) (Comбина *et al.*, 2012). Ces enzymes, jouent un rôle important dans la technologie alimentaire, principalement dans la transformation des jus de fruits, des vins et dans la macération des tissus végétaux (Oskay et Yalçin, 2015).

La production des pectinases utilisées dans l'industrie a été rapportée chez les microorganismes, notamment les bactéries, les actinomycètes, les champignons filamenteux, en

particulier *Aspergillus niger*, *Penicillium pinophilum*, *Penicillium viridicatum*, *Mucor circinelloides* et chez certaines levures (Oskay et Yalçin, 2015).

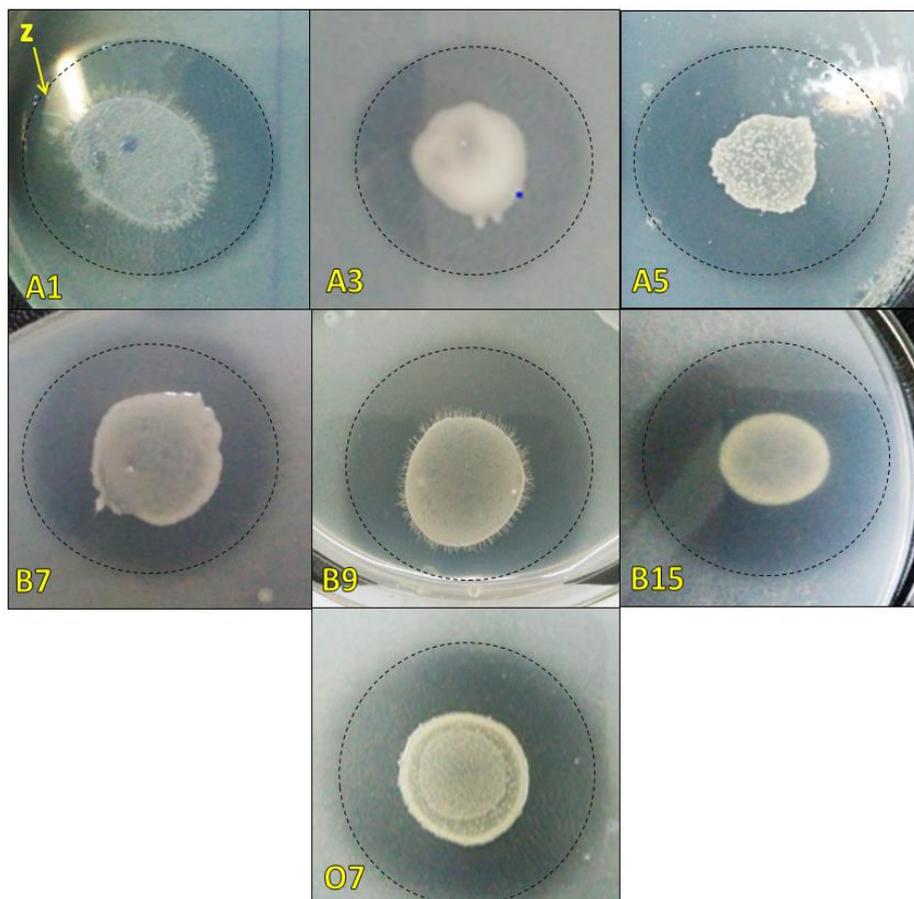
Les levures présentent des avantages par rapport aux champignons filamenteux par rapport la production de pectinases, car elles sont des unicellulaires, leur croissance est relativement simple dans des milieux de culture économiques et relativement plus facile à réaliser à grande échelle (Combina *et al.*, 2012 ; Martos *et al.*, 2013 ; Oskay et Yalçin, 2015). Ainsi, Banakar et Thippeswamy (2012) ont rapporté que la levure appartenant à l'espèce *S. cerevisiae* est parmi les microorganismes les plus étudiés pour la production de pectinases dans les 15 dernières années.

D'autre part, Geralda da Silva *et al.*, (2005) ont pu isoler à partir des fruits tropicaux une trentaine de levures productrices de polygalacturonase et de pectine lyase. Les souches pectinolytiques isolées appartiennent aux espèces *Kluyveromyces wickerhamii*, *K. marxianus*, *Debaryomyces hansenii* et *Stephanoascus smithiae*. De manière similaire, Combina *et al.*, (2012) a signalé que la levure *Wickerhamomyces anomalus*, isolée à partir des pelures de citron, est capable de produire une polygalacturonase, de type polygalacturonase. De plus, Bennamoun (2017) a isolé à partir du sol saharien une souche levurienne *Aureobasidium pullulans* capable de produire une pectinase, type polygalacturonase.

Ainsi donc, les levures pectinolytiques peuvent être isolées à partir de différentes sources y compris le sol, les fruits, etc. En effet, les substances pectiques ou pectines représentent la troisième source de polysaccharides retrouvés dans les parois cellulaires végétales. Certains sous-produits de l'industrie alimentaire, comme les écorces d'agrumes, le marc de pomme, la pulpe de betterave et de tomate, peuvent être considérés comme d'excellentes sources de pectine et de fibres alimentaires tels que les pommes (avec une teneur en pectine entre 0.5 - 1.6 %), les fraises (entre 0.6 - 0.7 %), la pulpe d'oranges sec (entre 12.4 - 28%) et la pulpe de betteraves (entre 10.0 - 30 %) (Sakai *et al.*, 1993 ; Kashyap *et al.*, 2001).

