

République Algérienne Démocratique et Populaire

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

Département de Biochimie



Mémoire présenté en vue d'obtention du diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Spécialité : Biochimie Appliquée

Intitulé

**Etude d' α -amylase levurienne : Production,
optimisation et immobilisation**

Présenté par :

- ❖ **Mahious Rayane**
- ❖ **Rehahlia Narimane**

Jury d'évaluation :

Présidente : Mme Bennamoun L.	MCB, UMC Constantine.
Encadreuse : Mme Dakhmouche S	MCA, ENS Assia Djebbar, Constantine.
Examinatrice : Mme Labbani F.Z.K.	MCB, ENS Assia Djebbar, Constantine.

Année Universitaire

2019-2020

﴿سبحانك لا علم لنا الا ما علمتنا انك انت العليم الحكيم﴾
[البقرة: 31]

فكل بلوه جادها العلم اذهرت

رباها وصارت تنبت الغز لا العشبا

Remerciement

Nous tenons tout d'abord à remercier *Allah* qui nous avons donné la santé, le courage et la volonté tout au long de nos études pour arriver-la

Nous remercions vivement

M^{me} Dakhmouche-Djekrif Scheherazed C'est pour nous un grand honneur de vous voir encadrer ce mémoire. Ce travail est une occasion pour nous d'apprécier vos qualités humaines et professionnelles. Nous vous remercions pour vos précieux conseils et votre bienveillance. Vous nous avez transmis le goût pour la recherche qualitative en soins primaires tout au long de notre projet.

Aux membres de jury

Qui ont bien voulu de superviser ce mémoire La présidente **M^{me} Bennamoun L.**

Nous sommes très sensibles à l'honneur que vous nous faites en acceptant de présider la soutenance. Veuillez accepter l'expression de notre profond respect et notre reconnaissance.

L'examinatrice **M^{me} Labbani F.Z.K.**

C'est avec amabilité et spontanéité que vous avez acceptée de juger ce travail. Qu'il nous soyons permis à travers ce travail de vous témoigner notre estime.

A toutes les personnes

Qui n'ont manqué aucun effort et ont contribué de près et de loin à la réalisation de ce travail même sous forme d'encouragement.

Dédicaces

Je dédie ce mémoire à mes chers parents pour toutes ces
années de sacrifices.

A mon meilleur papa dans le monde *Kamal*, qui m'a
toujours fait confiance et poussée à donner le meilleur
de moi-même.

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

DJEDI garde leurs âmes dans son vaste paradis

A mes frères *Samir, Sicham, Djamel*

A mes sœurs *Lamyra* et *Loubna*, les femmes de mes
frères *Soumiaet Sadjer* pour leur amour, et l'aide tout
au long des années scolaires.

A mes neveux *Aness, Anfale, Adam, Ryme* et la petite
Amina, Narimene, Mjouade abde karim

I Love You My Dear Family

A ma chère collègue dans ce travail *Narimene*.

**A tous mes amis qui ont su arroser dans mon cœur joie
et bonheur.**

Rayane Mahious

Dédicace

Je dédie ce mémoire

A mon très cher père Abderrahmane

De tous les pères, tu es le meilleur. Vous avez été et serez toujours un exemple
pour moi.

Ce travail est votre travail, vous qui m'avez donné tant de choses et vous
continuez à le faire ... sans jamais vous plaindre. J'aimerais pouvoir vous
rendre tout l'amour et le dévouement que vous nous avez offerts, mais une
vie entière ne serait pas suffisante. J'espère au moins que ce mémoire
contribuera en partie à cela ...

Puisse Dieu vous préserver et vous procurer santé et bonheur.

A ma très chère mère Aicha

Une source inépuisable de tendresse, de patience et de sacrifice. Votre prière
et votre bénédiction m'ont été d'une grande aide tout au long de ma vie. Quoi
que je puisse dire et écrire, je ne pouvais pas exprimer ma grande affection et
ma profonde gratitude. J'espère ne jamais vous décevoir, ni trahir votre
confiance et vos sacrifices.

Je t'aime maman...

À ma chère collègue dans ce travail Rayene

Vous avez été avec moi tout au long de ce travail et je vous en suis très
reconnaisant. Il n'y a aucune dédicace qui puisse exprimer des sentiments
d'amour fraternels.

Merci pour votre précieuse aide à la réalisation de ce travail.

A mes sœurs Rayane, et Sadjer

Je ne peux pas exprimer à travers ces lignes tous les sentiments d'amour et d'affection envers vous. Je vous souhaite bonne chance dans votre vie.

A ma petite sœur Chaima

Une sœur comme on ne peut trouver nulle part ailleurs, Puisse Allah te protéger, garder et renforcer notre fraternité.

Merci pour ton encouragement en particulier, cette phrase : "I love you, keep going"

A ma sœur Sabrin que ma mère n'a pas eue

Je ne saurai traduire sur du papier l'affection que j'ai pour Toi, Je n'oublierai jamais tous les merveilleux moments que nous avons passés ensemble ☺
j'implore Allah de te réserver un avenir meilleur.

Rehablia Narimaine

Table des matières

Liste des abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Introduction	01
les levures	
1. Généralités.....	03
2. Caractéristiques des levures.....	04
2.1. Caractéristiques morphologiques de la production	04
2.2. Caractéristiques sexuelles.....	04
2.3. Caractéristiques culturelles.....	05
3. Facteurs influençant la croissance des levures.....	05
3.1. Température.....	05
3.2. Pression.....	07
3.3. Éléments nutritifs.....	07
3.3.1. Source de carbone.....	07
3.3.2. Source d'azote.....	08
3.3.3. Humidité.....	08
3.3.4. Sels minéraux.....	09
3.3.5. Vitamines.....	09
3.4. Eau.....	09
3.5. PH.....	10
3.6. Inhibiteurs des levures.....	10
3.7. Facteurs biotiques.....	10
3. Isolement des levures.....	11
4. Utilisation des levures.....	16
5.1. Utilisation des levures dans le domaine alimentaire.....	16
5.1.1. Panification.....	16
5.1.2. Fromagerie.....	16
5.1.3. Vinification.....	17
5.1.4. Levures des bières	17
5.1.5. Levures des cidres.....	17
5.1.6. Production des protéines.....	17
5.2. Agro-alimentaire.....	18
5.2.1. Levures probiotiques.....	18

5.2.2. Levures des distilleries.....	19
5.3. Agriculture	19
5.4. Thérapeutique.....	20
5.5. Autres utilisations des levures	20
6. Levures productrices d'enzymes.....	20
7. Levures amylolytiques.....	24
7.1. Levures productrices des amylases extracellulaires.....	24
7.2. Système amylolytique chez les levures.....	24

Chapitre 2 : α -amylase

1. Généralités.....	27
2. Définition.....	27
3. Nomenclature.....	28
4. Structure.....	28
5. Origine	29
5.1. α -Amylase végétale.....	29
5.2. α -Amylase animale	29
5.3. α -Amylase microbienne.....	30
5.3.1. α -Amylase bactérienne.....	30
5.3.2. α -Amylase fongique.....	30
6. Fermentation et production d' α -Amylase microbienne.....	35
6.1. Micro-organisme associé à la production industrielle d' α -amylase .	34
6.1.1 Bactéries productrices industrielles des α -amylases.....	34
6.1.2. Champignons producteurs industriels des α -amylases.....	35
6.1.3. Levures productrices des α -amylases	40
6.2. Fermentation en milieu liquide ou submergée(SMF).....	42
6.3. Fermentation en milieu solide FMS (SSF pour Solid State Fermentation).....	43
7. Paramètres du processus de la production	44
7.1. Température.....	44
7.2. pH.....	45
7.3. Durée de la fermentation.....	46
7.4. Source de carbone.....	46
7.5. Source d'azote.....	47
7.6. Ions de calcium.....	49
7.7. Humidité.....	49

8. Amélioration de la production d'α-Amylase microbienne.....	49
8.1 Optimisation du milieu par des plans statistiques.....	49
8.1.1. One-factor-at-time method (méthode d'O.F.A.T).....	50
8.2.1. Plans des Plackett et Burman.....	51
8.2.2. Plans des composites centrés de Box et Wilson.....	52
8.2.3. Plans des Box – Behnken.....	53
8.2.4. Méthodologie de surface de réponse RSM.....	54
8.2. La manipulation de la souche par le génie génétique	55
8.2.1. Mutagenèse.....	55
8.2.2. Technologie d'ADN recombinant.....	55
9. Purification d'α-Amylase.....	58
10. Caractérisation d'α-Amylase.....	63
10.1. Température et thermostabilité.....	63
10.2. pH.....	64
10.3. Poids moléculaire.....	65
10.4. Substrat et paramètres cinétiques.....	65
10.5. Effet du calcium.....	67
10. 6. Stabilité d'alpha-amylase.....	67
11. Immobilisation d'α-amylase.....	71
12. Application industrielle d'α-amylase.....	74
12.1. Amidonnerie.....	74
12.2. Alimentation et boulangerie	75
12.3. Papier.....	75
12.4. Textile.....	75
12.5. Détergents.....	76
12.6. Production d'alcool et biocarburant.....	76
12.7. Applications cliniques et médicinales.....	76
Conclusion	78
Références bibliographiques.....	79
Résumé	

Liste des abréviations

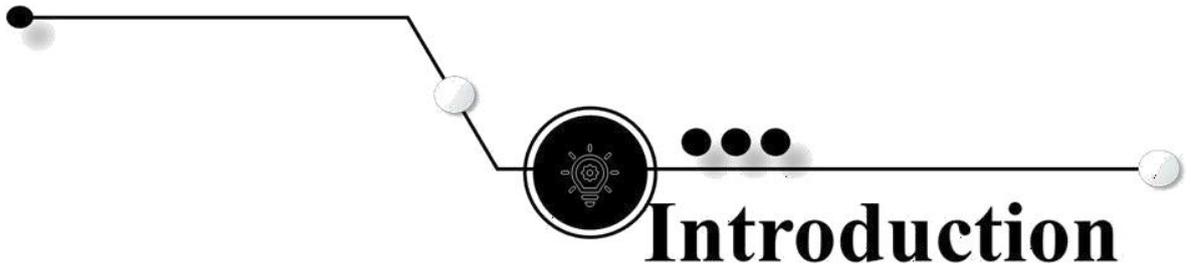
ADN :	Acide deoxyribonucléique
Aw :	Activité de l'eau.
G/l :	Gramme par Litre
KDa :	Kilo Dalton
PCR :	Polymerase Chaine Reaction
SCP :	Single Cell Protein
SSF :	Solid State Fermentation
SMF :	Submerged Fermentation
U/ml :	Unité Internationale par Millilitre.

Listes des figures

Figure 01	Aspect morphologique d'une levure	03
Figure 02	Cycle de reproduction de la levure	04
Figure 03	Image 3D d' α -amylase	28
Figure 04	Fermentation liquide pour la production l' α -amylase	42
Figure 05	Fermentation solide pour la production d' α -amylase	43
Figure 06	Plan Plackett – Burman	52
Figure 07	Plan Box – Behnken	53
Figure 08	Méthodologie de surface de réponse	54
Figure 9	Représentation schématique de la méthodologie de production, de purification et de caractérisation d'alpha amylase	57
Figure 10	Structures chimiques des amyloses et des amylopectines	66
Figure 11	Techniques des immobilisations	72
Figure 12	Applications des α -amylases	74

Liste des tableaux

Tableau 01	Température optimal pour la croissance des quelques levures	06
Tableau 02	Activité d'eau (A_w) minimale pour la croissance des quelques levures	07
Tableau 03	Besoin adéquat des certains éléments nutritifs pour la croissance des levures	08
Tableau 04	Besoins nutritifs	09
Tableau 05	Isolement des levures	13
Tableau 06	Levures productrices des enzymes	22
Tableau 07	Production des enzymes amylolytiques par certaines levures	25
Tableau 08	Sources d' α -amylase	31
Tableau 09	Fermentation et la production d' α -amylase microbienne	37
Tableau 10	Comparaison des technologies de fermentation en milieu solide et de fermentation en milieu liquide ou submergé	41
Tableau 11	Différentes méthodes utilisées pour la purification d' α amylase	60
Tableau 12	Caractéristiques physico-chimiques des quelques espèces productrices des α amylases	69
Tableau 13	Différentes méthodes utilisées pour l'immobilisation d' α -amylase	73



Introduction

L'impact des microorganismes sur les diverses activités humaines et l'omniprésence de ces êtres vivants à tous les niveaux et tous les temps, illustre bien l'importance des microorganismes et de leurs diverses activités pour l'homme. Et il serait intéressant de prendre en considération en tant qu'ennemies aussi bien que partenaires dans la gestion du quotidien et du futur de notre société. Ils constituent donc, par leur diversité et leurs activités, une composante précieuse et inestimable de l'homme. Louis Pasteur, un des fondateurs de la microbiologie, a bien dit : " Dans la nature le rôle d'infiniment petit est infiniment grand."

Des nombreux produits de consommation quotidienne sont élaborés grâce à l'activité précieuse et importante des microorganismes tels que le pain, les fromages, les yaourts, les produits laitiers fermentés et les boissons alcoolisées. Toutes ces applications microbiennes en industrie agro-alimentaire sont très anciennes. En biotechnologie, les souches fongiques sont considérées comme les microorganismes les plus importants pour leur fort potentiel de développement (**Henni, 2011**). Les levures occupent une place primordiale dans l'industrie agroalimentaire (**Randrianantoandro, 2014**) et certaines espèces ont été développées en tant qu'organismes industriels pour la production hétérologue des protéines et d'enzymes (**Johnson et Erasun, 2011**).

Parmi ces enzymes, les α -amylases sont les plus commercialisées à cause de la diversité de leur large application industrielle : Industrie alimentaire humaine et animale, détergents pour lessives, industrie des tanneries et industrie pharmaceutique...) (**Vaidya et al., 2015 ; Singh et al., 2014 ; Tiwari et al., 2015 ; Ferhat et Laklouka, 2015**). Les α -amylases constituent l'un des outils-clés des biotechnologies (**Little, 2004**) et elles représentent avec les protéases 80 % du marché mondial des enzymes (**Morvan, 2010 ; Rajagopalan et Krishnan, 2008**).

Les amylases d'origine microbienne sont les plus utilisées industriellement en raison de leur faible coût, grande productivité, protection de l'environnement, la plasticité et la grande disponibilité. (**Burhan et al., 2003**). L'intérêt pour les amylases fongiques (moisissures et levures), a augmenté ces dernières années, où plusieurs investigations sont menées sur les enzymes amylolytiques extracellulaires secrétées par différentes espèces fongiques (**Ramashandran et al., 2004 ; Dakhmouche-Djekrif, 2016**). La demande de ces enzymes a aussi augmenté suite aux crises énergétiques pétrolières. En effet, pour faire face à la raréfaction du pétrole, une troisième révolution industrielle est apparue (**Rifkin, 2012**). Il s'agit de la bioraffinerie (ou raffinerie du végétal) dont le concept se base sur l'hydrolyse enzymatique totale des polysaccharides en glucose (comme la cellulose et l'amidon). Le glucose est

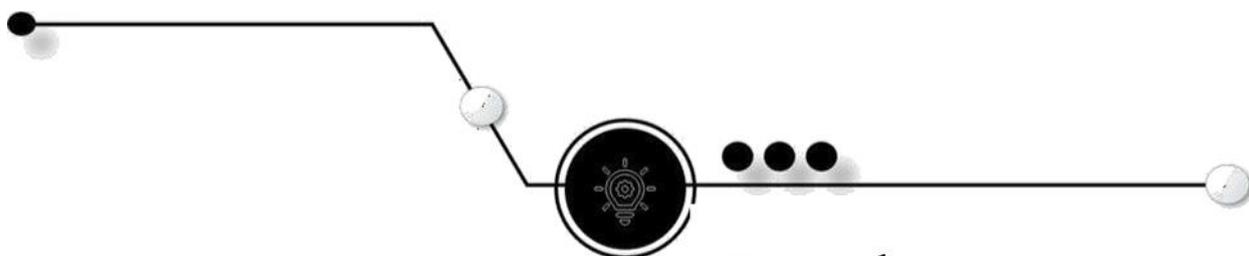
transformé à son tour et utilisé pour la fabrication des films agricoles et coating ou de plastifiants et de matériaux de performances (**Octave et Thomas, 2009**).

