



جمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
ÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي  
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE  
SCIENTIFIQUE

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

جامعة الاخوة منتوري قسنطينة  
كلية علوم الطبيعة و الحياة

**Département :** Biochimie/ Biologie Cellulaire et Moléculaire

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

**Domaine :** Sciences de la Nature et de la Vie

**Filière :** Sciences Biologiques

**Spécialité :** Biochimie appliquée

*Etude de la bioprospection de levures: criblage  
des activités enzymatiques d'intérêt  
biotechnologique.*

**Présenté et soutenu par :** Boulhadid Ramla Amina

Messai Rima

**Soutenu le :** 03/10/2019

**Jury d'évaluation :**

**Président du jury :** Mme Bennamoun.L. M.C.B, Université Frères Mentouri Constantine.  
**Encadreur :** Mme Dakhmouche. S. M.C.A, ENS, Assia Djebar, Constantine.  
**Co-encadreure :** Mme Labbani. F.Z.K M.C.B, ENS, Assia Djebar, Constantine  
**Examineur :** Mme Abdelaziz . W M.C.B, Université Frères Mentouri Constantine

*Année universitaire : 2018 - 2019*

## *Remerciement*

Tout d'abord, nous remercions le "bon Dieu" tout puissant pour la volonté, la santé et la patience qu'il nous a donnée durant toutes les années d'études.

Nous tenons à remercier vivement notre encadreur Mme DAKHMOUCHE .S, Maitre de conférences A d'avoir accepté de nous encadrer, pour son aide, sa disponibilité, ainsi pour ses conseils judicieux et ses encouragements précieux qui nous ont donné la force de continuer et de terminer ce travail.

Nos remerciements les plus chaleureux et respectueux à notre Co encadreur Mme LABBANI F.Z Kenza Maitre de conférences B à l'ENS de Assia DJEBAR, Constantine qui a fait preuve d'une grande patience et a été d'un grand apport pour la réalisation de ce travail, ses conseils, ses orientations, son soutien moral et scientifique.

Je tiens à remercier Mme Bennamoun .L Maitre de conférences B à l'Université Frères Mentouri Constantine pour nous avoir fait l'honneur d'accepter la présidence de notre jury de soutenance. Qu'elle trouve ici nos sincères sentiments de gratitude et de respect.

Nos vifs remerciements s'adressent également à notre examinatrice, Mme Abdelaziz Wided. Maitre de conférences B à l'Université Frères Mentouri Constantine, d'avoir honoré et accepté d'examiner ce travail.

Nos sentiments les plus profonds et remerciements infinis à tous nos enseignants pour leurs patiences et servitudes surtout ceux du département de biochimie.

Enfin, nos derniers remerciements et ce ne sont pas les moindres, vont à tous ceux qui ont participé de près ou de loin pour l'aboutissement de ce travail.

Merci à tous

# Dédicaces

*Je dédie ce modeste travail, en premier lieu à mes chers parents pour toutes ces années de sacrifices,*

*A toi papa, qui m'a toujours fait confiance et poussée à donner le meilleur de moi-même,*

*A toi maman, qui m'a appris que la persévérance fini toujours par payer et qui a toujours cru en moi et m'a offert la meilleure des éducations*

*A mon frère et à mes sœurs qu'ils trouvent ici le témoignage de ma profonde tendresse.*

*A mes très chères amies qui ont su arroser dans mon cœur la Joie et le bonheur*

*(Hadjer, Lyna, Assia, Malika)*

*À mon binôme Amina, nous avons vécu cette aventure ensemble. Nous sommes devenus plus patientes et on a appris que tout est possible quand on a la bonne volonté. A tous nos professeurs qui nous ont enseignée et à tous ceux qui nous sont chers.*

# Dédicace

*Je dédie ce travail ...*

*A mon paradis sur terre, ma vie et la source de mon bonheur « ma mère », qui m'a guidée vers le bon chemin, et qui a fait le possible pour me voir réaliser mes rêves.*

*Au meilleur papa du monde, mon héro, l'homme qui s'est sacrifié pour me voir réussir dans ma vie, et pour me rendre heureuse.*

*A ma grand-mère, pour son soutien moral durant de ce travail.*

*A ma chère sœur Romeissa celle qui a toujours été présente pour moi et qui m'a aidée, écoutée et encouragée tout au long de mon parcours.*

*A mon frère Adem pour son amour et mon beau-frère.*

*A ma petite princesse Rahaf que Dieu la garde et la protège.*

*A mes oncles et mes tantes surtout celles qui m'ont aidée et m'ont encouragée.*

*A mes cousins et mes cousines .*

*A mes adorables copines «Nour , Yasmine, Meriem , Hadjer*

*À mon binôme Rima, nous avons vécu cette aventure ensemble. Nous sommes devenu plus patientes et nous avons appris que tout est possible quand on a la bonne volonté. A tous nos professeurs qui nous ont enseigné et à tous ceux qui nous sont chers.*

*AMINA*

# Table des matière

Liste des abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Introduction .....	1
Partie bibliographique	
Les levures	
1.Généralité.....	4
2.Historique.....	4
3. Habitats.....	4
4. Morphologie.....	5
5. Besoin nutritionnelles.....	5
5.1. Source carbonée.....	6
5.2 .Source azotée.....	7
5.3 . Oligoéléments et facteurs de croissance.....	7
6. Reproduction des levures .....	8
6.1. Reproduction asexué .....	8
6.1.1.Reproduction asexuée par bourgeonnement .....	9
6.1.2 .Reproduction asexuée,parscissionScissiparité.....	9
6.2. Reproduction sexuée .....	10
7. Classification.....	10
7 .1.Les ascomycètes.....	11
7.2. Les basidiomycètes .....	11
7.3. Les deutéromycètes .....	11
8 .Conditions physicochimiques de croissance.....	11
8.1. Oxygène .....	11
8.2.Température.....	11
8.3. pH.....	11
8.4. Pression osmotique et l'activité d'eau.....	12
9.Biotechnologie des levures.....	12
10. Isolement des levures.....	13

## .Les enzymes

1. $\alpha$ -amylase (EC 3.2.1.1).....	15
1.1 .Définition .....	15
1.2. Nomenclature .....	15
1.3. Structure .....	15
1.4. Origine des $\alpha$ -amylases .....	16
1.4.1. Origine animale : .....	16
1.4.2. Origine végétale .....	16
1.4.3. Origine microbienne .....	17
1.5. Mode d'action .....	18
1.6. Application industriel.....	19
1.6.1. Traitement de la nourriture .....	19
1.6.2. Industrie du papier .....	19
1.6.3. Détergents biologique .....	19
2. Cellulase EC (3.2.1.4).....	20
2 .1. Définition.....	20
2.2. Nomenclature.....	20
2.3. Origines des cellulases.....	20
2.3.1. Origine animale.....	20
2.3.2. Origine végétale.....	20
2.3.3. Origine microbienne.....	21
2.4. Mode d'action .....	21
2.5. Applications industrielles des cellulases .....	22
3. Maltase (EC 3.2.1.20).....	23
3.1. Définition.....	23
3.2. Nomenclature.....	24
3.3. Structure de la maltase.....	24
3.4. Mode d'action .....	25
3.5. Applications de la maltase en industrie .....	25
4. Pectinase (EC 3.2.1.15).....	26
4.1. Définition .....	26
4.2. Nomenclature.....	26
4.3. Mode d'action.....	27
4.4. Origine de la pectinase .....	28

4.4.1 Origine animale .....	28
4.4.2 Origine végétale.....	29
4.4.3.Origine microbienne .....	29
4.5. Utilisation industrielle de la pectinase .....	29
5. Protéase (EC 3.4.21-24.).....	30
5.1. Définition .....	30
5.2. Origine de protéase.....	30
5.2.1. Protéases d'origine végétale .....	30
5.2.2. Protéases d'origine animale .....	30
5.2.3. Protéases d'origine microbienne .....	31
5.3. Mode d'action de protéase.....	31
5.4. Applications industriel des Protéases .....	32
5.4.1. Industrie des détergents.....	32
5.4.2. Tannerie.....	32
5.4.3. Industries alimentaires.....	32
5.4.4. Autres applications.....	33
6. laccases (EC 1.10.3.2, oxydase p-diphénol).....	33
6.1. Définition .....	33
6.2. Structure des laccases.....	34
6.3. Source de laccases .....	35
6.4. Applications des laccases.....	36
6.4.1. Industrie alimentaire.....	36
6.4.2. Industries textiles, des colorants, de la pâte à papier.....	36
6.4.3. Autre applications.....	37

### **Matériel et méthodes**

I. Isolement des levures.....	38
1. Echantillonnage.....	38
2. Milieu d'isolement.....	40
3. Préparation des solutions mères.....	40
3.1.Solution mère de déchet de pomme de terre.....	40
3.2.Solution mère du yaourt.....	40
3.3. Solution mère du miel.....	40
4. Préparation des dilutions.....	40
5. Repiquage des souches.....	40

6. Purification des souches.....	40
7. Conservation des souches.....	41
II. Mise en évidence des activités enzymatiques.....	41
1. Détermination de l'activité cellulasique.....	41
2. Détermination de l'activité maltasique.....	42
3. Détermination de l'activité de pectinase.....	42
4. Détermination de l'activité de laccase.....	42
5. Détermination de l'activité d'alpha amylase.....	42
6. Détermination de l'activité de protéase.....	43
7. Révélation.....	43

## **Résultats et discussion**

1. Isolement des souches de levures.....	45
2. Caractères cultureux et morphologique.....	49
2.1. Etude macroscopique.....	49
2.2. Etude microscopique.....	54
3. Mise en évidence des activités enzymatiques.....	59
3.1. Production d'alpha amylase.....	60
3.2. Production de la cellulase.....	61
3.3. Production de la protéase.....	63
3.4. Production de la pectinase.....	66
3.5. Production de laccase.....	67
3.6. Production de la maltase.....	69
Conclusion générale.....	72
Références bibliographiques.....	74
Résumés.....	98



## Liste des abréviations

Å : ångström

ABTS : 2,2-azinobis-3-éthyl-thiazoline-6-sulfonate

ASP : Aspartate

Cu<sup>+</sup> : Cuivre

Glu : Glutamate.

GMA : Génie microbiologique et application

H<sub>2</sub>O :Eau

HG : homogalacturonane

HOBT : hydro xybenzotriazole

M : Miel

Na Cl : Chlorure de sodium

NHPT : N-hydro-xyphthalimide:

O<sub>2</sub> : Oxygène

P : Déchet de pomme de terre

PE: pectinestérase

PG : polygalacturonase.

PGL : polygalacturonate lyase

PMG : polyméthylgalacturonase

PMGL : polyméthylgalacturonate lyase

p-NPG : P-Nitrophenyl beta-Dglucopyranoside

RG : rhamnogalacturonanes

Y : yaourt

YGC : Yeast extract Glucose Chloramphenicol

YNB : Yeast Nitrogen Base

YPCA : Yeast extract-Peptone-Cellulose-Agar

YPGA : Yeast extract-Peptone-Glucose-Agar

YPMA : Yeast extract-Peptone-Maltose-Agar

YPPA : Yeast extract-Peptone-Pectin-Agar

## Liste des figures

<b>Figure 01</b> : Présentation d'une cellule de levure.....	5
<b>Figure 02</b> : Schéma de la reproduction asexuée par bourgeonnement d'une levure .....	9
<b>Figure 03</b> : Schéma de la reproduction asexuée par scission d'une levure.....	9
<b>Figure 04</b> : Schéma de la reproduction sexuée d'une levure.....	10
<b>Figure 05</b> : Schéma des différents domaines d'utilisation des levures.....	12
<b>Figure 06</b> : Structure monomérique de l' $\alpha$ -amylase.....	16
<b>Figure 07</b> : Mécanisme catalytique des hydrolases glycosyliques .....	19
<b>Figure 08</b> : Structure monomérique de la maltase liée à 4-O- $\alpha$ -D-Glucopyranosyl- Dglucose chez <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	22
<b>Figure 09</b> : Structure de l'acide polygalacturonique (pectine).....	25
<b>Figure 10</b> : Mode d'action des pectinases PMGL.....	28
<b>Figure 11</b> : Structure chimique d'une portion du site actif de la laccase montrant l'emplacement des atomes de cuivre impliqués dans la réaction enzymatique.....	34
<b>Figure 12</b> : Différent échantillon utilisé pour l'isolement des levures.....	39
<b>Figure 13</b> : Fréquence des souches levuriennes.....	46
<b>Figure 14</b> : Fréquence des souches productrice d'alpha amylase.....	60
<b>Figure 15</b> : Mise en évidence de l'alpha amylase.....	61
<b>Figure 16</b> : Production qualitative de l'alpha amylase.....	61
<b>Figure 17</b> : Fréquence des souches productrice de la cellulase.....	62
<b>Figure 18</b> : Mis en évidence de la cellulase.....	62
<b>Figure 19</b> : Production qualitative de la cellulase.....	63
<b>Figure 20</b> : Fréquence des souches productrice de protéase.....	64

<b>Figure 21</b> : Mise en évidence de protéase.....	65
<b>Figure 22</b> : Production qualitative de protéase.....	66
<b>Figure 23</b> : Fréquence des souches productrice de pectinase.....	66
<b>Figure 24</b> : Mise en évidence de pectinase.....	67
<b>Figure 25</b> : Production qualitative de la pectinase.....	67
<b>Figure 26</b> : Fréquence des souches productrice de laccase.....	68
<b>Figure 27</b> : Mise en évidence de laccase.....	68
<b>Figure 28</b> : Production qualitative de laccase.....	69

## Liste des tableaux

<b>Tableau 01</b> : Sources de carbones pouvant être utilisés par les levures.....	6
<b>Tableau 02</b> : Importance de certains oligoéléments et vitamines pour la croissance des levures.....	8
<b>Tableau 03</b> : Quelques levures productrices d' $\alpha$ amylase.....	17
<b>Tableau 04</b> : Matériel utilisé pour la réalisation des manipulations.....	38
<b>Tableau 05</b> : Caractères cultureux des souches de levures isolées après une culture de deux jours sur YPGA à 25°C.....	50
<b>Tableau 06</b> : Caractères morphologiques des souches de levures isolées cultivées pendant 2 jours à 25°C dans YPGA.....	55
<b>Tableau 07</b> : Mise en évidence des activités enzymatiques des 17 souches de levures sélectionnées.....	59



*Introduction générale*

Les levures, en tant qu'usine cellulaire, sont les sources les plus exploitées dans une large gamme d'applications industrielles biotechnologiques (**Singh et al., 2015**), en raison de leur thermorésistance avérée et leur caractère non pathogènes (GRAS) (**Sindhu et al., 2009**).

Depuis très longtemps, les enzymes ont toujours fait partie de notre vie quotidienne (**Museum., 2004**). Elles sont présentes dans toutes les cellules et sont indispensables pour la survie de toutes les espèces vivantes. En effet, les enzymes sont capables de dégrader et de transformer différents composés se trouvant dans l'environnement du vivant. Un avantage pouvant être utilisé par certaines industries dans différents domaines. L'emploi des enzymes connaît un succès remarquable et ouvre des perspectives nouvelles. En effet, certaines industries n'ont vu le jour que grâce à la mise sur le marché d'enzymes purifiés.

Les enzymes de levures sont de plus en plus utilisées en industries pour faciliter les procédés et diminuer le coût énergétique du produit fini en particulier dans les industries agroalimentaire. La recherche des nouvelles enzymes de levures possédant un potentiel d'application industrielle (**Johnson et Echavarri-Erasum, 2011**).

Au cours des dernières décennies, des recherches importantes ont été entreprises sur les capacités des enzymes à être appliquées industriellement : forte thermostabilité et reproductibilité dans le temps par le biais de la biotechnologie, la biochimie et la microbiologie qui assurent une maîtrise hautement qualifiée, répondant aux besoins industriels, industrie agro-alimentaire ou pharmaceutique (**Rigoldi et al., 2018**). Ceci offre de nombreuses possibilités de valorisation des coproduits qui constituent une matière première permettant de réduire les coûts de production, dont le lactosérum, le principal coproduit des industries laitières (**Moletta, 2002**).

Le marché mondial des enzymes industrielles croit de 6,5% par an selon Reiss, 2007, en 2010 il devrait les 3,3 milliards USD. Pour certains pays, comme le Danemark ou la Finlande, la production d'enzymes représente plus de 30 % de leur industrie nationale en biochimie. En 2015, les lipases ont occupé 38,5 % du marché mondial, suivies par les amylases à 30,5 % (**Morvan, 2010**). Parmi les hydrolases figurent les  $\alpha$ -glucosidases et les  $\alpha$ -amylases extracellulaires en particulier. Elles sont commercialisées grâce à la diversité de leur application (amidonnerie, glucoiserie, brasserie) (**Khady, 2013**, **Carvalho et al., 2008**, **Arikan, 2007** et **Pandey et al., 2000**). La production de

ces enzymes par une grande variété de microorganismes existe depuis longtemps (Gupta *et al*, 2003), tel que le genre bactérien *Bacillus* (Sivaramakrishnana *et al*, 2006) et les microorganismes fongiques appartenant surtout aux genres *Aspergillus* et *Penicillium*, du fait que la première production de l'  $\alpha$ -amylase a été réussie par Takamine en 1894. (Djekrif-Dakhmouche S. 2016).

La production des enzymes à l'échelle industrielle est réalisée, généralement, à partir des bactéries et moisissures et peu de levures et actinomycètes sont utilisés pour cette production.

Pour cela, la recherche de nouveaux micro-organismes (levures) qui peuvent être utilisés pour la production d'enzymes est un processus continu.

Et pour améliorer l'économie (diminution du coût de l'importation des enzymes), il serait intéressant de produire des enzymes à utilisation industrielle à partir des microorganismes (levures) locaux.

Les levures sont très peu étudiées pour la production des enzymes ce qui donne à notre travail un caractère novateur.

L'objectif principal de cette étude consiste à isoler, dans un premier temps, des levures microbiennes locales à partir de trois échantillons : déchets de pomme de terre, yaourt et miel et dans un deuxième temps, mettre en évidence la production de six enzymes (protéase,  $\alpha$ -amylase, cellulase, pectinase, maltase, laccase) par les souches isolées.

Dans ce manuscrit, la première partie présente une étude bibliographique divisée en deux chapitres distincts. Le premier rapporte des données générales sur les levures, leur utilisation industrielle et l'isolement de ces microorganismes. Le deuxième portera sur les différentes enzymes étudiées et se focalisera plus précisément sur le mode d'action, l'origine et l'application industrielle de chaque enzyme.

La deuxième partie est consacrée aux matériels et aux protocoles expérimentaux mis en place pour la réalisation de ce travail de mémoire.

La troisième partie représente et discute l'ensemble des résultats obtenus à la suite de cette étude.

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







*Revue bibliographique*

## Les levures

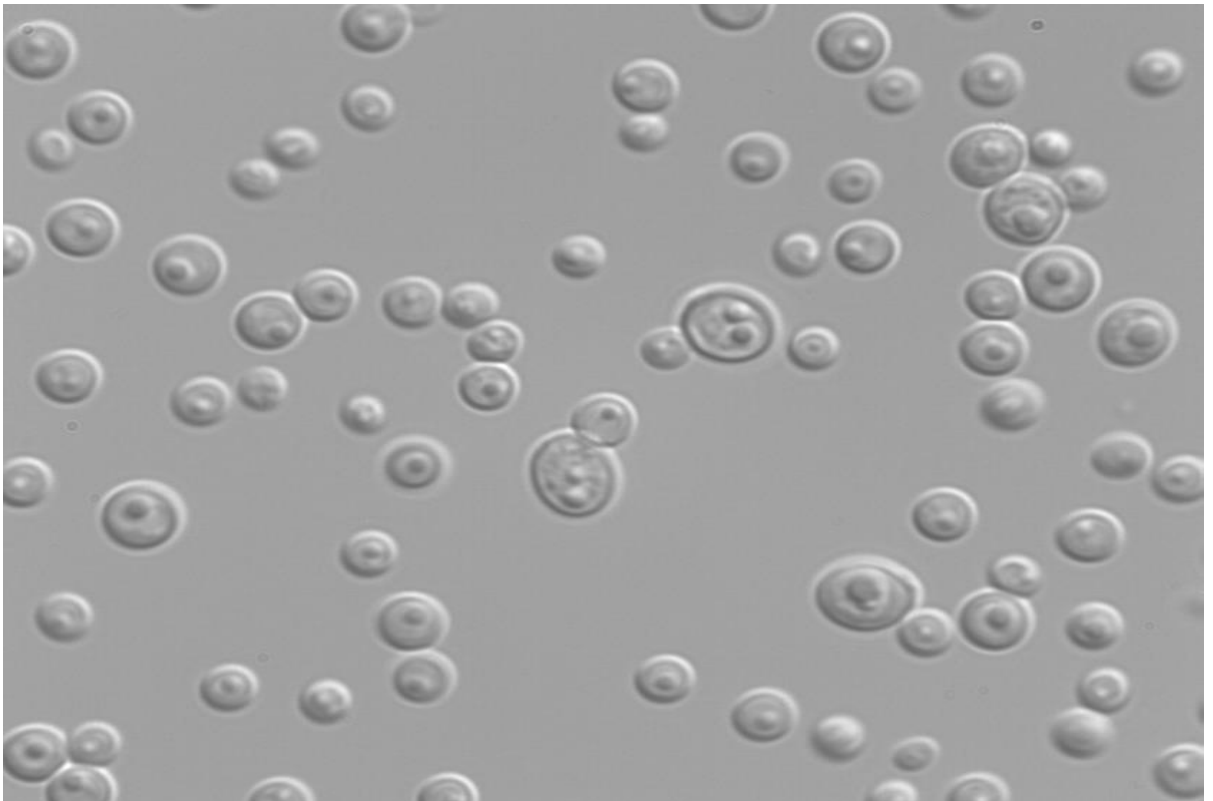


Photo **Dakhmouche** (2016) (*Clavispora lusitanae*)

## Les levures

### 1. Généralités

Le mot levure provient du mot latin «levare » qui se traduit par « lever » (**Oteng Gyang, 1984**). Les levures sont des eucaryotes hétérotrophes faisant partie du groupe des champignons dont on les distingue par leur caractère unicellulaire et généralement l'absence de vrai mycélium. Elles sont microscopiques et immobiles (**Guiraud et Galzy, 1998**).

Les levures sont des micro-organismes eucaryotes unicellulaires qui appartiennent au domaine des champignons. Certains de ces ascomycètes peuvent former un mycélium ou un pseudomycélium (**Kurtzman et al., 2011 et Barnett et al., 2000**).

Les levures se distinguent des procaryotes tels que les bactéries par la possession d'un noyau cellulaire et sont également beaucoup plus grand (**Site 1**)

### 2. Historique

Elles sont également les premiers micro-organismes à être observés au microscope par A. Van Leeuwenhoek en 1680 qui les a dessinées. Ce n'est qu'avec les travaux de Pasteur (1866-1876) que le rôle des levures dans la fermentation alcoolique a été mis en évidence. A la même époque, la levure fut à l'origine du développement de la biochimie avec notamment les travaux de Büchner. A l'heure actuelle, les levures constituent un matériel expérimental de choix en raison de leur double état de micro-organismes et d'eucaryotes (**Pol, 1996**).

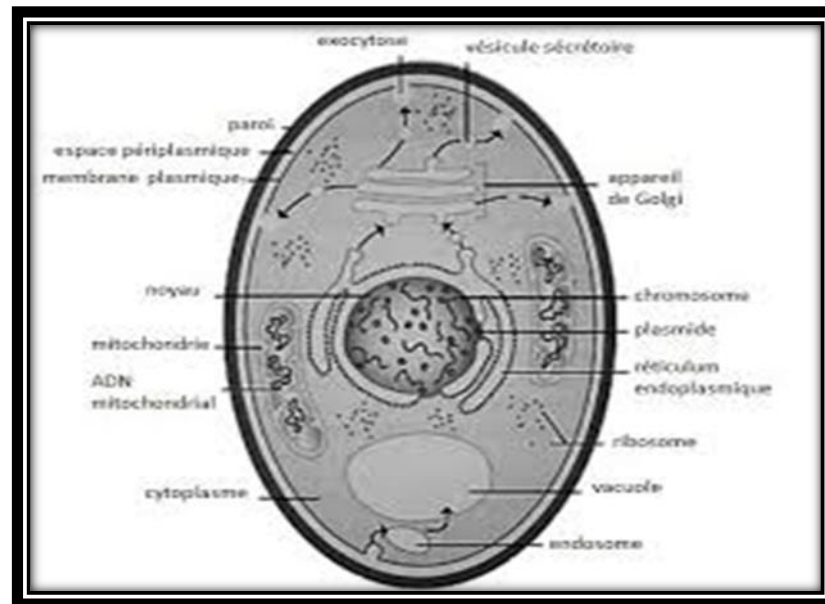
### 3. Habitats

Les levures sont des espèces ubiquitaires, largement distribuées dans la nature. Elles se rencontrent sur les végétaux riches en sucre directement assimilables (**Bouix et Leveau, 1991**). En effet, les milieux fortement concentrés en sucre représentent un de leur environnement préférés, comme les sirops, le miel, les fleurs et de nombreux fruits (les pommes, les raisins) (**Adewara et al., 2013, Greppi et al., 2013, Jimoh et al., 2012, Oteng-Gyang, 1984 et Leclerc, 1975**).

D'autres écosystèmes où se développent des levures : à la surface ou à l'intérieur d'autres êtres vivants, dans les eaux, dans l'atmosphère et dans le sol (Thanh, 2006, Leveau et Bouix, 1993)

#### 4. Morphologie

Les levures sont des cellules eucaryotes. Elles présentent une structure plus complexe que celle des bactéries notamment par la présence d'un noyau, de mitochondrie, d'un appareil de golgi (Figure 01) et de plus d'un chromosome (saccharomyces cerevisiae a 16 chromosomes) (Labrecque, 2003). Les cellules végétatives sont généralement ovoïdes ou sphériques, mais il existe d'autre formes spécifiques : triangulaires, ogivales, en forme de citron ou même en forme de bouteille. Leur taille cellulaire varie de quelques microns jusqu'à 25 à 30 microns. Certaines peuvent former des associations cellulaires ou se présenter sous forme filamenteuse à un certain stade de leur vie (Bouix et Leveau, 1991). Les colonies sont, en général, blanches (très rarement roses ou rouges) et régulières (Guiraud, 1998).



**Figure 01** : Présentation d'une cellule de levure (Manyri, 2005).

#### 5 .Besoin nutritionnelles

Les levures, comme tous les champignons, sont hétérotrophes et exigent donc du carbone organique. Certaines se contentent de glucose, d'autres demandent en outre

vitamines, amino-acides. Leurs besoins azotés sont généralement couverts par des sels d'ammonium, mais d'autres substances peuvent être utilisées : acides aminés, urée..., ou même les nitrates chez le genre *Hansenula*.

### 5.1 Source carbonée

Les levures étant des chimio hétérotrophes ont besoin de sources carbonées (Walker, 2009). Les sources carbonées sont d'une grande importance pour la biosynthèse des constituants cellulaires variés (les glucides, les lipides, les protéines et les acides nucléiques), leur oxydation fournit l'énergie à la cellule (Larpent, 1991). Certaines levures peuvent utiliser une large gamme de substrats carbonés (Tableau 01), mais d'autres assimilent seulement un petit nombre de composés (Bourgeois et Leveau, 1991). Les sources les plus efficaces sont des oses (glucose, fructose et mannose) qui sont utilisables par plus de 400 espèces identifiées (Pol, 1996 et Walker 2009).

**Tableau 01:** Source de carbones pouvant être utilisés par les levures (Walker et White, 2005).

Source de carbone	Exemples
Hexoses	D-glucose, D-galactose, D-fructose, D-mannos.
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 organiques	acétate, citrate, lactate, malate, pyruvate, succinate.
Hydrocarbones	Alcanes.
Acide gras	Oléate, palmitate .
Composés aromatique	Phénol, crésol, quinol,

	resorcinol,catechol,benzoate .
Déchets agroalimentaires et industriels	Déchets de tomate, d'orange, rebut de datte,lactosérum...

## 5.2 Source azotée

La plupart des levures sont capables d'assimiler différentes sources d'azote organiques (peptone, extrait de levure, glutamine, base purines et pyrimidines...), l'extrait de levure constitue le principal stimulateur de la croissance microbienne en particulier pour les levures (**Deak, 2006 et Walker *et al.*, 1998**).

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 est largement répandue chez ces dernières. Cependant, d'autres espèces levuriennes se caractérisent par une capacité à utiliser les nitrates et d'autres composés comme source d'azote (les acides aminés, l'urée, la biotine et les bases puriques et pyrimidiques (**Bouix et Leveau, 1991**). Tandis que le moût de raisin est relativement riche en constituants azotés (0,1 à 1g/L d'azote soluble), même s'ils ne représentent qu'environ le quart de l'azote total de la baie ; ils comprennent le cation d'ammonium (3 à 10% de l'azote total), des acides aminés (25 à 30%), des polypeptides (25 à 40%), et des protéines (5 à 10%).

## 5.3 Oligoéléments et facteurs de croissance

Les levures ont besoin d'éléments nutritifs pour assurer un développement adéquat. Il s'agit de sels minéraux et d'oligoéléments nécessaires à de très faibles concentrations (**Larpen-Gourgaud et Sanglier, 1992**). Ils agissent en complément des protéines comme activateurs ou stabilisateurs d'enzymes et peuvent stimuler la croissance. Parmi les métaux alcalins indispensables :  $Mg^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$  et  $Mn^{2+}$  (**Pommier, 2003**) (Tableau 02). Les vitamines (la biotine, la thiamine et l'acide pantothénique) aussi agissent à faible concentration, sur la multiplication et l'activité cellulaire (comme facteurs de croissance) (Tableau 02).