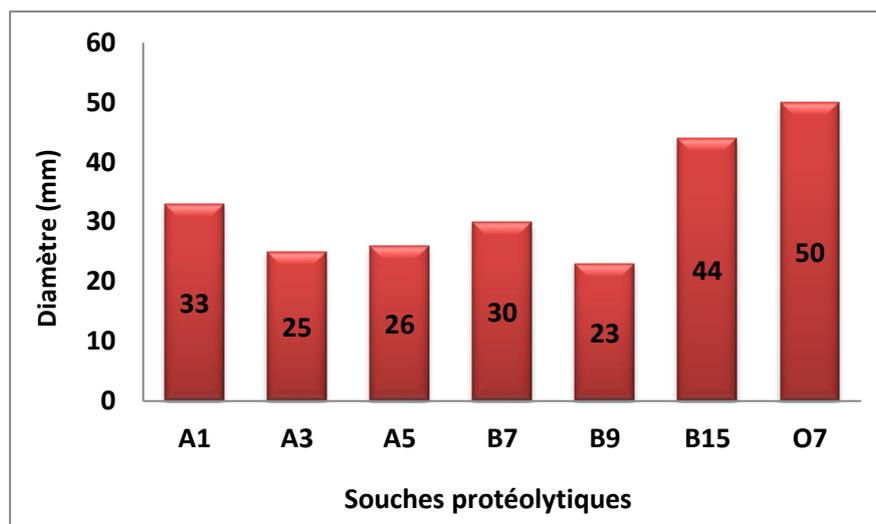
#### 2 – 4 – Screening des souches productrices de la protéase

Le résultat du test de la mise en évidence de la production de la protéase chez l'ensemble des levures isolées a montré qu'après 5 jours d'incubation à 25°C sur milieu SMA un développement d'un halo clair est observé dans les boîtesensemencées avec les souches A1, A3 A5, B7, B9, B15 et O7 avec un pourcentage de 17% (Figure 18). En revanche, aucune activité protéolytique n'est détectée chez le reste des autres souches étudiées.



**Figure 18.** Test de la mise en évidence de la production de la protéase chez les souches A1, A3, A5, B7, B9, B15 et O7 après 5 jours d'incubation à 25°C sur milieu SM. (z) : Zone d'hydrolyse.

Le screening secondaire des souches productrices de protéase par la méthode des puits sur milieu SMA a révélé que la souche O7 est la plus active avec un diamètre de zone d'hydrolyse de 50 mm, suivie par la souche B15 qui produit une zone d'hydrolyse de protéines de 40 mm de diamètre (Figure 19). Les autres souches testées, à savoir A1 et B7 développent également des zones d'activité plus au moins importantes avec des diamètres de 33 mm et 30 mm respectivement. Les activités protéolytiques les plus faibles (diamètres entre 23 mm et 26 mm) sont produites par les souches A3, A5 et B9 (Figure 18). Ainsi donc, la souche O7 est sélectionnée la plus performante pour la production de protéase.



**Figure 19.** Illustration des diamètres des zones de lyse formées autour des colonies des souches protéolytiques A1, A3, A5, B7, B9, B15 et O7 après 5 jours d'incubation à 25°C sur milieu SMA.

Les protéases produites par les souches de levures peuvent probablement libérer des acides aminés et des peptides à partir des protéines présentes dans les échantillons biologiques étudiés.

En effet, Certaines levures appartenant essentiellement aux genres *Saccharomyces*, *Rhodotorula*, *Candida*, *Debaryomyces*. L'espèce *S. cerevisiae* par exemple, produit trois types de protéases ; une aspartylprotéase, une sérine protéase et une métalloprotéase. L'activité protéolytique de ces levures est utilisée particulièrement pour l'affinage des fromages (**Kresze, 1991 ; Boiron, 1996**).

Les enzymes protéolytiques ou protéases sont des enzymes qui catalysent l'hydrolyse des protéines. Les microorganismes représentent une source exceptionnelle de protéases grâce à leur diversité biochimique extensive. En effet, 40% des enzymes industrielles sont produites par les microorganismes parmi lesquels, on trouve des souches fongiques (**García-Gómez et al., 2009**). Aussi, il a été démontré que les protéases fongiques ont de nombreuses applications pratiques dans la production des détergents, le traitement de cuir, le domaine alimentaire, le domaine médical, l'industrie chimique et dans le traitement des déchets (**Bessadok et al., 2015**)

### Conclusion Générale

Les microorganismes sont une bonne source de biomolécules telles que les enzymes qui revêtent une grande importance commerciale et industrielle, ce qui a conduit à l'isolement de microorganismes importants du point de vue biotechnologique. Les levures, par exemple, se sont révélées être de bonnes sources d'enzymes.

Dans ce contexte, le présent mémoire a pour objectif l'isolement et le criblage de souches levuriennes productrices d'enzymes à intérêt industriel, à savoir : l' $\alpha$ -amylase, la cellulase, la pectinase et la protéase.

Quarante-deux souches de levures ont été isolées à partir des pelures de pommes, de betteraves, d'oranges, et des fraises entières sur milieu YGCA. Environ 38% des isolats sont obtenus à partir des pelures de betteraves, 30% à partir des fraise entière, 17% à partir des pelures d'oranges et 16% à partir des pelures de pommes.

Les cultures sont identifiées comme levures en se basant sur l'observation des caractères macroscopique et microscopique des colonies isolées, ainsi que la formation des bourgeons.

Le screening primaire des souches de levures productrices des activités enzymatiques étudiées a montré que douze isolats de levures produisent au moins une activité enzymatique. Six souches (A1, A3, A5, A6, B9 et O7) se sont révélées productrices de l' $\alpha$ -amylase ; six souches (A2, A5, A7, B9, B15 et O7) synthétisent la CMCase ; huit souches (A1, A3 A4, A5, A6, B10, O7 et S13) présentent une activité pectinase et sept isolats (A1, A3 A5, B7, B9, B15 et O7) produisent la protéase.

Le screening secondaire a été réalisé afin de classer les souches sélectionnées en souches fortement productrices et faiblement productrices des enzymes recherchées. Ainsi, Les souches B9, B15, A1 et O7 ont respectivement les potentiels amylolytique (diamètre de zone d'hydrolyse d'amidon de 32 mm), cellulolytique (55 mm de diamètre), pectinolytique (32 mm de diamètre) et protéolytique (50 mm de diamètre) les plus élevés, par rapport aux autres souches.