La production d' α -amylase par la voie biotechnologique, nécessite non seulement l'utilisation de microorganismes amylolytiques sélectionnés, mais aussi l'utilisation des substrats de fermentation bon marché, disponibles et riches en éléments nutritifs nécessaires au développement des microorganismes et à la production d' α -amylase (**Laiche, 2018**). Au cours des dernières années, des nombreuses fermentations ont été réalisées sur des déchets agroalimentaires tels que les déchets d'oranges, le lactosérum,...etc (**Nouadri et al., 2010 ; Bennamoun et al., 2004 ; Ait Kaki et al., 2012**). La valorisation biotechnologique de ces derniers par les microorganismes permet la diminution de la pollution de l'environnement, d'une part, et la production des enzymes d'intérêt industriel, d'une autre part.

Pour l'utilisation industrielle des enzymes, il serait intéressant d'améliorer leur production et leur stabilité par les méthodes d'optimisation basées sur les plans statistiques (**Francisa et al., 2003**). tels que les plans de Plackett et Burman (1946), les plans de Box et Wilson (1951), les plans de Box Behnken et la méthodologie de surface de réponse (**Toumi, 2018 ; Dey et al., 2001 ; Prajapati et al., 2014 ; Francisa et al., 2003**), par la mutagenèse et par la technologie d'ADN recombinant (**Bhardwaj et al., 2019 ; Eksteen et al., 2002**). L'application industrielle d'enzymes est souvent entravée par un manque de la disponibilité, un prix élevé et une stabilité limitée dans les conditions opérationnelles.

L'utilisation des enzymes sous forme libre est très peu rentable car les enzymes ne peuvent généralement pas être récupérées à la fin de la réaction. Ces inconvénients peuvent être surmontés en immobilisant l'enzyme (**Talekar et Chavare, 2012**). Cette technique est l'une des méthodes de protection des enzymes (**Kumari et al., 2019**) la rendant plus stable et plus facile à récupérer et à recycler (**Talekar et Chavare, 2012**). cette technique présente certains avantages : améliorer la stabilité de l'enzyme par rapport aux conditions environnementales, faciliter l'isolement de l'enzyme du milieu réactionnel, réduire les coûts de production et la possibilité de réutiliser l'enzyme dans des processus continus (**Mardani et al., 2018**).

Ce manuscrit comprend une première partie relatant l'état des connaissances sur les levures. Dans la deuxième partie Nous avons abordé les connaissances les plus importantes sur l' α -amylase (la structure, la température et la thermostabilité, pH, poids moléculaire, substrat et paramètre cinétique, l'effet de calcium et la stabilité d' α -amylase).



Les levures

1. Généralités

Les levures sont un groupe des micro-organismes unicellulaires (**Bekatorou et al., 2006**) ; ce sont des eucaryotes hétérotrophes microscopiques avec un ADN double brin (**Kurtzman et al., 2011**) (**Figure 01**). Leur origine est clairement polyphylétique car elles se classent dans les deux phyla majeurs du Fungi les Ascomycètes et les Basidiomycètes (**Defosse et al., 2018**), dans les quelle elles sont différencient selon plusieurs lignées, reflétant ainsi la grande diversité des leurs origines évolutives et leurs propriétés biochimiques (**Dakhmouche- Djekrif, 2016**).

Les cellules des levures sont généralement sphérique, ovale ou de forme cylindrique ; avec une paroi à double couche (**Akbar et al., 2012**), le cytoplasme abrite l'ensemble des organites habituels des végétaux supérieurs non photosynthétiques (**Merabti, 2006**). Les levures se divisent végétativement par bourgeonnement comme les *Saccharomyces* ou par fission binaire comme les *Schizosaccharomyce* ; à ce jour 1500 espèces des levures ont été découverts. Les levures sont chimio-organotrophie car elles peuvent utiliser des produits chimiques inorganiques comme source d'énergie (**Phale, 2018**).



Figure 01 : Aspect morphologique d'une levure (**Acha, 2008**)

2. Caractéristiques des levures

2.1. Caractéristiques morphologiques de la production

Les caractéristiques de la reproduction peuvent être utilisées pour classer la levure. Les levures reproduites végétativement (**Figure 02**) soit par :

- Bourgeonnement comme le genre *Saccharomyces*.
- Fission chez le genre *Schizosaccharomyces*.
- Formation des conidies pour le genre *Sterigmatomyces* (**Phale, 2018**).

2.2. Caractéristiques sexuelles

Les Caractéristiques sexuelles impliquent la présence d'asque et les ascospores. Le mode de la formation des asques est caractérisé pour les espèces haploïdes et homothaliques. Les ascospores sont présentes dans les asques comme pour *Kluyveromyces*, *Hansenula* ; *Pichia* (**Phale, 2018**).

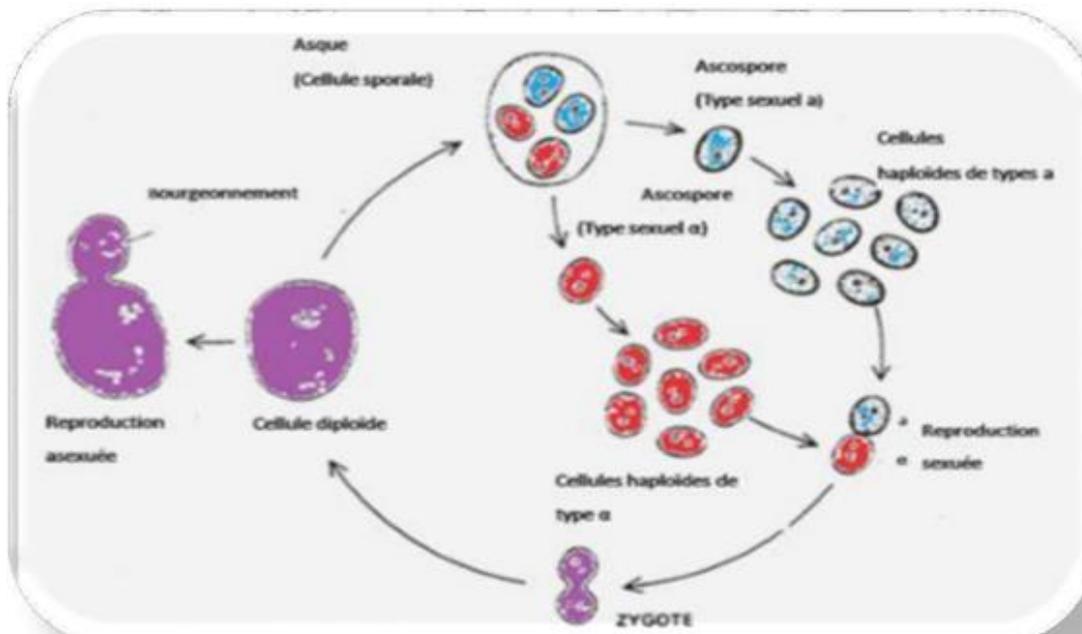


Figure 02 : Cycle de reproduction de la levure (**Laiche, 2018**).

2.3. Caractéristiques culturelles

L'étude des caractéristiques culturelles, des levures est réalisé dans des milieux liquides ou sur des milieux solides.

Les levures cultivées dans un milieu liquide peut donner lieu à la formation des sédiments, un anneau, une pellicule ; à la l'inverse La croissance sur un support solide peut-être soit par des muqueuse (*Lipomyces*), butyreuses, friables, tapis et pigmentée caractéristique pour les genres *Rhodotorula* et *Sporobolomyces* (Phale, 2018).

3. Facteurs influençant la croissance des levures

Comme tous les microorganismes, la croissance des levures exige certaines conditions physico-chimiques telles que la température, le pH, la pression et l'eau.

3.1. Température

Conformément aux lois thermodynamiques, la température influence les réactions biologiques (Dali et Hamame, 2016). Les micro-organismes thermophiles poussent à des températures comprises entre 45-80°C. Leur température minimale de la croissance se situe entre 20°C et 50 °C (Dakhmouche-Djekrif, 2016).

Les micro-organismes sont capables de se développer à des températures comprises entre 50 °C et 60°C sont désignés comme thermophiles modérés : étroitement liés phylogénétiquement aux microorganismes mésophiles, ils peuvent résulter d'une adaptation secondaire à la vie dans des environnements chauds des certains mésophiles (Bertoldo et Antranikian, 2002).

La température de culture des levures se situe entre 35 et 45°C pour leur assurer une croissance adéquate. Toutefois, ces températures ne sont pas rigoureusement, les températures optimales de croissance que les levures trouvent dans leurs habitats naturels (Dali et Hamame, 2016).

La température maximale de la croissance des levures se situe classiquement entre 35°C et 45°C. D'autres levures peuvent se développer à 0°C (Dakhmouche-Djekrif, 2016) ou à plus de 50°C : *Candida Slooffii*, *Saccharomyces telluris* et *Torulopsis bovina* (Dakhmouche-Djekrif, 2016).

D'autres levures peuvent se développer à des températures allant de 0 à 50°C, ce sont les levures mésophiles (**Dakhmouche-Djekrif, 2016**) tandis que les levures psychrophiles ont une température maximale de la croissance se situant entre 5°C et 20°C. Les levures thermophiles ont besoin d'une température élevée pour vivre qui peut aller jusqu'à 100°C (**Tableau 01**) (**Dali et Hamame, 2016**).

Dans une étude portant sur 600 souches et plus de 100 espèces des genres de *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Debaryomyces*, *Pichia*, *Candida*, 98% des levures ont une température de croissance comprise entre 24 et 48 °C (**Dakhmouche-Djekrif, 2016**). La levure *Candida thermophila*, isolée du sol en Corée, croit à 51°C (**Shin et al., 2001**).

Tableau 01 : Température optimal pour la croissance des quelques levures (**Dakhmouche-Djekrif, 2016 ; Péter et Rosa, 2006 ; Vohra, et Satyanarayana, 2003 ; Shin et al., 2001**).

<i>Espèces</i>	<i>Température (°C)</i>
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	44–47
<i>Candida glabrata</i>	43–46
<i>Candida albicans</i>	42–46
<i>Pichia guilliermondii</i>	38–43
<i>Pichia anomala</i>	35–37
<i>Yarrowia lipolytica</i>	33–39
<i>Metchnikowia pulcherrima</i>	31–39
<i>Candida vini</i>	27–31
<i>Candida zeylanoides</i>	32–34
<i>Leucosporidium scottii</i>	22–24
<i>Candida thermophila</i>	51
<i>Clavispora lusitaniae</i> ABS7	54
<i>Pichia spartinae</i>	75-80
<i>Pichia rhodanensis</i>	70-75
<i>Schwanniomyces castellii</i>	77

3.2. Pression

La pression osmotique intervient également dans le développement des levures. Son effet varie d'une souche à une autre (**Tableau 02**). la plupart des souches sont incapables de se développer à des activités d'eau inférieure à 0,90 (**Laiche, 2018**). Certaines levures sont osmotolérantes et supportent des A_w d'ordre de 0.65 comme des nombreuses levures xérotolérantes telle que *Zygosaccharomyces rouxii*, *Debaryomyces hanseii*, *Hanseula anomala*, *Pichia ohmeri*, *Schizosaccharomyces pombeet* même plus allant jusqu'à 0.70 comme *Zygosaccharomyces bisporus*, *Torulopsis candida*, *T.versatilis* et *T.etchellsii*. Ces dernières marquent une résistance important mais avec un métabolisme lente (**Rezki – Bekki, 2014**).

Tableau 02 : Activité d'eau (A_w) minimale pour la croissance des quelques levures (**Dakhmouche-Djekrif, 2016**).

<i>Levures</i>	<i>A_w</i>
<i>S.cerevisiae</i>	0,90-0,94
<i>Rhodotorula sp</i>	0,90
<i>Levures osmophiles</i>	0,62

3.3. Éléments nutritifs

3.3.1. Source de carbone

Selon **Laiche (2018)** cité par **Leveau et al (1993)**, La croissance est une période d'interaction entre la cellule et son environnement qui lui fournit les éléments nécessaires. Ce milieu subit parallèlement une modification occasionnée par le métabolisme des cellules. La croissance des levures à l'instar des tous les organismes exige la présence d'une source de carbone, d'une source d'azote, d'eau et celle des certains facteurs des croissances, parfois spécifiques à chaque espèce.

Le carbone constitue 50 % du poids sec de la levure. Les composés carbonés sont à la fois une source d'énergie. Les levures ont besoin de glucides mais elles peuvent également en produire (tréhalose, glycogène) (**Tableau 03**). La capacité des levures à utiliser les sucres varie (**Laiche, 2018**).

Tableau 03 : Besoin adéquat des certains éléments nutritifs pour la croissance des levures (**Péter et Rosa, 2006**).

<i>Espèces</i>	<i>Eléments nutritifs</i>		
	Glucose	Fructose	Sucrose
<i>Candida lactiscondensi</i>	0.79	0.78	0.70
<i>Candida versatilis</i>	0.79	0.80	0.79
<i>Debaryomyces hansenii</i>	0.84	0.86	0.81
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	0.90	0.93	0.90
<i>Pichia membranifaciens</i>	0.90	0.92	0.90
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	0.90	0.92	0.90

3.3.2. Source d'azote

En ce qui concerne les besoins en azote, la plupart des levures sont capables d'assimiler différentes sources des azotes organiques et inorganiques pour la biosynthèse des acides aminés, des protéines, des acides nucléiques et des vitamines (**Dali et Hamame, 2016**).

Selon **Laiche, (2018)** cité par **Leveau et al., (1993)**, Les levures ne peuvent cependant pas fixer l'azote libre, mais l'assimilation des ions des ammoniums est largement répandue chez ces dernières. Cependant, des autres espèces levurières se caractérisent par la capacité à utiliser les nitrates et d'autres composés comme source d'azote tels que les acides aminés libres, l'urée, la biotine et les bases puriques et pyrimidiques (**Tableau 04**).

3.3.3. Humidité

Les levures ont besoin d'une certaine humidité relative pour se développer. En effet, la plupart des levures nécessitent une humidité relative (HR%) comprise entre 90 et 95 %. Certaines espèces, les « osmophiles », peuvent se développer à une HR inférieure à 65 % (**Hencke, 2000**).

3.3.4. Sels minéraux

Comme la plupart des microorganismes, les levures ont besoin des sels minéraux et des oligoéléments en de très faibles concentrations, indispensables pour un développement adéquat (Dakhmouche-Djekrif, 2016).

3.3.5. Vitamines

Certaines espèces levurières ont besoin également d'une ou des plusieurs vitamines comme par exemple la thiamine (vitamine B1), la biotine (vitamine B8), l'inositol (vitamine B7), l'acide pantothénique (vitamine B5) et d'autres facteurs de croissance le **Tableau 04** récapitule les besoin en élément nutritif (Laiche, 2018).

Tableau 04 : Besoins nutritifs (Péter et Rosa, 2006 et Hencke, 2000).

<i>Sources des carbones et des énergies</i>	<i>Sources des azotes</i>	
	Organique	Inorganique
les sucres simples (glucose, galactose).		
les disaccharides (saccharose, maltose lactose).	Les acides aminés.	Sels des phosphates.
les trisaccharides (raffinose) pentoses (fructose et les polysaccharides).	Sels des ammoniums.	
les hexoses.	Nitrates.	Potassium.
Oligosaccharides.	L'urée.	Magnésium.
Alcools et les acides organiques.	D'autres sources d'azote.	Fer.
		Zinc.

3.4. Eau

Les éléments nutritifs sont pris dans les cellules de levure sous forme de solutions d'eau et d'eau elle-même est une condition essentielle à la vie. L'eau doit être fluide et libre (non lié chimiquement) pour être absorbé (Péter et Rosa, 2006).