**Tableau 02 :** Importance de certains oligoéléments et vitamines pour la croissance des levures (Lourens et Reid, 2002 et Walker, 2000)

Oligoélément et facteurs de croissance	Rôle
Magnésium	Stabilité et perméabilité des membranes. Protection de la cellule contre les facteurs négatifs, tels que le choc thermique et la toxicité de l'éthanol.
Manganèse	Appui la synthèse de la thiamine et des protéines, ce qui contribue à l'augmentation de la biomasse
Biotine	Essentielle dans la réaction de carboxylation et de décarboxylation. Production des alcools et des esters
Thiamine	Synthèse de l'isoleucine et de la valine.
Acide pantothénique	Synthèse de l'acétyl- CoA. Production des acides gras et des acides aminés
Riboflavine( B2 )	Déshydrogénation et transport d'électron.
Acide pantothénique	Synthèse de l'acétyl- CoA. Production des acides gras et des acides aminés

## 6. Reproduction des levures

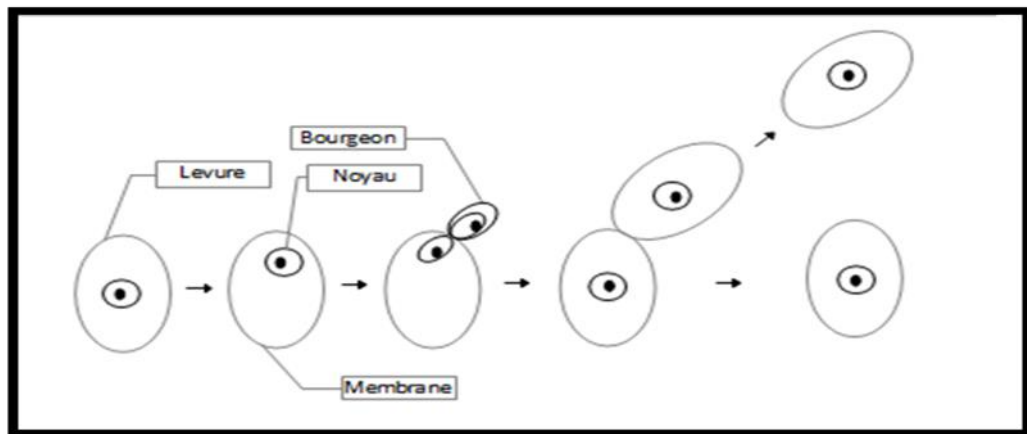
On appelle levures sporogènes celles qui se reproduisent soit de façon sexuée, soit de façon asexuée, suivant les conditions de milieu, et levures asporogènes, celles se reproduisent uniquement de façon asexuée (Pierre, 2004).

### 6.1 Reproduction asexuée

Suivant l'espèce de la levure, cette multiplication végétative se réalise par bourgeonnement ou par scission.

### 6.1.1 Reproduction asexuée par bourgeonnement

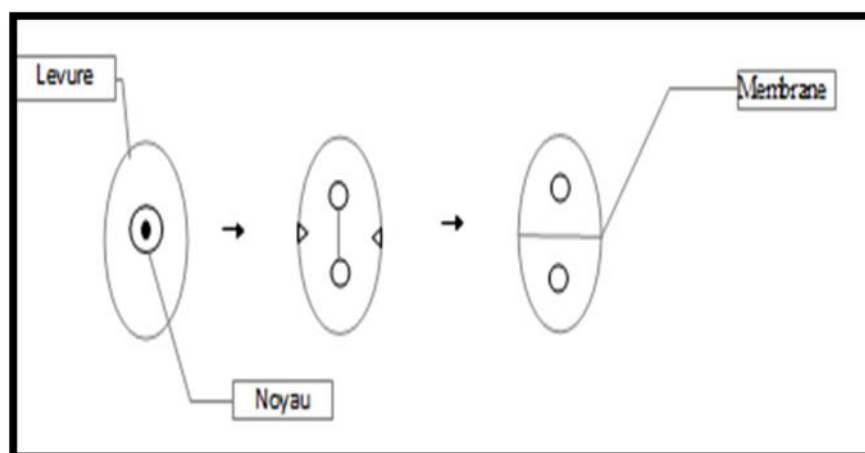
Le noyau de la cellule se déplace vers la paroi, s'étire et se divise en donnant naissance à un petit bourgeon à la surface de la cellule. Celui-ci croît rapidement pour donner naissance à une cellule fille qui peut ou non se détacher de la cellule mère et bourgeonner à son tour (Figure 02).



**Figure 02** : Schéma de la reproduction asexuée par bourgeonnement d'une levure (Thuriaux, 2004).

### 6.1.2 Reproduction asexuée, par scission-Scissiparité

Le noyau s'étire et se divise en deux. Pendant ce temps, une séparation s'amorce au niveau de la paroi, ce qui conduit à la formation de deux cellules (Figure 03).

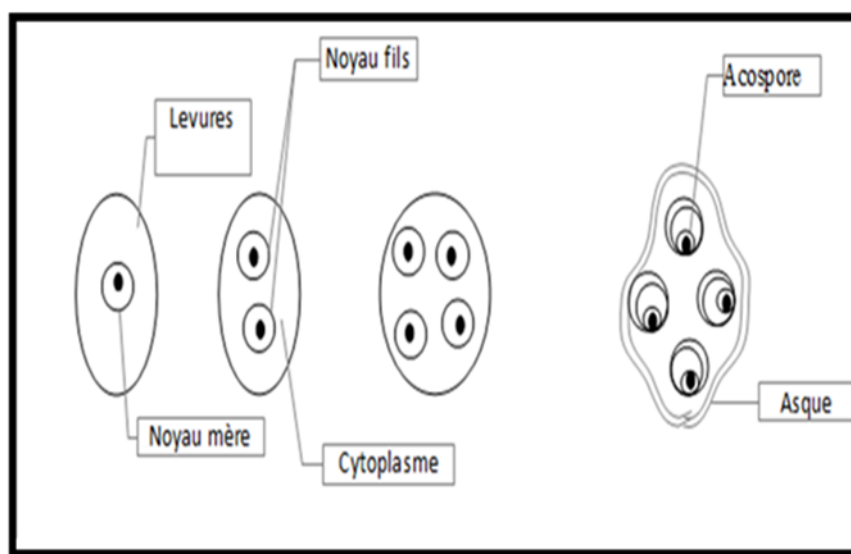


**Figure 03** : Schéma de la reproduction asexuée par scission d'une levure (Thuriaux, 2004).



## 6.2 Reproduction sexuée

Lorsque les conditions de milieu deviennent défavorables (température extrêmes, absence d'éléments nutritifs ...), 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. Elle renferme 2 à 4 ascospores qui sont à l'état de vie ralentie et qui ne reprendront leur vie active que lorsque les conditions du milieu seront favorables. Les ascospores représentent le mode de survie durant la mauvaise saison (Figure 04).



**Figure 04** : Schéma de la reproduction sexuée d'une levure (Thuriaux, 2004)

## 7. Classification

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). La classification de référence est actuellement celle de (Kreger-Van, 1984) qui présente des changements sensibles par rapport à la précédente de (Lodder, 1971). En particulier, de nouveaux critères taxonomiques comme la composition en bases de l'ADN, la structure de la paroi, le type de coenzyme Q sont pris en compte pour permettre des études plus rigoureuses. La classification actuelle répertorie 60 genres et 500 espèces (Bouix et Leveau, 1991).

### 7.1 Les ascomycètes:

Ils se reproduisent par un processus sexué dans un asque résultant de la transformation d'une cellule après méiose.

### 7.2 Les basidiomycètes:

Ils réalisent une reproduction sexuée avec formation de basidiospores sur une baside.

### 1.3 Les deutéromycètes:

Ils regroupent l'ensemble des levures ne présentent pas de mode connu de reproduction sexuée, ne se multipliant que par reproduction végétative.

## 8 Conditions physico-chimiques de croissance

### 8.1 Oxygène

Toutes les levures sont capables de se développer en présence d'oxygène, il n'y a pas de levures anaérobies strictes. Certaines levures sont aérobies strictes comme les *Rhodotorula*. Les autres sont aéro-anaérobies facultatives préférant un métabolisme soit fermentaire (comme les *Saccharomyces*) soit respiratoire (*Candida*, *Kluyveromyces* ...) (**Bouix et Leveau, 1991**).

### 8.2. Température

La température courante de culture des levures se situe entre 25 et 30°C, pour assurer la croissance adéquate de la plupart des levures. En effet, on trouve des levures psychrophiles, mésophiles et thermophiles (50°C pour *Candida slooffii*, *Saccharomyces telluris*) (**Bourgeois et Larpent, 1996**).

### 8.3 pH

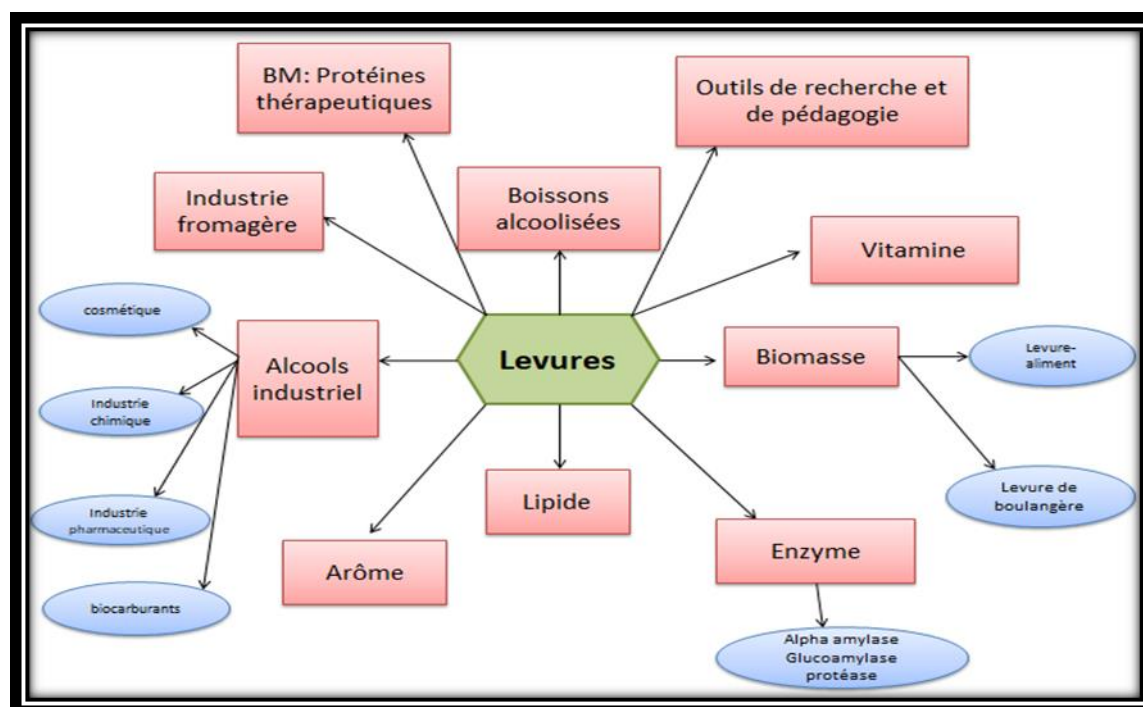
Les levures ont tendance à coloniser des environnements acides (leurs enveloppes cellulaires sont imperméables aux ions  $H_3O^+$  et  $OH^-$  et par leurs métabolismes acidifiant encore plus le milieu. Elles donc tolèrent des gammes de pH de 2,4 à 8,6 (**Bourgeois et Larpent, 1996**)).

#### 8.4. Pression osmotique et l'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 (betaine, glycérol). Par conséquent, certaines espèces sont osmophiles mais avec un métabolisme lent. Ces levures sont dites xérotolérants (**Bourgeois et Larpent, 1996**).

#### 9 .Biotechnologie des levures

Les levures sont utilisées par l'homme depuis des millénaires avec une large application, à la fois fondamentale et industrielle, dans les disciplines scientifiques, alimentaires, médicales et agricoles., Les levures sont traditionnellement impliquées dans de nombreuses fermentations alimentaires et la fabrication de produits tels que les bières, les cidres, les vins, le saké, les produits de boulangerie, le fromage, les saucisses et autres aliments fermentés (figure05). Des procédés industriels impliquent, depuis longtemps, des levures dans la production d'éthanol-carburant, de protéines unicellulaires (SCP) pour l'alimentation animale ou d'enzymes industrielles, la production de vaccins et de caroténoïdes (**Djekrif,2016 ; Buzzini, 2000 ; Jacob, 1997**).



**Figure 05:** les différents domaines d'utilisation des levures (**Bourat, 1992**).

## 10. Isolement des levures

Les levures occupent une place essentielle dans l'industrie alimentaire. Elles participent à la fabrication de nombreux produits alimentaires (brasserie, cidrerie, vinification, fromagerie) mais aussi à la valorisation des déchets agricoles et industriels et à la production des protéines. Aussi, les levures sont les microorganismes idéaux pour la revalorisation de déchets agricoles et industriels et pour la fabrication de protéines d'appoint. La présence de levure est donc fréquente dans beaucoup d'aliments et de nombreux industriels sont amenés à les manipuler.

Mais si les levures sont des agents d'altérations des produits alimentaires, elles demeurent par ailleurs des organismes intéressants, exploités pour leurs potentialités propres ou comme support de nouvelles propriétés.

Et mis à part le fait qu'on peut se procurer rapidement des souches entretenues dans les collections internationales (elles servent notamment de références), il est indispensable d'opérer un travail systématique de prélèvement à partir du milieu naturel et des matières organiques en décomposition. C'est ainsi qu'on a pensé à isoler des levures, à partir des denrées et des déchets alimentaires.

Différents travaux de recherches se sont intéressés à l'isolement des levures à partir de différents échantillons. 12 souches de levures ont été isolées à partir du blé dur provenant d'une zone aride (Sahara Algérien). Après identification, ces levures appartiennent aux *Clavispora lusitaniae*, *Pichia guilliermondii*, *Pichia caribbica*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Meyerozyma guilliermondii*. Et il s'est avéré que ces souches levuriennes sont productrices de l' $\alpha$ -amylase et de Pullulanase (**Djekrif,2016**),

A partir du sol palmeraies (dattier, olivier et vigne) et sol du steppe,( **Bennamoun ,2017**) a isolé 20 souches de levures de différent genre : *Clavispora lusitaniae*, *Cryptococcus magnus*, *Meyerozyma guilliermondii*, *Aureobasidium pullulans* et *Yarrowia lipolytica*. Cette étude a montré que ces levures sont productrices de pectinase, amylase, protéase, lipase et estérase.

A partir du sol saharien algérien (palmeraies de biskra), 05 souches de levures sont isolées et purifiées sur le milieu PDA. Et la souche sélectionnée pour la production de l' $\alpha$ -amylase correspond à *Lipomyces sp* (**Merabti, 2006**).

Labbani (2015) a isolé 15 souches de levures à partir de deux biotopes dans la région de Constantine (Nord Est Algérien) : sol agricole situé dans la localité de Hama Bouziane (Nord- Est Constantine, 15 Km) et le sol forestier localisé dans le campus Chaab-Ersas de l'Université Frères Mentouri Constantine. Après identification, ces levures appartiennent aux *Pichia kluyveri*, *Hanseniaspora opuntiae*, *Meyerozyma guilliermondii*, *Saccharomyces cerevisiae* et *Cryptococcus aerius*.

## Les enzymes

### 1. $\alpha$ -amylase (EC 3.2.1.1)

#### 1.1 Définition

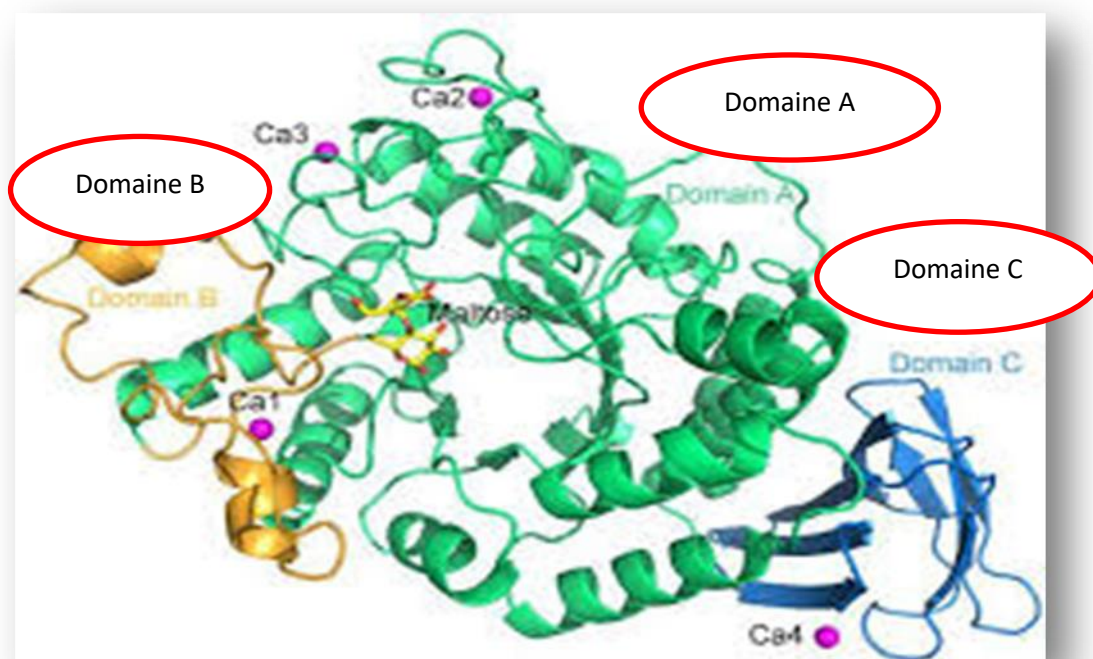
L' $\alpha$ -amylase (EC 3.2.1.1) est une protéine globulaire appartenant à la famille des glycosides hydrolases nommée GH13. Elles regroupent près de 28 000 séquences de protéine avec différentes spécificités (**Janeček et al., 2014**). Elle est une enzyme ubiquitaire, synthétisée dans tous les genres de la vie (**Merabti, 2006**).

#### 1.2 Nomenclature

- ✓ Nom codifié : EC 3.2.1.1
- ✓ Nom commun :  $\alpha$  -amylase
- ✓ D'autres nom (s): glycogénase,  $\alpha$ -amylase; endoamylase; Taka-amylase A, maxilase.
- ✓ Nom systématique: 1,4 – alpha -D-glucane,4 glucano hydrolase
- ✓ Synonymes: glycogenase, endoamylase, maxilase, taka-amylase A. (**Schomburg and Salzmann ,1991**).

#### 1.3 Structure

L' $\alpha$ -amylase fongique est une glycoprotéine monomérique (**De Souza et al., 2010**) comportant trois domaines globulaires (A, B et C) (**Li et al., 2014**). Le domaine A forme un tonneau ( $\beta / \alpha$ )<sub>8</sub> et porte le site actif à la partie C-terminale des feuillets  $\beta$ . Le domaine B forme une boucle à partir du milieu du domaine A et constitue une sorte de couvercle au-dessus du site actif (figure 06). Quant au domaine C, il constitue un tonneau de 8 feuillets  $\beta$  antiparallèles (**Benaouida, 2008**).



**Figure 06** : Structure monomérique de l' $\alpha$ -amylase (Li *et al.*, 2014).

#### 1.4 Origine d' $\alpha$ -amylase

Les  $\alpha$ -amylases sont des enzymes abondantes dans tous les règnes. Cependant, les sources microbiennes sont les plus préférées pour la production à grande échelle (Haq *et al.*, 2003).

##### 1.4.1. Origine animale

Généralement, l' $\alpha$ -amylase est extraite de la salive humaine et du pancréas des mammifères, tels que les porcs et les veaux (Chatterton *et al.*, 1996 Bertheau *et al.*, 1985).

##### 1.4.2. Origine végétale

Cette enzyme joue, chez les plantes, un rôle important dans le métabolisme glucidique, où elle participe à l'hydrolyse de l'amidon en produisant des sucres réducteurs (glucose et maltose) directement assimilables (Badot *et Merlin*, 1984). Elle est obtenue par extraction à partir des céréales, notamment le blé, l'orge, le son ou le riz (Srinivasa *et al.*, 2004).

### 1.4.3. Origine microbienne

Deux types sont distingués : les  $\alpha$ -amylases bactériennes et les  $\alpha$ -amylases fongiques :

#### ✓ Les $\alpha$ -amylases bactériennes

Ce type d'enzymes est obtenu principalement par fermentation de Bacillacées (Milner *et al.*, 1997). Il s'agit de *Bacillus subtilis* et *Bacillus amyloliquefaciens* (Haq *et al.*, 2003). De nombreuses amylases aux propriétés industrielles ont été découvertes chez des bactéries acidophiles ; *Penicillium grisofulvum* (Ertan *et al.*, 2006), alcalinophiles ; *Thermobifida fusca* (Yang *et al.*, 2010) et thermophiles ; *Bacillus cohnii* (Panchal, 1990 et Fogarty et Kelly, 1980) et *Bacillus licheniformis* (Yihan, 2010, Cordeiro *et al.*, 2002) . Ces enzymes interviennent dans la transformation de l'amidon par fragmentation rapide en clivant les liaisons  $\alpha$  (1,4) (Nadirman *et al.*, 2006).

#### ✓ Les $\alpha$ -amylases fongiques

La production industrielle d'enzymes, à partir des microorganismes fongiques notamment les genres *Aspergillus* et *Penicillium*, existe depuis longtemps, du fait que la première production d'  $\alpha$ -amylase a été réussie par Takamine en 1894. Les levures sont les organismes les plus employées dans la production de biomasse, à valeur nutritive élevée (Leveau et Bouix, 1993). Cependant, différentes levures sont productrices d' $\alpha$ -amylase (tableau 3).

**Tableau 3 :** Quelques levures productrices d' $\alpha$  amylase.

Levure	Références
<i>Schwanniomyces sp</i>	<b>Haifeng <i>et al.</i>, 2006</b>
<i>Pichia polymorpha</i>	<b>Gonzalez <i>et al.</i>, 2008</b>
<i>Candida utilis</i>	<b>Ouédraogo <i>et al.</i>, 2012</b>
<i>Candida guilliermondi</i> <i>Candida famata</i> <i>Trichosporon mucoides</i>	<b>Acourene et Ammouche, 2011</b>
<i>Lipomyces kononenkoa</i>	<b>Boukhennane et Boudebza, 2014</b>
<i>Talaromyces pinophilus</i>	<b>Liang <i>et al.</i>, 2015</b>

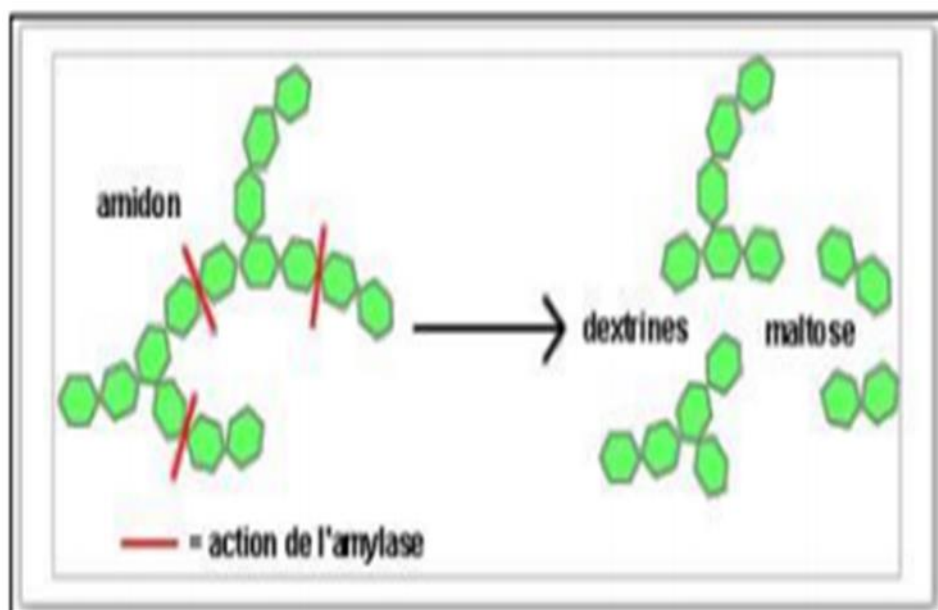


<i>Clavispora lusitaniae</i>	<b>Ranjan et al., 2016 , Ranjan et Sahay, 2015 , Djekrif et al., 2014 .</b>
------------------------------	---

### 1.5 Mode d'action

L' $\alpha$ -amylase par sa capacité à modifier un certain nombre des propriétés de l'amidon, participe à de nombreuses applications, permettant la fabrication des sucres adaptés aux demandes spécifiques des utilisateurs en industrie alimentaire (**Palmer, 1975**).

L' $\alpha$ -amylase agit sur les polysaccharides (amidon, glycogène) et les oligosaccharides (figure 07).



**Figure 07:** Mode de d'action de l' $\alpha$ -amylase (**Florimont, 2013**).

Elle hydrolyse les liaisons glucosidiques ( $\alpha$ -1,4) de l'amidon et des substrats relatifs (**Heslot, 1996**). Son action peut se faire de différentes façons :

- Attaque aléatoire**, en coupant les liaisons ( $\alpha$ -1,4) à partir de l'extrémité non réductrice. Il en résultera, principalement, la formation de glucose, de maltose et surtout d' $\alpha$ -dextrines (**Scriban, 1999**).
- **Mécanisme uni-chaîne** où l' $\alpha$ -amylase dégrade une chaîne avant de passer à l'autre. Cette action est due à la formation du complexe actif avec

le premier substrat. L'enzyme catalyse la réaction et ne forme pas de complexes actifs, jusqu' à l'achèvement de la dégradation de la première chaîne (**Berry et Paterson, 1990**).

- **Mécanisme multi-chaîne**, la dégradation des chaînes est simultanée (**Pazur et Marchetti, 1992**).

## **1.6. Application industriel**

### **1.6.1. Traitement de la nourriture**

- Production de sucre à partir d'amidon : fabrication de sirops.
- Boulangerie : fermentation de sucre par les levures pour produire du dioxyde de carbone qui lève la pâte ; ce qui permet d'obtenir un pain aéré avec peu de mie. (**Site 2**)

### **1.6.2. Industrie du papier**

Hydrolysent l'amidon pour baisser la viscosité du papier et aider à sa découpe et son surfaçage. (**Site 2**)

### **1.6.3 Détergents biologiques**

- ✓ Pré-trempe et applications liquides directes pour enlever les taches des vêtements.
- ✓ Détergents pour enlever les résidus d'amidon résistants. (**Site2**)

## 2. Cellulase EC 3.2.1.4

### 2.1. Définition

Les cellulases [1,4-(1,3 ; 1,4)- $\beta$ -D-Glucanohydrolase] se rapportent à un groupe d'enzymes qui hydrolysent la cellulose en sucres simples (Korish, 2003 et Kader et al, 1999). Elle est l'une des principaux membres de la famille des glycosides hydrolases. C'est un système enzymatique complexe, composé de trois types principaux d'enzymes: Endo  $\beta$  (1-4)-glucanase ou endocellulase (EC 3.2.1.4), Exo  $\beta$  (1-4)- glucanase ou cellobiohydrolase (EC 3.2.1.91),  $\beta$  (1-4)-glucosidase ou cellobiase (EC 3.2.1.21) (Xu, 2002).

### 2.2. Nomenclature

- ✓ Nom codifié : EC. 3.2.1.4
- ✓ Nom systématique : 1,4 - (1,3 ; 1,4) - beta-D - Glucan4 - glucanohydrolase
- ✓ Nom recommandé : Cellulase

### 2.3. Origines des cellulases

Les cellulases sont largement répandues dans la nature, elles sont recensées chez des organismes très divers : bactéries, champignons, plantes etc. De ce fait, les cellulases peuvent avoir plusieurs origines : animale, végétale et microbienne (Xu et al, 2000).

#### 2.3.1. Origine animale

Plusieurs espèces animales (omnivores et herbivores) utilisent la cellulose comme source d'énergie, malgré leur incapacité à produire des cellulases endogènes, mais ceci est dû à une vie symbiotique des microorganismes dans leur système digestif. Des cellulases ont été isolées à partir du tube digestif d'escargot comestible (Smant et al, 1998).

#### 2.3.2. Origine végétale

Les cellulases jouent un rôle important dans la maturation des fruits où elles participent à la libération des arômes. Ces enzymes végétales sont généralement obtenues par extraction à partir des fruits tels que les grains de raisin, les amandes

douces, des céréales tels que l'orge et le riz de la variété *Oryza sativa*. Et il a été noté que les préparations celluloliques d'origine végétale sont dépourvues d'exo- $\beta$ -glucanases (**Xu et al, 2000**).

### 2.3.3. Origine microbienne

Les bactéries et les moisissures utilisent la cellulose pour la production de quantités substantielle d'enzymes extracellulaires qui sont alors facilement récupérées du milieu de culture après fermentation, ces enzymes peuvent être présentes sur la surface des cellules. Les cellulases bactériennes et fongiques sont les plus étudiées en raison de leurs utilisations potentielles en biotechnologie (**Odier et Rouau, 1985**).

### 2.4. Mode d'action

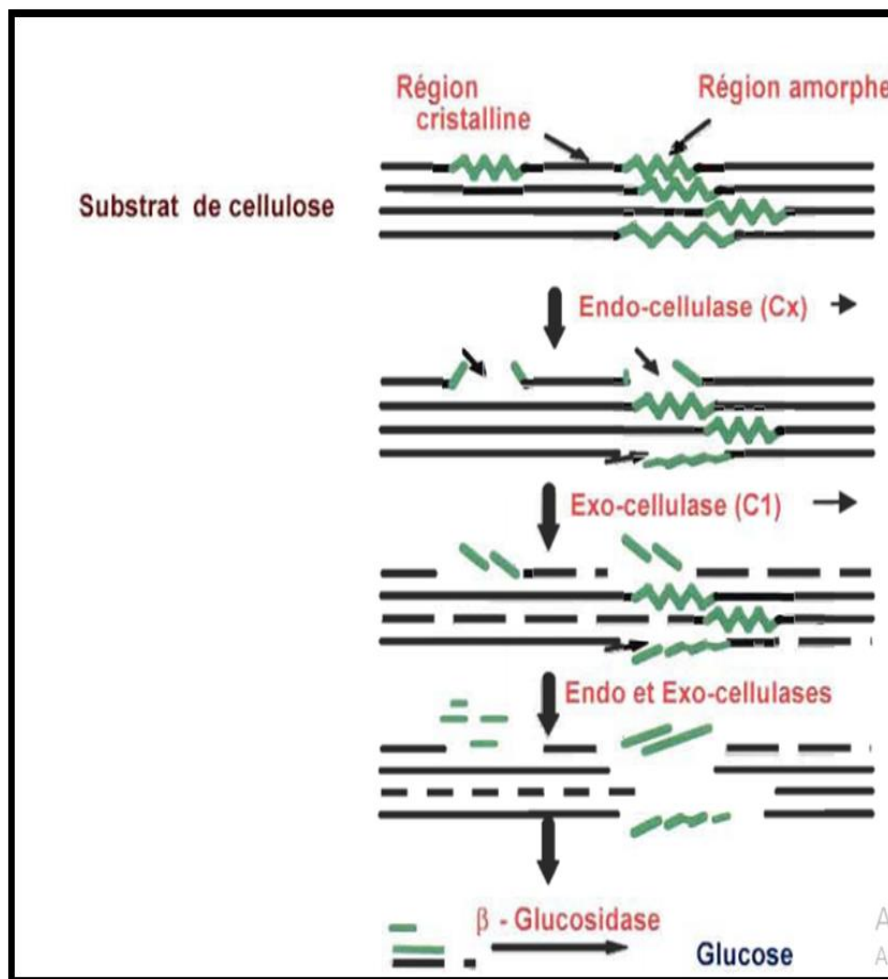
Selon (**Walker et Wilson, 1991**), la réaction d'hydrolyse de la cellulase par un complexe enzyme-substrat se fait en cinq étapes:

1. le transfert de l'enzyme dans la phase aqueuse de la pâte à la surface de la cellulose.
2. l'enzyme est adsorbée et il y a formation d'un complexe que l'on nomme enzyme-substrat (ES).
3. L'hydrolyse de la cellulose.
4. le transfert des produits de réactions dans la pâte.
5. l'hydrolyse des oligomères du glucose dans la phase aqueuse de la pâte.