Les isolats de levures, B9, B15, A1 et O7, peuvent être qualifiés de « souches performantes » pour la production des enzymes recherchées. Elles peuvent présenter donc des applications biotechnologiques.

Comme perspectives, il serait intéressant de faire:

- ✓ Identifier des espèces des souches sélectionnées productrices d'enzymes par des techniques de biologie moléculaire.
- ✓ Etudier la production quantitative des enzymes révélées par les souches productrices en fermentation liquide ou solide.
- ✓ Optimiser la production des enzymes étudiées par les souches sélectionnées.
- ✓ Déterminer la structure moléculaire des enzymes produites par analyse protéomique.

## Références bibliographiques

### *A*

- Abdelguerfi A., Ramdane S.A. (2003). Evaluation des besoins en matière de renforcement des capacités nécessaires à la conservation et l'utilisation durable de la biodiversité importante pour l'agriculture, Bilans des Expertises sur «La Biodiversité Importante pour l'Agriculture en Algérie » MATE-GEF/PNUD : Projet ALG/97/G31 (TOME XI).
- Admassu H., Zhao W., Yang R., Mohammed A.A. Gasmalla., Zhang W. (2015). Recent Advances on Efficient Methods for  $\alpha$ -Amylase Production by Solid State Fermentation (SSF). International Journal of Advanced Research (2015), Volume 3, Issue 9, 1485- 1493.
- Alazi., Ebru., Jing Niu., Joanna E., Kowalczyk., Mao Peng., Aguilar Pontes M.V., Jan AL Kan., Jaap Visser., Ronald P., Vries., Arthur FJ Ram. (2016).The transcriptional activator GaaR of *Aspergillus niger* is required for release and utilization of d-galacturonic acid from pectin. FEBSletters.
- Amoozegar M.A., Malekzadeh F., Malik K.A. (2003). Production of amylase by newly isolated moderate halophile, *Halobacillus* sp. strain MA-2. Microbiol Methods 52:353-359.
- Aougeub S., Lahreche F. (2018). Production et caractérisation d' $\alpha$ -amylase de *Clavispora lusitaniae* et *Pichia guilliermondii* isolés de blé cultivé et stocké en zones arides. Mémoire de master, Université Mentouri, Constantine.
- Arevalo-Villena M., Briones-Perez A., Corbo M.R., Sinigaglia M., Bevilacqua A. (2017). Biotechnological application of yeasts in food science: Starter cultures, probiotics and enzyme production. Journal of Applied Microbiology 123, 1360—1372.
- Arévalo-Villena M., Ubeda Iranzo J., and Briones Pérez A. (2007). Beta-glucosidase activity in wine yeasts: application in enology. Enz Microbial Technol 40, 420–425.
- Aiadi S., Touati N. (2018). Criblage des souches halophiles locales productrices d'enzymes hydrolytiques extracellulaires d'intérêt biotechnologique. Mémoire de master, Université A. MIRA – Béjaia.

**B**

- Banakar S., Thippeswamy B. (2012). Isolation, production and partial purification of fungal extracellular pectinolytic enzymes from the forest soils of Bhadra Wildlife Sanctuary, Western Ghats of Southern India. *Journal of Biochemical Technology* 3(5):S138-143.
- Belmaziz M., Djalal F. (2017). Analyses microbiologiques, biochimiques et biotechnologiques des levures issues du cépage Cinsault cultivé dans la commune Ben Abdelmalek Ramdane (Wilaya de Mostaganem). Mémoire de magister, Université Abdelhamid Ibn Badis, Mostaganem.
- Benaouida K. (2008). Etude de l' $\alpha$ -amylase des levures isolées d'un écosystème extrême (sol environnant les sources thermale) et cultivées sur milieu à base de lactosérum. Thèse de Magister, Université Mentouri, Constantine.
- Bennamoun L. (2017). Isolement, sélection de souches levuriennes de sols arides sahariens (El-M'gheir) productrices de polygalacturonase : Purification et caractérisation enzymatique. Thèse de doctorat, Université Frères Mentouri, Constantine.
- Belda I., Lorena B., Conchillo., Ruiz J., Navascués E., Marquina D., Antonio Santos. (2016). Selection and use of pectinolytic yeasts for improving clarification and phenolic extraction in winemaking. *International journal of food microbiology*. 223(45) : 1–8.
- Benhamouche N., Messadi H. (2017). Criblage d'enzymes d'intérêt biotechnologique produites par des souches halophiles locales. Mémoire de master, Université A. MIRA – Bejaia.
- Bessadok B., Masri M., breuck T., Sadok S. (2015). Isolation and screening for protease activity by marine microorganisms. *Laboratoire de Biodiversité et Biotechnologie marines, INSTM, centre La Goulette, Port de Pêche 2060, Tunis, Fachgebiet Industrielle Biokatalyse, IBK Technische Universität München, Germany., Vol. 42.*
- Biomnis. (2011). Amylase. Précis de biopathologie analyses médicales spécialisées.
- Biz., Alessandra., Anelize T., Luana O., Bruna S., Krieger N., David A. (2016). Production of pectinases by solid-state fermentation of a mixture of citrus waste and sugarcane bagasse in a pilot-scale packed-bed bioreactor. *Biochemical Engineering Journal*. 111: 54–62.
- Bouhadi N., Nouani A., Benmalek N., Benchabane A. (2016). Valorisation des sous produits d'agrumes : production d'enzymes pectinolytiques par bioconversion. *Algerian Journal of Environmental Science and Technology*, ISSN: 2437-1114.
- Boiron P. (1996). Organisation et biologie des champignons. Nathan. Paris. P. 19-79.
- Bouchet P., Guignard J.L., Pouchus Y.F., Villard J. (2005). Les champignons. Mycologie fondamentale et appliquée. 2ème édition. Elsevier Masson. P : 125- 130.