3.5. pH

Selon **Rezki-Bekki, (2014)**, le maintien du pH cytoplasmique est indispensable à la survie de la levure et les limites de leur pH reportées dans la littérature se situent entre 2.4 et 8.6, avec un pH optimal entre 4.4 et 6.5. Il a été trouvé que pour la production d' α -amylase, le pH de la culture de *Saccharomyces Cervisiae* se situe entre 2.5 et 6 (**Carmelo et al., 1996**), entre 8 et 9 (**Peña et al., 2015**), il est de 4 (**Yalcin et Ozbas, 2008**), de 5.5 (**Narendranath et Power, 2005**). Le pH de *Rhodospiridium toruloides* NCYC 921 et de *Schizosaccharomyces pombe* CBS 3-6 (**Dias et al., 2016**) et 3.5 (**Jansen et al., 2006**) respectivement.

Les levures montrent une tolérance remarquable au pH et plusieurs espèces peuvent tolérer des pH acides fortes moins de 1.5, la gamme pH réelle de la croissance pour une espèce de levure dépend de la dissociation d'acide dans le milieu (**Ferhat et Laklouki, 2015**).

3. 6. Inhibiteurs des levures

Les levures supportent la plupart des acides organiques et sont inhibées par les acides lactiques, citriques et acétiques et fortement par les acides sorbiques et propioniques. D'autres stress peuvent modifier le pH comme le stress éthanolique qui provoque une chute de pH cytoplasmique qui induit le décès cellulaire. Cette diminution du pH intracellulaire peut être due soit à un influx de proton ou une accumulation d'intermédiaire de la réaction telle que l'acide acétique et le glycérole (**Rezki-Bekki, 2014**).

Selon **Ferreira et al., (2004)**, l'acide acétique, co-métabolite du métabolisme oxydo-réductif, semble plus toxique pour la levure que l'alcool éthylique et a un effet d'inhibiteur sur la croissance des cellules en provoquant une réduction de biomasse (**Giannattasio et al., 2005**).

3. 7. Facteurs biotiques

Dans les écosystèmes naturels et artificiels les levures sont soumises à des interactions avec d'autres organismes. Ces effets peuvent être plus réciproques ou unidirectionnel, neutre, synergiques ou antagonistes, et impliquent des interactions de levures avec eux-mêmes, des bactéries, des champignons filamenteux et des organismes supérieurs (**Péter et Rosa, 2006**).

4. Isolement des levures

Les levures sont des espèces ubiquitaires, largement distribuées dans la nature (**Laiche, 2018**) (**Tableau 05**). Elles ont des habitants communs de la phyllosphère : les feuilles, les tiges, les bourgeons, les fleurs et les fruits. Leur répartition est liée à divers facteurs, tels que la localisation géographique, les conditions climatiques, la saison, les espèces végétales et les organes végétaux. (**Vadkertiová et al., 2012**). Diverses espèces comme *Protomyces sp*, *Dioszegia sp*, *Cystobasidiomycetes sp*, *Microbotryozyma* ont été trouvés abondamment chez les végétaux riches en sucres directement assimilables (**Laiche, 2018**) notamment chez la plante *Arabidopsis thaliana* qui contient (**Wang et al., 2016**).

On trouve, aussi, ces microorganismes dans les milieux fortement concentrés en sucre ; tels que les sirops, le miel, les fleurs (**Laiche, 2018**). Différentes souches levuriennes comme *Cryptococcus laurentii*, *Rhodotorula mucilaginosa* ont été isolées à partir des fleurs de tilleul, de soie de maïs, de menthe et de sauge de jardin. Les genres de *Metschnikowia*, *Kodamaea*, *Wickerhamiella*, et *Starmerella* ont été trouvés en association avec des fleurs éphémères du genre *Hibiscus* (**Vadkertiová et al., 2012**). De nombreux fruits constituent un habitat favorable pour les levures tels que les pommes où les genres *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Hansenula*, et *Pichia* sont prédominants, tandis que les genres *Rhodotorula* et *Sporobolomyces*, sont moins importants (**Vadkertiová et al., 2012**). Aussi, *Candida krusei* a été isolé à partir des raisins et des dattes (**Warnasuriya et al., 1984**).

Les levures se trouvent également sur la peau et dans les tractus intestinaux des animaux à sang chaud : *Malassezia cunicularia* a été isolé de la peau du lapin (**Cabañes et al., 2011**); *Metschnikowia zobelli*, *Rhodosporidium toruloides* *Pichia anomala* ont été extraites de l'intestin des poissons, du marsouin et des insectes comme drosophile et paludisme anophèle respectivement (**Kutty et Philip, 2008 ; Walker, 2010**).

Aussi, l'eau renferme un grand nombre des levures. Les levures rencontrées dans les eaux marines sont des genres *Candida*, *Rhodotorula*, *Cryptococcus* et *Trichosporon Debaryomyces* et *Metschnikowia* (**Hinzelin et Lectard, 1974**).

Schmidt et Daudin, (1983), ont isolé différentes espèces des levures à partir de la surface et l'intérieur des fromages de Camembert préparés à partir de lait cru ; comme *Candida pseudotropicalis*, *Hluveromyces marxianus*, *Zygosaccharomyces-ouxii*, *luyveromyces laclis*, *Torulopsis sphaerica*, *Torulopsis versatilis*, *Kiuyveromyces bulgaricus*, *Debaryomyces hansenii*, *Saccharomyces ilalicus*.

Les levures

Le yaourt contient des concentrations faibles des levures comme *Candida kefir*, *Saccharomyces cerevisiae* qui possède plusieurs avantages potentiels pour la santé et un potentiel probiotique (**Karaduman et al., 2019**).

Les levures sont relativement peu nombreuses dans les sols dans lesquelles la majorité se multiplie seulement par bourgeonnement telle que : *Candida*, *Cryptococcus*, *Rhodotorula*, *Torulopsis*, *Trichosporon* (**louadj, 2014**).

Les levures

<i>Espèces</i>	<i>Isolement</i>	<i>Références</i>
<i>Aureobasidium pullulans</i>	Lac paléo-karstique du plateau de Lagoa Santa	Rosa et al., 1995
<i>Candida famata</i>		
<i>Cryptococcus albidus</i>		
<i>Cryptococcus laurentii</i> ,		
<i>Rhodotorula glutinis</i>		
<i>Rhodotorula rubra</i>		
<i>Candida oleophila</i>	Tomate	
<i>Rhodotorula glutinis Y-44</i>	Feuilles de tomate	
<i>Metschnikowia fructicola</i>		
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Raisin	
<i>Zygosaccharomyces</i>		
<i>Pichia guilliermondii</i>	Agrume	
<i>Candida saitoana</i>	Orange	
<i>Candida ciferrii</i>	Pomme	
<i>Candida sake</i>		
<i>Cryptococcus laurentii</i>		
<i>Pichia membranaefaciens</i>	Pêche	
<i>Kloeckera apiculata 34-9</i>	Citrus racine	
<i>Leucosporidium scottii At17</i>	Sol antarctique	
<i>Pichia caribbica</i>	Sol orchard	
<i>Rhodosporidium paludigenum</i>	Mer de chine orientale	
<i>Debaryomyces hansenii</i>	Mar des cortes	
<i>Candida natalensis</i>	Algue du marine	
<i>Trichosporon cutaneum</i>		
<i>Endomycopsis chodatii</i>		
<i>Pichia anomala</i>	Peau humaine, matières fécales, sucre de palme pain, pâte fermenter, oursins, eaux usées pharmaceutiques, silos des céréales et l'ensilage, huile sol contaminé	Walker, 2010

Les levures

<i>Candida valida</i>		
<i>Trichosporon beigeli</i>		
<i>Candida intermedia</i>		
<i>Yarrowia lipolytica</i>	Fromages des chèvres	Nahabieh et Schmidt, 1990
<i>Kluyveromyces marxianus</i>		
<i>Debaryomyces hansenii</i>		
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>		
<i>Cryptococcus sp</i>		
<i>Leucosporidium sp</i>	Plant d'Arabidopsis thalian	
<i>Taphrina sp</i>		Wang et al., 2016
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>		
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>		
<i>Candida glabrata</i>		
<i>Candida albicans</i>		
<i>Cryptococcus arboriformis</i>	Tube digestif des canards	Hu et al., 2018
<i>Kazachstania Bovina</i>		
<i>Candida parapsilosis</i>		
<i>Lodderomyces elongisporus</i>		
<i>Kodamaea ohmeri</i>		
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>		
<i>Candida lipolytica</i>	Traditionnels yogourts	Karaduman et al., 2019
<i>Candida tropicalis</i>		
<i>Candida guilliermondii</i>	Jus de papaye et de raisin	
<i>Kloeckera apiculata</i>	Cassis	Warnasuriya et al., 1984
<i>Saccharomyces exiguus</i>	Jus de nelli	
<i>Saccharomyces italicu</i>	Jus de mangue	
<i>Pichia fermentans</i>	Jus d'orange	

Les levures

<i>Cryptococcus gilvescens</i>	Glace arctique de surface	Butinar et al., 2006
<i>Cryptococcus victoria</i>		
<i>Cryptococcus adeliensis</i>		
<i>Cryptococcus albidosimilis</i>		
<i>Cryptococcus albidus</i>	Glace arctique basale	
<i>Cryptococcus carnescens</i>	Glace arctique de surface + Glace arctique basale	Cabañes al., 2011
<i>Cryptococcus laurentii</i>		
<i>Cryptococcus laurentii</i>		
<i>Cryptococcus liquefaciens</i>		
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>		
<i>Malassezia. Caprae</i>	Chèvre, Cheval	
<i>M. dermatis</i>	Homme	
<i>M. japonica</i>	Cheval, Vache	
<i>M. obtusa</i>		
<i>M. restricta</i>		
<i>M. yamatoensis</i>		
<i>M. equina</i>		
<i>M. furfur</i>	Homme, Vache, Eléphant, Cochon, Singe, Autruche, Pélican	
<i>M. nana</i>	Chat, Vache, Chien	
<i>M. slooffiae</i>	Homme, Porc, Chèvre, Mouton	
<i>M. sympodialis</i>	Homme, Cheval, Porc, Mouton	
<i>Torulasporea delbrueckii</i>	Sol, surface des raisins, jus d'agave	Antonio, 2018
<i>Candida thermophila</i>	Sol en Corée	Shin et al., 2001
<i>Clavispora lusitaniae</i> ABS7	Grain de blé	Dakhmouche-Djekrif. 2016

Tableau 05 : Isolement des levures.

5. Utilisations des levures en biotechnologie

Les levures sont été connues par l'homme, depuis des milliers d'années, elles ont été utilisées dans les procédés de fermentation traditionnels comme le vin, la bière et la fabrication du pain (**Bekatorou et al, 2006**). A l'heure actuelle les levures ont une grande importance dans l'industrie alimentaire et pharmaceutique, la technologie, la médecine, la biotechnologie modernes pour la production des diverses substances (vitamines, enzymes, antibiotiques, acides aminés, protéines....) ; Et aussi, les levures sont utilisées comme modèles biologiques pour l'étude de la régulation du métabolisme et la génétique générale des cellules eucaryotes (**Kopecká et al., 2012**).

5.3. Utilisation des levures dans le domaine alimentaire

Divers micro-organismes sont utilisés pour la consommation humaine, dans le monde entier, en tant que SCP ou en tant que composants des démarreurs alimentaires traditionnels. On trouve les algues (*Spiruline, Chlorelle, Laminaires, Rhodyménié*, etc.), les bactéries (*Lactobacillus, Cellulomonas, Alcaligenes*, etc.), les champignons (*Aspergillus, Penicillium*, etc.) et les levures (*Saccharomyces, Candida, Kluyveromyces, Pichia et Torulopsis*....). Cependant, *Saccharomyces cerevisiae* et *Candida* sont les plus acceptées pour la consommation humaine, alors que très peu d'espèces de levures sont disponibles dans le commerce (**Bekatorou et al, 2006**).

5.3.1. Panification

Il est connu depuis l'antiquité, que la fabrication du pain est effectuée par la fermentation aérobie de *Saccharomyces cerevisiae* (levure de boulangerie). Le dégagement de gaz carbonique, qui accompagne la fermentation, permet de faire lever la pâte en lui conférant une texture légère (**Kherraz et Lorbi, 2015**).

5.3.2. Fromagerie

Les levures participent à l'affinage des fromages par la consommation d'acide lactique produit par les bactéries lactiques (*Lactobacillaceae, Streptococcaceae*...) à partir des composants du lait. Les espèces les plus rencontrées appartiennentt aux genres *Kluyveromyces, Debaryomyces, Pichia, Saccharomyces, Torulopsis, Candida et Rhodotorula* (**Kherraz et Lorbi, 2015**).

5.3.3. Vinification

L'avènement de la compréhension scientifique de la vinification est principalement attribué à Louis Pasteur. Il a été démontré que le vin était le produit d'une fermentation alcoolique des sucres (glucose et le fructose) dans le jus de raisin par la levure ; avec la formation d'éthanol et de dioxyde de carbone (**Johnson et Echavarri-Erasun, 2011**). Les espèces des *Saccharomyces* telle que *S. cerevisiae*, *S. bayanus*, *S. uvarum*, *S. oviformis*, *S. carlsbergensis*, *S. chevalieri*, *S. diastaticus*, *S. fructuum*, *S. pasteurianus*, *S. sake*, *S. vini* et *S. beticus* (**Bekatorou et al., 2006**), *Kloeckera sp.*, *Hanseniaspora guilliermondii* (**Kopecká et al., 2012**), *Pichia anomala* (**Walker, 2010**) sont les principale espèces dominantes dans la fermentation du vin, en raison de leur capacité de produire et à tolérer des niveaux élevés des alcools lors des fermentations (**Bekatorou et al., 2006**).

5.3.4. Levures des bières

La production de bière est basé sur l'utilisation des levures ayant une capacité à convertir les monosaccharides (glucose), ou les disaccharides, trisaccharides (maltotriose) en l'éthanol et en CO₂ (**Kopecká et al., 2012**) au cour de la fermentation anaérobie. Habituellement deux *Saccharomyces* sont couramment utilisés pour la production des bières, *S. uvarum* et *S. cerevisiae*. La levure de bière est une excellente source des protéines et des vitamines telle que les vitamines B (**Bekatorou et al., 2006**).

5.3.5. Levures des cidres

Le cidre est produit par la fermentation des levures du pomme (*Malus pumila*) dans lesquelles on implique un microbiote mixte prédominé par les levures, notamment *S. cerevisiae* et *S. bayanus*, et les espèces des genres *Dekkera*, *Lachancea*, *Ogataea*, *Pichia*, *Candidose*, *Hanseniaspora* et *Rhodotorula* serait inclus dans la préparation de cidre (**Johnson et Echavarri-Erasun, 2011**).

5.3.6. Production des protéines

L'augmentation du taux de déficit protéique mondial a conduit à la recherche des nouvelles méthodes alternatives de production des protéines. La production des protéines unicellulaires (SCP) est l'une des solutions à ce problème. Une gamme d'avantages des

protéines microbiennes a été démontrée qui a un meilleur rendement que les protéines d'origines végétales et animales (**Kieliszek et al., 2017**).

Les levures constituent une source précieuse des protéines car elles sont le siège d'une biosynthèse protéique très active ; utilisées à la production des protéines d'organismes unicellulaires (POU) ou "single cell protéins" (SCP), qui sont souvent incorporées à l'alimentation animale et humaine. Cette production peut s'effectuer sur des substrats considérés comme des déchets agricoles telles que le lactosérum et les résidus de pâte à papier, son de blé (**Kherraz et Lorbi, 2015**). *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae* et *Hansenula polymorpha* assurent la synthèse des protéines y compris les protéines pharmaceutiques (**Dakhmouche-Djekrif, 2016**).