Ce type d'enzyme agit directement sur la cellulose, mais plus facilement sur les zones amorphes de celle-ci. Le mécanisme d'action de cette enzyme suggère que la cellulase dépolymérise les unités de glucoses de la surface des fibres. Elle agit en défaisant les liens glucosidiques aléatoirement, ce qui résulte en une rapide diminution de la force de la chaîne cellulosique et produit des cellobioses, cellotrioses et quelques autres glucoses.

La cellulase peut être divisée en trois composantes: les endo-glucanases, les exoglucanases (nommé aussi cellobiohydrolases) et les glucosidases (nommé aussi cellobiases). La préparation complète de cellulase comprend un mélange de ces trois composantes (**Rousselle et al, 2002**). L'endo-glucanase effectue le clivage interne de la

cellulose, ce qui produit des chaînes plus courtes. L'exo-gluconase quant à elle produit des cellobioses à partir de la chaîne non réductrice de la cellulose et finalement, la cellobiase hydrolyse les cellobioses en glucose. Il existe un synergisme entre ces trois composantes de la cellulase. Le synergisme des composantes de la cellulase est illustré dans la figure 08.



**Figure 08** : Synergie des composantes hydrolytiques de la cellulase. (Semedo *et al*, 2000).

## 2.5 Applications industrielles des cellulases

Les cellulases étaient commercialement valables pour plus de 30 ans, et présentaient une cible pour les recherches académiques comme celles industrielles (Singh, 1999). Son utilisation permet, potentiellement, la production de glucose, élément de base, qui une fois fermentée permet d'accéder à d'autres substances clés à savoir alcools, acétones et acides organiques notamment des gras volatiles d'où

l'importance, écologique et industrielle, considérable des cellulases (**Receveur et al., 2002**) et parmi les applications industrielles, nous citons

- Alimentation : Les cellulases sont utilisées pour faciliter la filtration de diverses suspensions, riches en fibres cellulosiques (**Scriban, 1993**). Des traitements de différents produits pour améliorer leurs qualités, où les cellulases sont utilisées sous forme de mélange d'enzymes.
- textiles et des détergents : Elles sont utilisées au cours de la finition, pour donner l'aspect aux vêtements en jean après lavage et améliorer l'apparence des tissus par élimination des tâches (**Gusakov et al., 2007**).
- Papeterie : Dans la fabrication des pâtes à papier, l'addition de cellulases, aux suspensions de pâtes en cours de lavage et surtout aux suspensions de pâtes de papier de recyclage, améliore significativement leur filtrabilité et conduit à des économies importantes de consommation d'eau (**Scriban, 1993**).
- Nutrition animale : utilisées comme additifs dans l'alimentation animale car l'addition des cellulases, aux aliments pour porcins, améliore leur digestibilité, ce qui réduit l'excrétion de cellulose non digérée (et donc diminue la charge polluante des excréta) (**Gusakov et al., 2007**).
- Thérapeutique : L'utilisation quasi confidentielle de certaines cellulases dans des formules médicamenteuses à vocation d'aide digestive (**Scriban, 1993**).

### 3. Maltase (EC 3.2.1.20)

#### 3.1. Définition

Les Maltases sont des  $\alpha$ -glucosidases spécialisées (hydrolases qui libèrent l' $\alpha$ -D-glucose de l'extrémité non réductrice de leurs substrats) (**Andriotis et al., 2016**), leur substrat préféré est le maltose (**Choi et al., 2013**).

C'est une enzyme ubiquitaire présente dans tous les tissus (**Scheen et al., 2008**): les vertébrés, les plantes, les bactéries, les champignons, les moisissures et les levures comme *Isaria fumosorosea* (**Linxia et al., 2015**) ; *Cordyceps brongniartii* (**Sasaki et al., 2015**), *Moesziomyces antarcticus* (**Wang et al., 2015**) *Grosmanniac lavigera* (**Riken et al., 2016**) et *Candida sp.* (**Boukail et Maazi , 2015**).

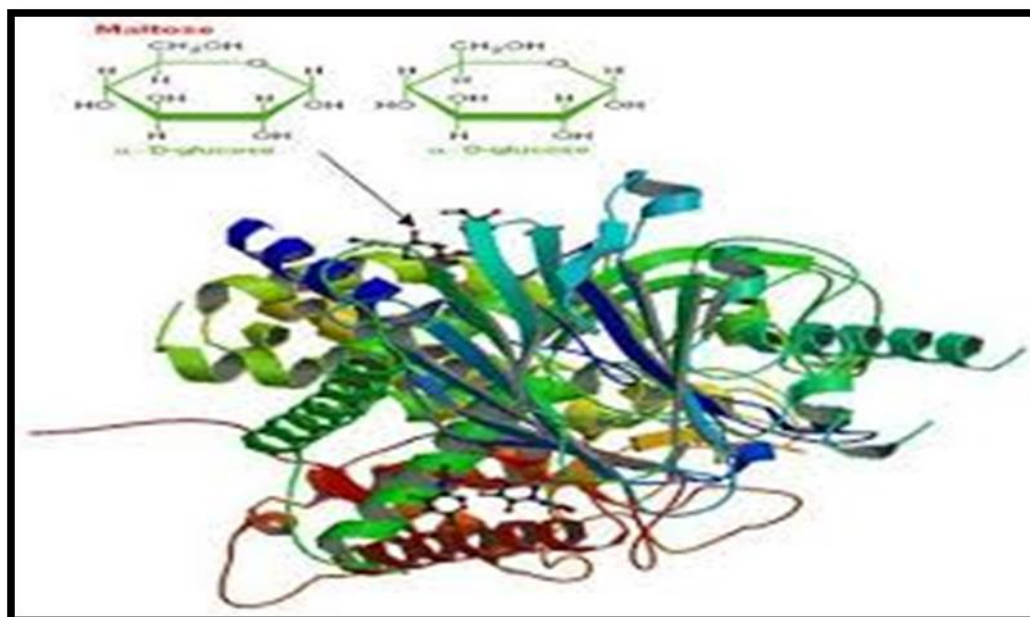
### 3.2. Nomenclature

- ✓ Nom systématique :  $\alpha$ -(1,4) D-glucosidase (**Salafsky et al., 1971**)
  - ✓ Nom codifié : EC 3.2.1.20
  - ✓ Nom recommandé : maltase (**Dahlqvist, 1961**).
  - ✓ Synonymes :
- Glucoinvertase (**Acourene et al.,2014**).
  - Glucosidosucrase (**Satoshi et al.,1993**).
  - Glucopyranosidase ( $\alpha$ -D-glucosidase ( **Sieczko et al., 2016**).
  - Glycosidases (**Peumans et al.,2006**).

### 3.3. Structure de la maltase

Les maltases ont une structure qui diffère selon leurs origines :

- Homodimérique : comme celle extraite de la bactérie *Geobacillus sp.* (**Hung et al.,2005**); des moisissures comme *Xanthophyllomyces dendrorhous* (**Gutiérrez et al.,2015**), et de la levure *Pichia pastoris*. . La masse moléculaire de l'enzyme est variable selon la souche, elle est de 430 Kda chez la levure *Candida guilliermondii* (**Nadeem et al., 2016**).
- Monomérique:chez les bactéries thermophiles comme *Thermuscaldophilus* (**Oyekanmi et al., 2001**); chez les levures comme *Saccharomyces cerevisiae* (PM 13Kda) (**Katrin et al., 2016**), *Lipomyces starkeyi*, (PM 35Kda) (**Gong et al., 2012**), *Candida albicans* (PM 50Kda) (**Zheng et al.,2015**) (Figure 09)



**Figure 09** : Structure monomérique de la maltase liée à 4-O- $\alpha$ -D-Glucopyranosyl-D-glucose ( $C_{12}H_{22}O_{11}$ ), chez *Saccharomyces cerevisiae* (diffraction par les rayons X, la structure est représentée à une résolution de 2 Å) (Barker *et al.*, 2013).

### 3.4. Mode d'action

La maltase est une hydrolase amylolytique glycolytique qui permet l'obtention du Glucose à partir de l'extrémité terminale non réductrice du substrat des oligosaccharides ou des polysaccharides (Nawaz *et al.*, 2015). L'enzyme exerce deux types de réactions catalytiques :

- **Réaction d'hydrolyse** : transfert d'un résidu de glycosyle à partir d'un oligosaccharide ou polysaccharide à une molécule d' $H_2O$ , ce résidu glycosyle est obtenu par élimination du groupe hydroxyle hémi acétal de la forme cyclique (Marija *et al.*, 2014).
- **Réaction de transglucosylation** : transfert d'un résidu glycosyle à partir d'un oligosaccharide à une autre molécule réceptrice.

### 3.5. Applications de la maltase en industrie

Les maltases sont des biocatalyseurs de réactions biochimiques au sein des organismes vivants, elles sont utilisées en biotechnologie pour catalyser les réactions de dépolymérisation des macromolécules et de synthèse en raison de leur spécificité et de



leur efficacité (Yapi *et al.*, 2008). Chez l'homme, la maltase joue un rôle important dans différents industriels :

✓ **Industries alimentaires**

Les oligosaccharides et les monosaccharides à usage nutritionnel connaissent un développement important en raison de leur aptitude à favoriser la croissance de la flore bactérienne intestinale humaine ou animale, ils sont utilisés dans la formulation de nombreux produits alimentaires (confiseries, gommages, boissons, fromagerie). Ces oses sont obtenus soit par extraction de sources végétales, soit par hydrolyse de polysaccharides, soit par synthèse enzymatique (Bombeck *et al.*, 2016).

✓ **Industrie des détergents**

Les enzymes sont également utilisées dans les détergents afin d'éliminer les tâches tenaces pour la lessive et le lavage et dégrader les lipides les protéines des aliments (Vanhanen *et al.*, 2000) de nouvelles méthodes de protection environnemental et allergique sont additionnés aux détergents (Grbavčić *et al.*, 2015).

#### 4. Pectinase (EC 3.2.1.15)

##### 4.1. Définition

Les enzymes pectinolytiques « pectinases » constituent un groupe unique, complexe et hétérogène de différentes enzymes. Elles agissent spécifiquement sur les substrats pectinolytiques, notamment les polymères de pectine qui représentent le polysaccharide majeur de la paroi cellulaire primaire et la lamelle moyenne de la paroi végétale. Cette action se résume dans le scindement de l'acide polygalacturonique (PGA) en acide monogalacturonique, ouvrant ainsi les liaisons glycosidiques, réduisant l'adhésion intracellulaire et la rigidité tissulaire (Fogarty et Kelly, 1983). Ce qui aboutit par conséquent à la dégradation de la paroi cellulaire, l'éclatement des cellules, et donc, au symptôme de macération (Bateman et Basham, 1976).

##### 4.2. Nomenclature

- Nom: polygalacturonase
- Réaction: hydrolyse aléatoire de de( $\alpha$ -D-1,4) des liaisons–galactosiduroniques dans pectate et autres galacturonanes

- Autre nom : pectine dépolymérase ; pectinase; endopolygalacturonase; pectolase; hydrolase de pectine; polygalacturonase pectine.

### 4.3. Mode d'action

Il est important de mentionner que les pectinases peuvent être classées en se basant sur la nature du substrat (pectine, acide pectique et oligogalacturonate), le mécanisme de dégradation (trans-élimination ou hydrolyse) et le type de clivage (endo ou exo) (**Favela Torres et al.,2006**) en deux groupes principaux d'enzymes dont les propriétés et le mode d'action sont les pectines estérases (PE) et dépolymérases (polygalacturonases et lyases) (figure 10).

#### • Pectines estérases (PE)

Ces enzymes catalysent l'hydrolyse des liaisons esters méthyliques adjacents à un groupe carboxyle libre des pectines, enlevant ainsi les groupes méthyles de la chaîne les uns après les autres dans une direction donnée. Le résultat est la libération du méthanol et la formation du PGA (**Sakai et al., 1984**). Leur mode d'action reste toujours mal élucidé. Selon (**Jayani et al.,2005**), le mécanisme d'attaque des PE varie en fonction de leur origine. L'activité des PE peut être suivie soit par le dosage du méthanol libéré, soit par la détermination de l'augmentation du nombre des carboxyles libres, ou encore en utilisant un régulateur du pH puisque, l'ionisation du groupe carboxyle produit dans le milieu un proton causant une variation du pH (**Jayani et al., 2005**).

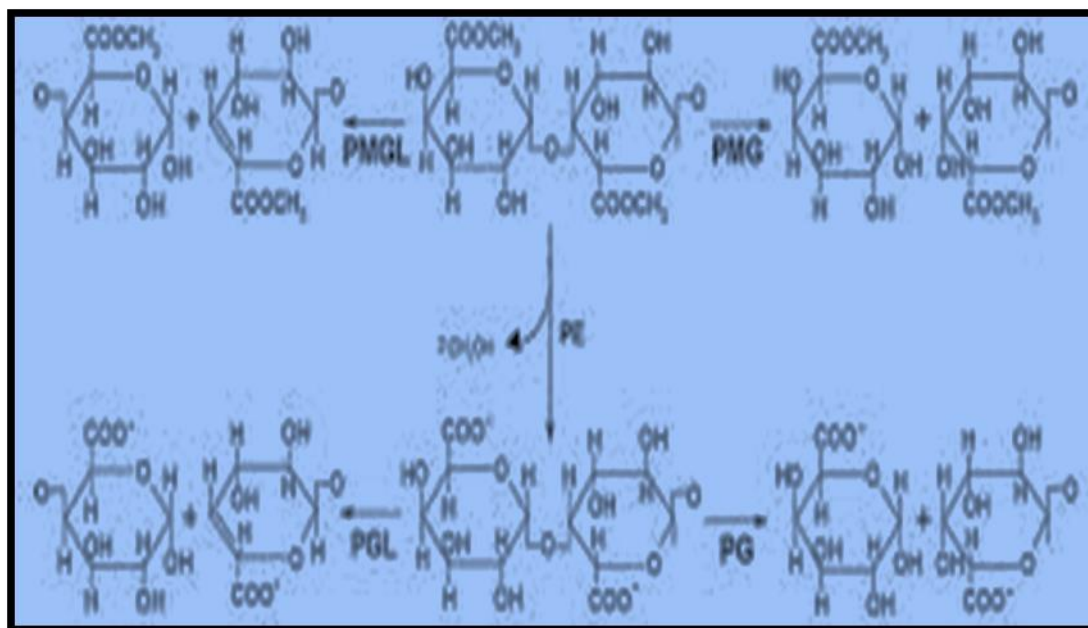
#### • Dépolymérases (polygalacturonases et lyases)

Ces hydrolases possèdent des activités endo- ou exogalacturonases. En fonction du substrat et du mécanisme de clivage des liaisons glycosidiques, on distingue quatre catégories différentes : Les PG et les PMG agissent respectivement sur les pectates et les pectines par hydrolyse.

#### • PGL et PMGL

Elles agissent par  $\beta$ -élimination sur les pectates et les pectines respectivement. (**Alkorta et al., 1998**).Suivant le mode d'attaque, la réaction peut se faire soit de

manière aléatoire ou bien de l'extrémité de la chaîne. Ce qui permet la distinction des endo- et des exo-dépolymérase (**Jayani et al., 2005**).



**Figure 10:** Mode d'action de la pectinase (**Jayani et al., 2005**).

#### 4.4. Origine de la pectinase

Les pectinase sont produites par des levures, des bactéries et des moisissures. Elles sont aussi présentes dans les végétaux, principalement dans les fruits où elles sont impliquées dans leur mûrissement. Elles ont été décelées également dans le règne animal puisqu'on les trouve dans les insectes comme la salive gélifiante des pucerons (**Guo et al., 2006**), les nématodes (**Popeijus et al., 2000**) ou dans le suc digestif d'escargots (**Baron et Thibault, 1985**).

##### 4.4.1 Origine animale

Les pectinase sont des enzymes produites par des animaux et des insectes tel que *Sitophilus oryzae* (**Shen et al., 2003**), *Meloidogyne incognita* (**Jaubert et al., 2002**)

#### 4.4.2 Origine végétale

Les pectinase produites par les plantes au niveau intracellulaire fragilisent les membranes cellulaires, ce processus est nécessaire à la croissance de la plante ainsi qu'à la chute des feuilles et des fruits (**Hadfield et Bennett, 1998**).

#### 4.4.3. Origine microbienne

Un grand nombre de pectinase furent produites par des bactéries, des moisissures et des levures.

##### ✓ Origine levurienne

Quelques souches de levures peuvent produire des pectinase comme *Saccharomyces cerevisiae* (**Radoi et al., 2005 ; Sieiro et al., 2003 ; Blanco et al., 2002; Gainvors et al., 2000**) d'autres levures comme *Kluyveromyces marxianus* (**Siekstele et al., 1999**) *Kluyveromyces fragilis* (**Sakai et al., 1984**). Ces enzymes sont utilisées dans certains procédés industriels : clarification du jus, industrie du textile pour l'assouplissement des fibres et industrie des pâtes et papiers.

##### ✓ Origine bactérienne

Les bactéries produisent principalement des pectate-lyases, cependant la présence de pectinase a été détectée dans quelques-unes : *Erwinia carotovora* (**Basset et al., 2000**), *Pseudomonas marginalis* CFBP 1287 (**Membre et Burlot, 1994**), *Bacillus sp.* RK9 (**Fogarty et Kelly, 1983**), *Leuconostoc sp.* LLn1 (**Bekhouche et al., 2006**).

#### 4.5. Utilisation industrielle de la pectinase

Ces enzymes sont classées parmi les enzymes les plus importantes dans le secteur industriel (**Kashyap et al., 2001**), en raison de leurs fréquentes et multiples utilisations. Comme titre d'exemple, on cite les pectinases acides utilisées dans l'extraction et la clarification des jus de fruit (**Rombouts et Pilnik, 1986**) et les pectinases alcalines faisant l'objet d'une immense utilisation dans le dégomme des fibres de ramie (**Cao et al., 1992**), Pourtant en réponse à l'extrême usage biotechnologique de ces enzymes, ces dernières sont produites par plusieurs organismes comme les champignons (**Aguilar et Huitron, 1990**), les levures (**Gainvors et Belarbi, 1995**) ainsi que, les bactéries (**Karbassi et Vaughn, 1980 et Horikoshi, 1972**).

## 5. Protéase (EC 3.4.21-24)

### 5.1. Définition

Les protéases ou les protéinases font partie de la classe des hydrolases (EC 3.4.21-24.X). En effet, ce sont des enzymes qui catalysent l'hydrolyse des protéines dans des sites bien spécifiques en scindant la liaison peptidique qui lie deux acides aminés dans une chaîne peptidique et sont produites extra cellulièrement comme intra cellulièrement (**Hornebeck, 2009, Kumar et al., 2008,** ).

Ce sont des enzymes multifonctionnelles assurant beaucoup des fonctions physiologiques chez les animaux et les végétaux comprenant la germination, l'apoptose, les processus inflammatoires etc. (**Schaller, 2004**).

### 5.2. Origine de protéase

Les protéases sont extraites aussi bien des plantes que des animaux ou des microorganismes (**Rao et al., 1998**).

#### 5.2.1. Protéases d'origine végétale

Les protéases sont présentes chez toutes les espèces vivantes. Les végétaux ont, avant les microorganismes, été l'objet de recherche en vue d'isoler des enzymes protéolytiques, c'est le cas de la bromélaïne extraite de tige de l'ananas (*Ananas comosus*) (**Rao et al., 1998**), la papaïne en provenance du latex de fruit la papaye (*Carica papaya*) (**Rao et al., 1998**).

#### 5.2.2. Protéases d'origine animale

Seules les protéases sécrétées par l'estomac des ruminants présentent un intérêt Industriel comme la présure préparée à partir du quatrième estomac des veaux ainsi que les pepsines bovines et porcines. L'activité non spécifique des enzymes pancréatiques, trypsine et chymotrypsine, les rendent moins importantes que les enzymes gastriques (**Scriban, 1999**). Des études récentes permettent, aussi, l'identification des protéases chez les helminthes : *Schistosoma sp* ; *Fasciola sp* ; *Taenia sp* et *Haemonchus sp*, où elles apparaissent comme cibles potentielles majeures en thérapie et vaccination antiparasitaire (**Trap et Boireau, 2000**).

### 5.2.3. Protéases d'origine microbienne

L'incapacité des protéases végétales et animales à répondre aux exigences du monde industriel a conduit à un intérêt accru pour les protéases microbiennes (**Mala et al., 1998**). Les enzymes protéolytiques sont produites par une grande diversité de bactéries, de moisissures et de levures (**Devet, 1996**). Parmi ces dernières, les genres primordiaux sont *Saccharomyces*, *Rhodotorula*, *Candida*, *Debaryomyces*. *Saccharomyces cerevisiae* par exemple, produit trois types de protéases ; une aspartyl protéase, une sérine protéase et une métalloprotéase. L'activité protéolytique de ces genres est utilisée particulièrement pour l'affinage des fromages (**Boiron, 1996 et Kresze, 1991**).

### 5.3. Mode d'action de protéase

Elles impliquent plusieurs mécanismes d'action, ce qui permet de distinguer les grandes familles mécanistiques, selon la nature des acides aminés du site actif (**Veyradier et al., 2011**):

- ✓ Les protéases à sérine : telles que la trypsine (EC 3.2.21.4), spécifique des liaisons peptidiques dans lesquelles l'acide aminé engagé par son carboxyle est une lysine ou une arginine (**Tapdiqov et al., 2015**); la chymotrypsine (EC 3.4.21.1), s'attaque à des liaisons peptidiques où le carboxyle engagé est un acide aminé hydrophobe ou aromatique et la thrombine qui clive le fibrinogène en fibrine lors de la coagulation sanguine (**Matsuo et al., 2012 et Ovaere et al., 2009**).
- ✓ Les protéases à cystéine (ou protéases à thiol) : qui possèdent une cystéine dans leur sites actifs comme la papaine (EC 3.4.22.2), spécifique des liaisons peptidiques dans lesquelles l'acide aminé engagé par son carboxyle est un acide aminé basique, aromatique ou apolaire .les caspases ; protéases qui interviennent dans le processus d'apoptose (**Cabon et al., 2013 et Jegham et al., 2009**).
- ✓ Les protéases acides : agissent à pH acide et possèdent un acide aspartique sur leur site actif (**Groeme et al., 2015**), telle que la pepsine ; spécifique des liaisons peptidiques dans lesquelles est engagé un acide aminé aromatique (fonction amine) (**Xuesong et al., 2016**).
- ✓ Les métalloprotéases : qui possèdent un cation métallique, en général un atome de zinc, telle que la thermolysine (**Tauzin et al., 2014**).

## 5.4. Applications industrielles des protéases

Les protéases jouent un rôle important dans de nombreux secteurs industriels, en particulier dans les détergents (**Gupta et al., 2002**), les industries alimentaires comme la boulangerie, la fromagerie, les transformations alimentaires...etc. (**Sullivan et Calkins, 2011**). Ainsi que dans le domaine pharmaceutique et médicale comme des traitements de quelques maladies exemple les désordres de la digestion, le cancer et dans les infections virales (**Walsh, 2002**), et plusieurs autres secteurs industriels.

### 5.4.1. Industrie des détergents

Les protéases utilisées dans l'industrie de détergents représentent 35% du marché mondial des enzymes industrielles (**Cherry et Fidantsef, 2003**). Elles servent également comme produits de nettoyage pour des usages industriels, pour les lentilles cornéennes et les appareils dentaires. Cependant, le marché le plus important au niveau de détergents est de loin celui des détergents à lessive (**Kumar et al., 2008**). Une protéase détergente idéale doit avoir une large spécificité de substrat et stable dans l'environnement hostile de la machine à laver (température élevée et pH alcalin) (**Rao et al., 1998**), la plupart des protéases ajoutées dans les détergents sont produites par des souches de *Bacillus* (**Gupta et al., 2002**).

### 5.4.2. Tannerie

Les sérilprotéases sont utilisées pour leur capacité à libérer les poils et la laine des peaux. Cette opération se fait à des pH élevés, et nécessite donc des protéases alcalines, comme celles produites par *Bacillus licheniformis*. Jusqu'à présent, l'usage des protéases a été limité car leur emploi est souvent plus coûteux que l'utilisation des produits chimiques. Par contre, l'emploi de produits chimiques comporte plusieurs inconvénients (**Gupta et al., 2002** et **Rao et al., 1998**).

### 5.4.3. Industries alimentaires

Les protéases sont largement utilisées dans l'industrie alimentaire. entre autres dans la brasserie, les boissons, pour la préparation d'hydrolysats de protéines solubles et aromatisés (protéases de type papaine), en tant que complément alimentaire (**Lavalle et al., 2000**) et pour la production d'émulsifiants (**Pardo et al., 2000**).

### • Fromagerie

L'application majeure des protéases dans l'industrie alimentaire est dans la fabrication de fromages (**Rao et al., 1998**). Cependant, les fluctuations du prix de caillette et leur pénurie épisodique fait qu'elle est de moins en moins utilisée et tend à être remplacée par des protéases microbiennes (**Aviron et al., 1982**). D'autres protéases d'origine végétale comme la papaïne, la bromélaïne, la ficine et les cardosines sont actuellement utilisées dans l'industrie fromagère (**Uhlig, 1998**).

### • Boulangerie

Les endo et les exo protéinases *d'A.oryzae* sont utilisées pour modifier le gluten de blé par une protéolyse limitée selon les caractéristiques désirées de la pâte ; un tel traitement enzymatique permet de réduire le temps de pétrissage (**Aguilar et al., 2008 et Aviron et al., 1982**). Des protéases bactériennes sont également souvent utilisées pour améliorer l'élasticité et la force de la pâte (**Rao et al., 1998**). La bromélaïne a également été utilisée pour obtenir de la farine de frome hypoallergénique, en raison de sa capacité à briser l'épitope IgE du gluténines du blé Gln-Gln-Gln-Pro-Pro. (**Tanabe et al., 1996**).

#### 5.4.4 Autres applications

Les protéases sont considérées aussi comme moyen efficace pour le traitement des rejets riches en protéines (**Ichida et al., 2001**). La protéase neutre de *B. subtilis* peut être également utilisée pour le décreusage de la soie naturelle. Ces enzymes sont employées aussi avec des mélanges des enzymes hydrolytiques pour dégrader les polymères constitutifs de la matière végétale servant pour l'alimentation animale (**Aviron-Violet et al., 1982**). Elles sont aussi utilisées pour traiter les eaux usées riches en kératine provenant des chaînes d'abattage de volailles (**Ichida et al., 2001**), une autre utilisation des protéases neutres est la récupération d'argents à partir les films photographiques par hydrolyse de la gélatine (**Sumantha et al., 2006**).

## 6. Laccases (EC 1.10.3.2, oxydase p-diphénol)

### 6.1. Définition

La laccase (EC 1.10.3.2, oxydase p-diphénol), est une oxydoréductase bleue de type ligninase, car elle est capable de dégrader la lignine (**Madhavi et Lele 2009**,



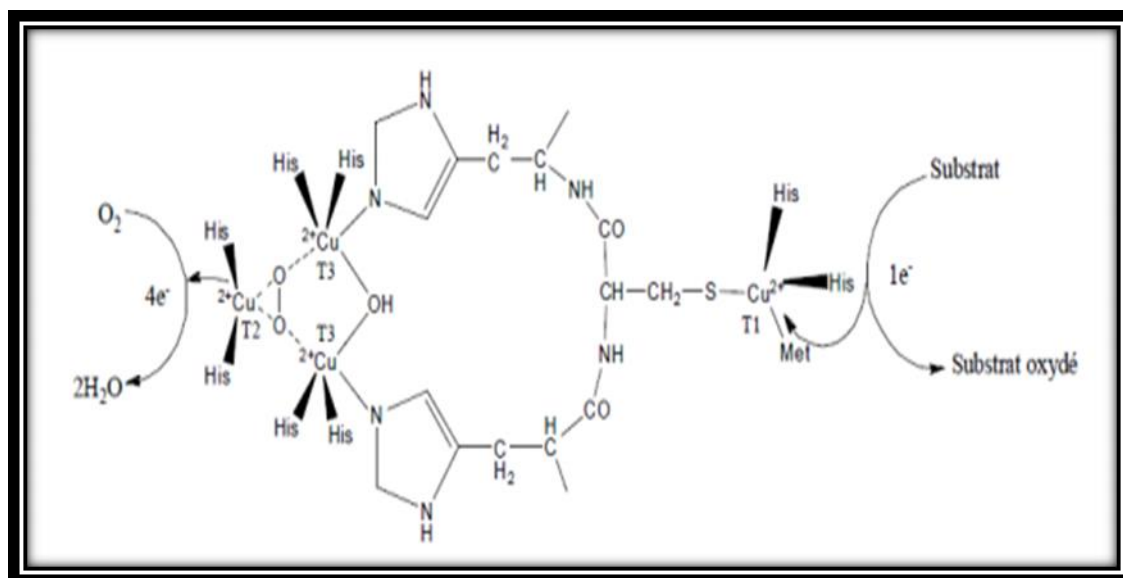
**Camarero *et al.*, 2005**). Elle représente un ensemble d'enzymes impliqués notamment dans le brunissement enzymatique des fruits et des légumes (**Nicolas *et al.*, 2003**)

Elles appartiennent à la famille des protéines multi-cuivrées qui utilisent l'oxygène pour oxyder de nombreux composés phénoliques par le biais d'un mécanisme radicalaire (**Jeanneau, 2005**).

Les laccases ne présentent pas d'activité catécholasique, mais en revanche elles sont capables d'oxyder aussi bien les o-phénols que les p-phénol. En plus, elles oxydent les monophénols en monoquinones, sans hydroxylation préalable (**Issa, 2009**).

## 6.2. Structure des laccases

Les laccases sont des métalloenzymes contenant des atomes de cuivre dans leurs sites actifs respectif; elles assurent simultanément l'oxydation des composés phénoliques et la réduction d'O<sub>2</sub> (**Enguita *et al.*, 2003**).



**Figure 11** : Structure chimique d'une portion du site actif de laccase montrant l'emplacement des atomes de cuivre impliqués dans la réaction enzymatique (**Rocheffort, 2001**)

En général, les laccases sont des glycoprotéines dimériques ou tétramériques contenant au niveau de leur site actif quatre atomes de cuivre qui sont différents par la nature de leurs ligands. On distingue trois sites appelés T1, T2 et T3 (**Claus, 2004**). Les

sites de type 1 et 2 possèdent chacun un atome de cuivre et sont impliqués dans la capture et le transfert d'électrons (**Lanteigne, 2010**).