- Bourgeois C.M., Larpent J.P. (1996). Microbiologie alimentaire, aliments fermentés et fermentations alimentaires. Tome 2. Ed. France. P : 35-130.
- Bouix M., Leveau J.Y. (1991). Les levures Ds : Bourgeois C.M., Leveau J.Y. Techniques d'analyse et de contrôle dans les industries agroalimentaires, édition 21 Lavoisier-Tec & Doc: 206-229.
- Bouzegag H., (2007). Recherche et identification des souches de levures types sahariens issus de la datte et Du vinaigre traditionnelle de dattes. Diplôme d'Etude Supérieur en Biologie. Université Kasdi Merbah-Ouargla.
- Boulal A., Kihal M., Khelifi C., Benali B. (2016). Bioethanol production from date palm fruit waste fermentation using solar energy, African Journal of Biotechnology, 15(30), 1621-1627.

### C

- Carrasco M., Villarreal P., Barahona S., Alcaíno J., Cifuentes V., Baeza M. (2016). Screening and characterization of amylase and cellulase activities in psychrotolerant yeasts. BMC Microbiology, 16(21): 1-9.
- Call H. P., Walter J., Emeis C. C. (1995). Maceration activity of an endopolygalacturonase from *Candida macedoniensis*. Journal of food biochemistry. 9(4): 325–348.
- Christiaens., Stefanie., Sandy Van Buggenhout., Ken Houben., Zahra Jamsazzadeh Kermani., Katlijn RN Moelants., Eugénie D., Ngouémazong., Ann Van Loey., Marc EG Hendrickx. (2016). Process structure function relations of pectin in food. Critical reviews in food science and nutrition. 56(6) : 1021–1042.
- Combo, Agnan M. M., Aguedo M, Paquot M. (2011). Les oligosaccharides pectiques : production et applications possibles/Pectic oligosaccharides : production and potential applications. Biotechnologie, agronomie, société et environnement. 15 (1) : 153.

### D

- Dakhmouche-Djekrif S. (2016). Production et caractérisation de l'amylopullulanase de la levure *Clavispora lusitaniae* ABS7 isolée de blé cultivé et stocké en zones arides. Thèse de doctorat, Université des Frères Mentouri, Constantine.
- De Vos P., Garrity G. M., Jones D., Krieg N. R., Ludwig W., Rainey F. A., Schleifer K. H., and Whitman W. B., 2009. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2<sup>nd</sup> edition, Volume Three, The Firmicutes. Springer, New York, USA.

- Deak T. (2006). Chapitre 8: environmental Factors. Influencing yeasts, in yeast handbook: biodiversity and ecophysiology of yeasts, Carlos rosa, gabor peter (eds.). Springer Verlag Berlin Heidelberg. : 155-174.
- Djelti N., Lassel S. (2017). Identifications biomoléculaires et Caractérisation biotechnologique des levures issues du cépage Cinsault cultivé dans la commune Ben Abdelmalek Ramdane(Mostaganem). Diplôme de master en Biologie.
- Dongyou L. (2015). Alpha-Amylase. Molecular Medical Microbiology.

### E

- Evania Geralda da Silva A., Maria de Fatima Borges B., Clara Medina C., Roberta Hilsdorf Piccoli A., Rosane Freitas Schwan A. (2005). Pectinolytic enzymes secreted by yeasts from tropical fruits. FEMS Yeast Research 5 (2005) 859–865.
- Eschstruth A., Benoit D. (2011). Comparative characterization of endo-polygalacturonase (PGU1) from *Saccharomyces Cerevisiae* and *Saccharomyces Paradoxus* under Winemaking Conditions. Applied microbiology and biotechnology. 91(3): 623-34.

### F

- Feijoo-Siota L., Villa T.G. (2011). Native and biotechnologically engineered plant proteases. Food Bioprocess. Technol. 4, 1066-1088.
- Ferhat H.S., Laklouka N. (2015). Contribution à l'étude de l'alpha amylase levurienne : optimisation des conditions de production. Mémoire de master, université Echahid Hamma Lakhdar D'el-oued.

### G

- García-Gómez M.J., Huerta-Ochoa S., Loera-Corral O., Prado-Barragán L.A. (2009). Advantages of a proteolytic extract by *Aspergillus oryzae* from fish flour over a commercial proteolytic preparation. Food Chem. 112; 604–608.
- Gana S. K., and Gana M.L. (2014). Algerian Yeast Strains: Isolation, Identification and Production of Single Cell Protein from Whey with Strain *Candida kefyr*, International Journal of Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics vol. 4, no. 3, pp. 160-165.
- Giese C. E., Dussán J.K., Pierozzi M., Chandel K.A., Pagnocca C.F., Silvio S.S. (2017). Cellulase Production by *Trichosporon laibachii*. Orbital: Electron. J. Chem. 9 (4): 271-278.

- Gomez Del Pulgar M.E., Saadeddin A. (2013). The cellulolytic system of *Thermobifida fusca*. ISSN: 1040-841X (print), 1549-7828 (electronic).
- Guiraud J.P. (2003). Microbiologie alimentaire. Ed. DUNOD. Paris. P : 651-655.
- Guiraud J.P. (1998). Microbiologie alimentaire. Dunod, Paris. p : 310-321.
- Gummadi S.N., Sunil, Kumar D., Dash S.S., and Sahu S.K. (2009). Industrially important carbohydrate degrading enzymes from yeasts: pectinases, chitinases, and b-1,3- glucanases. In *Yeast Biotechnology: diversity and applications* eds. Satyanarayana, T. and Kunze, G., pp 673–691. New York: Springer Science.
  
- Guendouz F., Belibel S. (2014). Etude du potentiel de production des protéases par des souches mycéliennes isolées des zones arides. Mémoire de master, Université Mentouri, Constantine.
- Gut A. M., Vasiljevic T., Yeager T., and Osaana N., Donkor. (2018). Salmonella infection – prevention and treatment by antibiotics and probiotic yeasts: a review.

### H

- Henes B., Sonnleitner B. (2007). Controlled fed-batch by tracking the maximal culture capacity. *Journal of Biotechnology*. 132: 118 –126.