5.4. Agro-alimentaire

Les levures du genre *Candida* possèdent un potentiel significatif pour une utilisation industrielle. Elles sont une source d'ingrédients minéraux, grâce à la capacité de collecter divers éléments du substrat, ces levures peuvent lier les ions métalliques à l'environnement puis s'intégrer de façon permanente dans leurs structures cellulaires pour être utilisées dans des applications thérapeutiques souvent à des fins médicales et nutritionnelles. L'accumulation de la matière métallique (par exemple sélénium ou du magnésium) dans les cellules conduit à la formation des complexes stables ; avec des protéines appelées bioplexes qui sont incluses dans les préparations pharmaceutiques ou les compléments alimentaires.

D'autre part l'utilisation biotechnologique des levures de *Candida* est liée à la production de métabolites extracellulaires tels que l'acide citrique, l'éthanol, le xylitol, l'érythritol, les biosurfactants et les exopolysaccharides. Ces substances sont utilisées dans l'industrie agroalimentaire, l'industrie pharmaceutique et l'industrie cosmétique (**Kieliszek et al., 2017**).

5.4.1. Levures probiotiques

Elles sont des préparations ou des composants des cellules microbiennes qui ont un effet bénéfique sur la santé des animaux en améliorant son équilibre microbien intestinal. Les levures autorisées et couramment utilisées dans les aliments pour animaux comme additifs probiotiques sont : *Candida pintolopesii*, *C. saitoana* et *Schwanniomyces cerevisiae*, *S. boulardii* (**Bekatorou et al., 2006**).

5.4.2. Levures des distilleries

Elles sont utilisées pour la production industrielle des alcools et des spiritueux (brandy, whisky, rhum, tequila, etc.). Généralement elles sont isolées des fermentations industrielles des pulpes des fruits et de mélasse de betterave ou de canne à sucre. Leur sélection dépend des propriétés souhaitées du produit, y compris la saveur, le rendement en alcool (**Bekatorou et al., 2006**). Différents genres de levures sont utilisés pour la production d'éthanol comme : *Pichia*, *Candida*, *Kluyveromyces*, *Issatchenkia*, *Rhodotula*, *Zygosaccharomyces*, *Clavispora*, *Debaryomyces*, *Metschnikowia*, *Cryptococcus* (**Kopecká et al., 2012**).

5.5. Agriculture

Les pertes des légumes, des céréales des fruits y compris noyau, les baies et les agrumes, après la récolte, peuvent manipulation, de traitement et de stockage défavorable.

Les fruits à pépins, les fruits à être liés aux conditions de la lutte biologique contre ces pertes a été assuré par des levures antagonistes qui gèrent les maladies post-récolte causées par des champignons pourrissants. Certains de ces champignons pathogènes sont également à l'origine de mycotoxines nocives pour l'homme. Parmi ces levures : *Candida oleophila*, *Candida saitoana*, *Pichia caribbica*, *Cryptococcus laurentii* (induction de la défense de l'hôte) ; *Pichia membranaefaciens* (fixation et sécrétion d'enzyme lytique) ; *Saccharomyces cerevisiae* (M25), *Pichia fermentans* (Changement de morphologie) ; *Pichia membranaefaciens*, *Rhodotorula glutinis*, *Cryptococcus laurentii* et *Candida guilliermondii* (atténuation des dommages oxydatifs de l'hôte fruitier) (**Liu et al., 2013**).

5.6. Thérapeutique

Depuis le début des années 1980, les levures ont été utilisées pour la production d'une variété de protéines hétérologues. La production de ces dernières protéines hétérologues dans les levures recèle un énorme potentiel pour les processus biotechnologiques. Une percée majeure dans l'expression des protéines hétérologues dans la levure a été le clonage, l'expression, le traitement et la sécrétion. Des études ultérieures ont montré que *Komagataella pastoris* et *S. cerevisiae* ont une capacité exceptionnelle de produire de grandes quantités de protéines hétérologues dans lesquelles *Komagataella pastoris* synthétise des protéines végétales, animales et humaines, ainsi que les protéines associées à la membrane qui sont souvent difficiles à exprimer fonctionnellement dans de nombreux autres systèmes ; et

pour la *S. cerevisiae*, elle synthétise et sécrète efficacement de nombreuses protéines mammifères et humaines, y compris α -interféron, facteur de croissance épidermique, albumine sérique humaine, antigène de surface de l'hépatite B, facteur de croissance épidermique, β -l'endorphine et la prochymosine. Plusieurs de ces protéines ont été développées et commercialisées en tant que produits pharmaceutiques ou enzymes humains de grande valeur.

D'autre espèce des levures *Schiz. pombe*, *Kluyveromyces. lactis*, *Yarrowva. lipolytica*, *Zygosaccharomyces. rouxii*, *Z. bailii*, *pastoris*, *Ogataea. polymorpha*, *Candida. boidinii*, *O. methanolica*, et *Schwanniomyces. occidentalis*, peuvent assurer la production des divers protéines hétérologues (Johnson et Echavarri-Erasun, 2011).

5.7. Autres utilisations des levures

Aujourd'hui, les levures constituent des importantes sources des enzymes produites commercialement en raison des leurs capacités polyvalentes et des frugalités des leurs exigences permettant d'obtenir une biomasse importante à bas prix (Kherraz et Lorbi, 2015).

6. Levures productrices des enzymes

Une grande variété des microorganismes (bactéries, levures, moisissures, algues, protozoaires, gastéropodes et arthropodes) produit les enzymes (Allah Antoine et al., 2009).

Depuis des nombreuses années, les enzymes sont utilisées dans les procédés biotechnologiques comme catalyseurs dans plusieurs secteurs industriels, principalement dans la production alimentaire. L'utilisation d'enzymes présente des avantages par rapport aux catalyseurs chimiques tels que des conditions de réaction douces et la polyvalence (Fraga et al., 2018).

Les enzymes digestives et leur utilisation en bio-industries sont très développées. les lipases produites par différent espèces des levures comme *Candida boidinii* (Rodríguez-Gómez et al., 2010) occupent 38,5 % du marché suivi par les amylases, 30,5 % du marché européen des enzymes dans les applications alimentaires (Morvan, 2010). Les levures telle que les *Saccharomyces diastaticus* et *Endomycopsis capsularis*, *Lipomyces kononenkoae*, *Pichia burtonii* (Dakhmouche-Djekrif, 2016) constituent des importantes sources d'enzymes commerciales glucoamylase, pullulanase, glucoamylase, α -glucosidase, α -amylase et cellulase en raison de leurs capacités polyvalentes et de la frugalité de leurs exigences permettant, d'obtenir une biomasse importante à bas prix (Tableau 06) (Dali et Hamame, 2016).

Les enzymes saccharolytiques sont utilisées dans l'industrie alimentaire pour hydrolyser le saccharose en glucose et fructose plus solubles ce qui permet en confiserie de faire des bonbons dont la partie centrale reste liquide. L'invertase sert également à fabriquer du miel artificiel L'invertase est produite par une large variété de microorganismes ; Il existe des invertases endo et exocellulaires : l'invertase endocellulaire est obtenue à partir de la levure de bière *Saccharomyces cerevisiae*, *S. carlsbergensis* ; aussi la β -fructofuranosidase extracellulaire est synthétisé par *Candida guilliermondii* (**Bousmaha et al., 2007**).

Les levures

<i>Souches des levures</i>	<i>Enzymes</i>	<i>Références</i>
<i>Wickerhamia sp. X-Fep</i>	α -Amylase	Hernández-Montañez et al., 2012
<i>Candida guilliermondii</i>		Acourene et al., 2011
<i>Aureobasidium pullulans N13d</i>		Li et al., 2007
<i>Schwanniomyces castellii</i>	α -Amylase et Glucoamylase	Clementi et Rossi, 1986
<i>Pichia spartinae</i>		
<i>Pichia rhodanensis</i>	Phytase	Vohra, et Satyanarayana., 2003
<i>Schwanniomyces castellii</i>		
<i>Arxula adenivoran</i>		
<i>Pichia guilliermondii</i>		
<i>Kluyveromyces fragilis</i>	Inulinase	Gong et al., 2006
<i>Kluyveromyces marxianus</i>		
<i>Candida kefyr</i>		
<i>Debaryomyces Cantarelli</i>		
<i>Candida Guilliermondii</i>	Glucoamylase Extracellulaire	Lagzouli et al., 2007
<i>Cryptococcus adeliae</i>	Xylanase	Gomes et al., 2000
<i>Yarrowia lipolytica</i>		Fraga et al., 2018
<i>Candida lipolytica</i>	Lipase	Ali et al., 2010
<i>Cryptococcus.sp</i>	Carboxymethyl Cellulase	Thongekkaew et al., 2008
<i>Saccharomyces Sp</i>	α -Galactosidase	
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	L-Glutaminase	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Invertase	

Les levures

<i>Candida pseudotropicalis</i>	Lactase	Johnson et Echavarri-Erasun, 2011
<i>Kluyveromyces sp</i>		
<i>Rhodotorula sp</i>	L-Phénylalanine Ammonialyase	
<i>Candida boidinii</i>	Phénylalanine Dehydrogenase	
<i>Ogataea polymorpha</i>	Phytase	
<i>Aureobasidium pullulans</i>	Polygalacturonase	Belda et al., 2016
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>		
<i>Metschnikowia fructicola</i>		
<i>Schwanniomyces arboricola</i>	Pictinase	Naumov et al., 2016
<i>S. bayanus</i>		
<i>S. cariocanus</i>		
<i>S. cerevisiae</i>		
<i>S. kudriavzevii</i>		
<i>S. mikatae</i>		
<i>S. paradoxus</i>		
<i>Candida guilliermondii</i>	Esterase	Basaran et Hang, 2000
<i>Clavispora lusitania</i>	α -Amylase	Dakhmouche-Djekrif, 2016
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Phénylalanine-ARNt Synthétase	Fasiolo et al., 1970

Tableau 06 : levures productrices des enzymes.

7. Levures amylolytiques

Selon Djekrif *et al.*, (2016), la facilité de culture de la levure amylolytique a suscité l'intérêt des chercheurs pour son application dans les bio-industries. Ces micro-organismes peuvent produire différentes enzymes amylolytiques (**Tableau 07**). Pour cette raison, leur utilisation dans la production des enzymes sont de plus en plus demandée, alors que les amylases secrétées dépendent de la composition du milieu de culture.

7.3. Levures productrices des amylases extracellulaires

Les études pour les amylases extracellulaires d'origine levurienne sont très peu répertoriées *Cryptococcus heimaeyensis* HA7 (**Hossam et al.**, 2011), *Candida* sp. (**Hernandez-Montanez et al.**, 2010), *Lipomyces starkeyi* NCYC 1436 (**Graham et al.**, 2000), *Trichosporon pullulans*, *Saccharomycopsis bispora*, *Saccharomycopsis capsularis*, *Saccharomycopsis fibuligera* (*Endomycopsis fibuligera*) (**Gonzalez et al.**, 2008), *Candida parapsilosis*, *Candida glabrata*, *Rhodotorula mucilaginosa* (**De Oliveira et al.**, 2015), *Cryptococcus flavus* (**Wanderley et al.**, 2004) et chez *Candida lusitaniae* ABS7 (**Dakhmouche**, 2016).

7.4. Système amylolytique chez les levures

La levure comporte un système amylolytique très diversifié qui se compose de plusieurs enzymes principale sont : l' α -amylase, la glucoamylase, la pullulanase et la cyclodextrinase (**Sills et al.**, 1984 ; **De Mot et Verachtert**, 1987; **Horn et al.**, 1988 ; **Ouédragao et al.**, 2012 et **Moubasher et al.**, 2013).

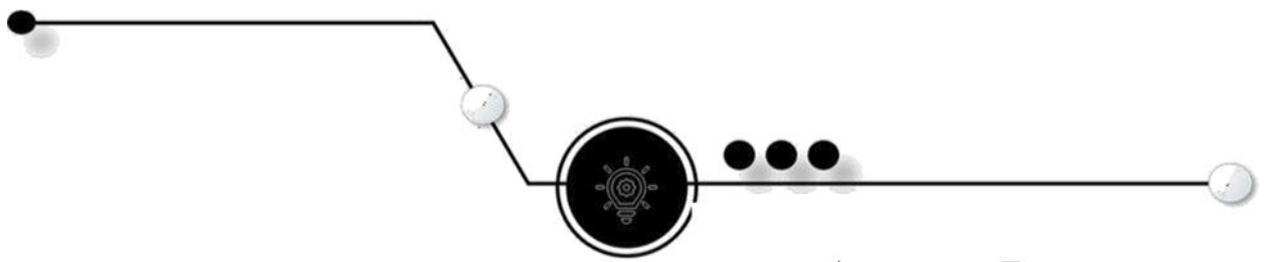
Les levures

<i>Levures</i>	<i>Enzymes amylolytiques</i>	<i>Références</i>
<i>Candida utilis</i>	α -Amylase	Ouédraogo et al., 2012
<i>Candida Guillermondii</i>	Glucoamylase	Lagzouli et al., 2007
<i>Wickerhamia sp. X-Fep</i>	α -Amylase	Hernández-Montañez et al. 2012
<i>Cryptococcus flavus</i>	α -Amylase	Wanderley et al., 2004
<i>Aureobasidium pullulans</i>	Pullulanase	Moubasher et al., 2013
	α -amylase	Rajeeva et al., 2010
<i>Aureobasidium pullulans N13d</i>	Glucoamylase	Li et al., 2007
<i>Pichia burtonii</i>	α -Amylase	Takeuchi et al., 2006
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	α -Amylase	Acourene et Ammouche, 2011
<i>Candida guilliermondii</i>		
<i>Candida guilliermondii</i>	Esterase	Basaran et Hang, 2000
<i>Saccharomycopsis fibuligera DSM-70554</i>	α -Amylase, Glucoamylase	González et al., 2008
<i>Kluyveromyces Marxianus</i>	Inulinase	Jain et al., 2012
<i>Pichia kudriavzevii</i>	Phytase	Greppi et al., 2015
<i>Yarrowia lipolytica</i>	Lipase	Fickers et al., 2004
<i>Candida tropicalis</i>	Naringinase	Sahota et Navjot, 2015
<i>Saccharornyces cerevisiae</i>	α -Amylase	Ruohonen et al., 1991
<i>Filobasidium capsuligenum</i>		De Mot et Varachtert, 1985

Les levures

<i>Candida utilis</i> NOY	Ouédraogo et al., 2012
<i>Cryptococcus flavus</i>	Wanderley et al., 2004
<i>Lipomyces kononenkoae</i>	Spencer- Martins et Van Uden, 1979
<i>Pichia burtonii</i> 15-1	Kato et al., 2007
<i>Pichia burtonii</i>	Takeuchi et al., 2006
<i>Cryptococcus sp. S-2</i>	Iefuji et al., 1996
<i>Wickerhamia sp</i>	Hernandez-Montanez et al., 2012

Tableau 07 : Production des enzymes amylolytiques par certaines levures.



α -Amylase

1. Généralités

Les amylases sont permises les enzymes les plus importantes de la biotechnologie actuelle, occupant environ 25% du marché des enzymes. Leur utilisation dans l'hydrolyse de l'amidon remonte au 9^{ème} siècle après JC, lorsque le malt était utilisé pour convertir l'amidon de la marante (*Maranta arundinacea*) en édulcorant. Le développement et la commercialisation d' α -amylase à partir des champignons et de bactéries ont commencées respectivement à la fin du XIX^e et au début du XX^e siècle. Dans les années 1930, ces enzymes étaient utilisées commercialement dans diverses applications industrielles, notamment la liquéfaction d'amidon, le brassage, le textile, les produits pharmaceutiques, le papier, les détergents, les médicaments, l'élimination des déchets toxiques et le forage pour le pétrole (Dabai et al., 2011; Gangadharan et al., 2006; Haq et al., 2003). Ces utilisations ont mis d'avantage l'accent sur la recherche de nouvelles α -amylases pour des processus plus efficaces.

L' α -amylase est réputée pour la modification de l'amidon par la rupture des liaisons glycosidiques α -1,4 et elle est largement appliquée dans différents secteurs industriels. Selon leur dépendance des caractéristiques intrinsèques, les micro-organismes expriment des alpha-amylases uniques avec des caractéristiques thermostables et halotolérantes. De même, des méthodes de génie génétique sont appliquées pour produire des enzymes avec une stabilité plus élevée contrairement aux types sauvages. Aussi, comme il existe une application répandue d' α -amylase dans l'industrie, des méthodes d'optimisation comme RSM sont utilisées pour améliorer la production de l'enzyme (Babak et al., 2019).