Le site T1 contient un atome de cuivre ( $\text{Cu}^{2+}$ ) absorbe à 610 nm. Il coordonne une cystéine et il est responsable de la couleur bleue de l'enzyme. Alors que le site T2 contient le cuivre non bleu ( $\text{Cu}^{2+}$ ) et il forme avec l'azote des histidines et avec l'oxygène un complexe tétraédrique. Le site T3 absorbe à 330 nm. Chaque ion cuivre est lié à trois histidines (**Piontek et al., 2002**).

### 6.3. Source de laccases

La laccase est largement répandue dans les plantes supérieures, les bactéries, les champignons et les insectes dont les détails sont présents dans les éléments suivants:

**Plantes:** Elle a été découverte chez différentes plantes : choux, navets, betteraves, pommes, asperges, pommes de terre, poires, pêches, sycomores, tabac et autres légumes. Récemment, la laccase a été exprimée dans l'embryon de graines de maïs (*Zea mays*) (**Arora et Sharma, 2010 et Bailey et al., 2004**).

**Champignons:** Les laccases fongiques ont un potentiel rédox plus élevé que celui des enzymes bactériennes ou végétales. Les champignons des deutéromycètes, les ascomycètes (**Aisemberg et al., 1989**) ainsi que les basidiomycètes sont les producteurs connus de laccase (**Sadhasivam et al., 2008**).

**Bactérie:** la laccase bactérienne a été signalée pour la première fois chez *Azospirillum lipoferum* (**Givaudan et al., 1993**); elle joue un rôle dans la pigmentation cellulaire, l'oxydation de composés phénoliques (**Faure et al., 1994**) et / ou le transport d'électrons (**Alexandre et al., 1999**).

**Insecte:** La laccase d'insecte est une longue séquence amino-terminale caractérisée par un domaine unique constitué de plusieurs résidus de cystéine, aromatiques et conservés. L'enzyme laccase a également été caractérisée chez différents insectes, par exemple *Bombyx*, *Calliphora*, *Diploptères*, *Drosophila*, *Lucilia*, *Manduca*, *Musca*, *Orycètes*, *Papilio*, *Phormia*, *Rhodnius*, *Sarcophaga*, *Schistocerca* et *Tenebrio* (**Arora et Sharma, 2010**).

## 6.4. Applications des laccases

Leur abondance, leur diversité font que les laccases sont des sources enzymatiques importantes et potentiellement intéressantes (**Levavasseur, 2007**). Une vaste quantité d'applications industrielles pour laccases a été proposée, elles comprennent l'industrie boulangère, papeterie, la synthèse organique, l'environnement, la nourriture, les produits pharmaceutiques et nanobiotechnologie. (**Kunamneni et al., 2007**).

### 6.4.1. Industrie alimentaire

De nombreux substrats de laccase, tels que les glucides, les acides gras insaturés, les phénols et les protéines contenant un thiol, sont des composantes importantes de divers aliments et des boissons.

Leur modification par laccase peut conduire à des nouvelles fonctionnalités, la qualité, l'amélioration ou la réduction des coûts (**Kirk et al., 2002**). Donc ; la laccase est utilisée pour améliorer la qualité des boissons telles que la bière, le vin ou les jus de fruit par l'élimination sélective des dérivés phénoliques. Elles sont également utilisées pour améliorer la durée de conservation de la bière (**Minussi et al., 2002**).

Les laccases sont aussi utilisées dans la cuisson de certains aliments (**Selinheimo et al., 2006**) et peuvent être appliquées pour la stabilisation de certains périssable produits contenant des huiles végétales (**Morozova et al., 2007**).

Selinheimo et al., (2006) ont montré l'intérêt de la laccase dans l'industrie des pâtes. Ils ont trouvé que la laccase de *Trametes hirsuta* a la capacité, d'une part d'augmenter la résistance d'une pâte de farine avec le gluten et d'autre part de favoriser la diminution de son extensibilité.

### 6.4.2. Industries textiles, des colorants, de la pâte à papier

Les colorants synthétiques sont largement utilisés dans des industries telles que textile, le cuir, les cosmétiques, l'alimentation et l'impression de papier (**Forgacs et al., 2004**).

Dans ces industries, les procédés relatifs à la décoloration (dégradation de colorant, blanchiment) utilisent les laccases, principalement avec des systèmes médiateurs (**Camarero et al., 2005**, **Baldrian, 2004**, **Knutson et Ragauskas, 2004** et

**Schliephake et al., 2000**). Dans les industries du papier, les systèmes laccase/médiateur sont le plus utilisés pour dégrader la lignine lors de l'extraction de la pulpe évitant l'utilisation de produits chimiques chlorés par exemple (**Srebotnik et Hammel, 2000**).

#### **6.4.4. Autre applications**

Plus récemment, la laccase de *Trametes hirsuta* a été également largement utilisée pour la fonctionnalisation de biocathodes (**Frasconi et al., 2010 Vaz-dominguez et al, 2008**) et pour la réalisation de biopiles en fonction de leur site actif (**Tingry et al., 2013**). Cette enzyme est connue pour le rôle important qu'elle joue dans la dégradation des phénols ce qui la rend très utile dans la décontamination des eaux industrielles (**Riva, 2006**).

Les laccases sont également utilisées pour délignifier des complexes lignocellulosiques et améliorer la production du bioéthanol obtenu à partir de ces complexes (**Mayer et Staples, 2002**).

An orange scroll graphic with a dark orange border and rounded corners. The scroll is unrolled in the middle, with the top and bottom edges curled up. The text is centered on the unrolled portion.

# *Matériels et méthodes*

Ce travail a été réalisé au niveau de laboratoire de Génie Microbiologique et Application (GMA) département de Biochimie Biologie Cellulaire et Moléculaire Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie Université des frères Mentouri Constantine. Le but est la recherche d'enzymes d'intérêt biotechnologique produites par des levures locales.

### • Appareillage et Réactifs

Le matériel utilisé pour la réalisation des différentes manipulations effectuées dans ce travail sont récapitulés dans le tableau 4.

**Tableau 04** : Matériel utilisé pour la réalisation des manipulations.

Verrerie	Appareillage
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Bêchers</li> <li>- Entonnoirs</li> <li>- Tubes à essai</li> <li>- Fioles jaugées</li> <li>-Éprouvettes</li> <li>- Tube à vis stériles.</li> <li>-pipettes pasteurs.</li> <li>-boîtes de pétri.</li> <li>-Flacons stériles.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Bain Marie</li> <li>-Autoclave</li> <li>- Agitateur magnétique (plaque chauffante)</li> <li>- Vortex.</li> <li>- Balance analytique</li> <li>-Étuve d'incubation</li> <li>-Bec bunsen</li> <li>- Spectrophotomètre</li> <li>-Microscope.</li> </ul>

## I . Isolement des levures

### 1. Echantillonnage

Différents levures ont été isolées à partir de plusieurs échantillons :

- Deux denrées alimentaires :
  - Yaourt (Soummam fort) est un produit laitier produit par fermentation lactique, sucré aromatisé et acheté du marché local de Constantine.
  - Miel substance sucrée fabriquée par les abeilles, provenant de sidi Maaroufe wilaya de Mila.
- Un déchet alimentaire : pelures de pomme de terre (figure12)



miel



yaourt



Pelures de pomme de terre

**Figure 12:** Différent échantillon utilisé pour l'isolement des levures

## 2. Milieu d'isolement

Le milieu utilisé pour l'isolement est le milieu YGC (Yeast extract Glucose Chloramphenicol) sa composition est la suivante :

- Extrait de levure :5g/l
- Glucose :20g/l
- Chloramphénicol :0,1g/l
- Agar : 20g/l
- Stérilisation à 120C° pendant 20 min.

### **3. Préparation des solutions mère**

#### **3.1. Solution mère de déchet de pomme de terre**

Une suspension de l'échantillon est constituée par 10 g de pomme de terre et 90 ml d'eau distillée. la suspension est agitée pendant 10 min à l'aide d'un agitateur.

#### **3.2. Solution mère du yaourt**

Une suspension de l'échantillon est constituée par 10 g du yaourt et 90 ml d'eau distillée. la suspension est agitée pendant 10 min à l'aide d'un agitateur.

#### **3.3. Solution mère du miel**

Une suspension de l'échantillon est constituée par 10 g du miel et 90 ml d'eau distillée. la suspension est agitée pendant 10 min.

### **4. Préparation des dilutions**

- Après homogénéisation, préparer une série de dilutions décimales ( $10^{-1}$  jusqu'à  $10^{-5}$ ) est préparée à partir de la solution mère.
- Couler le milieu YGCA stérile dans des boites de pétri
- Après solidification du milieu un volume de 1ml de chaque dilution indiquée et déposée sur des boites de pétri, puis étalé uniformément avec un étaloir stérile par un mouvement de balayage et de rotation sur l'ensemble de la surface du milieu.
- Incuber à 25 C° pendant 2 à 7 jours.

Des observations quotidiennes de l'aspect macroscopique et microscopique des isolats sont réalisées.

### **5. Repiquage des souches**

Après l'observation microscopique des isolats, les levures sont repiquées sur milieu YPGA par la méthode des stries dont la composition est la suivante :

- Glucose : 20g/l
- Extrait de levure : 10g/l
- Peptone : 20g /l
- Agar : 20g /l

Incuber à 25 C° pendant 2 jours.

### **6. Purification des souches**

La purification des levures est effectuée par la méthode des stries sur YPGA.

Incuber à 25 C° pendant 2 à 3 jours.



## 7. Conservation des souches

Les souches sont conservées selon deux méthodes :

Les souches pures sont conservées sur le milieu YPGA à 4 C° ( **Haq et al., 2002**) pour une courte durée et sur milieu incliné d'YPGA à -20 C° pour une longue durée.

Et pour une conservation plus longue, nous utilisons le milieu YPG avec glycérol

- A partir de jeunes colonies, ensemercer la levure dans un tube contenant d'YPG
- Après agitation, transférer 0,5ml de la suspension et 0,5ml du glycérol dans un eppendorf puis agiter.
- Conserver au congélateur.

## II. Mise en évidence des activités enzymatiques

L'activité d'enzymes est recherchée qualitativement sur la gélose.

Les enzymes à étudier sont : $\alpha$  amylase, cellulase, pectinase, laccase, protéase et maltase.

L'activité d'enzymes est recherchée quantitativement sur la gélose suivant des étapes:

- Préparer des suspensions à partir des cultures levuriennes jeunes.
- Déposer les puits (les embouts découper) au centre de boîte de pétrie.
- couler les milieux et laisser séchés.
- Déposer les suspensions au centre.
- Incuber à 25 C° pendant de 3 à 5 jours.

### 1. Détermination de l'activité cellulasique

Cette activité est réalisée par le milieu : « Cellulase Activity Medium » (CAM) (**Goldbeck et al., 2012**).

- Cellulose 10g
- Extrait de levure 0,6g/l
- KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 7g/l
- K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2g/l
- MgSO<sub>4</sub>, 7H<sub>2</sub>O 0,1g/l
- (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1g/l
- Agar 20g

Stérilisation à 120 °C pendant 20 min.

## 2. Détermination de l'activité maltasique

Cette activité est réalisée par le milieu YPMA (Yeast Peptone Maltose Agar) g/l :

- Extrait de levure 5g
- Peptone 10g
- Maltose 20g
- Agar 20g

Stérilisation à 120 °C pendant 20 min.

## 3. Détermination de l'activité de pectinase

Le milieu utilisé pour la mise en évidence de cette l'activité est « Pectinase Activity Medium » (PAM) :

- Extrait de levure 10g
- Peptone 10g
- Pectine 20g
- Agar 20g

Stérilisation à 120 °C pendant 20 min.

## 4. Détermination de l'activité de laccase

Le milieu utilisé pour la mise en évidence de cette activité est le suivant :

- Amidon de pomme de terre 50g/l
- Glucose 20g/l
- Bleu de bromophénol 0.2 %
- Agar 20g/l

Stérilisation à 120 °C pendant 20 min.

## 5. Détermination de l'activité $\alpha$ - amylasique (dégradation de l'amidon)

Le milieu utilisé pour la mise en évidence de cette l'activité est « Amylase Activity Medium » (AAM) additionné de 0.5% d'amidon soluble : (Yalçın et Çorbacı, 2013)

- Amidon 5g/l
- Peptone 5g/l
- Extrait de levure 5g/l

- MgSO<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>O 0,5g
- FeSO<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>O 0, 01g
- Na Cl 0,01g

Stérilisation à 120 °C pendant 20 min.

### 6. Détermination de l'activité de protéase

Le milieu utilisé pour la mise en évidence de cette l'activité est :

- Agar blanc (2%)

Stérilisation à 120 °C pendant 20 min, après refroidissement à 45°C dans un bain marie, ajouter 100 ml de lait écrémé. (Juszczuk et al., 2005).

### 7. Révélation

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

-**Pour les enzymes : laccase et protéase** la zone est révélée directement sans détecteur. 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. (De VOS et al., 2009).

-La présence d'enzymes laccase se distingue par la formation d'un anneau jaune.

-**L'activité  $\alpha$ -amylasique** est révélé par : inondation des boîtes de Pétri avec la solution de lugol 1 laissé agir pendant 15 min. Le lugol 1 (Guiraud, 1998) colore spécifiquement l'amidon non dégradé en bleu-violet . L'anneau clair autour des colonies des souches indique la dégradation de l'amidon.

-**L'activité pectinolytique** est révélée par le lugol 2 (Guiraud, 1998), laisser agir pendant 20 min. L'activité pectinolytique est mise en évidence par l'apparition de zones claires qui forment un anneau autour des colonies .

-**L'activité enzymatique de la cellulase et de la maltase** est révélée par le rouge Congo 0,1% (Guiraud, 1998), laisser agir 15 à 20 min puis rincer par le Na Cl ,laisser agir 20 min, les activités sont mises en évidence par l'apparition de zones claires qui forment un anneau autour des colonies. (Romano Mwirichia et al., 2010).

Le diamètre des zones de lyse pour chaque enzyme et pour chaque levure est mesurée :

- Faible activité : Diamètre inférieur à 2 mm
- Activité moyenne : Diamètre entre 2-10 mm
- Et forte activité : Diamètre supérieur à 10 mm

✓ **Réactif de révélation**

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

- Eau distillé 100ml
- Iodure de potassium 2g
- Iode métalloïde I<sub>2</sub> 1g

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

- eau distillé 330 ml
- diiode (I<sub>2</sub>) 1g
- Iodure de potassium (KI) 5g

**Rouge Congo 0,1% pour l'activité cellulotique et maltasique :**

- Rouge Congo 1g
- Eau distillée 100ml

**Na Cl :**

- Na Cl 58.44g de
- Eau distillé 1L



*Résultats et discussion*

Les levures sont connues des humains depuis des milliers d'années car elles ont été utilisées dans les processus de fermentation traditionnels tels que la fabrication du vin, de la bière et du pain. De nos jours, les levures sont également utilisées comme sources alternatives de protéines, enzymes et vitamines à haute valeur nutritionnelle et ont de nombreuses applications dans l'industrie des aliments de santé, en tant qu'additifs alimentaires, agents de conditionnement et agents aromatisants, pour la production de milieux et d'extraits de microbiologie, ainsi que pour la nourriture du bétail. Les progrès scientifiques modernes permettent l'isolement, la construction et la production industrielle de nouvelles souches de levure afin de satisfaire les demandes spécifiques de l'industrie alimentaire.

### **1. Isolement des souches de levures**

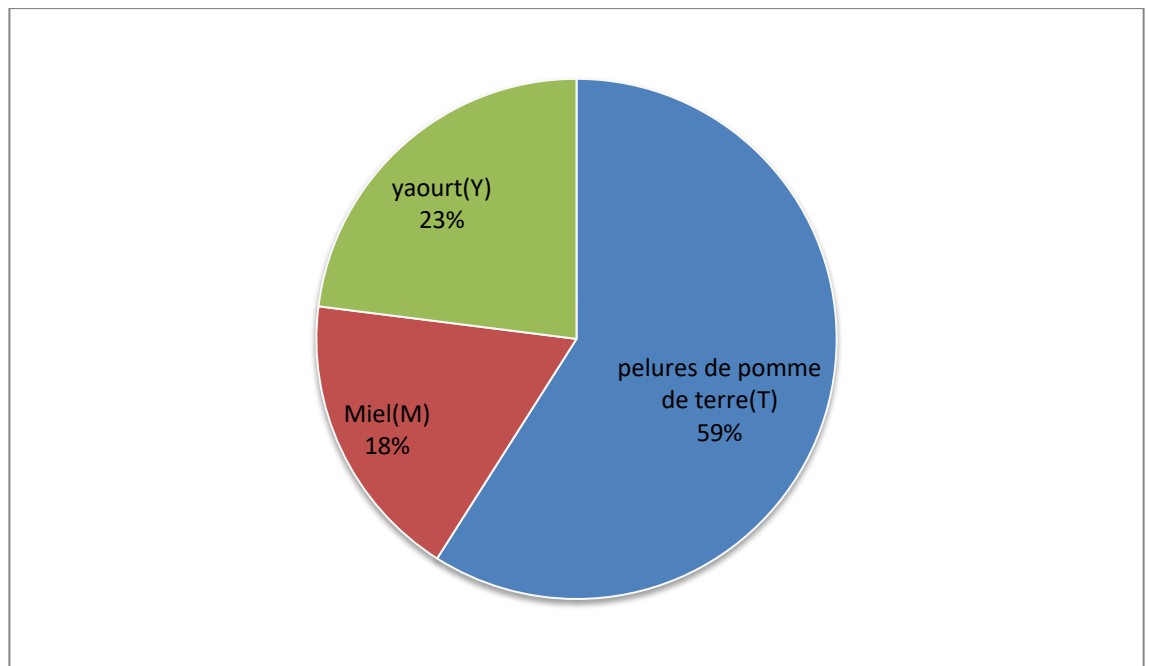
Les levures sont largement distribuées dans la nature et leur aspect ubiquitaire est encore une fois confirmé par leur présence dans les échantillons biologiques choisis. Les levures représentent une part notable de la flore microbienne de pelures de pomme de terre, du yaourt et du miel où elles sont susceptibles de participer activement aux différentes modifications biochimiques qui sont à l'origine du développement de la saveur et de l'arôme de ces produits (**Schmidt, 1984 et Baroillet et Schmidt, 1990**)

L'isolement des levures à partir de trois échantillons 2 denrées alimentaires: le yaourt (Y) et le Miel (M) et un déchet alimentaire: pelure de pomme de terre (P) a permis l'obtention de dix-sept souches levuriennes.

Ces souches ont donné une bonne croissance sur les milieux YGC et YPGA, après incubation à 25°C pendant 2 à 7 jours.

D'après nos résultats, dix souches (59%) proviennent de pelure de pomme de terre, quatre souches (23%) sont isolées à partir du yaourt et trois souches (18%) sont d'origine du miel (figure 13). Aussi, nous constatons une forte densité de levure dans les déchets de pomme de terre.

Dans le but d'obtenir de nouvelles souches de levures productrices de différents métabolites, différentes équipes de recherche se sont intéressés à l'isolement des levures à partir de différentes denrées alimentaires, divers déchets et échantillons comme le sol, l'eau,..etc (Thapa et al., 2015).



**Figure 13:** Fréquence des souches levuriennes

Somdatta *et al.*, (2011) ont isolé 33 souches à partir de 14 échantillons de différentes sources de nourriture, à savoir, dahi, jaggery et différentes sortes de fruits et de jus .

Rezki-Bekki (2014) a aussi isolé neuf souches de levure à partir de cinq échantillons (miel, lait, melon, cornichons et datte) .

Selon Hossam *et al.*, (2011) : Cent quatre-vingt dix huit espèces de levures ont été obtenues à partir de canne à sucre, de pommes, de raisins, de prunes et de figues avec une attention particulière aux fruits pourris et en décomposition (obtenus sur le marché local d'Assiout, Assiout, Egypte).

L'étude de Belmaziz et Djalal (2017) a permis l'obtention de 05isolats de levures collectées du cépage Cinsault cultivé dans la commune Ben Abdelmalek Ramdane.

Il a été signalé par différents auteurs comme Lachance *et al.*, (2003) que les levures (comme *Clavispora lusitaniae*, *Issatchenkia orientalis*, *Hanseniaspora uvarum*) se trouvent couramment sur la peau des fruits riches en fructose et glucose comme la peau des raisins (**Baffi *et al.*, 2011**) et des pomme (**Pando-Bedrinana *et al.*, 2011**).

Aussi dans le jus d'orange où elles participent à la fermentation (**Mingorance-Cazola et al., 2003**). Et à partir des raisins noirs et verts, six levures ont été isolées pour la production de l'éthanol (**Thapa et al., 2015**)

12 souche de levure ont été isolé à partir de cinq fruits pourris, dont les pommes, le melon d'eau, le melon, papaye et l'ananas. (Ruriani et al., 2012).

Selon le travail de Matharasi et al., (2018) et 10 souches de levure ont été obtenues à partir de déchets de bananes (écorces et pseudo-tige de bananes). (Matharasi et al., 2018).

Il a été, aussi, révélé que les dattes présentent un biotope favorable pour les levures comme *Hansenla porauvarum*, *Clavispora lusitaniae* et *Kodamae aohmeri* (**Rezzki, 2014 ; Benda et al., 2008 et Lachance et al., 2001**).

Il est à noter que l'étude réalisée par Galzy et al., (1996) a confirmé la présence de *Clavisporalutitaniae*, *H. uvarum* et *Z. bailii* dans les fruits, celle d'*Issatchenkla orientalis* et de *Yarrowia lipolytica* dans les laitages et de *Zygosaccharomyces rouxii* dans le miel.

selon le travail de Carvalho et al., (2010): 24 souches de levure ont été isolées du miel, Neuf espèces ont été identifiées, représentant les espèces suivantes. *Candida magnoliae* (25%), *Rhodotorula mucilaginosa* (17%) et *Zygosaccharomyces mellis* (12,5%) et *Candida sp.* (plus de 45%).

Rezki –Bekki, (2014) a isolé une seule souche de levure à partir du miel provient de sidi Lakhdar de la région de Mostaganem. Cette levure a été identifiée comme *Zygosaccharomyces rouxii*. Et il a été révélé que les levures présentes dans le miel sont très résistantes aux sucres (**Barnett et al., 1990, Jensen et al., 2003**).

Un total de 123 d'isolats levuriens est obtenu à partir de différents échantillons de produits laitiers de vache, récoltés de la région de Constantine et de grignon d'olive variété locale « *Chemlal* » (GOC), obtenu d'une huilerie située à Skikda (**Betaiche, 2014**).

Arroyo-Lopez et al., (2006) ont retrouvé la levure *Issatchankla orientalis* dans les olives.



Merabti (2015) ,a isolé une flore de levure à partir de blé dure et de blé fermenté (lemzeiet).

Ouédraogo (2012), a isolé vingt-cinq souches de levures à partir de déchets de pommes de terre.

Cependant, Temim et Hmaidia (2018) ont isolé 32 souches à partir de déchets de pommes de terre et une souche de levure à partir du yaour et 5 souches a partir du miel.

Le lait et les produits laitiers constituent un biotope intéressant pour la flore microbienne. Lopandica *et al* ,(2006) ont isolé 513 souches de levures à partir de différents produits laitiers (99 échantillons : fromage frais (23), fromage blanc (12), fromage bleu (10), camembère (6), frottis surface affinée semi-fromage à pâte dure (10) fromage à pâte molle affiné à surface lisse (11), fromage affiné à moisissure superficielle (11), fromage à pâte molle non affiné (3), yaourt (4), beurre (7), crème sure (1) et lait aigre(1).

La présence des levures comme *Yarrowialipolytica* dans le lait de vache, de chèvre et de brebis a été signalé par Suzzi *et al.*, 2001, Guerzoni *et al.*, 2001, Wyder et Puham, (1999) en raison de la teneur élevée de ces produits en lipides.

Les levures ont été aussi isolées à partir du fromage et certains produits laitiers car elles participent à leur affinage comme *Clavispora lusitaniae* et *Issatchenkla orientalis* (El-Sharoud *et al*, 2009 ; Wyder et Puham, 1999) où elle participe à la protéolyse et la formation de composés d'arômes dans le fromage type Camembert (Chen *et al.*, 2011) et dans les yaourts (Lourens-Hattingh et Viljoen, 2002). Aussi, Lee *et al.*, (2002) ont isolé *Issatchenklaorientalis* à partir du Kéfir.

D'autres études ont été, aussi, réalisées sur l'isolement des levures à partir du yaourt :

Ozmen *et al.*, (2013)ont isolé 96 isolat de levure à partir de yaourts produits selon des méthodes traditionnelles dans la région nord-est de l'Anatolie de Turquie.

577 isolats de levure appartenant au différent espèces : *Debaryomyceshansenii*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Mrakiafrigida*, *Hansenulaspp.*, *Candida parapsilose*, *Debaryomycescastellii* et *Candida maltosa*, *Schizosaccharomycespombe* , *Candida*

*mogii* et *Kluyveromycesmarxianus* ont été isolés à partir du yaourt (Regina et al.,2001) .

D'autre part, 165 souches de levure ont été isolées à partir de 100 échantillons de sol prélevés dans 10 régions comprenant 10 sites. Les levures obtenues appartiennent aux espèces suivantes: *Lipomycesstarkeyi*, *L. tetrasporus*, *D. hansenii* var. *Fabryi* et *D.occidentalis*, *Debaryomycespolymorphus*, *Dipodascusspicifer*, *Galactomycesgeotrichum*, *G. reessii*, *Kluyveromyceslactis*, *L. kononenkoae*, *L. mesembrius*, *L.spencermartinsiae*, *Pichia anomala*, *P. fabianii*, *P. guilliermondii*, *Yarrowiasp.* (Shahida.,2004 )




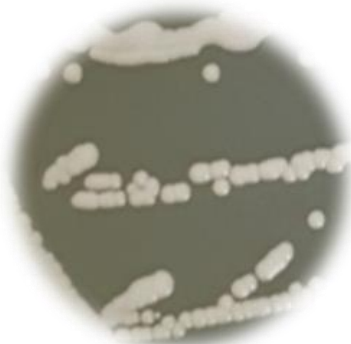
## 2. Caractères culturels et morphologiques





Nous avons débuté, notre étude par des cultures en milieu solide afin de déterminer l'aspect des cultures de ces souches, la morphologie des cellules isolées, une éventuelle organisation particulière des cellules (mycélium ou pseudo-mycélium et leurs modes de reproduction végétative qui peut se faire par scissiparité ou par bourgeonnement. Dans ce dernier cas, l'arrangement du (ou des) bourgeon (s) sur la cellule mère (bourgeonnement mono polaire, bipolaire ou multipolaire) mérite une attention


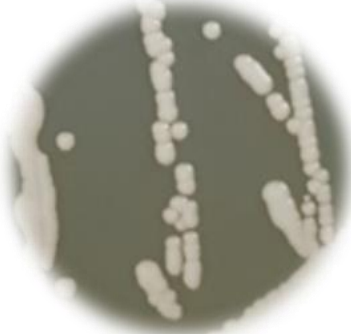


### 2.1 Etude macroscopique



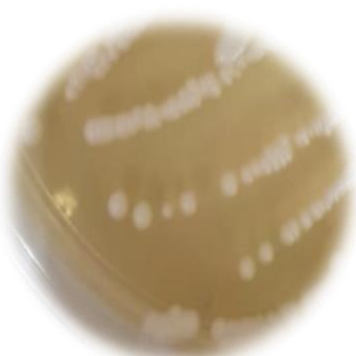
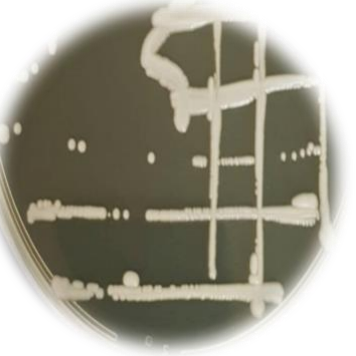
L'étude macroscopique effectuée sur les colonies de souches préalablement isolées nous a permis de faire une présélection basée essentiellement sur leurs caractéristiques morphologiques telles que l'aspect, la forme et la couleur.


**Tableau 05** : Caractères cultureux des souches de levures isolées après une culture de 2 jours sur YPGA à 25°C.

Code des souches	Caractères macroscopique cultureux sur YPGA à 25°C.	Aspect des souches
<b>P1</b>	Ronde, la surface lisse bombée, blanche, brillante et crémeuse	
<b>P2</b>	Ronde, la surface lisse bombée, blanche, brillante et crémeuse	
<b>P3</b>	la surface lisse bombée, crème, brillante et crémeuse	
<b>P4</b>	Ronde, la surface lisse bombée, blanche, brillante et crémeuse	

<p><b>P5</b></p>	<p>Ronde, la surface lisse bombée, blanche, brillante et crémeuse</p>	
<p><b>P6</b></p>	<p>Ronde, la surface lisse bombée, crème, brillante et crémeuse</p>	
<p><b>P7</b></p>	<p>Ronde, la surface lisse bombée, blanche, brillante et crémeuse</p>	
<p><b>P8</b></p>	<p>Ronde, la surface lisse bombée, corail , brillante et crémeuse</p>	

<p><b>P9</b></p>	<p>Ronde, la surface lisse bombée, blanche, brillante et crémeuse</p>	
<p><b>P10</b></p>	<p>Ronde, la surface lisse bombée, blanche, brillante et crémeuse</p>	
<p><b>Y1</b></p>	<p>Ronde, la surface lisse bombée, blanche, brillante et crémeuse</p>	
<p><b>Y2</b></p>	<p>Ronde, la surface lisse bombée, corail, brillante et crémeuse</p>	


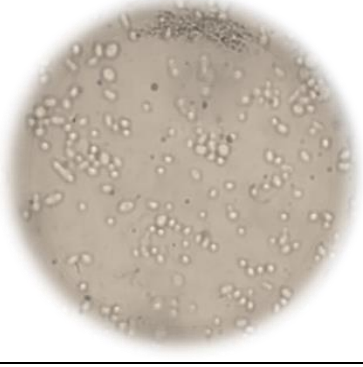
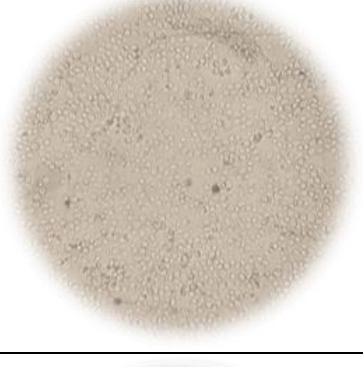
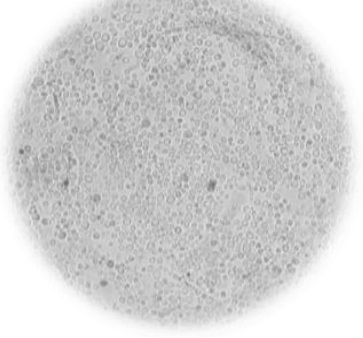
<p><b>Y3</b></p>	<p>Ronde, la surface lisse bombée, blanche, brillante et crémeuse</p>	
<p><b>Y4</b></p>	<p>Ronde, la surface lisse bombée, blanche, brillante et crémeuse</p>	
<p><b>M1</b></p>	<p>Ronde, la surface lisse bombée, blanche brillante et crémeuse</p>	
<p><b>M2</b></p>	<p>Ronde, la surface lisse bombée, crème brillante et crémeuse</p>	

<b>M3</b>	bombée, blanche, brillante et crémeuse avec contour lisse	
-----------	---	--


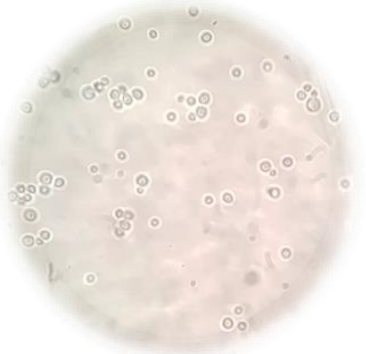
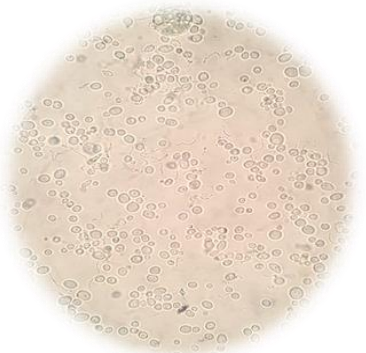

## 2.2. Etude morphologique microscopique

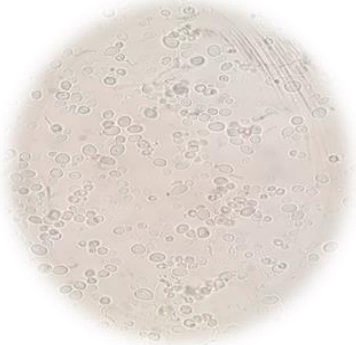
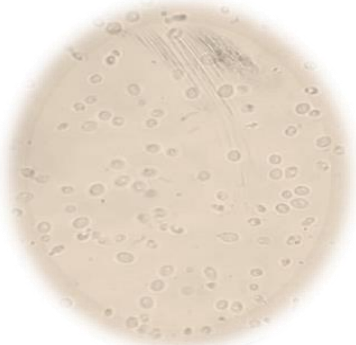


L'observation au microscope des lames effectuée sur les colonies des souches nous a permis de définir les formes : variables, sphériques, ovoïdes, allongées, ronde. Le mode de reproduction végétatif se fait par bourgeonnement pour la totalité des souches. Il est monopolaire pour P3, P6, P7, P9, P10, Y1, Y2, Y3, Y4, M1 et M2 ; mono et bipolaire pour P1, P2, P4, P5, P8, et mono et multipolaire pour M3. La présence de pseudomycélium, formé par une succession de bourgeons allongés, a été observée chez P1, P2, P3, P4, P5, P8, et Y2 (Tableau06).