### J

- Jadhav J.P., Parshetti G.K., Kalme S.D., and Govindwar S.P. (2007). Decolourization of azo dye methyl red by *Saccharomyces cerevisiae* MTCC 463. *Chemosphere* 68, 394–400.
- Jangra M.R., Jangra S., Kumar R., and Nehra K.S. (2018). A Study on Yeast Micro Flora Isolated from Common Indian Fruits and Cheese, *Int. J. Pure App. Biosci.* 6(1): 828-839 (2017).
- Jaiboon K., Lertwattanasakul N., and Limtong P. (2016). Yeasts from peat in a tropical peat swamp forest in Thailand and their ability to produce ethanol, indole-3-acetic acid and extracellular enzymes. *Mycol Progr* 15, 755–770.
- Johnson E. A., and Echavarri C. *Erasum*. Part II, Chapter 3: Yeast biotechnology in Kurtzman C. P., Fzll J. W. and Boekhout T. (eds). (2011). *The yeast. A taxonomic study*. Volume 1. Fifth edition. Elsevier., , p. 21-45.

**K**

- Kara Ali M. (2014). Isolement et caractérisation de souches levuriennes des milieux arides productrices de l'éthanol sur différents substrats. Thèse de Doctorat, Université Mentouri, Constantine.
- Kalyani D., Tiwari M.K., Li J., Kim S.C., Kalia V.C., Kang Y.C., and Lee J.K. (2015). A highly efficient recombinant laccase from the yeasts *Yarrowia lipolytica* and its application in the hydrolysis of biomass. PLoS ONE 10, e0120156.
- Kashyap D.R., Vohra P.K., Chopra S., Tewari R. (2001). Applications of pectinases in the commercial sector: a review. *Bioresource Technology*. 77: 215–27.
- Kumar S., Grewal J., Sadaf A., Hemamalini R., and Khare S.K. (2016). Halophiles as a source of polyextremophilic  $\alpha$ -amylase for industrial applications. *AIMS Microbiol* 2:1–26.
- Kurtzman C.P., Fell J.W., Boekhout T., Robert V. (2011). *The Yeasts, A taxonomic study*, Vol 1. Elsevier, New York, pp. 3–110.
- Kurtzman C.P. (2011). *Meyerozyma Kurtzman.*, and Suzuki M. (2010). In: Kurtzman C.P., Fell J.W., Boekhout T. (Eds), *The Yeasts, A taxonomic study*. Elsevier, London, pp. 623.
- Korish M. (2003). Production, Purification, Properties and Application of the Cellulase from a Wild type Strain of a Yeast isolate. Faculty of Biology, Johannes Gutenberg- University, Mainz, Germany.
- Kresze G. B. (1991). Proteases during purification. *Bioprocess-technol*. 12. 85-120.
- Kreger-Van Rij N.J. (1984). *The yeast a Taxonomie Study*, Elsevier Biomedical. Suarit, R., Gopal, P-K, et Sherped, M-G, 1988. Evidence for a glycosidic linkage between chitin and glucan in the cell wall of *Candida albicans*. *J. Gen. Microbial*, 134. PP: 359 - 368.

**L**

- Labbani F.Z.K. (2008). Isolement de levures d'écosystème extrêmes (sols de sources thermales). Production de cellulase thermostable. Mémoire de Magister, Université Mentouri, Constantine.
- Labbani F.Z.K. (2015). Activité « Killer » chez des levures isolées des sols du Nord-Est Algérien : Purification, caractérisation et effet sur les souches de levures indésirables. Thèse de Doctorat En science, Université Mentouri, Constantine.
- Larpent J. P. et Larpent-Gourgaud M. (1997). *Mémento technique de microbiologie*. 3e édition, Lavoisier-Tec & Doc, Paris. (8) : 217-240.
- Larpent J.P. (1991). *Biotechnologie des levures*. Ed. Masson. Paris. P 266-373.

- Leveau J.Y., Bouix M. (1993). Microbiologie industrielle: les micro-organismes d'intérêt industriel. Ed. Tec et Doc Lavoisier, pp. 612.
- Leyral G., Vierlin E. (2007). Microbiologie et toxicologie des aliments: Hygiène et sécurité alimentaires, édit Wolters Kluwer, Amsterdam. P: 287.
- Li H., Chi Z., Wang X., Duan X., Ma L., and Gao L. (2007). Purification and characterization of extracellular amylase from the marine yeast *Aureobasidium pullulans* N13d and its raw potato starch digestion. *Enz Microbial Technol* 40, 1006–1012.
- Lai Q P. (2010). Utilisation des levures non-Saccharomyces en oenologie : études des interactions entre *Torulaspota delbrueckii* et *Saccharomyces cerevisiae* en cultures mixtes. Thèse de Doctorat, Université de Toulouse.
- Lourens K., and Reid G. (2002). Yeast nutrient management in winemaking. *The Australian & New Zealand Grapegrower & Winemaker. Annual Technical Issue.* p: 54.

### M

- Maturano Y.P., Assof M., Fabani M.P., Nally M.C., Jofré V., Rodriguez Assaf L.A., Toro M E., Castellanos de Figueroa L.I. (2015). Enzymatic activities produced by mixed *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* cultures: relationship with wine volatile composition. *Antonie Van Leeuwenhoek* 108, 1239–1256.
- Manohara A., Somashekar K. L., Shobha A. K., and Vinu A. K. (2010). Screening of yeasts for alpha- amylase production from agricultural produce. *As J Microbiol Biotechnol Environ Sci* 12, 161–165.
- Marlène C.O.T. (2006). Etudes physiologiques de l'adaptation et de la résistance de la levure *Saccharomyces cerevisiae* au cours de la production intensive d'éthanol. Thèse Doctorat, Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse, France.
- Martos M.A., Emilce R., Zubreski., Oscar A., Garro., and Roque A., Hours. (2013). Production of Pectinolytic Enzymes by the Yeast *Wickerhamomyces anomalus* Isolated from Citrus Fruits Peels. *Biotechnology Research International*, Article ID 435154, 7 pages.
- Martos M.A., Zubreski E.R., combina M., Garro O. A., Hours R.A. (2012). Isolation of a yeast strain able to produce a polygalacturonase with maceration activity of cassava roots. *Food Sci. Technol, Campinas*, 33(2): 332-338.