2. Définition

Les α -amylases (EC.3.2.1.1) dégradent les liaisons glycosidiques (α -1,4) d'amidon et des substrats apparentés de façon endo produisant du maltose, du glucose et des dextrans alpha limites (Dabai et al., 2011).

3. Nomenclature

L' α -amylase est décrite par l'Union internationale de biochimie et de biologie moléculaire (IUBMB, 1992) comme suit (Olempska-Beer, 2004). **Nom codifié** : EC 3.2.1.1.

Nom commun : alpha-amylase.

Nom systématique : 1,4- α -D-Glucan glucanohydrolase.

- Réaction :** Elle endohydrolyse des liaisons α -1,4-D-glucosidiques dans les polysaccharides contenant au moins trois unités D-glucose liées.
- Substrat :** Amidon, glycogène et les polysaccharides et oligosaccharides apparentés (Kolli et Zatout, 2015 ; Olempska-Beer, 2004).

4. Structure

L' α -amylase a une structure tridimensionnelle capable de se lier au substrat par des groupes catalytiques hautement spécifiques, de favoriser la rupture des liaisons glycosidiques. (Souza et Magalhaes, 2010). La plupart des α -amylases sont des métalloenzymes, qui nécessitent des ions de calcium (Ca^{2+}) pour leur activité, leur intégrité structurelle et leur stabilité (Mobini-Dehkordi et Afzal Javan, 2012).

Selon Tiwari et al., (2015), l' α -amylase comporte une seule chaîne polypeptidique repliée en trois domaines A, B et C (Figure 03) :

- Le domaine A est le domaine le plus conservé d'enzyme, il consiste en un pli hautement symétrique des huit brins β parallèles disposés dans un fût entouré des huit hélices α . Les résidus des acides aminés hautement conservés de la famille des α -amylases impliqués dans la catalyse et la liaison au substrat sont situés dans des boucles aux extrémités C des brins β dans ce domaine.
- Le domaine B, qui fait saillie entre la feuille β_3 et l'hélice α_3 , il comporte de 44 à 133 résidus des acides aminés et joue un rôle dans la liaison du substrat ou la liaison des ions Ca^{2+} .
- Le domaine C est relativement conservé et se replie en un baril de feuillet β antiparallèle. La fonction de ce domaine est inconnue.

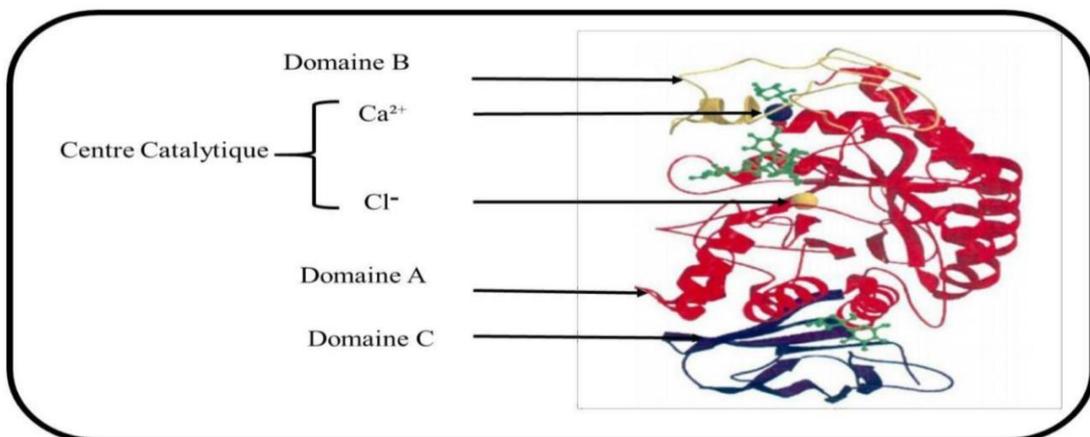


Figure 03 : Structure 3D d' α -amylase humain (Souza et Magalhaes, 2010).

5. Origine

L' α -amylase peuvent être obtenus à partir des plusieurs sources, telles que les plantes, les animaux et les micro-organismes : les bactéries, les champignons et les actinomycètes (Souza et Magalhães, 2010).

5.1. α -Amylase végétale

L' α -amylase est importante dans le métabolisme du maltose et de maltodextrine. Commercialement, Elle est produite principalement à partir des sources fongiques, mais elle est également extraite des différentes sources végétales comme le péricarpe (enveloppe externe d'endosperme) du fruit de *Borassus indica* (Srinivasa Rao et al., 2005), millets, le sorgho et le maïs (Srinivasa et al., 2004).

5.2. α -Amylase animale

La ptyaline, une α -amylase salivaire (α -1,4- α -D-glucan-4-glucanohydrolase);E.C. 3.2.1.1) est l'une des enzymes les plus importantes de la salive. L'enzyme a été décrite pour la première fois dans la salive par Leuchs en 1831. Elle se compose des deux isoenzymes, dont une, seulement, est glycosylée. Les amylases salivaires représentent 40% à 50% de la protéine salivaire totale et 80% du total des enzymes synthétisées dans la glande parotide. Il s'agit d'une métalloenzyme à calcium qui hydrolyse les liaisons α -1,4 d'amidon en glucose et en maltose.

Elle est, aussi, connue pour être principalement impliqué dans l'initiation de la digestion d'amidon dans la cavité buccale (Tiwari et al., 2015).

5.3. α -Amylase microbienne

Les micro-organismes sont la principale source d' α -amylase produisant une grande quantité d'enzyme. En outre, les micro-organismes génétiquement manipulés sont obligés de produire de l' α -amylase avec des nouvelles caractéristiques telles que la thermostabilité (Sundarram et Murthy, 2014 ; Konsoula et Liakopoulou-Kyriakides, 2005). Les micro-organismes les plus largement utilisés pour la production d'alpha-amylase comprennent les bactéries, les actinomycètes et les champignons (Abou-Elela et al., 2009).

5.3.1. α -Amylase bactérienne

Différentes études ont été menées sur la production bactérienne de l' α -amylase et il s'est avéré que plusieurs espèces de *Bacillus* sont productrices de cette enzyme telle que *B.*

licheniformis, et *Bacillus subtilis* (**Tableau 08**). Ces souches sont généralement préférées pour la propriété des thermostabilités d' α -amylase utilisée dans divers processus de fermentation (**Babak et al., 2019**).

5.3.2. α -Amylase fongique

Plusieurs espèces d'*Aspergillus* sont également considérées comme source d' α -amylase (**Tableau 09**). Elles ont gagné plus d'attention en raison de leur disponibilité facile et de la productivité élevée. Différentes espèces d'*Aspergillus* telles qu'*A. niger*, *A. oryzae*, *A. flavus*, *A. tamarisii*, *A. fumigatus* ont fréquemment été utilisées pour la production d' α -amylase (**Varga et al., 2011 ; Gazali et Suwastika, 2018 ; Wang et al., 2018**).

α -Amylase

Tableau 08 : Sources d' α -amylase.

<i>Sources</i>	<i>Exemples</i>	<i>Références</i>
Végétales	Orge	Khalil Adaml et al., 2017
	Millets, Sorgho, Blé et Maïs.	Srinivasa et al., 2004
Animales	Salive humaine	Butterworth et al., 2011 ; Chatterton et al., 1996
	Pancréas humains	Ponnusamy et al., 2015
Bactéries	<i>Bacillus licheniformis</i>	Haq et al., 2003 ; Abdel-Fattah et al., 2013
	<i>Bacillus sp. PS-7</i>	Sodhi et al., 2005
	<i>Bacillus licheniformis M27</i>	Ramesh et al., 1990
	<i>Bacillus cereus</i>	Raplong et al., 2014
	<i>Bacillus licheniformis ATCC 12759</i>	Akcan, 2011
	<i>Bacillus subtilis MTCC 121</i>	Raul et al., 2014
	<i>Escherichia coli</i>	Raha et al., 1992
	<i>Bacillus.sp HOP-40</i>	Ramesh et Lonsane, 1987
Moisissures	<i>Bacillus subtilis D19</i>	Almanaa et al., 2011
	<i>Bacillus amylolique- faciens</i>	Aditya et Deka, 2019
	<i>Aspergillus kawachii</i>	Nagamine et al., 2014
	<i>Aspergillus oryzae</i>	Acourene et Ammouche, 2012 ; Bennamoun et al., 2004
	<i>Aspergillus awamori</i>	Acourene et Ammouche, 2012

α -Amylase

	<i>Penicillium. camemberti</i> PL21	Nouadri, 2011
	<i>Aspergillus niger</i> ATCC16404	Dakhmouche, 2006
	<i>Aspergillus niger</i> RBP7	Mukherjee et al., 2017
	<i>Aspergillus niger</i>	Oluwabunmi et al., 2019 ; Mathew et al., 2016, Aliyah al., 2017 ; Suganthi et al., 2011 ; Dakhmouche et al., 2008
Levures	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Ruohonen et al., 1991
	<i>Filobasidium capsuligenum</i>	De Mot et Varachtert, 1985
	<i>Candida utilis</i> NOY, <i>Candida guilliermondii</i> <i>Trichosporon mucoides</i> , <i>Candida famata</i> ,	Ouédraogo et al., 2012
	<i>Cryptococcus flavus</i>	Wanderley et al., 2004
	<i>Lipomyces kononenkoae</i>	Spencer- Martins et Van Uden, 1979
	<i>Pichia burtonii</i> 15-1	Kato et al., 2007
	<i>Pichia burtonii</i>	Takeuchi et al., 2006
	<i>Cryptococcus sp. S-2</i>	Iefuji et al., 1996
	<i>Wickerhamia sp.</i>	Hernandez-Montanez et al., 2012
	<i>Saccharomycopsis fibuligera</i>	Hostinová, 2002
	<i>Candida guilliermondii</i>	Acourene et Ammouche, 2012
	<i>Schwanniomyces occidentalis</i>	Dohmen et al., 1989
	<i>Clavispora lusitaniae</i> , <i>Pichia carbica</i> , <i>Rhodotorula rubra</i> ,	Djekrif, 2016

α -Amylase

<i>Pichia guilliermondii</i> , <i>Meyerozyma guilliermondii</i>	
<i>Schwanniomyces alluvius</i>	Moranelli et al., 1987
<i>Saccharomycopsis capsularis</i>	Soni et al., 1996
<i>Schwanniomyces castellii</i>	Sills et al., 1984

6. Fermentation et production d' α -Amylase microbienne

Les enzymes industrielles ont été produites à partir des plantes, des animaux et des micro-organismes, mais la source végétale et animale sont minimales à cause de plusieurs raisons. Si la concentration d'enzyme dans la source végétale est généralement faible, le traitement industriel d'amidon requiert de grandes quantités d'enzymes. En revanche, si l'enzyme d'origine animale provient du sous-produit d'industrie de la viande, son approvisionnement est donc limité. Cependant, l' α -amylase de source microbienne peut être abondante et produite en quantités à cause du taux élevé de prolifération et de croissance.

Les micro-organismes utilisent différentes sources de carbone à savoir les déchets agroalimentaires, l'amidon de maïs, la fécule de pomme de terre, le sucre de canne, etc... en milieu liquide ou en milieu solide (**Tableau 09**). Pour la source d'azote, il utilise, généralement, l'extrait de levure, la peptone, la caséine, le sulfate d'ammonium, le nitrate d'ammonium, les plumes de poulet. Cette production microbienne des enzymes peut être optimisée par diverses méthodes telles que la méthodologie de surface de réponse (**Kizhakedathil et Chandrasekaran, 2018**).

6.1. Micro-organisme associé à la production industrielle d' α -amylase

6.1.1 Bactéries productrices industrielles des α -amylases

Pour des applications commerciales, l' α -amylase est principalement obtenue par le genre *Bacillus*. Ces enzymes produites à partir de *Bacillus licheniformis*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus subtilis* et *Bacillus amyloliquefaciens* trouvent une application potentielle dans un certain nombre de processus industriels tels que les industries alimentaires, de fermentation, des textiles et du papier (**Souza et Magalhães, 2010**). À des températures élevées, certaines bactéries thermophiles produisent d' α -amylase thermostable, utile pour les processus industriels car, la plupart des étapes des traitements des amidons, y compris la saccharification, la gélification et la liquéfaction, nécessitent une température élevée. Les sources les plus courantes d' α -amylase thermostable sont la bactérie *Geobacillus* isolée des sources chaudes de Manikaran (**Babak et al., 2019**). En outre, certains types d'actinomycètes tels que *Nocardia aegyptia* peuvent produire des enzymes adaptées au froid (**Abou-Elela et al., 2009**). Les actinomycètes, tels que *Streptomyces fragilis* DA7-7, produisent d' α -amylase thermostable (**Nithya et al., 2017**).

Aussi, les bactéries thermophiles extrêmes telles que *Rhodothermus marinus* et des bactéries mésophiles comme *Bacillus megaterium*, *B. macerans* et *B. coagulans* sont aussi utilisées. Mais, il a été noté que la plupart des α -amylases thermostables utilisées dans l'industrie, elles sont produites à partir de *B. licheniformis* (Sundarram et Murthy, 2014 ; Nithya et al., 2017) et les α -amylases hautement thermostables sont également obtenues à partir des archées hyper thermophiles et thermophiles telles que *Pyrococcus furiosus*, *Thermococcus hydrothermalis* (Konsoula et Liakopoulou-Kyriakides, 2007 ; Kizhakedathil et Chandrasekaran, 2018).

6.1.2. Champignons producteurs industriels des α -amylases

En raison de la sécrétion extracellulaire d' α -amylase qui est facilement isolable du milieu de culture microbien, les champignons peuvent être une bonne source de production d' α -amylase dans l'industrie (Gupta et al., 2010). Les sources fongiques d' α -amylase commerciale incluent *Aspergillus niger*, *Aspergillus awamori* et *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus carbonarius* (Sundarram et Murthy, 2014 ; Pasin et al., 2020 ; Oshoma et al., 2019) à cause de leur grande production de cette enzyme.

L'*Aspergillus. oryzae* a reçu une attention accrue en tant qu'hôte favorable à la production des protéines hétérologues en raison de sa capacité à sécréter une grande quantité de protéine de haute valeur à savoir les enzymes industrielles telles que l' α -amylase. Quant à l'*Aspergillus niger*, il possède des capacités hydrolytiques importantes dans la production d' α -amylase et, en raison de sa tolérance à l'acidité (pH <3), il permet d'éviter la contamination bactérienne.

En plus de leur utilisation dans la production du fromage, des espèces de *Pencillium* comme *P. chrysogenum*, *P. brunneum* et *P. camemberti* PL21 sont aussi utilisées pour la production α -amylasique. (Nouadri, 2011 ; Sundarram et Thirupathihalli Pandurangappa, 2014).

En outre, il a été signalé que d'autres espèces des champignons possèdent certaines caractéristiques inhabituelles qui les rendent aptes à l'industrie ; par exemple une α -amylase produite par *Aspergillus flavus* NSH9 est thermostable à 50 ° C 31 (Karim et al., 2018). D'autres espèces des champignons thermophiles telles que *Hemicola insolens*, *H. lanuginosa*, *H. stellata* etc... Ont été aussi utilisées pour la production de cette enzyme.

De plus, les espèces fongiques conviennent parfaitement à la fermentation solide (**Gopinath et al., 2017**) car leur morphologie leur permet de coloniser et de pénétrer les substrats solides ce qui facilite les processus des hydrolyses. Les α -amylases fongiques sont préférées aux autres sources microbiennes en raison de leur statut GRAS (**Mobini-Dehkordi et Afzal Javan, 2012**).

α -Amylase

Tableau 09 : Fermentation et laproduction d' α -amylase microbienne.