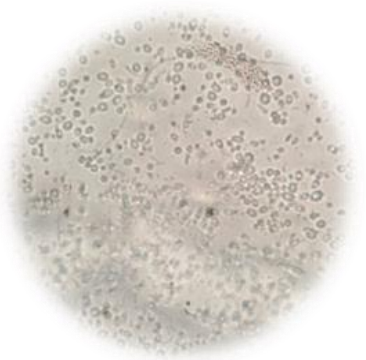
**Tableau 06** : Caractères morphologiques des souches de levures isolées cultivées pendant 2 jours à 25°C dans YPGA.


Code des souches	Forme et taille des cellules	Aspect microscopique (grossissement x 100)
P1	Cellules ovoïdes, bourgeoisement monopolaire et bipolaire Présence de pseudomycélium	
P2	Forme variable ovale à allongée bourgeoisement monopolaire et bipolaire. Présence de pseudomycélium	
P3	Ronde à ovale bourgeoisement monopolaire et bipolaire. Présence de pseudomycélium	
P4	Ronde bourgeoisement monopolaire et bipolaire. Présence de pseudomycélium	



<p><b>P5</b></p>	<p>Ronde bourgeonnement monopolaire et bipolaire. Présence de pseudomycélium</p>	
<p><b>P6</b></p>	<p>Ronde bourgeonnement monopolaire et bipolaire</p>	
<p><b>P7</b></p>	<p>Ronde à ovale bourgeonnement monopolaire</p>	
<p><b>P8</b></p>	<p>Forme variable ovale à allongée Bourgeonnement monopolaire et bipolaire. Présence de pseudomycélium</p>	

<p><b>P9</b></p>	<p>Grosses cellules, ovoïdes Bourgeoisement monopolaire</p>	
<p><b>P10</b></p>	<p>Grosses cellules, rondes à ovales Bourgeoisement monopolaire</p>	
<p><b>Y1</b></p>	<p>Grosses cellules rondes à ovoïdes Bourgeoisement monopolaire scissiparité</p>	
<p><b>Y2</b></p>	<p>Forme variable souvent allongée Bourgeoisement monopolaire Présence de pseudomycélium</p>	

<p><b>Y3</b></p>	<p>Grosses cellules rondes à ovoïdes Bourgeoisement monopolaire Scissiparité</p>	
<p><b>Y4</b></p>	<p>Ovoïdes à allongées Bourgeoisement monopolaire</p>	
<p><b>M1</b></p>	<p>Rondes à ovales Bourgeoisement monopolaire</p>	
<p><b>M2</b></p>	<p>Rondes à ovales Bourgeoisement monopolaire</p>	

<b>M3</b>	Rondes Bourgeonnement monopolaire et multipolaire Présence de pseudomycélium	
-----------	---	---

### 3. Mise en évidence des activités enzymatiques

Dans l'optique d'améliorer et de réduire le coût de l'importation des enzymes, 17 souches de levure ont été isolées de yaourt, de miel et de pelures de pomme de terre, sur la base de leurs potentialités à produire la protéase, la cellulase, la maltase, l' $\alpha$ -amylase, la pectinase et la laccase. Ces enzymes sont très utilisées dans différentes industries. 47,06% des levures isolées ont été productrices de protéase 23,53% de la cellulase, 0% de la maltase, 11,76% de l' $\alpha$ -amylase, 11,76% de la pectinase et 5,88% de la laccase. Les capacités des différentes souches sélectionnées à produire ces principaux enzymes, ont ensuite été évaluées. Les levures sont cultivées sur des milieux solides et spécifiques (appropriés pour chaque enzyme) et incubées à 25 °C pendant 5 jours.

Après observation et révélation, les résultats sont rapportés dans le tableau 07 et les figures (15, 18, 21, 24,27).

**Tableau 07** : Mise en évidence des activités enzymatiques des 17 souches de levures sélectionnées

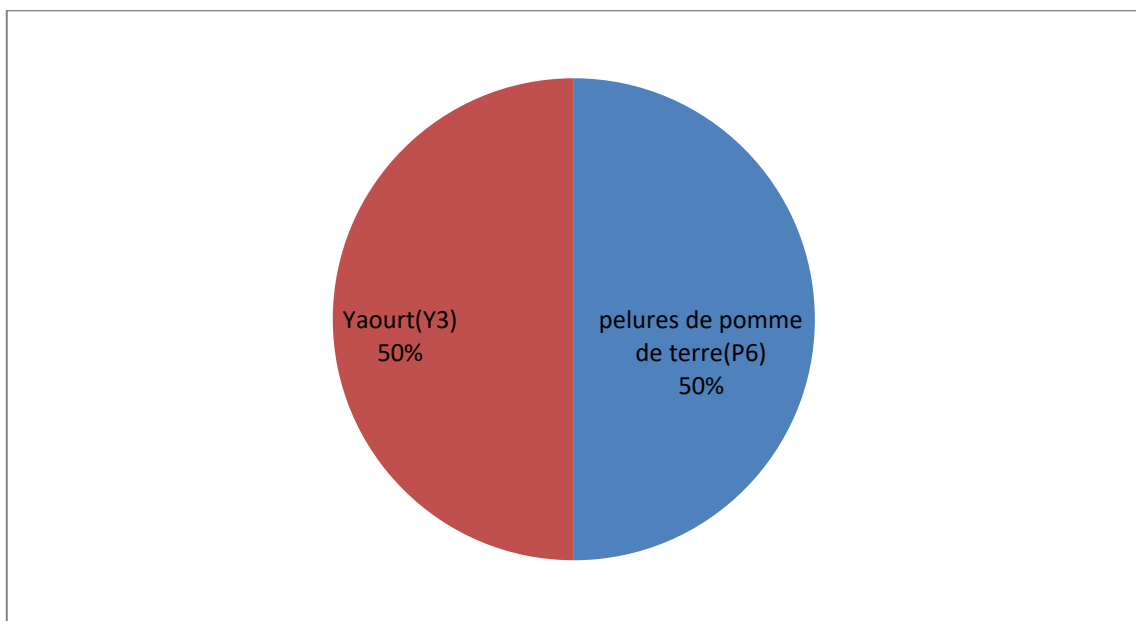
	Protéase (mm <sup>2</sup> )	Cellulase (mm <sup>2</sup> )	Maltase (mm <sup>2</sup> )	Amylase (mm <sup>2</sup> )	Pectinase (mm <sup>2</sup> )	Laccase (mm <sup>2</sup> )
P1	-	+ 17	-	-	-	-
P2	+21	+ 22	-	-	-	-
P3	+18	+ 37	-	-	-	-
P4	+ 23	-	-	-	-	-
P5	+ 42	-	-	-	-	-
P6	+9	-	-	+ 16	-	-
P7	-	-	-	-	-	-
P8	-	-	-	-	-	-
P9	-	-	-	-	-	-
P10	-	-	-	-	-	-
M1	-	-	-	-	-	-
M2	+ 11	-	-	-	-	-

M3	+ 15	-	-	-	-	+ 55
Y1	+ 15	-	-	-	-	-
Y2	-	-	-	-	+ 13	-
Y3	+ 7	+ 32	-	+ 14	+ 25	-
Y4	-	-	-	-	-	-

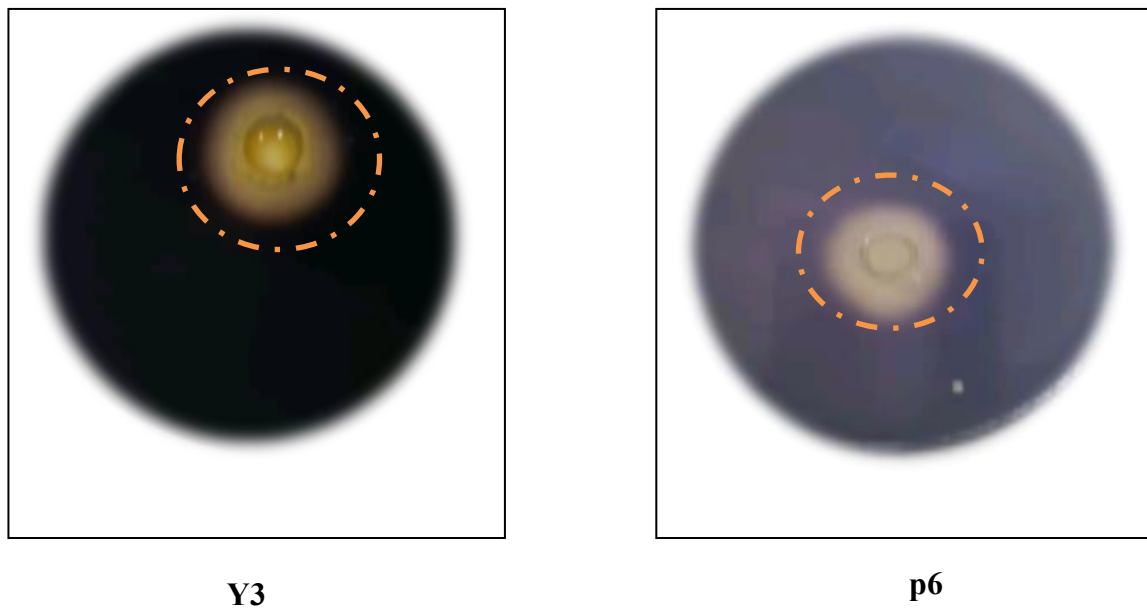
D'après notre étude, les différentes souches sélectionnées ont montré une grande capacité d'activités enzymatiques à savoir :

### 3.1 . Production d' $\alpha$ -amylase

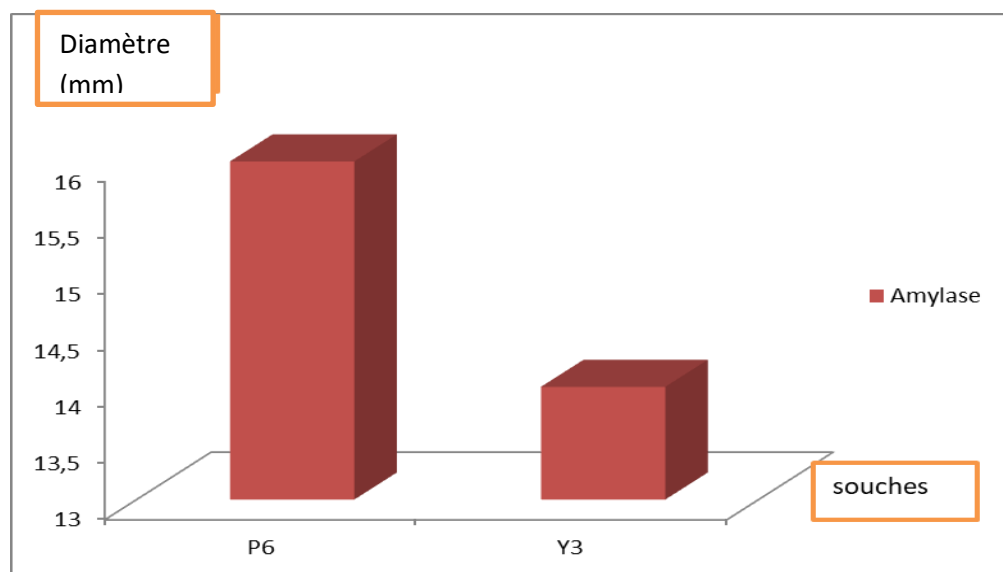
L'étude a montré que seulement deux souches (P6 et Y3) sont capables de produire l' $\alpha$ -amylase car elles montrent après révélation avec le lugol 1 des zones claires (figure15) avec un diamètre de 16mm<sup>2</sup> et de 14mm<sup>2</sup> respectivement (tableau 07 et figure 16). Elles sont réparties selon l'origine comme suit : 50% de déchets de pomme de terre, 50% de yaourt (figure14). Les résultats indiquent aussi que la meilleure levure pour la production de l'  $\alpha$ -amylase est la souche P6 puisque qu'elle montre la grande zone de lyse et donc elle représente la meilleure production (figure16)



**Figure14:** Fréquence des souches productrices d' $\alpha$ -amylase



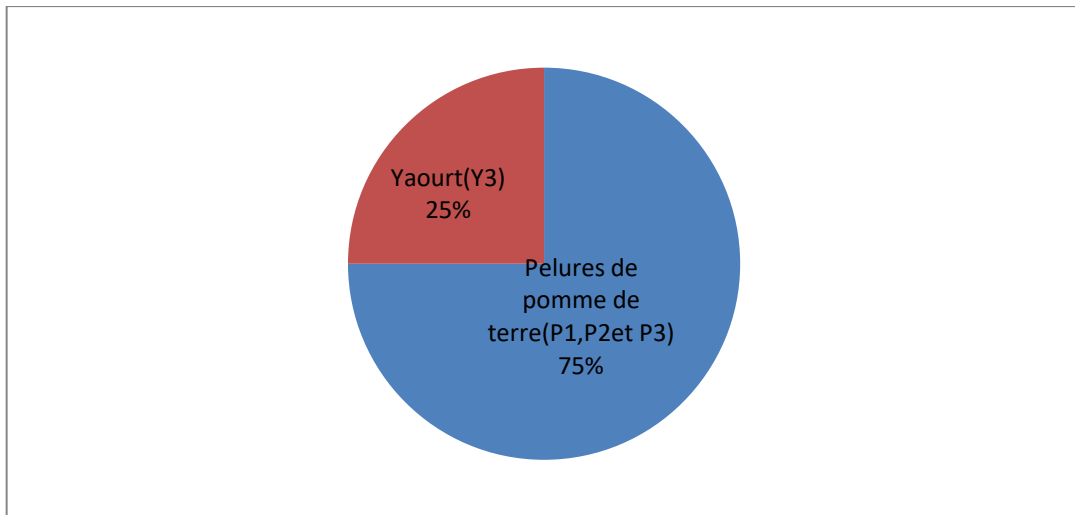
**Figure 15:** Mise en évidence de l' $\alpha$ -amylase



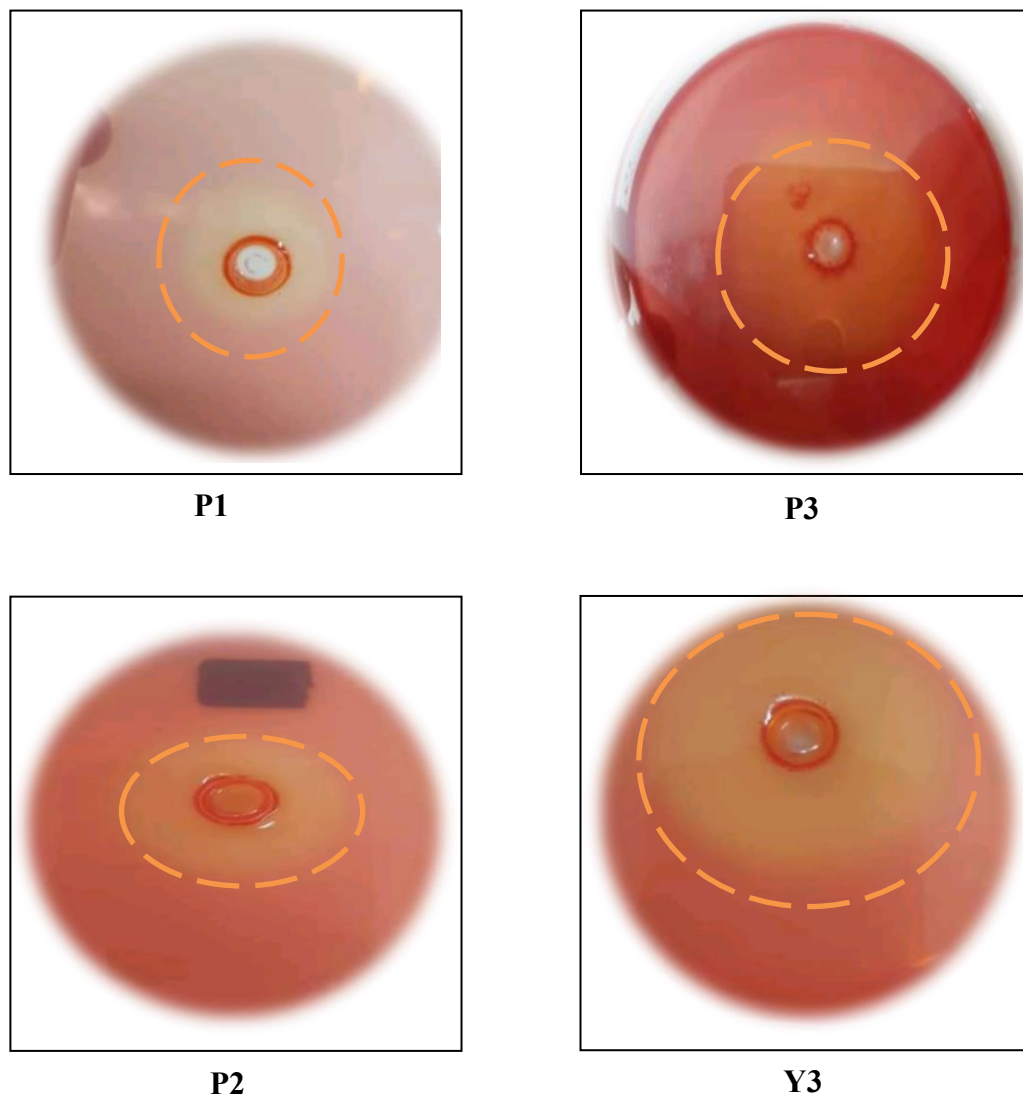
**Figure 16 :** Production qualitative de l' $\alpha$ -amylase

### 3.2. Production de la cellulase CMC<sub>5</sub>

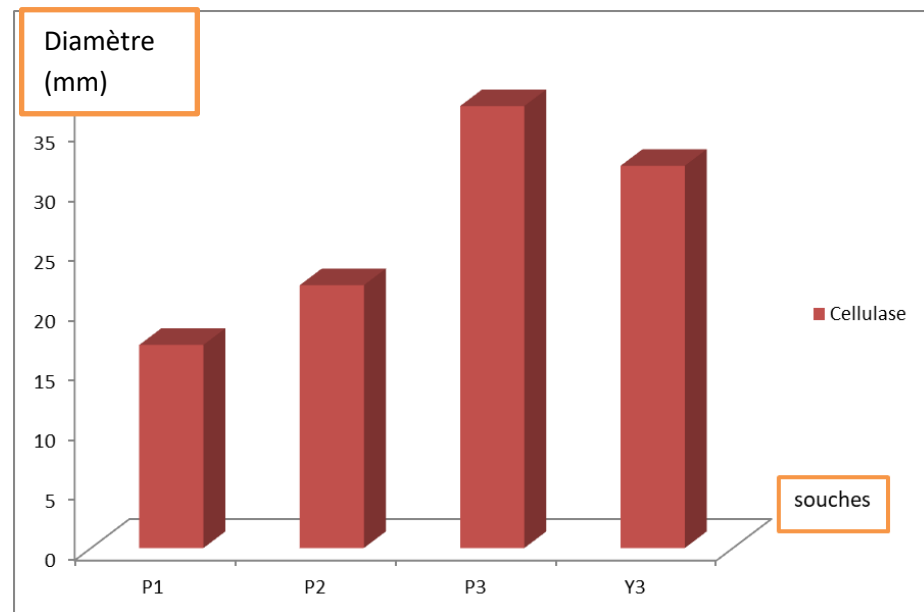
D'après les résultats, il ressort que 04 souches (Y3 ,P2, P1 et P3) sont productrice de la cellulase (tableau 07 ) car elles montrent après révélation avec le rouge congo des zones claires (figure18) . Elles sont réparties selon l'origine comme suit : 75% de déchets de pomme de terre, 25% de yaourt (figure17) .Les résultats indiquent aussi que la meilleure levure pour la production de CMC<sub>5</sub> (cellulase) est la souche P3 car elle montre la grande zone de lyse (figure19).



**Figure17:** fréquence des souches productrices de cellulase



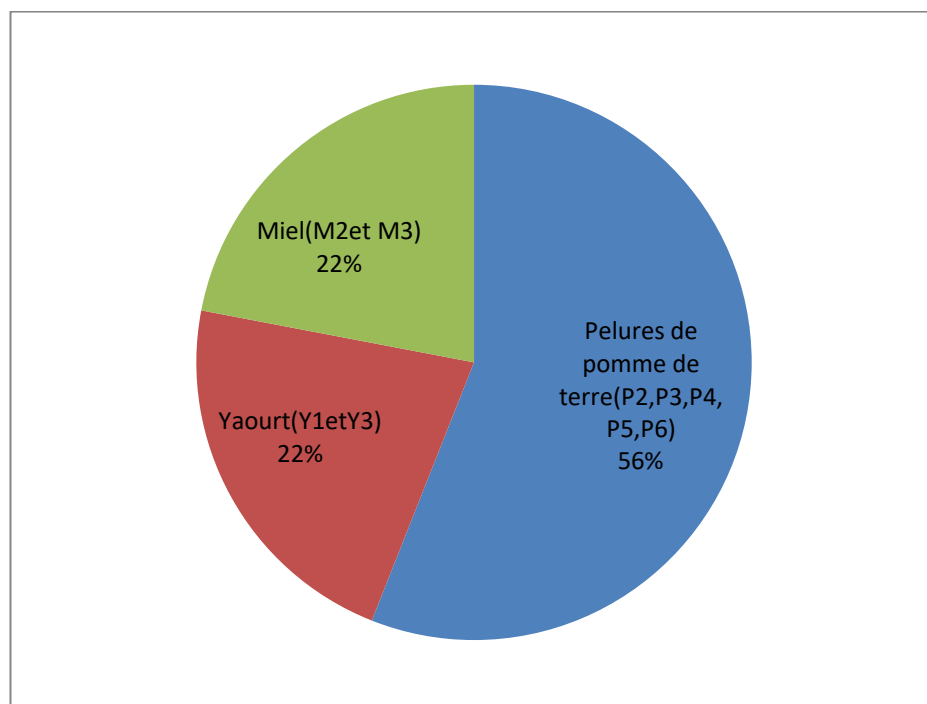
**Figure18 :** Mise en évidence de la cellulase



**Figure 19** : Production qualitative de la cellulase

### 3.3. Production de la Protéase

Les résultats de la production qualitative de la protéase sont présentés dans le (tableau 05). Après incubation, 09 souches ont montrée des zones claires (figure 21) : 56% sont d'origine de pelures de pomme de terre, 22% proviennent du yaourt et 22% sont isolés du miel (figure 20).

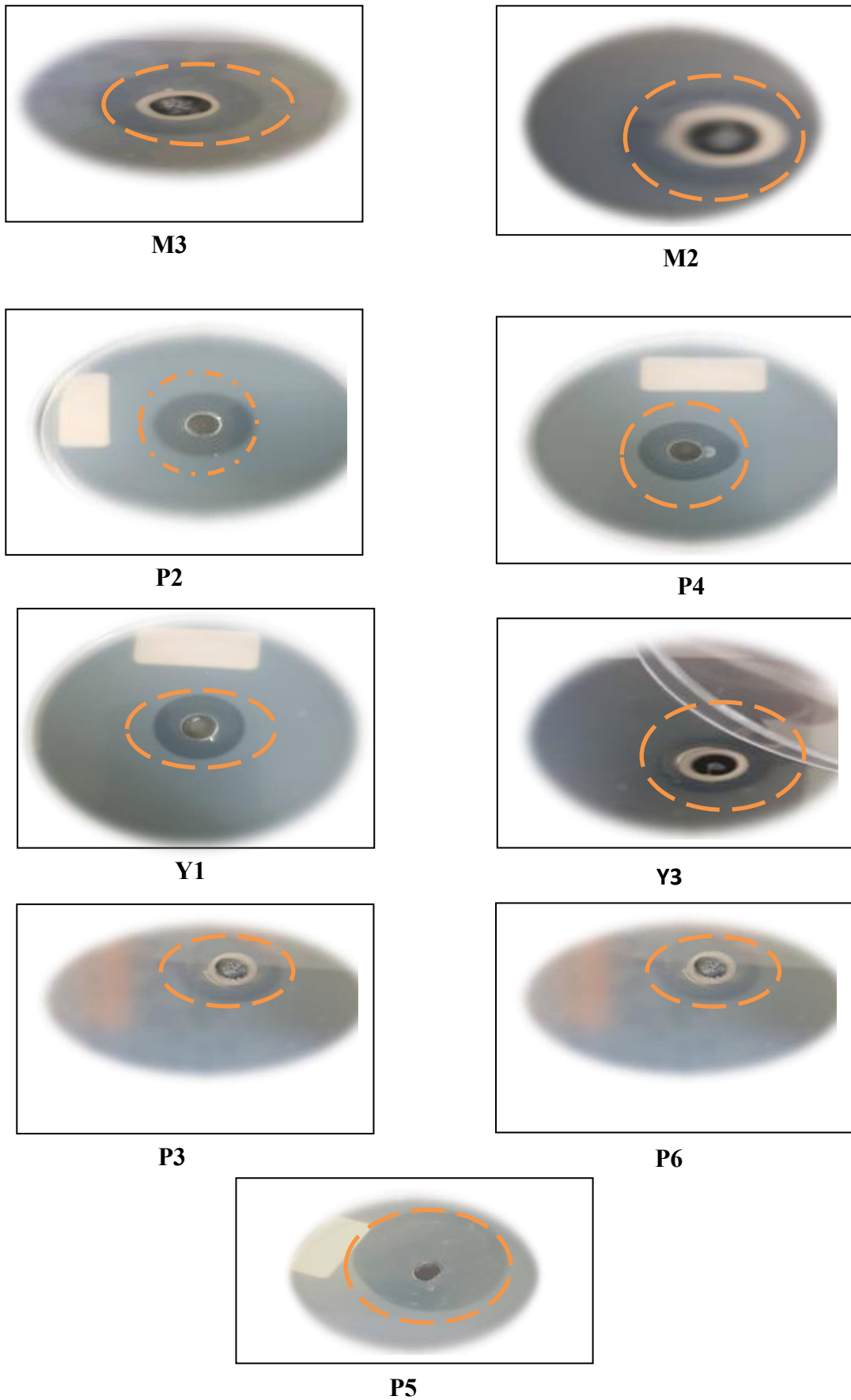


**Figure 20** : Fréquence des souches productrices de protéase

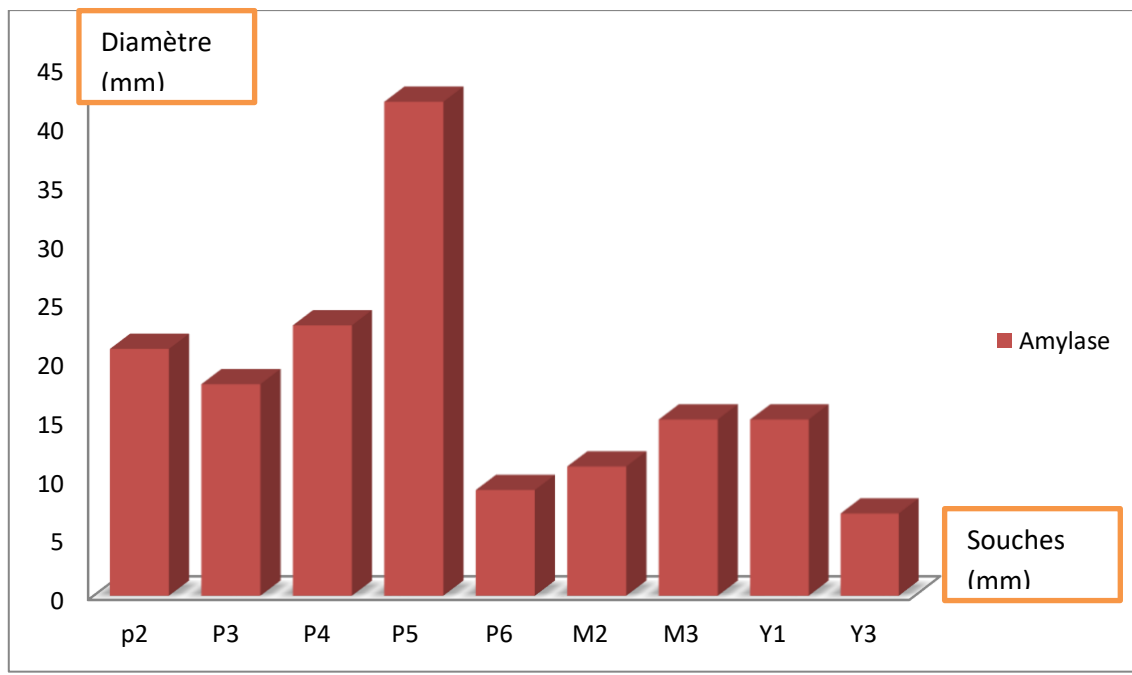


Il ressort que la souche P5 (42mm<sup>2</sup>) est la meilleure pour la production protéasique, suivie de P4 (23mm<sup>2</sup>), P2 (21mm<sup>2</sup>), P3(18mm<sup>2</sup>), puis M3 et Y1 qui montrent une production moins importante (15mm<sup>2</sup>), M2 (11mm<sup>2</sup>), P6 (9mm<sup>2</sup>) et enfin Y3 qui présente l'activité la moins importante (7mm<sup>2</sup>) (tableau 07 et figure 22).