- Meshram A., Singhal G., Bhagyawant S. S., Srivastava N. (2019). Plant-Derived Enzymes: A Treasure for Food Biotechnology. Department of Bioscience and Biotechnology, Banasthali University, Banasthali, India SOS in Biotechnology, Jiwaji University, Gwalior, India.
- Merabti R. (2006). Isolement et caractérisation de souches levuriennes amylolytiques à partir de sol saharien algérien. Thèse de Magistère, Université Mentouri, Constantine.
- Merín., Gabriela M., Martín M.C., Rantsiou K., Cocolin L., et Vilma Inés Morata de Ambrosini. (2015). Characterization of pectinase activity for enology from yeasts occurring in Argentine bonarda grape. *Brazilian journal of microbiology*. 46(3): 815–823.
- Mir N.Ali., and Mohammed M.Kh. (2014). Current Research in Microbiology and Biotechnology, Vol. 2, 316-324.
- Moubasher A.A. H., Mady A.I., Nemmat A., Hussein., Hassan A. Gouda. (2016). Enzyme producing capabilities of some extremophilic fungal strains isolated from different habitats of Wadi El-Natron, Egypt: Cellulase, xylanase and pectinase. *European journal of biological research*. 6(2): 103–111

### N

- Naumov G. I., Yu Shalamitskiy M., Naumova E.S. (2016). New family of pectinase genes PGU1b–PGU3b of the pectinolytic yeast *Saccharomyces bayanus* var *uvarum*. In *doklady biochemistry and biophysics*. 467:89–91. Springer,
- Najjar A. (2010). Etude quantitative de la sécrétion de lipase, de la lipolyse et du stockage de lipides chez *Yarrowia lipolytica* lors de sa croissance en présence d'huile d'olive. Thèse de doctorat, université de la méditerranée (AIX-MARSEILLE II).

### O

- Olempska-Bier Z.S., Merker R.I., Ditto M.D., and Di Novi M.J. (2006). Food-processing enzymes from recombinant microorganisms-a review. *Reg Toxicol Pharmacol* 25,144–158.
- Ognyanov., Manol., Connie R., Henk A., Schols., Yordan G., Kratchanova M., Christo Kratchanov.(2016). Isolation and structure elucidation of pectic polysaccharide from rose hip fruits (*Rosa canina* L.). *Carbohydrate polymers*.

- Oskay M., and Yalçın H.T. (2015) Screening of Yeast Strains for Pectinolytic Activity: Effects of Different Carbon and Nitrogen Sources in Submerged Fermentations. *OnLine Journal of Biological Sciences*, 15 (3): 89-96.

### P

- Pagani., Danielle M., Heidrich D., Gustavo V.B Paulino., Karine de Oliveira Alves., Paula T. Dalbem., Caroline F. de Oliveira, Zélia M.M Andrade. (2016). Susceptibility to antifungal agents and enzymatic activity of *Candida haemulonii* and *Cutaneotrichosporon dermatis* isolated from soft corals on the Brazilian reefs. *Archives of microbiology*. 45(2): 1–9.
- Pandey A., Carlos R.S., Selvakumar P., Vanete T.S., Krieger N., and Jose D.F. (1999). Recent developments in microbial inulinases: its production, properties and industrial applications. *Appl Biochem Biotechnol* 81, 35–52.
- Panesar P. S., Kumari S., and Panesar R. (2010). Potential applications of immobilized beta galactosidase in food processing industries. *Enzyme Res* 2010, 473137.
- Pařenicová L., Harry K., Jacques A.E.B., Jaap Visser. (2000). Characterization of a novel endopolygalacturonase from *Aspergillus niger* with unique kinetic properties. *FEBS letters*. 467(23): 333–336.
- Pessoa J.R., Hartmann M., Vitolo M., and Hustedt H. (1996). Recovery of extracellular inulinase by expanded bed adsorption. *Journal of biotechnology* 51, 89–95.
- Pol D. (1996). *Travaux pratiques de biologie des levures. Guide de laboratoire*. ellipses edition marketing S.A, Paris. 15 : 20-38, 42-57, 141-151.

### R

- Rezki-Bekki M.N. (2014). Production de métabolites par les levures : caractérisation et identification des arômes et des alcools. Thèse de Doctorat, Université d’Oran.
- Riva, S. (2006) Laccases: blue enzymes for green chemistry. *Trends Biotechnol* 24, 219–226.
- Rodriguez M.E., Lopes C.A., Valles S., and Caballero A.C. (2010). Characterization of alfa-rhamnosidase activity from a Patagonian *Pichia guilliermondii* wine strain. *Journal of Applied Microbiology* 109, 2206–2213.

- Romano Mwirichia A.W., Muigai B., Tindall H. I., Boga E., Stackebrandt. Isolation and characterisation of bacteria from the haloalkaline Lake Elmenteita, Kenya. *Extremophiles* 14:339–348.