<i>Organismes</i>	<i>Type des fermentations</i>	<i>Substrats utilisés</i>	<i>Références</i>
Levures			
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	SSF	Amidon.	Yamakawa et al., 2012
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (YF207, pGA11/pAA12)	SSF	Amidon de maïs.	Shigechi et al., 2004
<i>Saccharomycopsis fibuligera</i> A11	SSF	Son de blé et balle de riz.	Chen et al., 2009
<i>Aureobasidium pullulans</i> N13d	SMF	Amidon soluble.	Li et al., 2007
culture mixte de <i>Aspergillus niger</i> et <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	SSF	Grains de sorgho.	Abu et al., 2005
<i>Clavispora lusitaniae</i> ABS7	SMF	Lactosérum.	Dakhmouche, 2016
<i>Lipomyces kononenkoae</i>	SMF	Amidon soluble.	Prieto et al., 1995
Moisissures			
<i>Trichoderma harzianum</i>	SSF	Pelure de mandarine.	Mohamed et al., 2011
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	SSF	Son de blé, son de mélasse, son de riz, farine de maïs, céréales de millet, flocons de blé, son d'orge, maïs concassé, épis de maïs et blé concassé.	Kunamneni et al., 2005
<i>Rhizopus oryzae</i>	SSF	Déchets de pain blanc.	Benabda et al., 2019
<i>Rhizopus oryzae</i>	SMF	Lactosérum.	Ait Kaki, 2017

α -Amylase

<i>Monascus sanguineus</i>	SSF	écorce d'orange, écorce de rasine de betterave, pelure d'oignon, tourteaux des arachides, tourteaux de coco.	Tallapragada et al., 2017
<i>Penicillium brevicompactum</i>	SSF	Son de blé, la balle de riz et la farine de tournesol.	Balkan et Ertan, 2010
<i>Penicillium camemberti</i> PL21	SMF	Déchets des oranges.	Nouadri, 2011
Culture mixte <i>Rhodotorula sp</i> et <i>Aspergillus niger</i>	SMF	Lactosérum.	Dakhmouche et al., 2008
<i>Aspergillus oryzae</i>	SMF	farine de soja, lactosérum en poudre, maltose, saccharose, lactose et l'amidon des pommes des terres.	Naili et al., 2016 ; Melnichuk et al., 2020
<i>Aspergillus niger</i>	SSF	Résidus de cassave.	Pereira et al., 2018 ; Oshoma et al., 2019
<i>Aspergillus niger</i>	SMF	Amidon.	Oluwabunmi et al., 2019
<i>Aspergillus terreus</i> NCFT	SSF	Mil à chandelle (mil)	Sethi et al., 2016
<i>Aspergillus oryzae</i> Ahlburg	SMF	Déchets des oranges.	Bennamoun et al., 2004
Bactéries			
<i>Bacillus licheniformis</i>	SSF	de graines de coton, farine de soja, cosse de riz (son de riz).	Ui-Haq et al., 2003
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	SSF	Son de blé, sons de riz et pelure de pomme de terre.	Mojumdar et Deka, 2019

α -Amylase

<i>Bacillus subtilis D19</i>	SSF	Son de blé, zeste de banane, écorces des oranges, son de riz et zeste de pomme.	Taghreedet <i>al.</i>, 2019 ; Almanaa et <i>al.</i>, 2020
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	SMF	Son de blé, paille de blé, son de riz, paille de riz, balle de riz, riz cassé, amidon de maïs, déchets des féculs de pomme de terre et épis de maïs.	Abd-Elhalem et <i>al.</i>, 2015
<i>Bacillus subtilis (MTCC 121)</i>	SSF	Son de blé.	Raul et <i>al.</i>, 2014

6.1.3. Levures productrices des α -amylases

Les amylases extracellulaires d'origine levurienne sont très peu étudiées. Du point de vue industriel, certaines espèces des levures telles que *Candida tsukubaensis*, *Filobasidium capsuligeum*, *Lipomyces kononenkoae*, *Saccharomycopsis capularis*, *Saccharomyces cerevisiae* ont été utilisées pour la production d' α -amylase (Asghar et al., 2000 ; Ui-Haq et al., 2002).

Les souches microbiennes isolées utilisées dans la transformation d'amidon doivent être capables de produire l'enzyme à l'échelle industrielle. Et de nos jours, les processus de fermentation submergée (SMF) et de fermentation à l'état solide (SSF) sont généralement adoptés pour la biosynthèse d' α -amylase à l'échelle industrielle. La comparaison des deux types de fermentation en milieu solide et en milieu liquide est récapitulée dans le (Tableau 10).

Tableau 10 : Comparaison des technologies de fermentation en milieu solide et fermentation en milieu liquide ou submergé (Krishna, 2005 ; Raimbault, 1998 ; Manpreet *et al.*, 2005 ; Assamoi *et al.*, 2005 ; Gmoser *et al.*, 2019).

Condition de fermentation	Paramètres	Fermentation en milieu solide	Fermentation en milieu liquide ou submerge
	Température	- Contrôle compliqué (transfert de chaleur limité par le support, l'air et l'absence d'eau libre) -Risque de formation de gradients dans le milieu	-Contrôle aisé - Température homogène
	pH	-Contrôle compliqué -Régulation partielle possible (ajout de solutions acides ou basiques, utilisation de systèmes tampon : solutions, supports au pouvoir tampon)	- Contrôle aisé Régulation par l'ajout de solutions acides ou Basiques
	Aération	- Passive (de surface) ou active (forcée) - Pas ou peu de contrainte d'aération (oxygénation) - Circulation de l'air aisé et aération (transfert d'oxygène) élevée	-Nécessaire et compliquée -Contrainte d'aération (oxygénation) élevée liée à la solubilité/au transfert de l'oxygène (fonction de la température) et à la rhéologie des milieux (viscosité)
	Agitation	- Absente, discontinue ou continue - Contrainte de cisaillement limitée - Peut limiter l'hétérogénéité du milieu	- Nécessaire (homogénéisation du milieu + aération pour les cultures aérobies) - Contrainte de cisaillement importante (limitation des souches cultivables) - Problème lié à la rhéologie des milieux (nature du substrat + culture de moisissures)
	Antimousse	- Pas nécessaire	- Nécessaire
	Stérilisation	- Possibilité de travailler en condition non stérile ou semi stérile du fait de la faible Aw (limitation des contaminants et de leur développement) et une fois l'implantation de la souche réalisée - Risque de contamination limité, principalement pour les souches à croissance lente et surtout par d'autres champignons - Prétraitement par cuisson ou traitement à la vapeur pour éliminer les principaux contaminants (flore autochtone)	-Nécessaire - Risque de contamination élevée

6.2. Fermentation en milieu liquide ou submergée (SMF)

L'utilisation de la fermentation immergée (SmF) (**Figure 04**) est avantageuse en raison de la facilité de stérilisation et le contrôle des processus. Selon la souche et les conditions de culture, l'enzyme peut être constitutive ou inductible, montrant différents modèles des productions. Le SMF est utilisé pour produire des bioproduits à partir de bouillons tels que la mélasse. La fermentation submergée a été définie comme la fermentation en présence d'un excès d'eau, elle nécessite, donc, une humidité remarquable ce qui est cruciale pour la croissance des micro-organismes (principalement des bactéries) dans le milieu et ainsi pour produire d' α -amylase (**Sundarram et Murthy, 2014**) Cette humidité élevée fournit également des processus facilement applicables pour la stérilisation, la production, la purification, le contrôle de la température, des nutriments, et du pH (**Elyasifar et al., 2019**). Et presque toutes les installations des productions d'enzymes à grande échelle utilisent la technologie éprouvée de SmF en raison d'une meilleure surveillance et d'une facilité de manipulation et de récupération des produits (**Krishna, 2011**).

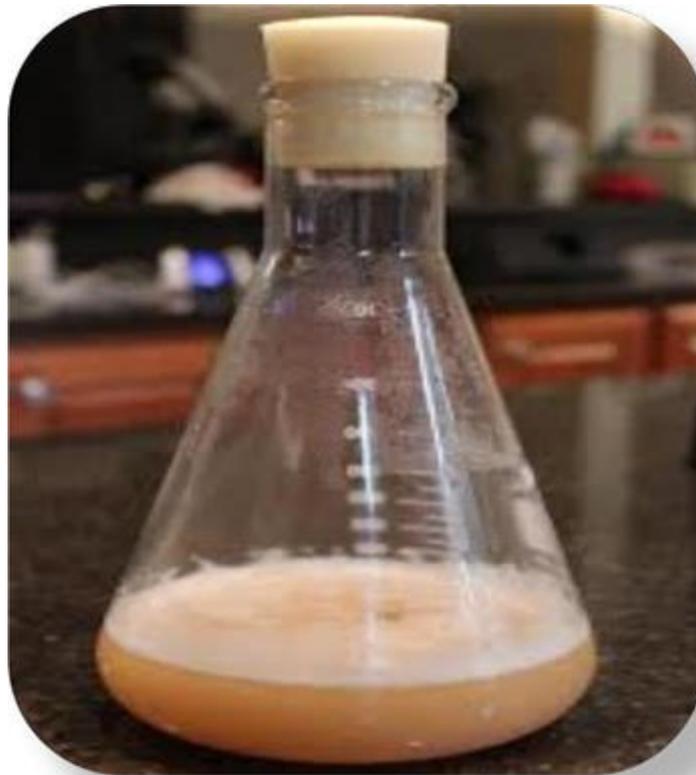


Figure 04 : fermentation liquide pour la production d' α amylase.

Pour répondre aux demandes croissantes d'industrie, il est nécessaire d'améliorer les performances du système et les conditions, en particulier les paramètres physiques et chimiques qui sont importants dans le développement du processus de fermentation en raison de leur impact sur l'économie et la praticabilité du processus (**Francis et al., 2003**). La croissance d'organisme et la production des enzymes sont fortement influencées par la composition du milieu, l'optimisation des composants du milieu et des paramètres culturels est donc une étape principale d'un processus biologique (**Jiby John Mathew, 2016**). Dans les processus industriels contemporains les α -amylases fongiques sont des grandes importances en raison de leur extraction et séparation facile du mycélium (**Sethi et al., 2016**).

6.3. Fermentation en milieu solide FMS (SSF pour Solid State Fermentation)

Le SSF est utilisé pour la production d'alpha-amylase à partir des déchets facilement recyclables tels que le papier. Cette méthode nécessite des substrats solides à faible humidité, ce qui peut être considéré comme un avantage. Divers matériaux bruts sont utilisés pour les SSF, par exemple, les déchets de la cave et de la brasserie, les déchets des moulins à huile... (**Figure 05**) (**Olfa Benabda et al., 2019**). Les autres avantages du SSF incluent un équipement plus simple, une production plus importante et une production des effluents moins importantes (**Elyasifar et al., 2019**).

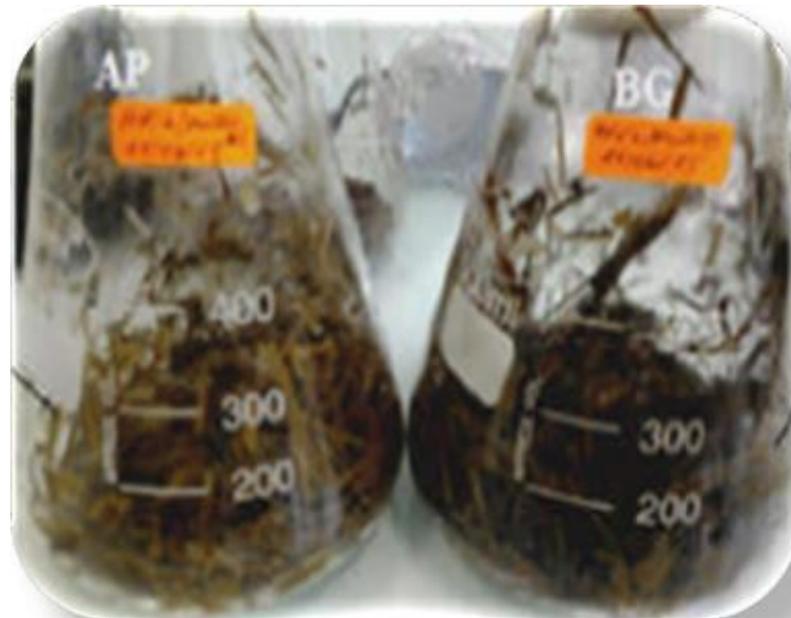


Figure 05 : fermentation solide pour la production d'alpha amylase.

Dans ce type de fermentation, les substrats utilisés sont moins coûteux et les besoins énergétiques sont inférieurs par rapport à la fermentation immergée (**Chinnasamy et al., 2011**). Cependant, SSF est plus lente que SMF à utiliser des substrats par des micro-organismes. Par conséquent, le SSF est largement utilisée pour la production d'alpha-amylase (**Sundarram et Murthy, 2014**).

En raison de la demande croissante de ces enzymes dans diverses industries, il y a un énorme intérêt à développer des enzymes avec des meilleures propriétés telles que les amylases capables de dégrader l'amidon brut. Cette capacité permet l'adaptation des ces enzymes aux applications industrielles et leurs techniques des productions rentables (**Sivaramakrishnan et al., 2006**). La sélection des sources de carbone et d'azote appropriées des autres nutriments sont l'une des étapes les plus critiques dans le développement d'un processus efficace et économique (**Jiby John Mathew, 2016**).

7. Paramètres du processus de la production d' α -Amylase

7.1. Température

Au cours d'une fermentation, deux températures importantes doivent être optimale pendant la production ; celle de la croissance microbienne et celle de la production maximale d'enzyme. Chez *B. licheniformis* et *B. subtilis* 29, les températures optimales pour la croissance et la production d' α -amylase sont de 45 °C et de 50 °C respectivement (**Sundarram et al., 2014**). Parmi les champignons, la plupart des études de la production d' α -amylase ont été réalisées chez les mésophiles dont la température optimale se situe entre 25 et 37 °C. La température optimale de 30°C a été obtenue lors de la production maximale d' α -amylase d'*Aspergillus sp.MK07* (**Chimata, 2010**), d'*Aspergillus ficuum* NRRL 3135 (**Ebunle et al., 1995**). Cependant, une production maximale d' α -amylase a été signalée entre 50 et 55 °C pour les cultures fongiques thermophiles telles que *Talaromyces emersonii*, *Thermomonospora fusca* et *Thermomyces lanuginosus* (**Sivaramakrishnan et al., 2006**). Des levures telles que *Saccharomyces kluyveri*, *Saccharomycopsis fiuligera* et *S. cerevisiae* et *Candida tropicalis* AUN-H100 seraient capable de produire l' α -amylase à 30 °C (**Hesham et al., 2019 ; Tansel et Cengiz, 2013 ; Sivaramakrishnan et al., 2006**). D'après **De Oliveira et al., 2015**, *Candida parapsilosis*, *Rhodotorula mucilaginosa* et *Candida glabrata* produisent l' α -amylase à 28°C. La production de cette enzyme chez *Saccharomycopsis capsularis* est maximale à 32°C (**Soni et al., 1996**). La levure *Clavispora lusitaniae* ABS7 isolée à partir des grains de blé de zone

aride (Sahara Algérien) montre une activité α -amylasique maximale de 808,6 U/min à 54,14°C (**Dakhmouche, 2016**). Les micro-organismes capables de se développer de façon optimale à des températures comprises entre 50°C et 60°C sont désignés comme thermophiles modérés. On peut supposer que les thermophiles modérés, étroitement liées phylogénétiquement aux organismes mésophiles, peuvent s'adapter à la vie dans des environnements chauds (**Bertoldo et Antranikian, 2002**).