Cependant la meilleure production est montrée par la souche P5 suivie de P4. Alors que la souche Y3 a montré une production moyenne (7mm<sup>2</sup>).



**Figure21** : Mise en évidence de protéase

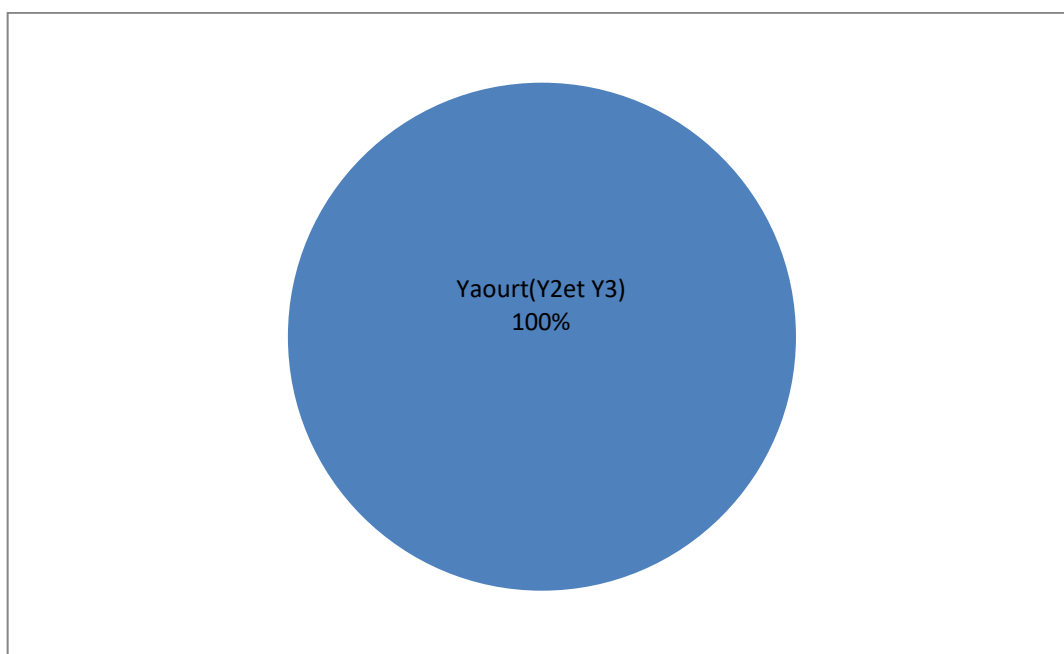


**Figure 22** : Production qualitative de la protéase

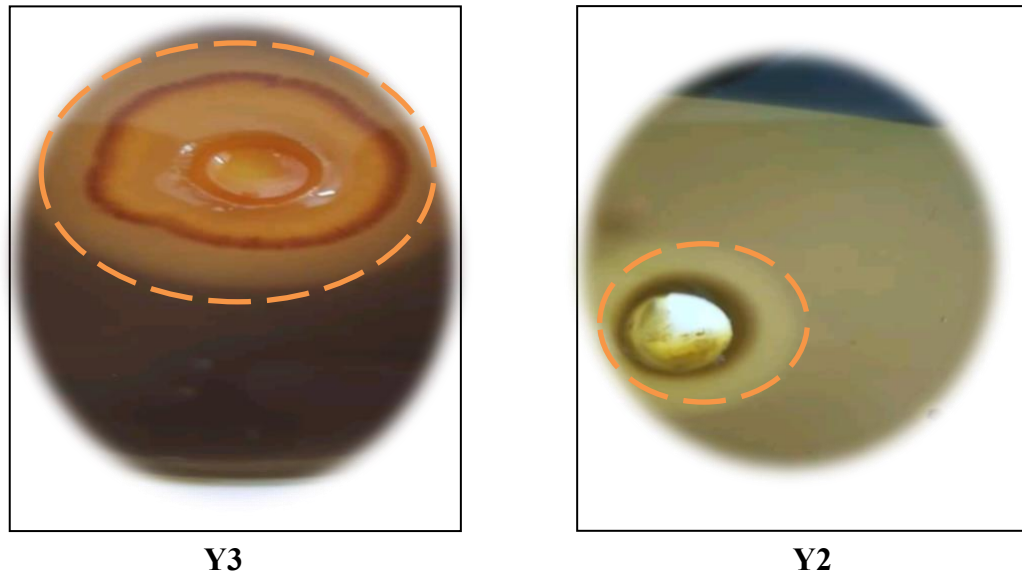
### 3.4. Production de la pectinase

Les résultats montrent que 2 souches (Y2, Y3) d'origine yaourt (100%) sont productrices de la pectinase (tableau07, figure 23). Après la révélation avec lugol2 ; des zones claires de (25mm<sup>2</sup>) de diamètre pour Y3 et (13 mm<sup>2</sup>) pour Y2 (figure24).

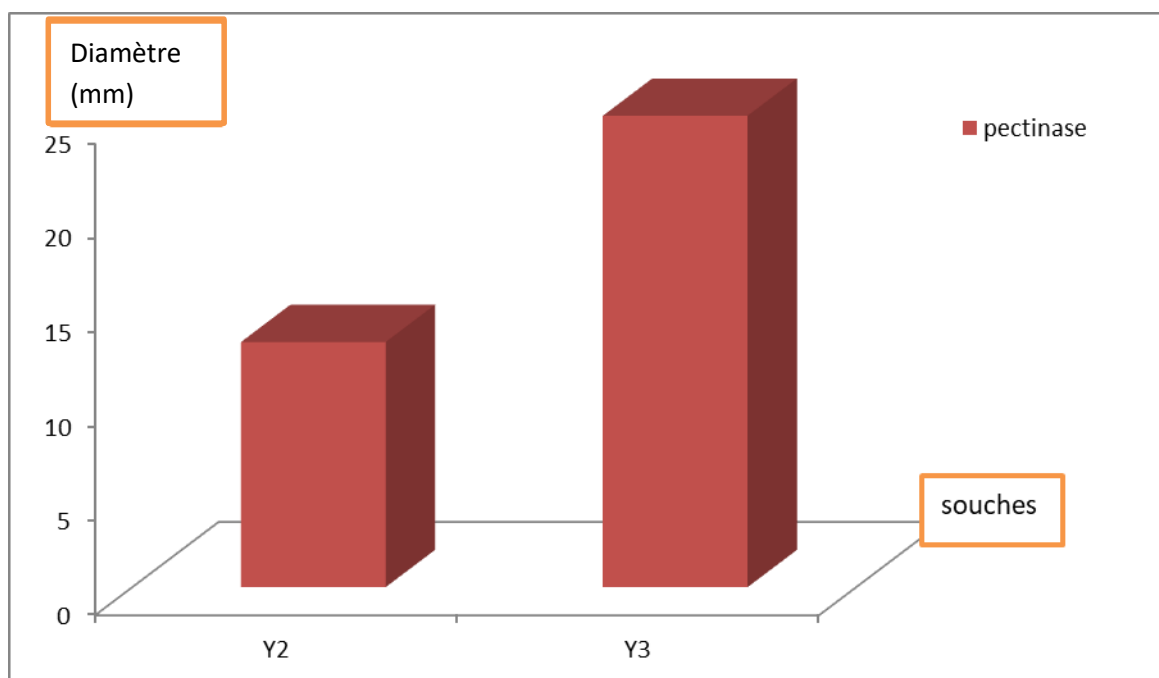
Nous concluons que la souche Y3 est plus performante pour la production pectinasique (figure25).



**Figure23** : Fréquence des souches productrices de pectinase.



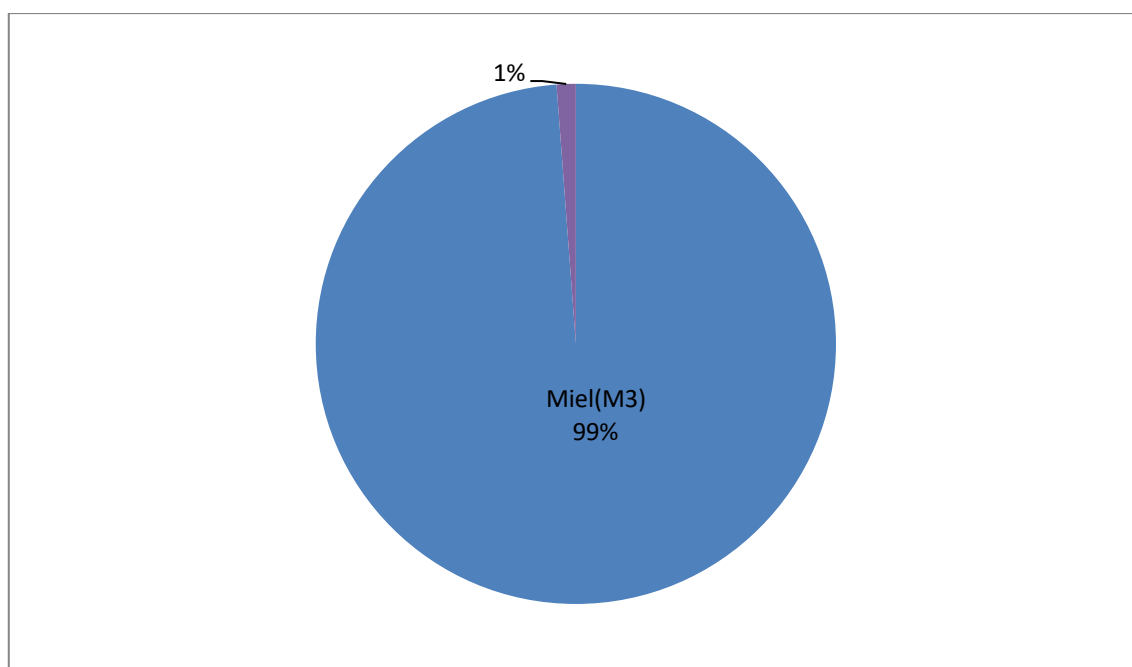
**Figure 24** : Mise en évidence de pectinase



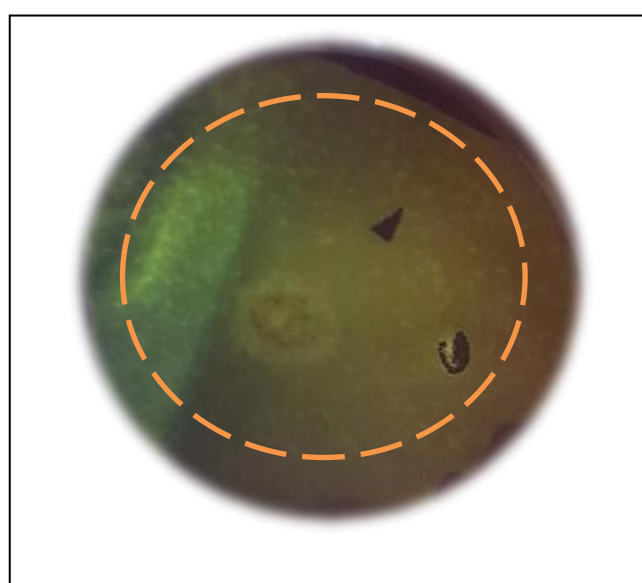
**Figure 25**: Production qualitative de la pectinase

### 3.5. Production de laccase

Cette étude montre que, uniquement, la souche M3 est productrice de cette enzyme (tableau 07) car elle montre, après révélation, un anneau jaune (figure27) avec un diamètre de 55 mm<sup>2</sup> (figure 28). Cette souche est d'origine du miel (figure 26).

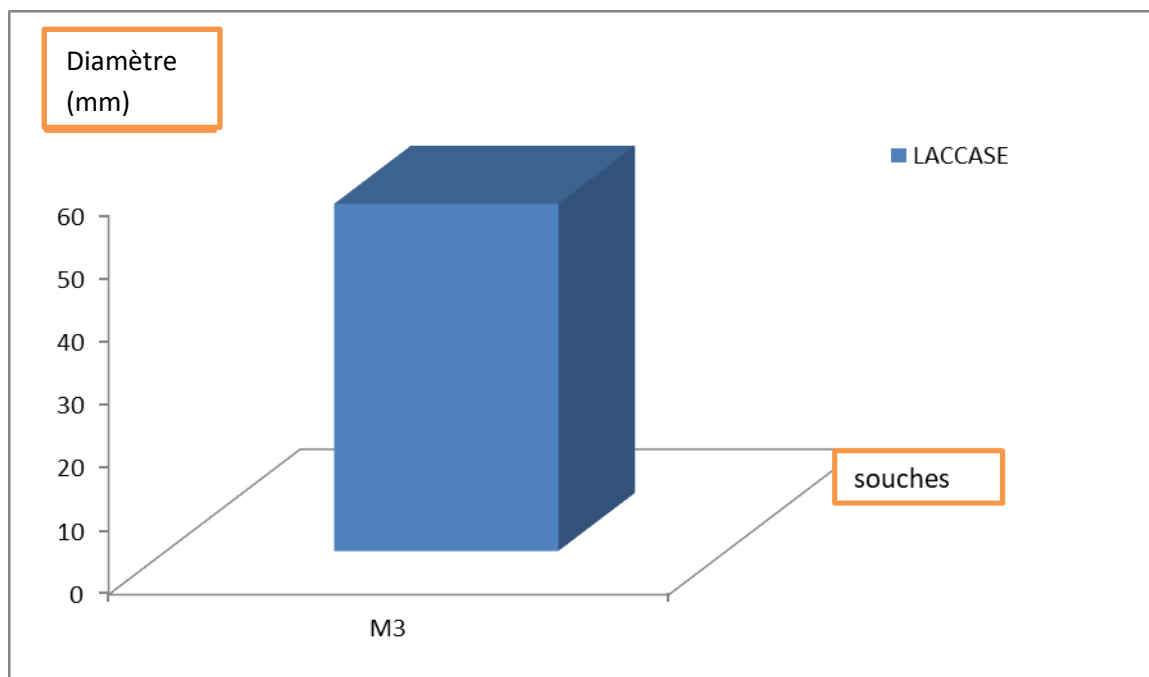


**Figure26** : Fréquence des souches productrices de laccase.



M3

**Figure 27** : Mise en évidence de laccase



**Figure 28** : Production qualitative de laccase

### 3.6. Production de la maltase

Cette études montre qu'aucune souches productrice de cette enzyme (tableau 7) .

En conclusion, la meilleure souche pour la production de la protéase est P5 (zone de lyse de 42 mm<sup>2</sup>), celle pour la cellulase est P3 (zone de lyse de 37 mm<sup>2</sup>). Aucune des levures isolées n'est productrice de la maltase. La souche la plus performante pour la production  $\alpha$ -amylasique est la souche P6 (zone de lyse de 16 mm<sup>2</sup>). Pour la production de la maltase, la souche Y3 est la meilleure (avec une zone de lyse de 25 mm<sup>2</sup>) et la seule souche productrice de la laccase est M3 avec une zone de lyse de 55 mm<sup>2</sup>. Cependant, nous constatons que la souche Y3 est une levure à production mixte de quatre enzymes :  $\alpha$ -amylase, protéase, pectinase et cellulase avec une activité cellulasique, pectique et  $\alpha$ -amylsique relativement plus importantes que l'activité protéolytiques, après 48 h d'incubation à des températures de croissance dépassant les 25°C. La souche P6 est productrice de deux enzymes : Protéase (9 mm<sup>2</sup>) et  $\alpha$ -amylase (16 mm<sup>2</sup>) et la souche M3 est capable de montrer deux activités enzymatiques : protéase (zone de lyse de 15 mm<sup>2</sup>) et laccase (zone de lyse de 55mm<sup>2</sup>)

Différentes études ont isolées les levures à partir de différents échantillons végétaux, déchets agroalimentaires, denrées alimentaires...etc.

Feillet, (2000) a isolé, une trentaine de souches levuriennes amylolytiques, à partir des grains de blé. Par sa composition riche en amidon, en matière azotée et en matière minérale, le grain de blé constitue une bonne source pour l'isolement de levures.

Dali et Hamame (2016) ont étudié l'activité d' $\alpha$ -amylase, de maltase, de pectinase et de cellulase chez la levure *Clavispora lusitaniae* isolée à partir des grains de blé d'une région aride (Biskra).

L'étude de Aichour (2017) a permis la mise en évidence de différentes activités enzymatiques:  $\alpha$ -amylasique, protéolytique, maltasique, cellulasique et pectique chez deux souches *Meyerozyma guilliermondii* et *Clavispora lusitaniae* ABS7 isolées d'écosystèmes arides, région de Biskra, Sud Algérien.

Différentes levures ont été étudiées pour la production de la cellulase comme *Yarrowia lipolytica* (Boonvitthya et al., 2013), *Candida easanensis* (Thongekkaew et al., 2014), *Pichia stipitis* (Bhatia et al., 2015), *Saccharomyces cerevisiae* (Van Zyl et al., 2016) et *Clavispora sp.* nrrl (Wang et al., 2016).

Selon Aline et al., (2011): 89 isolats de levure, collectés de différents sites de l'Antarctique ont été identifiés. Ces levures appartiennent aux *Aureobasidium pullulans*,

*Bensingtonia yamatoana*, *Candida glabrosa*, *L.spencermartinsia*, *C.zeylanoides*, *Cryptococcus antarcticus*, *Cr.victoriae*, *Debaryomyces hansenii*, *Dioszegia aurantiaca*, *D.crocea*, *D.hungarica*, *Dioszegiasp*, *Exophiala xenobiotica*, *Filobasidium sp.*, *Issatchenkia(Pichia),orientalis*, *Kodamaea ohmeri*, *Leuconeurospora sp.*, *fragaria*, *L.muscorum*, *Leucosporidium scottii*, *Metschnikowia australis*, *Microglossum sp.*, *Microglossum sp*, *Nadsoniacommutate*, *Pichia guilliermondii*, *Rhodotorula glacialis*, *Rhodotorula. laryngis*, *Rhodotorula. mucilaginoso*, *Sporidiobolus salmonicolor*. Les activités de cellulase et d'estérase étaient les plus fréquentes, elles sont présentes dans 76% des isolats.

Ferhat et Laklouka (2015) ont sélectionné six souches levuriennes productrices d' $\alpha$ -amylase à partir du blé dur (*Triticum durum*) locale de la wilaya d'El-Oued, et la production  $\alpha$ -amylasique est optimisée sur un milieu à base de jus de datte.

Selon le travail de Benssalem *et al.*, (2001), quatre isolats de levure *Candida tropicalis* (Ct1, Ct2 et Ct3) et *Candida guilliermondii* (Cg) productrices d' $\alpha$ -amylase ont été obtenues à partir de la pomme de terre.

Kermiche, (2013) a isolé 03 souches levuriennes à partir de deux échantillons de blé fermentés, Les trois levures montrent des activités amylolytiques, protéolytiques et lipolytiques.

Une trentaine de souches levuriennes ont été isolée à partir des grains de blé dont une douzaine de souches de levures productrices d' $\alpha$ -amylase et de pullulanase thermostables. Ces souches appartiennent à *Clavispora lusitaniae* ; *Pichia guilliermondii*, *Pichia carribica*, *Myerozyma guilliermondii* et *Rodotorula rubra* (Djekrif, 2016).

Selon Boulefkhad et Talhi (2018), une seule souche de levure a été isolée à partir du sol provient du Hammam Debegh, Guelma, Algérie. La mise en évidence de la production de quatre enzymes : protéase,  $\alpha$ -amylase, cellulase et pectinase a été réalisée. Aussi, Bennamoun (2017), a isolée une vingtaine de souches de levures à partir du sol de la région d'EIM'gheir Wilaya d'El-Oued, les souches ont été identifiées : 02 souches de *Clavispora lusitaniae*, 02 souches de *Cryptococcus magnus*, 12 souches de *Meyerozyma guilliermondii* ; cette levure a montré une activité de lipase et d'estérase, 01 souche d'*Aureobasidium pullulans* produit de différentes activités enzymatiques : pectinase, amylase, estérase, protéase et lipase, 03 souches de *Yarrowia lipolytica* ont donné des activités enzymatiques pour la lipase et l'estérase. L'isolement des levures à partir d'un sol agricole a permis l'obtention de 15 souches appartenant à : *Saccharomycétales* (*Hanseniaspora uvarum*, *Pichia kluyveri*, *Hanseniaspora opuntiae*, *Meyerozyma guilliermondii* et *Saccharomyces cerevisiae*) (Labbani, 2015).

Les levures ont été aussi isolées pour la production d'autres métabolites. (Zahida *et al.*, 2014), ont isolées des levures capables de produire de l'éthanol à partir de pommes, d'oranges, de bananes et d'autres fruits disponibles localement et servent donc de niches écologiques facilement disponibles pour l'isolement des microorganismes.



An orange scroll graphic with a light orange background and a darker orange border. The scroll is unrolled, with the top and bottom edges curved. The text is centered on the scroll.

# *Conclusion général*

Cette étude a permis de répondre aux différents objectifs préalablement fixés.

Un lot de souches de levures isolées à partir de yaourt, miel et pelures de pomme de terre contribue aujourd'hui à enrichir la mycothèque du laboratoire d'un ensemble de souches dont les spécificités métaboliques présentent un intérêt certain. Il offre au Laboratoire la perspective d'études diverses et plusieurs travaux sur cette mycocénose vont être réalisés dans le cadre de mémoires de Master.

Le nombre total de ces isolats a été estimé à dix-sept souches : dix souches sont isolées à partir de déchet de pomme de terre (59%), quatre souches proviennent du yaourt (23%) et trois souches sont d'origine du miel (18%). Ces souches ont été sélectionnées selon la croissance rapide sur YPGA à 25°C.

Un screening est réalisé sur milieu solide pour la mise en évidence de 07 enzymes à savoir : alpha-amylase, pectinase, maltase, Protéase, cellulase et laccase. Les souches testées sont cultivées sur un milieu à base de substrat inductible pour chaque enzyme. Ces milieux solides sont incubés à 25°C pendant 3 à 5 jours. Les résultats ont montré que la majorité des isolats étudiés sont productrices d'enzymes :

**L'activité  $\alpha$ -amylasique** : 10% de souches isolées de déchets de pomme de terre (P) sont productrices d' $\alpha$ -amylase: 0% du miel, 25% du Yaourt.

**L'activité protéolytique** : 50% de souches isolées de déchets de pomme de terre (P) sont productrices d' $\alpha$ -amylase: 66,66% du miel, 50% du yaourt

**L'activité cellulastique** : Déchets de pomme de terre: 30%, le miel: 0%, yaourt:25%

**L'activité pectinolytique** Déchets de pomme de terre: 0 %, le miel: 0%, yaourt:50 %)

**L'activité de laccase** Déchets de pomme de terre:0 %, le miel:33,33 %, yaourt: 0%)

**L'activité maltasique** Déchets de pomme de terre : 0%, le miel: 0%, yaourt: 0%

D'après les résultats, il ressort que

- aucune souche n'est productrice de la maltase,
- La souche Y3: révélé la présence de 04 enzymes : pectinase, cellulase, protéase et  $\alpha$ -amylase.
- La souche M3 : révélé la présence de 02 enzymes : protéase et laccase est la seule souche levurienne productrice de laccase.
- Les souches P2 et P3:révélé la présence de 02 enzymes : cellulase et protéase .
- La souche P6 révélé la présence de 02 enzymes :  $\alpha$ -amylase et protéase .
- Les souches P4, P5, M2 et Y1:révélé la présence d'un seul enzyme : la protéase.

Nous concluons que la levure Y 3 est la meilleure en raison de sa grande diversité pour la production d'enzymes.

La souche Y3, à production mixte de pectinase, cellulase, protéase et  $\alpha$ -amylase. est très intéressante car elle peut être utilisée en bioraffinerie ou raffinerie du végétal dont le concept se base sur l'hydrolyse enzymatique totale des polysaccharides, cellulose et amidon, en glucose. Le glucose sera ensuite transformé en acide succinique pour la fabrication des films agricoles et en coating ou en sorbitol puis en isosorbides pour la fabrication des plastifiants et les matériaux de performances. Cette souche peut également être destinée à plusieurs industries : alimentaire pharmaceutique, des détergents, du textile, ... etc.

Aussi, la souche M3, productrice de la laccase peut avoir plusieurs applications industrielles comme l'industrie alimentaire, celle du textile, des colorants, de la pâte à papier, dans la décontamination des eaux industrielles et aussi dans la production du Bioéthanol.

Cette étude de la mise en évidence et la production des enzymes par des souches levuriennes a donné des résultats très encourageants qui devront être complétés par les perspectives suivantes :

- Identification des souches
- Etude de la production quantitative, en fermentation liquide ou solide, des enzymes révélées par les levures isolées
- Optimisation du milieu de production à base de déchets alimentaires et industriels, pour un meilleur rendement et un faible coût.
- Purification des enzymes produites, pour un usage alimentaire ou pharmaceutique
- Rechercher chez ces levures d'autres enzymes d'intérêt, pouvant ouvrir à d'autres applications industrielles.





*Références  
bibliographiques*

- Acourene S.**, Amourache L., Djafri K., Bekal S. (2014). Date wastes substrate for the production of  $\alpha$ -amylase and invertase. Iranian journal of biotechnology , 12(3) : 41-49.
- Acourene S.**, Ammouche A. (2011). Optimization of ethanol, citric acid, and  $\alpha$ -amylase production from date wastes by strains of *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus niger*, and *Candida guilliermondii*. Society for Industrial Microbiology and Biotechnology , 39(5): 1-8
- Adewara A.O.** and Ogunbanwo S.T. (2013). Effects of processing variables on the production of “Burukutu”. a Nigerian fermented beverage. Nat. Sci.11:16-28.
- Aguilar C. N.**, Gutiérrez-Sánchez G., Rado-Barragán PA., Rodríguez-Herrera R., MartínezHernandez J L., Contreras-Esquivel J C. (2008). Perspectives of solid state fermentation for production of food enzymes. American Journal of Biochemistry and Biotechnology, 4(4); 354-366.
- Aguillar G.**, Huitron C. (1990). Constitutive exopectinase produced by *Aspergillus* sp. CH-Y-1043 on different carbon sources. Biotechnology Letters , 12, P: 655-660.
- Aichour Nour El Houda** .(2017). Etude des hydrolases chez les levures. Purification et caractérisation de l' $\alpha$ -amylase chez *Clavispora lusitaniae* ABS7. Mémoire de Master Département : Biochimie et Biologie Moléculaire et Cellulaire.
- Aisemberg GO.**, Grorewold E., Taccioli GE and Judewicz N.( 1989). A major transcript in the response of *Neurospora crassa* to protein synthesis inhibition by cycloheximide. Exp Mycol. 13: 121-128.
- Alexandre G.** Bally R., Taylor BL and Zhulin IB. (1999). Loss of cytochrome oxidase activity and acquisition of resistance to quinine analogs in a laccase-positive variant of *Azospirillum lipoferum* J. Bacteriology , 181: 6730-6738.
- Aline B. M. Vaz** , Luiz H. Rosa , Mariana L. A. Vieira ,Virginia de Garcia , Luciana R. Brandão<sup>1</sup>, Lia C. R. S. Teixeira , Martin Moliné , Diego Libkind , Maria van Broock and Carlos A., Rosa . (2011). The diversity, extracellular 120 enzymatic activities and photoprotective compounds of yeasts isolated in antarctica. Brazilian Journal of Microbiology ,42: 937-947
- Alkorta I.**, Garbisu C., Llama M.J and Serra J.L. (1998). Industrial applications of pectic enzymes: A review. Proc Biochemistry. 33 (1) : 21-28.

- Andriotis** Vasilios M. E. Gerhard S., Robbie W., Robert A. Field and Alison M. Smith.(2016). The maltase involved in starch metabolism in barley endosperm is encoded by a single gene. 11(3): 151-642.
- Arikan B.** (2007). Highly thermostable, thermophilic, alkaline, SDS and chelator resistant amylase from a thermophilic *Bacillus sp.* Isolate A3-15. Bioresource Technology, 99(8): 3071-3076.
- Arora D.S** and Sharma R.K. (2010). Ligninolytic Fungal Laccases and Their Biotechnological Applications. Application Biochemistry and Biotechnologie , 160: 1760–1788.
- Arroyo-L.F.N.** Durán-Q.M.C., Ruiz-B.J.L., Querol A., Garrido F.A. (2006) Use of molecular methods for the identification of yeast associated with table olives. Food Microbiologie. 23(8):791-796.
- Aviron-Violet, P.,** J.L. Baret, C. Bertrand B. , Blazy F., Bouvier M., Comtat P.R., Coulet P. Dupuy J.F. , Hervagault A., Joyeau4 J., Laurent P., Monsaq D., Thomas P. Sicard G.M.A. and Van B . (1982). Les enzymes. Production et utilisation industrielles. Durand G. et P. Monsan (eds), Bordas, Paris, France, 349.
- Badot R . M.**et Merlin D. (1984). Métabolisme énergétique et mouvement révolitif chez le haricot (*Phaseolus vulgaris*). Scientific University Franche-Comté, Biologie Végétal . (4) : 7-12 .
- Baffi M. A.,** Dos S., Bezerra C., Arevalo V.M., Biones-Perez I. A., Gomes E. and Da Silva R. (2011). Isolation and molecular identification of wine yeasts from a Brazilian vineyard. Anals of Microbiology, 61 (1): 75-78.
- Bailey MR . ,**Woodard S.L ., Callawy E., Beifuss K., Lundback, MM., Lane J. (2004) Improved recovery of active recombinant laccase from maize seed. Appl Microbiologie and Biotechnologie . 63, 390–397.
- Baldrian P.** (2004).Purification and characterization of laccase from the white-rot fungus *Daedalea quercina* and decolorization of synthetic dyes by the enzyme. Application Microbiologie and Biotechnologie , 63 (5) : 560-563.
- Barker Megan. K.,** David. R, Rose.(2013). Specificity of processing  $\alpha$ -glucosidase is guided by the substrate conformation crystallographic and in silico studies. Journal of biological chemistry , 288(19) : 13563–13574.

**Barnett J. A.**, Payne R. W. and Yarrow D. (1990). A guid to identifying and classifying yeast, Cambridge University Press , 213.-219.

**Barnett J. A.**, Payne R. W. and Yarrow D. (2000). Yeast: Characteristics and identification. Third edition 2000,. Cambridge University Press , 752.-758.