### S

- Sakai T., Sakamoto T., Hallaert J., Vandamme E. J. (1993). Pectin, pectinase and protopectinase: Production, properties and applications. *Advances in Applied Microbiology*. 39: 231-294.
- Sujeeta K.M., Shikha M., Khushboo S. (2017). Isolation and Screening of Amylase Producing Fungi. *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci* 6(4): 783-788.
- Silva-Santisteban Y.B.O., Converti A., and Filho F.M. (2006). Intrinsic activity of inulinase from *Kluyveromyces marxianus* ATCC 16045 and carbon and nitrogen balance. *Food Technol Biotechnol* 44, 479–483.
- Singh R.S., Dhaliwal R., and Puri M. (2006). Production of inulinase from *Kluyveromyces marxianus* YS-1 using root extract of *asparagus racemosus*. *Proc Biochem* 41, 1703–1707.
- Singh A., Kuhad R.C., and Ward O.P. (2007a). Industrial application of microbial cellulases. In *Lignocellulose Biotechnology: future Prospects* eds. Kuhad, R.C. and Singh, A., pp 345–358. New Delhi: I. K. International Publishing House.
- Singh R.S., Sooch B.S., and Puri M. (2007b). Optimization of medium and process parameters for the production of inulinase from a newly Isolated *Kluyveromyces marxianus* YS-1. *Biores Technol* 98, 2518–2525.
- Singh P., Sahota P.P., and Singh R.K. (2015). Evaluation and characterization of new alfa-L-rhamnosidase-producing yeast strains. *Journal of general and applied microbiology* 61, 149–156.
- Singh G., Jawed A., Paul D., Bandyopadhyay K. K., Kumari A., Haque S. (2016). Concomitant Production of Lipids and Carotenoids in *Rhodospiridium toruloides* under Osmotic Stress Using Response Surface Methodology. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1686. <http://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01686>.
- Singh A., Singh A.K. (2017). Haloarchaea: worth exploring for their biotechnological potential. *A.K. Biotechnol Lett.* 39: 1793-1800.

- Singh A., Singh A.K. (2017). Haloarchaea: worth exploring for their biotechnological potential A.K. *Biotechnol Lett.* 39: 1793-1800.
- Schreck S.D., Grunden A.M. (2014). Biotechnological applications of halophilic lipases and thioesterases. *Appl Microbiol Biotechnol* 98:1011–1021.
- Setati M.E. (2010). Diversity and industrial potential of hydrolase producing halophilic/halotolerant eubacteria. *African Journal of Biotechnology* Vol. 9 (11), pp. 1555-1560.
- Serrat., Manuel., Rosa C., Bermúdez., Tomás G., Villa. (2004). Polygalacturonase and ethanol production in *Kluyveromyces marxianus*. *Applied biochemistry and biotechnology.* 117(1) : 49–64.

### T

- Thuriaux P. (2004). Les organismes modèles de la levure. Ed. Belin. P: 15, 17, 23, 24, 27, 42 et 44.
- Thakur., Akhilesh., Roma P., Singh S., Gupta R. (2010). Production, purification, and characterization of polygalacturonase from *Mucor circinelloides* ITCC 6025. *Enzyme research.* 25 (5) : 256-638.
- Tghzert W. (2012). Immobilisation d'une lipase sur des supports polymères et applications. Mémoire de master, université A.MIRA –BEJAIA.
- Touijer H., Benchemsi N., Ettayebi M., Idrissi J. A., chaouni B., Bekkari H. (2019). Thermostable Cellulases from the Yeast *Trichosporon* sp. Article ID 2790414, 6 pages.
- Toumi S., Tifrit A., Hadjazi D., Chama Z., and Abbouni B. (2016). Production of a thermostable amylase by yeast strain isolated from saharian soils cultivated in Soft cheese whey. *Der Pharmacia Lettre* 8 (17):32-41.
- Torres, Ernesto, Tania Volke-Sepúlveda, Gustavo Viniegra-González. (2013). Production of hydrolytic depolymerising pectinases. *Food technology and biotechnology* 44(2): 221-320.
- Tibor D. (2008). Handbook of food spoilage yeasts. 2nd Ed. DNLM. New York. 350P.

### U

- Uma C., Gomathi D., Muthulakshmi C., Gopalakrishnan V.K. (2010). Production, purification and characterization of invertase by *aspergillus flavus* using fruit peel waste as substrate. Adv. Biol. Res.4, 31-36.

### V

- Venturini Copetti M. (2019). Yeasts and molds in fermented food production: an ancient bioprocess. PII: S2214-7993(18)30101-2.
- Vela Sebastiao M. R., Fernandes B., and Jiang B. (2013). Fungal Inulinases as potential enzymes for application in the food industry. Ad J Food Sci Technol 5, 1031–1042.
- Voragen, Fons, Henk Schols, Richard G.F Visser. (2013). Advances in pectin and pectinase research. Springer.

### W

- Walker G.M. (1998). Yeast. Physiology and Biotechnology John Wiley and Sons, Chichester.
- Walker G. (2000). The role of metal ions in optimising yeast fermentation performance. *In* Nutritional aspects II. Synergy between yeasts and bacteria. Lallemand Technical Meeting. PP: 27-30.
- Wenling W., Huiying W.W.L., and Shiyuan W.W. (1999). Continuous preparation of fructose syrups from Jerusalem artichoke tuber using immobilized intracellular inulinase from *Kluyveromyces* sp. Y-85. Proc Biochem 34, 643–646.

### Z

- Zahida N., Shaista J., Muafia S., Shumaila U., Tehseen Y., Ammara Y., and Saima N. (2014). Production of alcohol by yeast isolated from apple, orange and banana, International Journal of Food and Nutrition Sciences, Vol. 1(2), pp. 016-019.
- Zhang L.C., Zhao C., Ohta W.Y., and Wang Y. (2005). Inhibition of glucose on an exoinulinase from *Kluyveromyces marxianus* expressed in *Pichia pastoris*. Proc Biochem 40, 1541–1545.

- Zhang Z.X., Zhang P.Y. (2013). CELLULASES: CHARACTERISTICS, SOURCES, PRODUCTION, AND APPLICATIONS. Bioprocessing Technologies in Biorefinery for Sustainable Production of Fuels, Chemicals, and Polymers, First Edition. Edited by Shang-Tian Yang, Hesham A. El-Enshasy, and Nuttha Thongchul.

## Annexes

### Annexe 1: Yeast Glucose chloramphenicol Agar (YGCA)

- Extrait de levure : .....5g
- Glucose : .....20 g
- Antibiotique :Chloramphénicol :.....0 ,10 g
- Agar : .....20 g
- Eau distillée : ..... 1000 ml

Le milieu est stérilisé pendant 20 minutes à 120°C.