7.2. pH

Le pH joue un rôle important dans la croissance des microorganismes, et aussi dans la production, la sécrétion et la stabilité d' α -amylase. Les enzymes sont sensibles au pH ce qui nécessite son contrôle durant le processus de la production (**Tansel et Cengiz, 2013 ; Sundarram et al., 2014**). Pour la production d'amylase, différentes études ont montré que les champignons se développent à pH légèrement acide et les bactéries ont besoin d'un pH neutre (autour de pH 7). Des rendements significatifs d' α -amylase chez *A.oryzae*, *A.ficum* et *A.niger* sont montrés à un pH entre 5,0 et 6,0 en SmF. Le pH optimum pour la production d' α -amylase par *Penicillium notatum* IBGE 03 et *P. camemberti* PL21 est de 5,5 (**Nouadri et al., 2011**). De plus, le pH nécessaire pour la production remarquable d' α -amylase chez *Bacillus sp. MB6* et *B. amyloliquefaciens* est de 6 (**Babak et al., 2019**) et de 7,0 respectivement (**Mohsin et al., 2017**).

Habituellement, le pH de la production d' α -amylase de la plupart des levures est compris entre 5 et 7. Un pH de 5 pour l'enzyme de *Candida utilis* NOY1 (**Ouédraogo et al., 2012**), de *S. cerevisiae* et de *S. kluyveri* (**Oluwadamilare et al., 2019**) et de *Saccharomycopsis capsularis* (**Soni et al., 1996**), de 5,5 pour *Saccharomycopsis fibuligera* DSM-70554 (**Gonzalez et al., 2008**), un pH compris entre 5,5 et 7 pour *Schwanniomyces castelli* (**Clementi et Rossi, 1986**) et un pH de 6,5 pour *Candida antractica* CBS 6678 (**De Mot et Verachtert, 1987**). La levure *Kluyveromyces marxianus* IFO 0288 à pH 6,13 produit la plus grande quantité d' α -amylase (**Babak Elyasifar, 2019**). Aussi, il a été trouvé que chez *Clavispora lusitaniae* ABS7, la production maximale d' α -amylase est obtenue à pH 8 (**Dakhmouche, 2016**).

7.3. Durée de la fermentation

Au cours de la fermentation, si les processus sont effectués pendant une période de temps inférieure à la durée optimale, le rendement maximal ne peut pas être obtenu. L'activité enzymatique accroit avec le temps d'incubation jusqu'à ce qu'elle atteigne la durée optimale où l'activité est maximale. Dans la plupart des cas, la production d'enzyme commence à diminuer si le temps d'incubation est encore prolongé. Cela pourrait être dû à l'épuisement des nutriments dans le milieu ou à la libération de substance toxique. La production a été étudiée chez *Bacillus subtilis*, un rendement élevé d' α -amylase est observé après 48 heures de fermentation (Sundarram et al., 2014).

Sujeeta et al., (2017), ont montré que parmi les isolats étudiés, la souche levurienne YPO3 montre une activité α -amylasique maximale (13,72 U/ml) après 120 h d'incubation.

Wanderley et al., (2004), ont étudié l'activité α -amylasique chez la levure *Cryptococcus flavus* et ils ont indiqués que la production maximale est atteinte après 24h de fermentation.

Chez *Candida parapsilosis*, *Rhodotorula mucilaginosa* et *Candida glabrata*, la production d' α -amylase a été étudiée en fermentation solide à 28°C avec un taux d'humidité de 70%. Après 120 h d'incubation, le taux maximal de l'activité a été de 14,18U/ml, 25 U/ml et 25,39 U/ml respectivement (De Oliveira et al., 2015). Pour *Saccharomycopsis fibuligera*, la production maximale de la même enzyme est notée après 72h de fermentation (Clementi et al., 1980). L' α -amylase de *Saccharomycopsis capsularis* atteint son pic d'activité pendant la phase stationnaire à la fine du 5ème jour de la culture (Soni et al., 1996).

7.4. Source de carbone

Des sources des carbones tels que le maltose, le glucose, le saccharose, le galactose, le glycogène et l'inuline ont été utilisée comme substrats appropriés pour la production d'amylase par *B.licheniformis* et *Bacillus.sp.1-3*. L'amidon et le glycérol ont augmenté la production des enzymes chez *B. subtilis* IMG22, *Bacillus sp, PS-7* et *Bacillus sp.1-3*. L'amidon soluble est révélé être le meilleur substrat pour la production d'alpha amylase chez *B. stearothermophilus*. (Oluwadamilare et al., 2019 ; Babak-Elyasifar, 2019).

L'étude sur *Aspergillus oryzae* S2 a montré qu'une concentration de 10% d'amidon est meilleure pour produire l' α -amylase (Naili et al., 2016) . *Penicillium notatum* IBGE 03 utilise la mélasse comme source de carbone favorable pour la production d'alpha-amylase. *Bacillus subtilis* en SSF a besoin de glucose à 0,02 g / g 46 pour une meilleur production. *Bacillus*

amyloliquefaciens a montré que la concentration en glucose de 10,50 g/l est préconisée pour une production optimale d' α -amylase (**Babak-Elyasifar, 2020**).

D'autre part, les déchets agricoles sont utilisés à la fois pour la fermentation liquide et solide pour réduire le coût des milieux de fermentation. Ces déchets sont utilisées sources de carbone et d'azote nécessaires à la croissance et au métabolisme des organismes. Ces sources des nutriments comprennent les déchets d'orange (**Bennamoun et al., 2004 ; Nouadri, 2011**), l'amidon de mils, la pomme de terre, le maïs, le tapioca, le blé et le riz sous forme de farine, lactosérum (**Dakhmouche, 2016**), les déchets des dattes (**Sivaramakrishnan et al., 2006 ; Ferhat et Laklouka, 2015**).

La souche bactérienne, *Bacillus subtilis* D19, a été inoculée dans les résidus solides tels que le son de blé, les pelures de banane, les écorces des oranges, le son de riz et les écorces de pin. D'après cette étude, le son de blé a provoqué une augmentation de la production d'amylase (640 U / g) par rapport aux autres substrats testés (**Taghreed et Almanaa, 2020**). Il semble que le son de blé est aussi meilleur pour la synthèse d' α -amylase en fermentation solide chez les levures amylolytiques : *Aureobasidium pullulans*, *Candida famata* et *Candida kefyr* (**Linardi et al., 1990**).

L'activité élevée d' α -amylase de *Saccharomycopsis capsularis* a été aussi obtenue grâce au son de blé et la farine de maïs (**Soni et al., 1996**).

D'autre part, différents amidon de sago, de blé, de manioc et du riz ont été étudiés pour la production enzymatique chez *Saccharomycopsis fibuligera*. Les résultats ont montré que l'amidon de sago est meilleur pour l'apparition d' α -amylase (305,77 U/mg) sous une agitation de 180rpm et à température ambiante (**Ishmayana et al., 2008**).

7.5. Source d'azote

La teneur en azote du milieu de culture joue un rôle important dans la croissance des micro-organismes ce qui affecte la production enzymatique. Différentes sources d'azote ont été largement étudiées pour l'optimisation de la production d' α -amylase, y compris les substances organiques telles que l'extrait de levure, le soja et la peptone, qui sont les sources d'azote les plus applicables dans le milieu de culture ; des autres sources inorganiques, telles que l'hydrogénophosphate d'ammonium $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, le sulfate d'ammonium $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ et le chlorure d'ammonium NH_4Cl ont été aussi utilisés (**Babak Elyasifar, 2019**). Il a été trouvé que la farine de soja est la meilleure source d'azote pour la production d' α -amylase de *Bacillus*

sp. I-3. **Tanyildizi et al., (2005)**, ont signalé que la peptone augmentait l'activité enzymatique tandis que l'extrait de levure ne présentait aucun effet sur la production d' α -amylase (**Sivaramakrishnan et al.,2006**).

Des souches des *Bacillus stearothermophilus* et *B.amyolyticus* ont sécrétés une α -amylase maximale dans un milieu supplémenté avec 1% de peptone, 0,5% d'extrait de levure et 0,5% de maltose sous agitation vigoureuses (**Oluwadamilare et al., 2019**).

Oluwadamilare et al., (2019), ont montré que l'asparagine serait l'une des sources des azotes les plus prometteuses pour la production d' α amylase chez *Thermomyces lanuginosus*. *Bacillus amyloliquefaciens KCP2* produit une quantité importante d'alpha-amylase en utilisant du sulfate d'ammonium $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ à 0,2 g en SSF (**Prajapati et al., 2015**) ou de l'extrait de levure à 2 g / l cette espèce. Une étude sur *Penicillium notatum IBGE 03* a utilisé du maïs pour optimiser la production d' α -amylase. Le soja a été utilisé par *Aspergillus oryzae CBS 819.72*, pour produire d' α -amylase dans des conditions optimisées (**Babak-Elyasifar, 2019**). Chez *Aspergillus sp.MK07*, la peptone a montré une augmentation de la production d' α -amylase (164 U / g) (**Chimata, 2010**).

Parmi les sources des azotes étudiées sur la production d' α -amylase, l'extrait de levure a stimulé la production maximale d' α -amylase chez *Bacillus substilis D19*, (594 U / g) (**Taghreed et Almanaa, 2020**), chez *Clavispora lusitaniae ABS7* à une concentration de 0,365 g/l (**Dakhmouche, 2016**) et chez *Saccharomycopsis fibuligera* à 1% (**Ishmayana et al., 2008**).

L'effet positif de l'extrait de levure est aussi confirmé par des travaux sur la même enzyme de *Cryptococcus flavus* et *Trichoderma pullulans* (**De Mot et al., 1984**). En fermentation submergée, la levure *Candida tropicalis AUN-H100* a donné le maximum d'activité α -amylasique ($21.123 \pm 2,06$ IU/min) en présence du chlorure d'ammonium (NH_4Cl) comme source d'azote (**Hesham et al., 2019**). Il a été signalé que l'utilisation de la farine de soja et de la farine d'arachide comme sources d'azote a permis la production maximale de l' α -amylase chez *Saccharomycopsis capsularis*. Aussi, parmi les sources inorganiques, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, a produit le niveau d'enzyme le plus élevé et l'utilisation combinée de l'extrait de levure et de la peptone a augmenté de manière significative le rendements en α -amylase de *Schwaniomycopsis capsularis* (**Soni et al., 1996**).

7.6. Ions de calcium

Les ions Ca^{2+} , dus à la présence dans la structure d'alpha-amylase, jouent un rôle important dans la production d'alpha-amylase ; Dans la plupart des milieux de culture, du chlorure de calcium (CaCl_2) est ajouté pour produire d'alpha-amylase (**Sivaramakrishnan et al., 2006**). Il a été démontré que *Bacillus amyloliquefaciens* l'utilise à 0,0275 M comme facteur crucial pour produire l'alpha-amylase (**Gangadharan et al., 2008**). De plus, une étude plus approfondie de **Zhao et al., (2011)**, a montré que le CaCl_2 à 2 g/l joue un rôle important dans la production α -amylasique par *Bacillus amyloliquefaciens*, *Penicillium sp*, une autre source microbienne est remarquablement dépendante du CaCl_2 pour produire des taux élevés des α -amylases (**Abdullah et al., 2017**).

7.7. Humidité

L'humidité est l'un des paramètres les plus importants de la SSF qui influence la croissance de l'organisme et donc la production des enzymes. Des niveaux d'humidité bas et élevés du substrat affectent la croissance du micro-organisme entraînant une production des enzymes plus faible. Une teneur élevée en humidité entraîne une réduction de la porosité du substrat, changement dans la structure des particules des substrats et réduction du volume de gaz. Les bactéries sont généralement connues pour leur besoin une humidité initiale de 70 à 80% (**Sivaramakrishnan et al., 2006**). Chez les sources fongiques, la teneur en humidité requise est faible par rapport aux sources bactériennes pour un rendement élevé en enzyme (**Sundarram et al., 2014**). La production des amylases extracellulaires par fermentation à l'état solide (SSF) a été étudiée chez *Aspergillus sp.* MK07. Il a été constaté que la production d'amylase était la plus élevée à 30 ° C, à 70% d'humidité initiale, à pH 5,0 et avec 5% d'inoculum. En fermentation solide avec un taux d'humidité de 70%, *Candida parapsilosis*, *Rhodotorula mucilaginosa* et *Candida glabrata* ont montré une production maximale d' α -amylase (**De Oleivera et al., 2015**).

8. Amélioration de la production d' α -Amylase microbienne

L'étude de la production des enzymes microbiennes consiste, dans un premier, à l'utilisation d'un milieu minimal commun, fournissant des nutriments essentiels à la croissance des micro-organismes. Ceci permet de vérifier que les souches sont capables de produire les enzymes, métabolites requis d'intérêt souhaité. Dans un deuxième temps, le processus doit être optimisé pour une production plus élevée des enzymes à partir de la souche étudiée. Différentes stratégies sont utilisées pour améliorer le rendement de la production telles que l'optimisation des composants du milieu, la régulation des paramètres physiques de la croissance et l'amélioration de la souche en utilisant différents outils biotechnologiques (**Bhardwaj et al., 2019**) à savoir la mutagénèse et l'ADN recombinant.

8.1 Optimisation du milieu par des plans statistiques

L'optimisation des variables des processus après le criblage et l'isolement du microorganisme ; producteur potentiel d' α -amylase est une condition préalable pour améliorer le rendement de la production pour une application industrielle. Par l'optimisation des variables de processus, on peut découvrir les paramètres importants qui améliorent les rendements (**Krishnan et kuma, 2015**). Pendant le SmF pour la production des enzymes, les différents facteurs qui doivent être optimisés sont la concentration des nutriments dans les milieux (la source de carbone, l'azote, les oligo-éléments, les vitamines et les acides aminés) et les paramètres physiques (la température, le pH, l'agitation, l'aération, la taille de l'inoculum et la période d'incubation).

Lors d'optimisation du SSF, il est nécessaire de réguler la taille des particules, l'humidité, la teneur en eau et l'activité de l'eau du substrat, le type et la taille des inoculum l'élimination de la chaleur supplémentaire générée pendant le métabolisme microbien et surtout le maintien de l'environnement uniforme (température) et l'évolution du CO₂ et la consommation d'O₂ (système gazeux) (**Bhardwaj et al., 2019**).

8.1.1. One-factor-at-time method (méthode d'O.F.A.T)

C'est une technique dans laquelle un facteur est variable en maintenant les autres facteurs constants. Le facteur peut être : un paramètre physique ou nutritionnel importants pour la régulation de la croissance du micro-organisme et son rendement enzymatique. Cette méthode permet l'évaluation des facteurs nutritionnels (différents substrats et leurs concentrations), et les facteurs physiques (température,...). Cette approche est fastidieuse et nécessite un large

éventail des expériences pour l'optimisation (**Bhardwaj et al., 2019**) et peut également conduire à une mauvaise interprétation des résultats (**Francisa et al., 2003**) car elle néglige les effets des interactions des facteurs étudiés sur la production enzymatique. Pour cette raison, on suggère l'application d'une approche statistique pour concevoir des expériences en considérant les différents facteurs comme des variables et en réalisant aussi des études des effets des interactions entre plusieurs paramètres physiques et nutritionnels (**Bhardwaj et al., 2019**).

Plusieurs plans expérimentaux peuvent être adoptés à différentes phases d'un processus d'optimisation, pour la sélection des facteurs significatifs influençant la production enzymatique et aussi la détermination de leur optima afin d'atteindre les conditions optimales pour des résultats ciblés (**Francisa et al., 2003**).

Les plans statistiques sont mieux reconnus que la méthode O.F.A.T. réalisés par les expériences traditionnelles à variable unique. Parmi les plans statistiques les plus recommandés pour l'optimisation de la production enzymatique, on trouve les plans de Plackett – Burman (1946), les plans composites centrés de Box et Wilson (1951) et les plans de Box –Behnken (BB) (**Francisa et al., 2003**).

8.2.1. Plans des Plackett et Burman

Une approche linéaire est considérée comme suffisante pour le dépistage (**Figure 06**) (**Francisa et al., 2003**). C'est un plan multifactoriel à deux niveaux basé sur les blocs incomplets équilibrés. Il consiste à cribler ; former diverses combinaisons ; des composants (variables ou facteurs) dans un milieu de fermentation (**Ahuja et al., 2004**). Il existe un nombre minimal des facteurs pour que la conception de Plackett-Burman puisse être utilisée pour le criblage des facteurs. Ces plans sont donc utilisés pour sélectionner les facteurs efficaces ; ayant un effet significatif sur la production. Cette technique diminue considérablement le nombre des expériences nécessaires pour déterminer les variables importantes (**Prajapati et al., 2014**).