**Baroillet C.** et Schmidt J. L. (1990). Contribution à l'étude de l'origine des levures du fromage de camembert. Le lait , 70 : 67-84.

**Baron A.**Thibault .J.F.(1985). Les enzymes pectinolytiques dans:Hydrolases et dépolymérasés, enzymes d'intérêt industriel. Mouranche A., Costes C., GauthierVillars, pp. 143-164.

**Basset, A,** Khush, R. S., Braun, A., Gardan, L., Boccard, F., Hoffmann, I. A et Lemaitre, B. (2000).The phytopathogenic bacteria *Erwinia carotovora* infects *Drosophila* and activates an immune response. Proc Natl Acad Sci USA 97(7): 3376-81.

**Bataiche I.** (2014). Recherche de nouvelles potentialités de *Yarrowia lipolytica*, isolé de différents milieux naturels pour des applications biologiques. Thèse de doctorat , Bioprocédés et biotechnologies, applications mycologiques , Université Constantine1

**Bateman D.F.** and Basham HG (1976). Degradation of plant cell walls and membranes by microbial enzymes. Physiology of Plant-Pathogen Interactions ,4: 316-35.

**Bekhouche F.** Bonnin E., Boulahrouf A., Levaux J.Y. (2006). Production d'enzyme polygalacturonase par des souches microbiennes isolées du lait cru et des olives noires et vertes. Canadian Journal of Microbiology, 52: 658- 663.

**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) Université Abdelhamid Ibn Badis-Mostaganem, mémoire de master , Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie .

**Benaouida K.** ( 2008) . Etude de l'alpha amylase de levures isolées d'un écosystème extrême (sol environnant des sources thermales) et cultivées sur un milieu à base de lactosérum. Mémoire Magistère. Département de Biotechnologie Alimentaire . Université Mentouri. Constantine. p 104.



- Benda N. D. N.,** Boucias D., Torto B. and Teal P. (2008). Detection and characterization of *Kodamaea ohmeri* associated with small hive beetle *aethina tumida* infesting honey bee hives. *Journal of Apicultural Research*, 47(3): 194- 201.
- 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, département biochimie et microbiologie appliquée Université Mentouri. Constantine.
- Berry DR.** et Paterson. A. (1990). Enzymes in food industry In: Sucking C.J. (éd.), *Enzyme chemistry impact and application*. Editions chapman and hall Lowdon, 2nd edition. P: 306-351
- Bertheau Y.,** Kotoujansky.A et Colenoa.A. (1985). Sources actuelles et potentielles d'enzymes d'hymolyses et de dépolymérisation. In : Mouranche A. et Coste C. (Ed) : *Hydrolyses et dépolymérase enzymes, d'intérêt industriel*. Ed. Gautier-Villard. : p 47-108.
- Bessalem S .,** laraba D., Bellal M.I. (2001).Isolement , purification et caractérisation de l'alpha amylase de levures isolées a partir de pomme de terre . *Recherche Agronomique* , Vol ( 1),PP 75-90 .
- Bhatia L.,** and Sonia J. (2015). Biovalorization potential of peels of *Ananas cosmosus* (L.) Merr. for ethanol production by *Pichia stipitis* Ncim 3498 et *Pachysolen tannophilus* MTCC 1077. *Indian journal of experimental biology* , 53 : 819–827.
- Blanco P.** Thow G., Simpson C. G., Villa T. G. and Williamson B. (2002). Mutagenesis of key amino acids alters activity of a *Saccharomyces cerevisiae* endopolygalacturonase expressed in *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiology Letters*. 210(2): 187-191.
- Boiron P .** (1996). *Organisation et biologie des champignons*. Nathan. Paris. P. 19-79.
- Bombeck P.L.,** Aurore R. et Jacques Hébert. (2016). L'utilisation de l'hydrolyse enzymatique pour la production de nanocellulose dans une stratégie de bioraffinage forestier intégré (synthèse bibliographique). *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*. 20(4) : 310-31.
- Boonvitthya N.,** Sophie B., Vorakan B., Michael J., Donohue O., and Warawut C. (2013). Comparison of the heterologous expression of *Trichoderma reesei* endoglucanase II and cellobiohydrolase II in the yeasts *Pichia pastoris* and *Yarrowia lipolytica*. *Molecular biotechnology* , 54(2) : 158-169.

**Bouix M.** et Leveau J-Y. (1991). Les levures .Techniques d'analyse et de contrôle dans les industries agroalimentaires, édition 2 Lavoisier-Tec & Doc, Paris. 3. PP : 206-229.

**Boukail H. A.** et Maazi A . (2015). $\alpha$ -glucosidase thermostable de la levure *Candida sp.* : Production, purification et caractérisation. Mémoire de Master. Spécialité : Analyse Protéomique et Santé. Département : Biochimie/ Biologie Cellulaire et Moléculaire . Université des Frères Mentouri Constantine.

**Boukhennane M.** et Boudebza D. (2014). Production mixte d' $\alpha$ -amylase et de maltase par *Candida sp.* Fermentation dans un milieu de culture, cinétique de production et caractérisation des enzymes. Mémoire de Master. Spécialité : Biochimie / Analyse Protéomique et Santé . Département : Biochimie/ Biologie Cellulaire et Moléculaire Université Mentouri. Constantine.

**Boulefkhad N.** et Talhi A. (2018). La mise en évidence de la production de quatre enzymes (protéase, amylase, cellulase et pectinase) par des micro-organismes isolés à partir d'eau thermale et sol proche des sources thermales . Mémoire de Master . Spécialité : Microbiologie Générale et Biologie Moléculaire des Micro-organismes Université des Frères Mentouri Constantine 1.

**Bourat G.** (1992). Propriétés des micro-organismes, traité génie des procédés. Journal de technique de l'ingénieur, Paris. Volume 6.

**Bourgeois CM.** et Larpent J. P. (1996). Microbiologie alimentaire. Tome II aliment fermentés et fermentations alimentaires. Ed. Tec. et Doc. Lavoisier, Paris. P . 100-450.

**Bourgeois CM.** et Leveau J.Y. (1991).Techniques d'analyse et de contrôle dans les industries agro-alimentaires.Vol III:le contrôle microbiologique.(Ed).Lavoisier.Paris P. 451.

**Buzzini P. (2000).** An optimization study of carotenoid production by *Rhodotorula glutinis* DBVPG 3853 from substrates containing concentrated rectified grape must as the sole carbohydrate source. Journal of industrial microbiology and biotechnology , 24: 41-45.

**Cabon L.,** Ana-Carolina M.T. and Santos A. Susin M. (2013). La mort cellulaire programmée ne manque pas de vocabulaire. Médecine sciences , 29(12) : 1117–1124.

**Camarero, S. L. D.,** Martinez M.J., Martinez A.T. (2005). Lignin-derived compounds as efficient laccase mediators for decolorization of different types of recalcitrant dyes. Applied and Environmental Microbiology , 71(4): 1775-1784.

- Cao J.** Zheng L. and Chen S. (1992). Screening of pectinase producer from alkalophilic bacteria and study on its potential application in degumming of rammie. *Enzmologie . Microbiologie. Technologie* , 14 : 1013-1016.
- Carvalho** C.M., Meirinho, S., Estevinho, and Choupina A. (2010). yeast species associated with hony :different identification méthodes *Archivos de zootecnia*, 59( 225).
- Carvalho** W. , Larissa C. , Silvio S. (2008) .Semi-continuous xylose-to-xylitol bioconversion by Ca-alginate entrapped yeast cells in a stirred tank reactor *Bioprocess and Biosystems Engineering* ,31:493–498.
- Chatterton J.R.**, Vogelsong K.M., Lu Ellman A.B. and Hudgens G.A. (1996). Salivaryamylase as a measure of endogenous adrenergic activity. *Clinical Physiology*. 16 (4) : 344-348.
- Chen L. S.**, Cui N., Ding Q. B., Ma Y., Chen L. J., Dong J;, Y., JiangT. M., and Maubois J., I. (2011). The effect of yeast species from raw milk in China on proteolysis and aroma compound formation in camembert type cheese. *Food and Bioprocess Technology*, 10: 1-9.
- Cherry** J.R . and Fidantsef A. L. (2003). Directed evolution of industrial enzymes: An update. *Current Opinion in Biotechnology* , 14, 438-443.
- Choi** H. M. A., Donati R., Parini D., Melis R., Gatti N., Bresolin G., Scarlato. And Comi G. P. (2013). Molecular characterisation of Gsd III subjects and identification of six novel mutations in AGL. *Human mutation*. 20(6) : 480–480.
- Claus** H. (2004) . Laccases: structure, reactions, distribution. *Micron*, 35 (1-2): 93-96.
- Cordeiro** CA. Leal M.L. and Luciano A.B. (2002). Production and proprieties of  $\alpha$ -amylase from thermophilic *Bacillus* sp. *Braz. J. Microbiologie* . 33(1).
- Dahlqvist** A. (1961). Pig intestinal  $\beta$ -glucosidase activities. Relation to  $\beta$ -galactosidase (lactase). *Biochimica et biophysica acta*. 50(1) : 55–61.
- Dali** N., Sofia H. A. (2016). Recherche de levures productrices d'enzymes glycolytiques exocellulaires thermostables : Production (sur boite de Pétri et en batch) et Caractérisation des enzymes produites. Mémoire de Master . Spécialité : Biochimie / Analyse Protéomique et Santé . Département : Biochimie/ Biologie Cellulaire et Moléculaire .Université Mentouri Constantine.
- De Souza** PM. et De Oliveira Magalhães P. (2010). Application of microbial  $\alpha$ -amylase in industry. A review *Braz J. microbiology*. 41(4) : 850-61.

- Deak T.** (2006). Environmental Factors. Influencing yeasts, in yeast handbook : biodiversity and ecophysiology of yeasts, Carlos rosa, gabor peter (eds.). Springer Verlag Berlin Heidelberg. : 155-174.
- 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, 2nd edition, Volume Three, The Firmicutes. Springer, New York, USA.
- Djekrif D. S.** Gillmann L, Cochet N, Bennamoun L, Ait-kaki A, Labbani K, Nouadri T. and Meraihi.Z. (2014). Optimization of thermophilic pullulanase and  $\alpha$ -amylase production by amyolytic yeast. International journal of microbiology research. 6 (2) : 559-569.
- Djekrif D. 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. Département de Biochimie et Biologie Moléculaire et Cellulaire / Laboratoire de GMA. Université Mentouri Constantine.
- El-Sharoud W.M.,** Belloch C, Peris D., Querol A. (2009). Molecular identification of yeasts associated with traditional Egyptian dairy products. Journal of Food Science. 74: 341-346.
- Enguita F.J.,** Martind.L.M. , Henriques. A.O. , Carrondo M.A., crystalline. (2003). Structure of a bacterial endospore coat componet. A laccase with enhanced thermostability propertries . journal of biological chimistrie . 278 :19416-19425.
- Ertan F.,** Yagar H., and Balkan B. (2006). Some Properties of free and immobilized alpha-amylase from *Penicillium Griseofulvum* by Solid state fermentation. Preparative biochemistry & biotechnology. 36(1) : 81-91.
- Faure D .** Bouillant M. L., and Bally R. (1994) Isolation of *Azospirillum lipoferum* 4T Tn5 mutants affected in melanization and laccase activity. Applied and Environmental Microbiology , 60 : 3413-3415.
- Favela-Torres E.** Volke-Sepúlveda T. and Vniegra-Gonzalez G. (2006). Production of hydrolytic polymerizing pectinases. Food Technology and Biotechnolgy., 44(2), P: 221-227.
- Feillet P.** (2000). Le grain de blé: composition et utilisation. INRA Editions. Paris. P. 114-121.

- Ferhat H. S.** and Laklouka N. (2015). Contribution à l'étude de l'alpha amylase levurienne optimisation des conditions de production. spécialité : Biochimie Appliquée . département de biologie cellulaire et moléculaire Université Echahid hamma Lkhdar d'eloud .
- Fogarty W.M.** and Kelly C.T. (1980). Amylase, amyloglucosidase and related glucanases. In Rose (A.H.) Ed. Economic microbiology, microbial enzymes and bioconversion. London: Academic Press, 5 : 115-170.
- Fogarty M.V** and Kelly, C.T. (1983) In Microbial Enzymes and Biotechnology. ed. Fogarty, M.W. London & New York: Elsevier Applied Science Publishers. p. 131-182
- Forgacs E.**, Cserhatila T., Oros G. (2004). Removal of synthetic dyes from wastewaters: a review. Environment International , 30: 953–971.
- Frasconi M.** Favero G., Boer H., Koivula A. and Mazzel F. (2010). Kinetic and biochemical properties of high and low redox potencial laccases from fungal and plant origin . Biochimica et Biophysica Acta, 1804 : 899-908.
- Gainvors A.** and Belarbi A. (1995). Detection methods for polygalacturonase producing strains of *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast ,10 : 1311-1319.
- Gainvors A.**, Nedjaoum N., Gognies S., Muzart M., Nedjma M. and Belarbi A. (2000). Purification and characterization of acidic endo-polygalacturonase encoded by the PGL1-1 gene from *Saccharomyces cerevisiae*. FEMS Microbiology Letters. 183(1): 131- 135.
- Galzy P.**, Moulin G. et Adrian J. (1996). Présence et utilisation des levures en alimentation humaine. agriculture et alimentation : 656-662.
- Givaudan A.** (1993). Polyphenol oxidase in *Azospirillum lipoferum* isolated from rizerhizosphere: vidence for laccase activity in non-motile strains of *Azospirillumlipoferum* FEMS MicribiogyL. Letters, 108, 205-210
- Gong Z.**, Wang Q., Shen H., Cuimin H.U., Jin G., and Zongbao K.. (2012). Cofermentation of cellobiose and xylose by *Lipomyces starkeyi* for lipid production. Bioresource technology 117 : (3) 20–24.
- Gonzalez C.F.**, Farina J. I. and de Figueroa L. I. C. (2008). Optimized amyolytic enzymes production in *Sacchromycopsis fibuligera* DSM-70554: An approach to efficient cassava starch utilization. Enzyme and microbiol technology,42 : 272-277.
- Grbavčić S.**, Darka M., Mirjana R-S., Mirjana A., Marina Š., Ivanka K., and Zorica K-J. (2015). Development of an environmentally acceptable detergent formulation for

fatty soils based on the lipase from the indigenous extremophile *Pseudomonas Aeruginosa* Strain. *Journal of Surfactants and Detergents*. 18(3) : 383-95.

**Greppi A.** (2013). Yeast dynamics during spontaneous fermentation of mawè and tchoukoutou, two traditional products from Benin. *Int. J. Food microbiology*, 165 : 200-207.

**Groeme R .J.**, Jaekel M., Le Mignon K., Jain E., Nony V., Baron.B P. Briozzo V. Bordas L.F., Mascarell P.and Moingeon. (2015). Production et caractérisation d'Amb a 11 mature, un nouvel allergène majeur du pollen d'ambrosie (*Ambrosia artemisiifolia*) avec une activité cystéine protéase, à pH acide. *Revue Française d'Allergologie*, 55(3) : 222-256.

**Goldbeck R.**, Andrade C.C.P., Pereira G.A.G., Filho M. (2012) Screening and identification of cellulase producing yeastlike microorganisms from Brazilian biomes . *Afr. J. Biotechnol.* 11(53): 11595-11603.

**Guerzonl M .E.**, lanclotl R., Vanninl L. , galgano F. , favai F. et suzzl .G. (2001) variability of the lipolytic activity in *Yarrowia lipolytica* and its dependence on environmental conditions .*Food Microbiologie* ,69 :79-89 .

**Guiraud J.P.** (2003). *Microbiologie alimentaire*. Ed. DUNOD. Paris, P : 651-655.

**Guiraud J.P.** ( 1998). *Microbiologie alimentaire* Ed. Dunod. P: 320-652.

**Guiraud J.P.** ( 1998 ). *Microbiologie alimentaire*. Dunod, Paris.

**Guo G.** Liu Y., Yang J. and Ma X. (2006). Identification, activity and function determination of several salivary enzymes secreted by *Macrosiphum avenae*. *Acta Entomologica Sinica* , 49: 768–774.

**Gupta R.**, Beg Q. et Lorenz P. (2002). Bacterial alkaline proteases: Molecular approaches and industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 59(1):15-32.

**Gupta R.**, Gigras P., Mohapatra H., Goswami V. K. and Chauhan B.( 2003) Microbial  $\alpha$ -amylases: a biotechnological perspective. *Process Biochem.*, 38: 1599-1616.

**Gusakov A.**, Sinitsyn A., Berlin A., Markov A. et Ankudimova, N. (2007). Design of highly efficient cellulase mixtures for enzymatic hydrolysis of cellulose *Biotechnology Bioengineering* , 97: 1028–1038.

**Gutiérrez A.**, Patricia., M . G. P., Mercedes,R.E. , FranciscoJ.P., Sanz-A.J and Fernández M. (2015). Molecular characterization and heterologous expression of a

- Xanthophyllomyces dendrorhous*  $\alpha$ -glucosidase with potential for prebiotics production. Applied microbiology and biotechnology, 15(2) : 1–11.
- Hadfield K.A.** Bennett A.B. (1998). Polygalacturonases: many genes in search of a function. Plant Physiology. 117: 337-43.
- Haifeng L.** Zhenming C., Xiaohong W., Xiaohui D., Liyan M. et Lingmei G. (2006). Purification and characterization of extracellular amylase from the marine yeast *Aureobasidium pullulans* N13d and its raw potato starch digestion. Enzymatic and microbiology and technology , 40 :1006-1012.
- Haq U.I .,** Ahsraf H ., Iabal J. and Qadeer M.A. (2003). Production of -amylase by *Bacillus licheniformis* using an economical medium, in: Behal A, Singh J, Sharama M.K., Pur P and Batra N., Characterisation of alkaline amylase from *Bacillus sp* AB 04. International Journal of Agriculture & Biology. 08(1): 80-83.
- Haq U . I .,** Roheena A., Ashraf H. and Shah A .H . (2002).Isolation and Screening of Fungi for the Biosynthesis of Alpha Amylase. Biotechnology , 1 (2-4) : 61-66.
- Heslot H .** (1996). L'ingenierie des proteines et ses applications . Lavoisier Technique et Documentation : 424- 432.
- Horikoshi K.** (1972) Production of alkaline enzymes by alkalophilic microorganisms Part III. Alkaline pectinase of *Bacillus* No P-4-N. Agricultural and Biological Chemistry ,36 : 285-293 .
- Hornebeck W.** (2009). Cascades protéolytiques. Médecine and longévité , 1(1) : 38–43.
- Hossam E. F. A,** Mohamed K. A. Fereg, W S. M. Rageb, Elsayed A. and Ghonaimy A. ( 2011). Isolation and identification of amylolytic yeasts from agricultural and industrial wastes. Pakistan Journal of Agricultural Sciences, 42 (3): 55-64.
- Hung V.S.,** Hatada Y., Goda S., Lu J., Hidaka Y., Li Z., Akita, M., Ohta Y., Watanabe K., Matsui H., Ito S. and Horikoshi K. (2005). Alpha-Glucosidase from a strain of deepsea *Geobacillus*: a potential enzyme for the biosynthesis of complex carbohydrates. Application Microbiology and Biotechnology, 68 :757-765.
- Ichida J.M .,** Krizov A. L., Lefebvre C.A, Keener H.M., EL well D .L and Burt J.R E.H. –(2001). Bacterial inoculum enhances keratin degradation and biofilm formation in poultry compost. Journal of Microbiological Methods, 47: 199-208.
- ISSA N ,** (2009). Etude de l'oxydation de différents composés phénoliques par la laccase de *Myceliophthora thermophila* : application à la fonctionnalisation du chitosane ; thèse de doctorats en procédés Biotechnologiques et Alimentaires , Institut National Polytechnique de Lorraine , Nancy, France.



- Jacob A.** and Rendleman Jr. (1997). Enhancement of cyclodextrin production through use of debranching enzymes. *Biotechnology and applied biochemistry*. 26(1) : 51-61.
- Janecek S.** Svensson B. and MacGregor E.A. (2014).  $\alpha$ -Amylase - an enzyme specificity found in various families of Cellular and Molecular Life Science,71: 1149-1170.
- Jaubert S.**, Laffaire J.B., Abad P., and Rosso.M.N. (2002).A polygalacturonase of animal origin isolated from the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. *Federation of European Biochemical Societies letters*. 522: 109-112.
- Jayani R.S.**, Saxena S. and Gupta R. (2005). Microbial pectinolytic enzymes: a review Protopectinase: production, properties, and applications. *Advances in Applied Microbiology*, 39: P 213-294.
- Jeanneau A.**, 2005. Etude sur la laccase de *Pycnoporus cinnabarinus*. Master, Université Pierre et Marie Curie, Paris. p 55 .
- Jegham H.** (2009). Etude de l'activité biologique et du mécanisme d'action de dérivés stéroïdiens à potentiel anticancéreux. *Science et Vie*, 12(3) : 123-632.
- Jensen L.T.** Ajua-Alemanji M. and Culotta VC. (2003) .The *Saccharomyces cerevisiae* high affinity phosphate transporter encoded by PHO84 also functions in manganese homeostasis. *The Journal of Biological Chemistry* 278(43): 36-40 .
- Jimoh S.O.**, Ado S.A, Ameh J.B. and Whong C.M.Z. (2012). Characteristics and diversity of yeast in locally fermented beverages sold in Nigeria. *World Journal of Engineering and Pure & Applied Sciences* 2 : 40-44.
- Johnson E. A.** and Echavarri C. (2011). Yeast biotechnology in Kurtzman. Part II, Chapter 3 : (eds). *The yeast. A taxonomic study*. Fifth edition. Elsevier, 1:21-45.
- Juszczak P .**, Rymowicz W . and Musiał I . (2005) . Selection of yeast strains for biomass production from raw glycerol . *Wrocław University of Environmental and Life Science*.
- Kader A J.** Omar O. and Feng L S. (1999). Isolation of cellulolytic fungi from the barrio Highlands, Sarawak.. *Review of Biodiversity and Environmental Conservation*. These de doctorat . University of Kebangsaan, Malaysia
- Karbassi A.** Vaughn R.H. (1980). Purification and properties of polygalacturonic acid trans-eliminase from *Bacillus stearothermophilus* *Canadian Journal of Microbiology* 26, 377-384.
- Kashyap D .R.**, Vohra P. K., Chopra S. and Tewari R. (2001). Applications of pectinase sin the commercial sector: areview. *Bioresource Technology* , 77 : 215-227.



- Katrin V.**, Triinu V., Karin M., Anneli A., Tiina A. (2016). Maltase protein of *ogataea* (*hansenula*) polymorpha is a counterpart to resurrected ancestor protein ancMALS of yeast maltases and isomaltases. *Yeast* (Chichester, England), 5(2) : 250-530.
- Kermiche M.** (2013). Caractérisation de certaines souches microbiennes évoluant dans le blé fermenté et mise en évidence de leurs activités enzymatiques. diplôme de Magister en Sciences Alimentaires Option : Biotechnologie Alimentaire. Département de Biotechnologie Université Constantine 1 .
- Khady B. A.** (2013). Contribution à l'étude des amylases du sorgho et leurs utilisations dans la transformation des produits amylicés. Thèse de doctorat : Sciences Agronomique et ingénierie biologique, Université de Liège-Gembloux, Gembloux, Belgique.
- Kherraz Z.** et Lorba S. (2015). Contribution à l'étude de l'influence des paramètres physico-chimiques sur l'activité amylolytiques des levures. Université Echahid Hamma lakhdar d'Eloud .
- Kirk O.** Borchertt V . and Fuglsang C.C. (2002). Industrial enzyme applications. *Current Opinion in Neurobiology and Biotechnology* , 13 : 345-351.
- Knutson K.** et Ragauskas A. (2004). Laccase-mediator biobleaching applied to a direct yellow dyed paper. *Biotechnol. Prog* ,20 (6): 1893 -1896.
- Korish M.** (2003). Production, Purification, Properties and Application of the Cellulase from a Wild type Strain of a Yeast isolate. These de doctorat. Faculty of Biology, Johannes Gutenberg- University, Mainz, Germany.
- Kreger-Van-** NJ. (1984). The yeasts, a taxonomic study. Elsevier Science publishing, Amsterdam : 1-1082.
- Kresze G. B.** 1991. Proteases during purification. *Bioprocess-technol.* 12. 85-120.
- Kumar GA.,** Nagesh,N., Prabhakart T,G. and Sekran G. (2008). Purification of extracellular acid protease, an analysis of fermentation metabolites by *Synergistes sp.* utilizing protein aceous solid waste from tanneries.*Bioresource Technology*, 99: 2364-2372.
- Kunamneni A.,** Ballesteros F. J. Plou M. Alcalde. (2007). Fungal laccase a versatile enzyme for biotechnological applications ; Departamento de Biocatálisis, Instituto de catálisis y Petroleoquímica, la SCCI, Madrid, Espagne,233.

- Kurtzman** Cletus P., Jack W. Fell, Teun B and Vincent R. (2011). Chapitre 7: Method for isolation, phenotypic characterization and maintenance of yeasts. The yeasts, a taxonomic study. Volume1, Fifth edition. Elsevier, p. 87-111.
- Labrani** 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 . Microbiologie appliquée . Constantine, Université des frères Mentouri.
- Labrecque** M-H. ( 2003). Etude de la capacité de deux souches de levures à dégrader le xylène, Mémoire pour l'obtention du grade de maître des sciences. Faculté des sciences de l'agriculture et de l'alimentation. Ed, Université Laval. p : 19-24.
- Lachance** M.A., Daniel H.M., Mayer W., prasad G.S. Guatam S.P. et Boundy Mills K . (2003). The D1/D2 domaine of the large subunit rDNA of the yeast species *clavispora lusitaniae* is unusually polymorphic . *Fems yeast Res* , 4 : 253- 258.
- Lachance** M.A., Starmer W.T., Rosa C.A., Bowles J.M., Barker J.S. and Janzen D.H. (2001). Biogeography of the yeasts of ephemeral flowers and their insects. *FEMS Yeast research*, 1 : 1- 8.
- Lachance** M-A. (2011). Yeast. *Encyclopaedia of Life Sciences*, Wiley John Wiley et sons, p.12-56.
- Lanteigne** R. L. M . (2010). Utilisation des enzymes lipase et laccase pour améliorer la blancheur d'une pâte désencrée de papier journal, mémoire de recherche en science de l'environnement, Université du Québec à trois-rivières, p 30.
- Larpent** JP. (1991). *Biotechnologie des levures*. Ed. Masson. Paris. P : 266-373.
- Larpent-gourgaud** M . et Sanglier J.J. (1992). *Biotechnologies, principes et méthodes*. Ed Doin. P 574-581.
- Lavalle** J. and Krinsky D, H. E. (2000). *Natural therapeutics pocket guide (Hudson)*. Les enzymes production et utilisations industrielles. Gauthier-Villars. France.
- Leclerc** H.( 1975). *Microbiologie générale*, Doin éditeurs, Paris. p : 28.
- Lee J.**, Lee B., Shin D., Kwak S., Bahk J.D., Lim C.O., Yun D.J. (2002). Carnitine uptake by AGP2 in yeast *Saccharomyces cerevisiae* is dependent on Hog1 MAP kinase pathway. *Molecular and Cellular Biology* ,13(3): 799-804.
- Levavasseur** L.S. (2007). Simultané de la consommation d'oxygène et de la Consistance des pâtes de farine de blé à l'aide d'un pétrin Instrumenté (le sitoxygraphe):

tentative d'explication Biochimique et rhéologique. Application à l'ajout de Laccases. Thèse de doctorat en sciences alimentaires. Université Paris VII et Paris XI.

**Leveau J.Y.** et Bouix M. (1993). Microbiologie industrielle. Les micro-organismes d'intérêt industriel. Lavoisier Technologie et Documentation , Paris, 08 : 2-92.

**Li, C.**, Du M., Cheng B., Wang L. Liu X., Yang, C. et Xu P. (2014). Close relationship of a novel Flavobacteriaceae  $\alpha$ -amylase with archaeal  $\alpha$ -amylases and good potentials for industrial applications. Biotechnology. Biofuels, 7: 18.

**Liang X.**, Fei W., Xiang L., Yu-Liang F., and Jia-Xun F. (2015). Purification and Characterization of a Highly Efficient Calcium-Independent  $\alpha$ -Amylase from *Talaromyces pinophilus* PLOS One. 10(3) : 1-95.

**Linxia L.**, Jun Z., Chuan C., Jitao T., Chengshu W. and Duqiang L. (2015). Structure and biosynthesis of fumosorinone, a new protein tyrosine phosphatase 1B inhibitor firstly isolated from the entomogenous fungus *Isaria fumosorosea*. Fungal genetics and biology, 81(7) : 191-200.

**Lodder J** . (1971). The yeasts. A taxonomie study. North Rolland Publishing Company, Amsterdam, London.

**Lopandica KS** . Zelgerb, L.K., Banzkyc F., Eliskases-Lechnerd., H. Prillingera. (2006). Identification of yeasts associated with milk products using traditional and molecular techniques, Food Microbiology, 23 :341–350.

**Lourens H. A.** and Viljoen B.C . (2002). Survival of dairy associated yeast in yogurt and yogurt related productd . Food Microbiology ,19 :597-604.

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

**Madhavi, V** and Lele .S. (.2009) « Laccase propreties, use »,BioResource 4(4),1694-1717.

**Mala B.R.**, Aparna M., Tanksale H., Mohini S., Ghatge and Vasanti V. (1998). Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases , Microbiology and molecular biology reviews , p. 597–635.

**Manyri L.** (2005). Analyse automatique d'image de population microbienne. Thèse de doctorat, Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse.

**Marija P.**, Dimitrijević A., Dejan B., Nenad M., Marija G., Dejan Š., and Dušan V. (2014). Dual effect of benzyl alcohol on  $\alpha$ -glucosidase activity : efficient substrate for

high yield transglucosylation and non-competitive inhibitor of its hydrolytic activity. Carbohydrate research. 387(4) : 14-18.

**Matharasi A.** (2018) Determination of bioethanol potential from banana waste using indigenous yeast. Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry , 7(5): 2661-2669.

**Matsuo T.**, Chie I., Takefumi Y., Takashi S., Takashi H. and Shun H. (2012). Creation of an artificial metalloprotein with a hoveyda–grubbs catalyst moiety through the intrinsic inhibition mechanism of  $\alpha$ -chymotrypsin. Chemical communications ,48(11) : 1662–1664.

**Mayer A.M.** and Staples R.C. (2002). Laccase: new functions for an old enzyme. Phytochemistry , 60: 551-565.

**Membre JM.** and Burlot P.M. (1994). Effects of temperature, pH, and NaCl on growth and pectinolytic activity of *Pseudomonas marginalis*. Applied and Environmental Microbiology, 60: 2017–2022.

**Merabti B.**, Lebouz I., Adamou A E et Ouakid M L., (2015). Effet toxique de l'extrait aqueux des fruits de *Citrullus colocynthis* (L.) Schrad sur les larves des Culicidae. Jour. Vol 5 N° 2.RBRS , (10) :120-130.