### Annexe 2: Yeast Peptone Glucose Agar (YPGA)

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

Le milieu est stérilisé pendant 20 minutes à 120°C.

### Annexe 3 : Yeast peptone Glucose (YPG) :

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

Le milieu est stérilisé pendant 20 minutes à 120°C.

### Annexe 4 : milieu d'activité amylase (AAM).

- amidon soluble .....5g
- extrait de levure.....5g
- peptone .....5g
- MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O .....0, 5 g
- FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O..... 0,01g
- Na Cl .....0, 01g
- Agar .....15 g
- Eau distillée .....1000 ml

Le milieu est stérilisé pendant 20 minutes à 120°C.

**Annexe 5 : milieu lait écrémé – Agar**

- Lait écrémé : .....100g
- Agar : .....20 g
- Eau distillée : ..... 1 litre

Le milieu est stérilisé pendant 20 minutes à 120°C.

**Annexe 6: milieu Carboxymethylcellulose Agar CMC- agar**

- CMC..... 10g
- Extrait de levure .....0,6g
- KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>..... 7,0g
- K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>..... 2,0g
- MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O.....0,1g
- (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.....1,0g
- Gélose..... 15,0g
- Eau distillée..... 1000 ml

Le milieu est stérilisé pendant 20 minutes à 120°C.

**Annexe 7 : milieu Yeast peptone pectin Agar YPPA**

- Pectine .....20g
- Peptone .....10g
- Extrait de levure .....5g
- Agar .....20g
- Eau distillée..... 1000 ml

Le milieu est stérilisé pendant 20 minutes à 120°C.

**Annexe 8 : Solution lugol 1 pour l'activité amylolytique (amylase) :**

- I<sub>2</sub> (Diiodure) : .....0.1 g
- KI (Iodure de potassium) : ..... 1 g
- Eau distillée : .....100 ml

Le milieu est stérilisé pendant 20 minutes à 120°C.

**Annexe 9 : Solution lugol 2** pour l'activité pectinolytique (pectinase) :

- I<sub>2</sub> (Diode) : .....1.5151 ~ (1.52 g)
- KI (Iodure de potassium) : .....7.57 g ~ (7.6 g)
- Eau distillée : .....500 ml

Le milieu est stérilisé pendant 20 minutes à 120°C.

**Annexe 10: Solution de Rouge Congo** pour l'activité CMCase

- Rouge Congo : ..... 0.1 g
- Eau distillée : ..... 100 ml

Le milieu est stérilisé pendant 20 minutes à 120°C.

**Annexe 11 : Solution de Na Cl :**

- Na Cl : ..... 58.44 g
- Eau distillée : .....1 Litre

Le milieu est stérilisé pendant 20 minutes à 120°C.

<b>Master en Biochimie de la Nutrition</b> <b>CHAOUR Abir</b> <b>MORDJANA Rayene</b>	<b>Date de soutenance :</b> <b>Faculté des SNV, Université Frères Mentouri</b> <b>Constantine 1</b>
--	---

**Thème : Contribution à l'isolement et la sélection des souches de levuriennes, productrices d'enzymes d'intérêt biotechnologique, à partir d'aliments végétaux sucrés.**

### **Résumé**

Dans cette étude, nous nous sommes intéressés à l'isolement et la sélection des levures productrices d'enzymes d'intérêt biotechnologique. L'isolement qui a été réalisé à partir d'aliments végétaux sucrés (pelures de pommes, de betteraves, d'oranges et des fraises entières) a permis de répertorier 42 souches de levures sur milieu YGCA. Toutes les souches isolées font l'objet d'un screening primaire et secondaire pour la production d'enzymes :  $\alpha$ -amylase, CMCCase, pectinase et protéase. Le screening de l'activité amylolytique sur milieu AAM a montré que les souches A1, A3, A5, A6, B9 et O7 sont productrices d' $\alpha$ -amylase. L'évaluation de leur l'activité par la méthode de puits a révélé que la souche B9 est la plus active avec un diamètre de zone d'hydrolyse de 32 mm. La mise en évidence de la production de la CMCCase a été effectuée sur milieu CAM. Les souches A2, A5, A7, B9, B15 et O7 ont été sélectionnées comme étant productrices de cette enzyme hydrolytique extracellulaire. Parmi ces dernières, la souche B15 a été signalé la plus intéressante avec une zone claire de 55 mm de diamètre. En outre, le criblage de l'activité pectinolytique et protéolytique des souches isolées a été fait sur milieux PAM et SMA respectivement. Huit souches pectinolytiques : A1, A3, A4, A5, A6, B10, O7 et S13 et sept souches protéolytiques, A1, A3, A5, B7, B9, B15 et O7 ont été sélectionnées. Le screening secondaire de ces activité enzymatiques a montré que les souches A1 et O7 possèdent respectivement une activité pectinase (diamètre d'hydrolyse de 32 mm) et activité protéase (50 mm de diamètre) élevée par rapport aux autres.

Par leurs activités enzymatiques élevées, les isolats de levures B9, B15, A1 et O7, isolées à partir des échantillons biologiques, peuvent ainsi être qualifiées de « souches performantes » pour la production des enzymes :  $\alpha$ -amylase, CMCCase, perctinase et protéase respectivement. Elles présentent donc un intérêt biotechnologique.

**Mots clés :** Levures, isolement, aliments végétaux sucrés, enzymes extracellulaires, applications biotechnologiques.

### **Jury d'évaluation :**

**Président : DAKHMOUCHE S.** M.C.A., E.N.S Assia Djebar - Constantine  
**Rapporteur : LABBANI F-Z. K.** M.C.B., E.N.S Assia Djebar - Constantine  
**Examineur : BENNAMOUN L.** M.C.B., Université Frères Mentouri - Constantine 1

**Année Universitaire : 2018 - 2019**