**Merabti R.** (2006). Isolement et caractérisation de souches levuriennes amylolytiques à partir de sol saharien algérien. Thèse de Magistère. Spécialité: Biochimie et microbiologie appliquée .Université Mentouri Constantine.

**Milner JA.** Martin DJ. et Smith A. (1997). Two-stage inoculate for the production of alphaamylase by *Bacillus amyloliquefaciens*. Enzyme and microbial technology. 21: 382-386.

**Mingorance C.L.**, Clemente J. M., Martinez-R.S., Las Heras F. J. and Rodriguez-V. F. (2003). Contribution of different natural yeasts to the aroma of two alcoholic beverages. World J. Microbiology and Biotechnology, 19: 297-304.

**Minussi RC.**, Pastore GM., Duran N. (2002). Potential applications of laccase in the food industry. Trends Food Science and Technology, 13: 205-216.

**Moletta R.** (2002). Gestion des problèmes environnementaux dans les industries agroalimentaires. Paris, France : Lavoisier de techniques et Documentation, P 600.

**Moller K.** Sharif M. Z. and Olsson L. (2004). Production of fungal alpha-amylase by *Saccharomyces kluyveri* in glucose-limited cultivations. J. Biotechnol ,111: 311-318.

**Morozova O.**, Shumakovich GP., Gorbacheva Ma., Shleev Sv. And Yaropolov Ai. (2007). Laccases "bleu". J Biochemistry , 72 (10): 1136-1150.

- Morvan J.** (2010). Marché européen des enzymes dans les applications alimentaires M55B, <http://www.frost.com>.
- Museum E.** (2004). Nobel Prize. Eduard Buchner : [hppnobelprize.org/chemistry/laureate](http://nobelprize.org/chemistry/laureate) 1907
- Nadeem H.** Muhammad H R ., Muhammad H S., Farrukh A., Saima M., Muhammad R J., Muhammad A ., Ijaz R. and Muhammad R. (2016). Microbial invertases : a review on kinetics, thermodynamics, physiochemical properties. *Process biochemistry*, 50(8) : 1202–1210.
- Nadirman H.** and Yoshiyuki O. (2006). Mechanism of Hydrolysis of the Treated Starch Granules by Raw Starch Digesting Amylase from *Penicillium brunneum*, *Journal Starch Starke*. 7 : 25- 28.
- Nawaz S.**, Muhammad A., Asad K., Afsheen A., Roberta M., Shah A Q. and Antonio Molinaro. (2015). Continuous degradation of maltose: improvement in stability and catalytic properties of maltase ( $\alpha$ -glucosidase) through immobilization using agar-agar gel as a support. *Bioprocess and biosystems engineering*, 38(4) : 631-38.
- Nicolas J.**, Billaud C., Rouet MA. and philipon J. (2003) . Enzymatic browning. 1. Biochemical aspects. In *Encyclopaedia of Food Science, Food Technology and nutrition*. Caballero, B., Trugo, L. et Finglas, P. M., eds., Academic Press. London, 1: 678-686.
- Nouadri T.** (2011). L' $\alpha$ -amylase de *Penicillium camemberti* PL21: Production, Purification, Caractérisation et Immobilisation. Thèse de Doctorat, Département de Biochimie et de Microbiologie .Université Mentouri Constantine.
- Odier E.** and Rouau X. (1985). Les cellulases et les enzymes de polymérisation de la lignine. Edition Gauthier- Villard. Paris, p.199-214.
- Oteng-Gyang K.** (1984). Introduction à la microbiologie ans les pays chauds. Ed. Lavoisier. Paris, P: 43-46.
- Ouédraogo N.** Savadogo A., Zongo C., Somda K. M. A. and Traoré S. (2012). High performance amylolytic yeast strains isolation and identification for valorization of potatoes waste available in Burkina. *The International Food Research Journal J*, 19(4): 1463-1469..
- Ovaere P.**, Saskia L., Peter V. and Wim D. (2009). The emerging roles of serine protease cascades in the epidermis. *Trends in Biochemical Sciences*, 34(9) : 453-463.

- Oyekanmi N.**, Sukhoon K., Se-Yong L. and Dae-Sil L. (2001). Novel  $\alpha$ -glucosidase from extreme thermophile *Thermus caldophilus* GK24. *Journal of biochemistry and molecular biology*, 34(4) : 347-354.
- Ozmen B.** and Ziya G.C. (2013). Agricultural Research Institute, Erzurum, Turkey. Isolation and Identification of Yeasts from Traditional Yoghurts and Some Microbiological Properties. Department of Food Hygiene and Technology, Faculty of Veterinary Medicine, Ataturk University, 25240 Erzurum, Turkey. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 12 (14): 1250-1255.
- Palmer T.A.** (1975). Glucose syrups in food and drink. *Process Biochemistry*. Fermentation en silos de laboratoire de pulpes de betteraves sucrières. *Belgian Journal of Food Chemistry and Biotechnology*, 98 :792-797.
- Panchal C.J.** (1990). Yeasts strain selection. Marcel Dekker (ed) USA, p. 189.
- Pandey A.**, Nigam P., Soccol C. R., Singh D., Soccol V. T. and Mohan R. (2000), *Advances in microbial amylases, Biotechnology and Applied Biochemistry*, 31(2): 135-152.
- Pando B.R.**, Lastra Q. A. and Suarez V. B. (2011). Screening of enzymatic activities in non-*Saccharomyces cerevisiae*. *Wiley Interdiscip. Reviews Systems Biology and Medicine*, 2: 98-106.
- Pardo M F.**, López L. M. I., Canals F., Avilés F. X., Natalucci C. L and Caffini N. O. (2000). Purification of balansain I, an endopeptidase unripe fruits of *Bromelia balansae* Mez (Bromeliaceae). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(9) : 3795–3800.
- Pazur J.H.** and Marchetti N.T. (1992). Action patterns of amylolytic enzymes as determined by the [1-14 C] malto-oligosaccharides mapping method. *Carbohydrate Research*. 227: 215-225.
- Peumans W.J.**, Mirjam C., Annick B., Alain R., Véronique RB., Van D. and Pierre R. (2006). Crystal structure at 1.45-Å resolution of the major allergen endo- $\beta$ -1, 3-glucanase of banana as a molecular basis for the latex-fruit syndrome. *Proteins: structure, function, and bioinformatics*, 63(1) : 235–242.
- Pierre T.** (2004). *Les organismes modernes. La levure*, édition belin, Paris. p 105-108 .
- Piontek K.**, Antorini M. and Choinowski T. (2002). Crystal structure of a laccase from the fungus *Trametes versicolor* at 1.90 resolution containing a full complement of coppers. *Journal of Biological Chemistry*, 277: 37663-37669.

- Pol D .** (1996). Travaux pratiques de biologie des levures. Pellisepse, édition marketing, 158: 21-151.
- Pommier S.** (2003). Dynamique de populations microbiennes en cultures mixtes : étude expérimentale en bioréacteur à membranes et modélisation du phénomène killer chez *Saccharomyces cerevisiae*. Thèse de doctorat. Institut national polytechnique de Toulouse. France.
- Popeijus H.** Overmars HA., Jones J., Blok VC., Goverse A., Helder J., Schots A., Bakker J. and Smant G. (2000). Degradation of plant cell walls by a nematode. *Nature*, 406: 36-37.
- Radoi F.,** Kishida M. and Kawasaki H. (2005). Endo-polygalacturonase in *Saccharomyces* wine yeasts: effect of carbon source on enzyme production. *FEMS Yeast Research*. 5(6-7): 663-8.
- Ranjan K.** and Sahay.S. (2015). *Clavispora lusitaniae* produce pH and temperature tolerant extracellular amylase. *Journal of Medical Microbiology* 1(1): 7-14.
- Ranjan K.,** Mansoor A L. and Sanjay S. (2016). Detergent compatible cold-active alkaline amylases from *Clavispora lusitaniae* CB13. *The Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*. 5(4) : 306523 .
- Rao M.B. ,** Tanksale A. M., Ghatge M. S., and Deshpande VV. (1998). Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews MMBR*, 62(3) 597-635.
- Receveur V.,** Czjek M., Schulein M., Panine P. and Henrissat B. (2002). Dimension, shape, and conformational flexibility of two domaine fungal cellulases in solution probed by small angle X-ray scattering. *The journal of Biological Chemistry*, 277 (43): 40887-40892.
- Regina S.M.,** Rosane FS., Eliana P., and Alan E. W. (2001). Isolation and identification of yeasts and filamentous fungi from yoghurts in brazil, *Brazilian Journal of Microbiology* 32:117-122.
- Rezki –Bekki M. A.** (2014) . Production et métabolite par les levure : Caractérisations des arôme et des alcool. Thèse de doctorat. Département de biotechnologie .Université d’Oron.
- Rigoldi F.,** Donini S ., Redaelli A., Parisini E. and Gautieri A. (2018). Engineering of thermostable enzymes for industrial applications. *Biomolecular Engineering Lab, Center for Nano Science and Technology at Polimi, Istituto Italiano di Tecnologia, Via G. Pascoli Milano, Italy ,70 : 3 . 20133.*



- Riken Y.**, Stephen A., Joseph J., Brian L. Strom S L., Douglas W., Pherson Mc., Srdan G., Acimovic, K D. and Klepzig. (2016). Effects of *grosmannia clavigera* and *leptographium longiclavatum* on western white pine seedlings and the fungicidal activity of alamo, arbotect, and tree-age, 25(2) : 256-652.
- Riva S.** (2006). Laccases: blue enzymes for green chemistry. *Trends in Biotechnology*, 24(5): 219-226.
- Rochefort D.** (2001). Etude des réactions enzymatiques et électrochimiques impliquées dans le bioblanchiment de la pâte à papier, Thèse de doctorat, Département de chimie Université de Montréal, Montréal.
- Romano M . 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.
- Rombouts F.M.** and Pilnik W. (1986). Pectinases and other cell-wall degrading enzymes of industrial importance. *Symbiosis* ,2 :79-89.
- Rousselle A. M.**, Bertoniere NR., Howley PS.and Goynes WR. (2002). Effect of whole cellulase on the supramolecular structure of cotton cellulose. *Textile Research Journal* 72(11): 963 -972.
- Ruriani E.**, Tliti C S. and Anja M. (2012) . Yeast Isolation for Bioethanol Production , *Hayati Journal of Biosciences* , 19( 3) : 145-149.
- Sadhasinam S.** Savitha S and Swaminathan LFH. (2008). Production, purification and characterization of mid-redox potential laccase from a newly isolated *Trichoderma harzianum* WL1. *Process Biochemistry*. 43: 736-742.
- Sakai Y.**, Goh T.K. and Tani Y. (1993) High-frequency transformation of a methylotrophic yeast, *Candida boidinii*, with autonomously replicating plasmids which are also functional in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriology* 175(11):3556-3562.
- Sakai T.**, Okushima M. and Yoshitake S. (1984). Purification, crystallisation and some properties of endo-polygalacturonase from *Kluyveromyces fragilis*. *Agricultural and Biological Chemistry*. 48(8): 1951-1961.
- Salafsky I.S.**, Henry L. and Nadler. (1971). Alpha-1,4 glucosidase activity in Pompe's disease. *The Journal of pediatrics*. 79(5) : 794-98.
- Sasaki F.**, Toshizumi M., Yutaka T. and Takashi Y. (2015). Note on cordyceps *brongniartii* Shimazu collected from the wild in Japan. *Mycoscience*, 48(5) : 312-315.



- Satoshi K.**, Toshiaki A., Takanao M. and Hiroshi S. (1993). The Syntheses of Catechinglucosides by transglycosylation with *Leuconostoc mesenteroides* sucrose phosphorylase. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 57(12) : 20-15.
- Schaller A.** (2004). A cut above the rest: The regulatory function of plant proteases. *Planta*, 220: 183-197.
- Scheen A.**, PaquoNicolas T., Van G. and Luc F. (2008). Inhibition des recepteurs CB1 et metabolisme du glucose : rimonabant dans le diabete de type 2. *Revue médicale suisse* , 4(5) : 168-632.
- Schliephake K.**, Mainwaring DE., Lonergan G.T., Jones I.K. and Baker,W.L. (2000). Transformation and degradation of the disazo dye Chicago Sky Blue by a purified laccase from *Pycnoporus cinnabarinus*. *Enzyme and Microbial Technology* , 27(1-2):100-107.
- Schmidt J.L.** (1984). La flore levure des fromages in «Lavoisier Diffusion edit, le fromage, Paris, P 265.
- Schomburg D.** and Salzmann M. (1991). *Enzyme Hand book 4. Classe 3: Hydrolases* Springer-Verlag . Berlin Heidelberg. Germany. p: 1-12.
- Scriban R.** (1993). *Trichoderma reesei* exhibitis true revercibility and a high exchange rate on cristalline cellulose. *Biotechnologie. 4ème édition* , P : 32-69,.
- Scriban R.** (1999). *Biotechnologie. 5ème édition. Techniques et Documentation – Lavoisier* P : 39, 351-356 , 401-409.
- Selinheimo E.**, Kruus K., Buchert J., Hopia A., Autio K. (2006). Effects of laccase, xylanase and their combination on the rheological properties of wheat doughs. *Journal of Cereal Science*, 43: 152- 159.
- Semedo L.**, Gomes Rc., Bon EPS., Soares R MA., Linhares L F. and Coelho R. (2000). Endocellulase and exocellulase activities of two streptomycetes strains isolated from a forest soil , *Applied biochemistry and biotechnology* , p 84-86, 267-276.
- Shen Z.**, Denton M., Mutti N., Pappan K., Kanost M., Reese J. and Reeck G. (2003). Polygalacturonase from *Sitophilus oryzae*: Possible horizontal transfer of a pectinase gene from fungi to weevils. *Journal of Insect Science*.3: 1-9.
- Sieczko M.** and Peduzz P. (2016). Variable enzymatic activity . *Biochemistry* , 5(2) : 25-36.
- Sieiro C.**, Poza M., Vilanova M. and Villa T G. (2003). Heterologous expression of the *Saccharomyces cerevisiae* PGUI gene in *Schizosaccharomyces pombe* yields an

enzyme with more desirable properties for the food industry. *Applied and Environmental Microbiology*. 69(3): 1861-1865.

**Siekstele R.**, Bartkeviciute D. and Sasnauskas K. (1999). Cloning, targeted disruption and heterologous expression of the *Kluyveromyces marxianus* endopolygalacturonase gene (EPG 1). *Yeast*, 15(4): 311-22.

**Sindhu R.**, Suprabha G N. and Shashidhar S. (2009). Optimization of process parameters for the production of alpha amylase from *Penicillium janthinellum* (NCIM 4960) under solid state fermentation. *Afr. Journal of Microbiology Research* , 3(9): 498-503.

**Singh A.** (1999). Engineering enzyme properties, *Indian Journal of Microbiology*, 39, ( 2) : 65–77.

**Singh B.** and Satyanarayana T. (2015). Fungal phytases: Characteristics and amelioration of nutritional quality and growth of non-ruminants. *Journal of animal physiology and animal nutrition*, 99(4) : 646-60

**Site 1 :** <https://www.aquaportail.com/definition-5597-levure.html>.

**Site 2 :** [https://www.creativeenzymes.com/similar/pectinase\\_533.html](https://www.creativeenzymes.com/similar/pectinase_533.html).

**Sivaramakrishnan S.**, Gangadharan D., Madhavan KN. and Pandey A. (2006). Solid Culturing of *Bacillus amyloliquefaciens*, for alpha amylase Production, *Food Technology and Biotechnology*, 44(2): 269-274.

**Smant G.**, Stokkermans J.P.W.G., Yan Y., De Boer JM., Baum TJ., Wang X., Hussey RS ., Gommers FJ., Henrissat B., Davis EL., Helder J., Schots A. and Bakker J. (1998). Endogenous cellulases in animals: isolation of beta-1, 4-endoglucanase genes from two species of plant-parasitic cyst nematodes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* , 95(9):4906-4911.

**Somdatta C.**, Bartina G. and Rina R. (2011) . Isolation and characterization of local yeast strain from wast fruit juice ,jaggery and dahi samples , *Int. journal of Chemistry . Scientific* , 9(2): 647-656.

**Srebotnik E.** and Hammel K.E. (2000). Degradation of nonphenolic lignin by the laccase1 hydroxybenzo triazole system. *Journal of Biotechnology*, 81 (2-3): 179-188.

**Srinivasa R.M.**, Redd G., Venkateswara RG. and Sambasiva KRS. (2004). Studies on the extraction and characterisation of thermostable -amylase from pericarp of *Borassus indica*. *African Journal of Biotechnology*, 4 : 289-291.

- Sullivan GA.** and Calkins C R. (2011). Ranking beef muscles for Warner-Bratzler shear force and trained sensory panel ratings from published literature. *Journal of Food Quality*, 34(3): 195–203.
- Sumantha A.** Larroche C. and Pandey A. (2006). Microbiology and industrial biotechnology of food-grade proteases: A perspective. *Food Technology and Biotechnology*, 44 (2) : 211–220.
- Suzzi G.,** Lanorte M T., Galgano F., Andrighetto, C., Lombardi A., Lanciotti R. and Guerzoni M E. (2001). Proteolytic lipolytic and molecular characterisation of *Yarrowia lipolytica* isolated from cheese. *International Journal of Food Microbiologie*, 69 : 69-77.
- Tanabe S.** Arai S. and Watanabe M. (1996). Modification of wheat flour with bromelain and baking hypoallergenic bread with added ingredients. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 60(8): 1269-1272.
- Tapdiqov S Z.,** Nizami A Z., Dilgam B T., Saadat FH., Samira M M., Elnara F N., and Dilshad TB. (2015). Hydrogels for immobilization of trypsin based on poly-n-vinylpyrrolidone and arabinogalactan graft copolymers. *Journal of The Chemical Society of Pakistan*, 37(6) : 1112
- Tauzin H.,** Gwenaël R., Céline V ., Philippe S., Philippe H. and Patrice Muret. (2014). A skin substitute based on human amniotic membrane. *Cell and tissue banking*, 15(2) : 257-265.
- Temim M.** and Hamaidia N . (2018). Screening et identification des levures pour la mise en évidence d'activité enzymatique . Mémoire de Master. Département : Biochimie/ Biologie Cellulaire et Moléculaire . Université Mentouri Constantine.
- Thanh V N.** (2006). *Lipomyces orientalis sp.* a yeast species isolated from soil in Vietnam. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56: 2009-2013
- Thapa S.,** Shrestha R., Tirewal A., Sharma A. and Yuvraj K.C. (2015). Isolation of yeast from soil and different food samples and its characterization based on fermentation. *Nepal Journal of Biotechnology*, 3(1) : 29-34.
- Thongekkaew J.,** Wanlee P., and Apichat J. (2014). Cellulase and xylanase production from *Candida easanensis* using agricultural wastes as a substrat. *Songklanakarin Journal of Science and Technology* ,36( 6).
- Thuriaux P.** (2004). Les organismes modèles de la levure. Ed. Belin. P . 15- 27, 42- 44.

- Tingry S.**, Marc C. and Innocent C. (2013). Les biopiles enzymatiques pour produire de l'électricité . Institut Européen des Membranes, Université Montpellier . L'actualité chimique n° 373.
- Trap C.** et boireau P. (2000). Les protéases chez les helminthes. *Veterinary Research*, 31 : 461-471.
- Uhlig H.** (1998). *Industrial Enzymes and Their Applications*. John Wiley and Sons, New York, 435.
- Vanhanen L .**, Alastair B ; R., Geoffrey P .S . and Sue M. (2000). Effect of Cooking on the Soluble and Insoluble Oxalate Content of Some New Zealand Foods. *Journal of Food Composition and Analysis* 13(3):201-206 .
- Van Z.**, John H D., Riaan D H. and Willem H. (2016). Overexpression of native *Saccharomyces cerevisiae* ER-to-Golgi SNARE genes increased heterologous cellulase secretion. *Applied microbiology and biotechnology*, 100 (1) : 505-518.
- Vaz-DC.**, Campuzano S., Rudiger O., Pita M., Gorbcheva M., SHLEEV S., Fernadezv M.and Delacey AL. (2008). Laccase electrode for direct electrocatalytic reduction of O<sub>2</sub> to H<sub>2</sub>O with high-operational stability and resistance to chloride inhibition ». *Biosensors and Bioelectronics* ,24 : 531-537.
- Veyradier A.** and Paul C. (2011). La protéase spécifique du clivage du facteur von Willebrand. *Medecine Sciences*, 27(12) : 1097.
- Walker G. M.** and White N. A. (2005). Introduction to Fungal Physiology. In «Kavanagh K., *Fungi: Biology and applications*, John Wiley & Sons Ltd., Chichester » P: 267.
- Walker G.** (2000). The role of metal ions in optimising yeast fermentation performance. In: Nutritional aspects II. Synergy between yeasts and bacteria. Allemand Technical Meeting ,p: 27-30 .
- Walker G.M.** (1998). *Yeast. Physiology and Biotechnology* John Wiley and Sons, Chichester, P :362
- Walker G.M.** (2009). Yeast In M. Schaechter, ed. *Desk Encyclopedia of microbiology*. 2nd ed. London : Elsevier/ Academic Press. P 1174-1187.
- Walker L.P.** and Wilson D B. (1991). Enzymatic hydrolysis of cellulose: An overview, *BioResource Technology*, 36(1): 3-14.
- Walsh G.** (2002). *Biochemistry and Biotechnology*. J. W. and Sons (Ed.) England ,420 .

- Wang X.U. Z.**, Lewis L ., Scott A., Weber R. and Xiaoping Z. (2015). Two new native  $\beta$ -glucosidases from *Clavispora nrri* y-50464 confer its dual function as cellobiose fermenting ethanologenic yeast. *Plos one*. 11(3) : 151-293.
- Wyder M T.** and Puham Z. (1999) . Role of selected yeasts in cheese ripening :An evaluation in aseptic cheese curd slurries . *International Dairy journal* ,9(2) :117-124.
- Xu B.** (2002). Endoglucanase and Mannanase from Blue Mussel, *Mytilus edulis*: Purification, Characterization, Gene and Three Dimensional Structure. Thèse de doctorat. Faculty of Science and Technology, Uppsala University, Sweden.
- Xu B.**, Hellman U. and Janson JC. (2000). Purification, characterisation and amino-acid sequence analysis of thermostable, low molecular mass endo-  $\beta$ -1,4 glucanase from blue mussel, *Mytilus edulis*. *European Journal of Biochemistry*, 267 : 4970-4977.
- Xuesong L. I.** (2016). Proteines structure et fonctions. Université de Liège. 123-356.
- Yalçın T .H.**, Çorbacı C. (2013). Isolation and Characterization of Amylase Producing Yeasts and Improvement of Amylase Production . *Turkish Journal of Biochemistry– Turk J Biochem* , 38 : (1) 101–108.
- Yang C .H.**, Yu-C. H., Cheng Y.C. and Chia Y .W. (2010). Heterologous expression of *Thermobifida Fusca* thermostable alpha-amylase in *Yarrowia Lipolytica* and its application in boiling stable resistant sago starch preparation. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 37(9) : 953-960.
- Yapi A** et Russell.E. Patrice YAPI.(2008). Caractérisation biochimique et applications potentielles des glucosidases et de l' $\alpha$ -galactosidase du suc digestif de la larve de *Rhynchophorus Palmarum* (Curculionidae). *Mémoire Online*, 46(6) : 541-46.
- Yihan L.**, Fuping L., Guanqun C., Crystal L., Snyder J., Sun YU L., Jianling W. and Jing X. (2010). High-level expression, purification and characterization of a recombinant medium temperature a amylase from *Bacillus subtilis*. *Biotechnology Biotechnology Letters* , 32 : 119-124.
- 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*, 1(2): 16-19.
- Zheng X.H.**, Jing C., Wei L., Cheng Y., Hai pZ., Zhang Ln., and Tian w H. (2015). Serological response and diagnostic value of recombinant candida cell wall protein enolase, phosphoglycerate kinase, and  $\beta$ -glucosidase. *Frontiers in Microbiology*, 12(4) : 125-358.



## **Abstract :**

The aim of this work is the isolation of yeasts from Algerian biotopes and the selection of strains that possess interesting bioproduction capacities. The isolation was carried out on three samples: yoghurt, honey and potato peels. These microbial niches have allowed the isolation of 17 strains depending on rapid growth on YPGA at 25°C. A macroscopic study to determine the cultural characteristics of isolated yeast strains after a 2-day culture on YPGA at 25°C, as well as a microscopic study to determine the shape, size and budding were performed. The enzymatic potential of the isolates studied was evaluated to produce 06 different activities by the growth of microorganisms on different substrates. The enzymes studied are  $\alpha$ -amylase, pectinase, maltase, cellulase, protease and laccase. The results showed that the most effective strains for  $\alpha$ -amylase, cellulase, protease, laccase and pectinase are P6, P3, P5, M3 and Y3 respectively. No strain produces maltase, strain M3 has the ability to produce 02 enzymes (protease and laccase). Also, P2 and P3 strains produce 02 enzymes (cellulase and protease) and similarly, P6 strain revealed the presence of 02 enzymes ( $\alpha$ -amylase and protease). As for the P4, P5, M2 and Y1 strains, they are proteolytic yeasts. However, strain Y3 isolated from yoghurt is capable of producing 04 enzymes (pectinase, cellulase, protease and  $\alpha$ -amylase). Due to its great diversity for enzyme production, strain Y3 is very interesting and can be used in several industries: food, detergents, textile, pharmaceutical... etc. Also, the M3 strain, which produces the laccase, can have several industrial applications such as the food industry, the textile industry, dyes, pulp and paper, in the decontamination of industrial water and also in the production of Bioethanol.

Keywords: yeast ,  $\alpha$ - amylase, pectinase, cellulase, protease and laccase

## ملخص:

الهدف من هذا العمل هو عزل الخمائر واختيار سلالات لها قدرات إنتاج حيوي مثيرة للاهتمام. تم إجراء العزلة من ثلاث عينات: الزبادي والعسل وقشر البطاطس. سمحت هذه الاوساط الميكروبية بعزل 17 سلالة وفقاً للنمو السريع عند 25 درجة مئوية. أجريت دراسة بالعين المجردة لتحديد خصائص النمو لسلالات الخميرة على YPGA المعزولة لمدة يومين عند 25 درجة مئوية ، بالإضافة إلى دراسة مجهرية لتحديد شكل وحجم وتبرعم السلالة المدروسة بعد نموها . تم تقييم الإمكانيات الأنزيمية للعزلات التي تمت دراستها لإنتاج 06 نشاطاً مختلفاً من خلال نمو الكائنات الحية الدقيقة على ركائز مختلفة. الانزيمات التي تمت دراستها هي الفا اميلاز و البروتياز والسليلاز و الملتازو لاکازو البكتناز.

ظهرت النتائج أن أكثر السلالات فعالية ل الفا اميلاز و السليلاز و البروتياز و لاکاز و البيكتناز على التوالي Y3 و M3 و P5 و P3 و P6 . لا توجد سلالة تنتج الملتازو

سلالة M3 لديها القدرة على إنتاج 02 انزيمات (بروتياز، اللاكاز) أيضاً، سلالات P3 , P2 تنتج أنزيمات (السليلاز و البروتياز) و بالمثل كشفت سلالة P6 عن وجود انزيمين (الفا الاميليز و البروتياز). أما السلالات P4 , P5 , M2, Y1 فهي خمائر منتجة لانزيمات محللة للبروتين و مع ذلك، فان السلالة Y3 المعزولة من لبن الزبادي قادرة على إنتاج 04 أنزيمات ( البيكتناز ، السليلاز ، بروتياز ، ألفا أميليز) نظراً لتنوعها الكبير في إنتاج الانزيمات، فان سلالة Y3 مثيرة جداً للاهتمام و يمكن استخدامها في العديد من الصناعات: الغذاء، المنضفات، المنسوجات و الأدوية... الخ، أيضاً يمكن أن يكون لسلالة M3 المنتجة لللكاز العديد من التطبيقات الصناعية مثل صناعة المواد الغذائية و المنسوجات و الاصباغ و لب الورق و إزالة التلوث من المياه الصناعية و كذلك في إنتاج الايثانول الحيوي..

**الكلمات المفتاحية:** الخميرة ، ألفا - الأميليز ، البكتيناز ، السليلاز ، البروتياز و اللاكاز



**Résumé :**

Le but de ce travail est l'isolement des levures à partir de biotopes algériens et la sélection des souches qui possèdent des capacités intéressantes en termes de bioproductions. L'isolement a été réalisé à partir de trois échantillons : le yaourt, miel et les pelures de la pomme de terre. Ces niches microbiennes ont permis l'isolement de 17 souches selon la croissance rapide sur YPGA à 25°C. Une étude macroscopique pour déterminer les caractères culturels des souches de levures isolées après une culture de 2 jours sur YPGA à 25°C, ainsi qu'une étude microscopique pour connaître la forme, la taille et le bourgeonnement ont été réalisées. Le potentiel enzymatique pour produire 06 activités différentes des isolats étudiés a été évalué par la croissance des microorganismes sur différents substrats. Les enzymes étudiées sont  $\alpha$ -amylase, pectinase, maltase, cellulase, protéase et laccase. Les résultats ont montré que les souches les plus performantes pour l' $\alpha$ -amylase, la cellulase, la protéase, la laccase et la pectinase sont P6, P3, P5, M3 et Y3 respectivement. Aucune souche n'est productrice de la maltase, La souche M3 a la capacité de produire 02 enzymes (protéase et laccase). Aussi, les souches P2 et P3 produisent 02 enzymes (cellulase et protéase) et de même, la souche P6 a révélé la présence de 02 enzymes ( $\alpha$ -amylase et protéase). Quant aux souches P4, P5, M2 et Y1 sont des levures protéolytiques. Cependant, la souche Y3 isolé à partir du yaourt est capable de produire 04 enzymes (pectinase, cellulase, protéase et  $\alpha$ -amylase). En raison de sa grande diversité pour la production d'enzymes, la souche Y3 est très intéressante et elle peut être utilisée dans plusieurs industries : alimentaire, des détergents, du textile, pharmaceutique.. etc. Aussi, la souche M3, productrice de la laccase peut avoir plusieurs applications industrielles comme l'industrie alimentaire, celle du textile, des colorants, de la pâte à papier, dans la décontamination des eaux industrielles et aussi dans la production du Bioéthanol.

**Mots clés :** levure,  $\alpha$ -amylase, pectinase, cellulase, protéase et laccase.

**Jury d'évaluation :**

**Président du jury :** Mme Bennamoun. L. M.C.B, Université Frères Mentouri Constantine.

**Encadreur :** Mme Dakhmouche. S. M.C.A, ENS, Assia Djébar, Constantine.

**Co-encadreuse :** Mme Labbani. F.Z.K M.C.B, ENS, Assia Djébar, Constantine

**Examineur :** Mme Abdelaziz . W M.C.B, Université Frères Mentouri Constantine

**Année Universitaire : 2018-2019**