Ces plans des expériences ont été utilisés par plusieurs auteurs pour l'optimisation du milieu de culture pour la production :

- Des cellules microbiennes.
- D'interféron gamma recombinant par les cellules du hamster.
- D'alpha-amylase par les moisissures : *Aspergillus oryzae* Ahlburg (Cohen) 1042.72 (**Bennamoun et al., 2004**), *Aspergillus niger* ATCC 16404 (**Dakhmouche et al., 2008**) et *Penicillium camemberti* PL21 (**Nouadri et al., 2011**) cultivées sur un milieu à base de déchets d'oranges, *Aspergillus flavus* sur les grains d'amarante

(Viswanathan et Surlikar, 2001) et *Rhizopus oryzae* (Ait Kaki et al., 2017) sur le lactosérum par les levures : *Clavispora lusitaniae* ABS7 (Dakhmouche, 2016) et *Schwanniomyces* sp (Toumi, 2018) et par les bactérie telles que *Bacillus amyloliquefaciens* KCP2 en fermentation solide en utilisant du son de blé comme substrat (Prajapati et al., 2014).

Plackett–Burman 8-Run Matrix

		Factors						
		A	B	C	D	E	F	G
Treatment Combinations	1	+	-	-	+	-	+	+
	2	+	+	-	-	+	-	+
	3	+	+	+	-	-	+	-
	4	-	+	+	+	-	-	+
	5	+	-	+	+	+	-	-
	6	-	+	-	+	+	+	-
	7	-	-	+	-	+	+	+
	8	-	-	-	-	-	-	-

Figure 06 : Plan Plackett – Burman (Net 2)

8.2.2. Plans composites centrés des Box et Wilson

Le plan composite centré est un outil expérimental efficace, il permet l'étude de chaque facteur à 05 niveaux. Des interactions des facteurs sélectionnés lors du plan précédant et aussi, la détermination de leurs optima. Ces plans ont fait l'objet des plusieurs études : Optimisation de la production de la protéase par *Pseudomonas* sp et par *Bacillus subtilis* DM-4 (Belmessikh, 2011).

L'étude de la production de la xylanase par *Bacillus* sp. 2129 (Belmessikh, 2011).

8.2.3. Plans des Box – Behnken

Ces plans sont des conceptions de surface de réponse, spécialement conçues étudier chaque facteur à trois niveaux codés comme -1, 0 et +1 (**Figure 07**). Ils sont formés en combinant des plans factoriels à deux niveaux avec des plans des blocs incomplets. Cette procédure permet la sélection des facteurs influençant la production enzymatique et aussi leurs optima. Ces plans ont été utilisés pour trouver la composition optimale des certains éléments nutritifs sélectionnés pour la production maximale d' α -amylase par *Aspergillus oryzae* NRRL 6270 (**Francisa et al., 2003**) et par *Aspergillus oryzae* CBS 819.72 (**Kammoun et al., 2008**) en fermentation solide (SSF) ou le rendement de l'enzyme a atteint 151.1 U/ml (**Kammoun et al., 2008**).

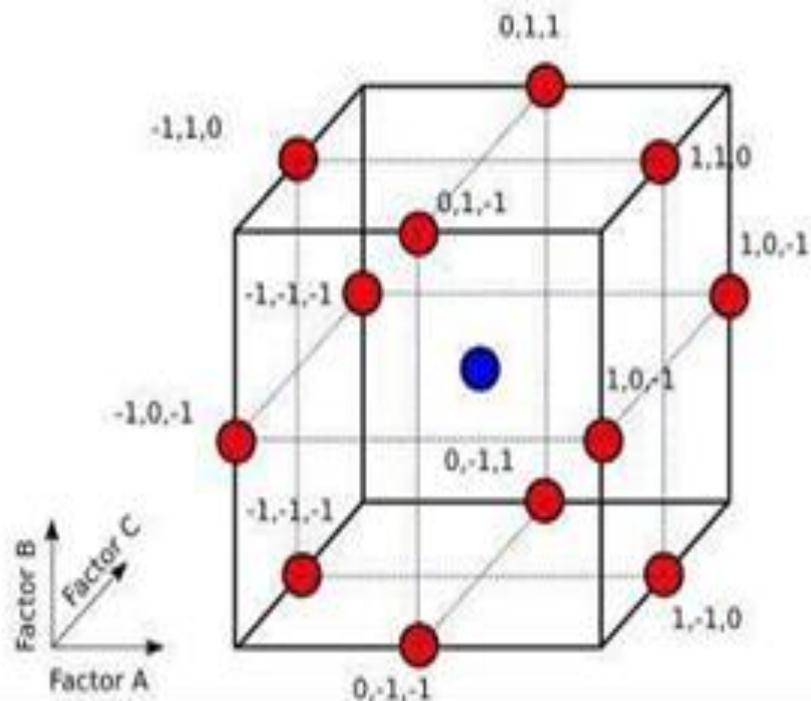


Figure 07 : Plan Box – Behnken (Net 1)

Les plans composites centrés (CCD) et les plans de Box – Behnken (BBD) sont toujours utilisés en combinaison avec la méthodologie de surface de réponse (RSM) afin de bien illustre l'effet des interactions des facteurs sur la réponse à la production enzymatique.

8.2.4. Méthodologie de surface de réponse RSM

C'est un ensemble des stratégies expérimentales, des méthodes mathématiques et des inférences statistiques pour construire et explorer une relation fonctionnelle approximative entre une variable de réponse et un ensemble de variables de conception (**Figure 08**). RSM n'est utile que pour un petit nombre des variables (jusqu'à cinq), en raison du nombre élevé des exécutions expérimentales requises. Elle est utilisée pour expliquer les effets combinés des tous les facteurs dans un processus de fermentation (**Prajapati et al., 2014**).

Cette approche a été employée aussi pour étudier l'effet interactif cumulatif des macronutriments des milieux, et pour optimiser leur concentration afin d'améliorer la production d'amylase à partir : de *Bacillus circulans* GRS 313 (**Dey et al., 2001**), *Bacillus amyloliquefaciens* KCP2 (**Prajapati et al., 2014**) ; *Streptomyces gancidicus* ASD (**krishnan et kumar, 2015**) , *Aspergillus awamori* par l'analyse de la réponse multiple (**Castro et al., 2011**) . L'optimisation du milieu a augmenté le rendement en amylase de 1,25 fois; 104.3, et 17.0Ug⁻¹ et 104.3-1 respectivement (**Dey et al., 2001** ; **Castro et al., 2011**).

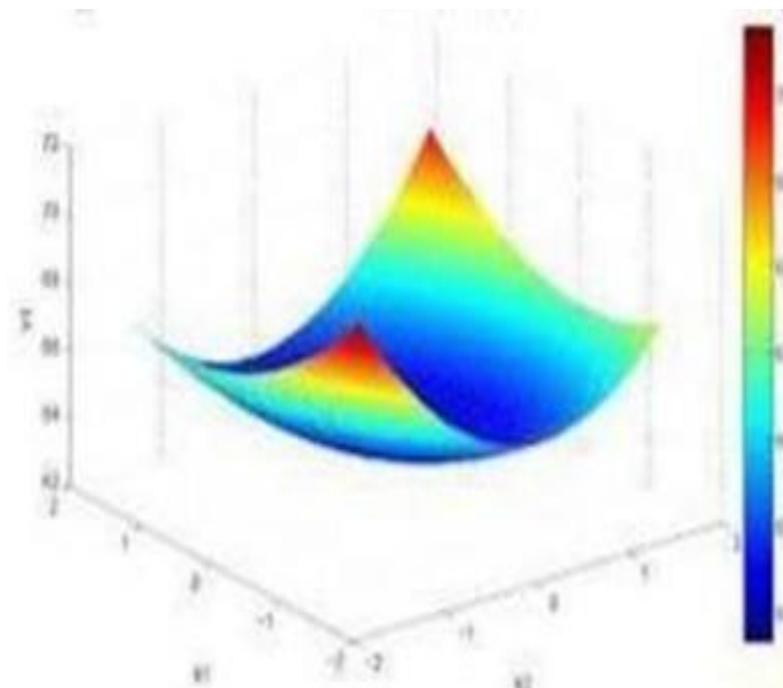


Figure 08 : Méthodologie de surface de réponse (Ahuja et Moreira, 2004).

8.2. Manipulation de la souche par le génie génétique

Les processus de la production à l'échelle industriel est souvent dépendant de l'utilisation des souches microbiennes surproductrices. Même avec des matières premières très bon marché, les conditions des cultures optimisées et des procédés des récupérations efficaces, un processus de production ne peut pas être commercialement viable et rentable jusqu'à ce que le rendement du produit final soit naturellement élevé par les souches productrices. Dans le cas où les souches productrices naturelles n'offrent pas un bon rendement ; des souches surproductrices peuvent être développées par mutagenèse aléatoire ou par une mutagenèse dirigée par génie génétique (Nickzad, 2016).

8.2.1. Mutagenèse

C'est une méthode pour améliorer la stabilité enzymatique est l'ingénierie des protéines, elle est classée en deux catégories ; la mutagenèse dirigée et la mutagenèse aléatoire. L'amélioration de la stabilité par la mutagenèse aléatoire sur toute la longueur d'une gène par utilisation des méthodes physiques telles que l'irradiation UV, le brassage d'ADN ; ou par la mutagenèse chimique par la PCR (Dey et al., 2016 ; Babak et al., 2019), N-méthyl-N-nitro,-N-nitrosoguanidine . L'exposition des souches aux mutagènes physiques et chimiques a entraîné des changements significatifs dans la souche mutante par rapport au type sauvage. Des travaux similaires ont également été mené sur différentes souches bactériennes comme *Cellulomonas biazotea* et *Bacillus mojavensis* entraînant des niveaux élevés de production par rapport à la souche parentale (Bhardwaj et al., 2019).

8.2.2. Technologie d'ADN recombinant

L'expression des protéines hétérologues dans le système de levure est très attrayante en raison de sa capacité à effectuer des modifications post traductionnelles eucaryotes et peut atteindre des densités cellulaires très élevées avec la capacité de sécréter des enzymes dans le système de fermentation. La plupart des levures sont considérées comme des organismes GRAS ne produisent pas des toxines. *Saccharomyces cerevisiae* déjà établi en tant que micro-organisme industriel (Bhardwaj et al., 2019) ; l'une des principales limitations de la levure de statut GRAS est son incapacité à convertir des substrats relativement peu coûteux en polysaccharides, tels que la biomasse d'amidon, en produits commercialement importants (Steyn et Pretorius, 1995).

La capacité de la levure à sécréter des protéines dans le milieu de culture est un avantage potentiel pour la production des protéines étrangères et a conduit à des études sur l'expression et la sécrétion d'un certain nombre des protéines hétérologues. Parmi celles-ci, plusieurs α -amylases eucaryotes (**Ruohonen et al., 1991**).

Lipomyces Kononenkoae ne peut pas être utilisé dans les fermentations industrielles existantes en raison de sa faible tolérance à l'éthanol, de son faible taux de croissance, et de la répression des catabolites, de ses gènes mal caractérisés et de son absence de statut GRAS (généralement considéré comme sûr). (**Steyn et Pretorius, 1995**). le clonage de gène de seconde α -amylase (LKA2), (LKA1) (**Steyn et Pretorius, 1995 ; Eksteen et al., 2002**) ,de *L.kononenkoae* et le plasmide multi copie pAAHS (**Ruohonen et al., 1990**) dans une souche génétiquement modifiée de *S.cerevisiae*.

α -Amylase

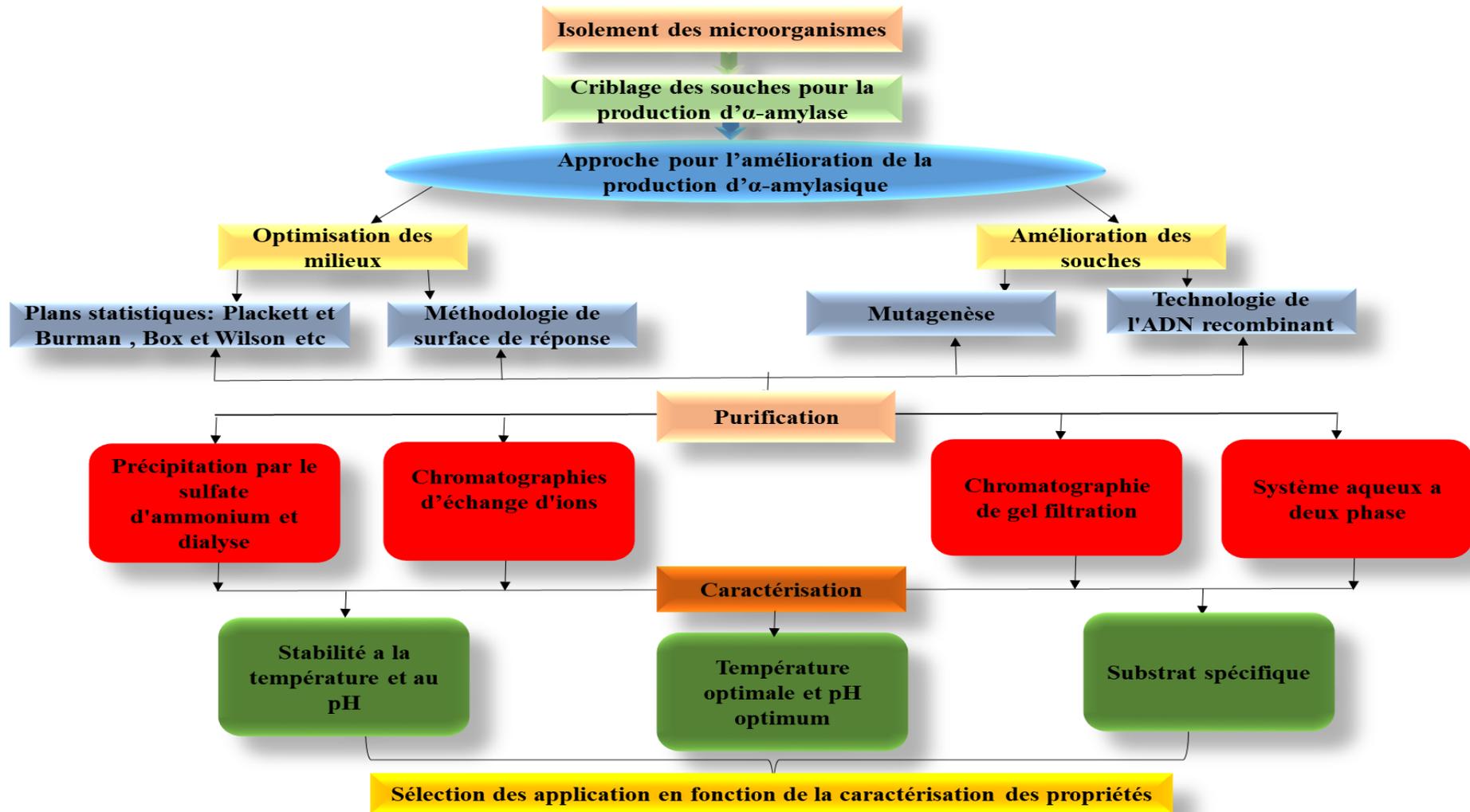


Figure 09 : Représentation schématique de la méthodologie de production, de purification et de caractérisation d' α -amylase

9. Purification d' α -Amylase

La purification d'enzyme produite peut inclure la majeure partie du coût de la production de l'enzyme, en particulier lorsqu'il existe un besoin de purification élevé. L'application des enzymes dans les secteurs pharmaceutiques et cliniques nécessite des amylases hautement purifiées. L'enzyme sous forme purifiée est également une condition préalable à l'étude des relations structure-fonction et des propriétés biochimiques. La purification des protéines extracellulaires étant plus facile que les protéines intracellulaires, les amylases extracellulaires ont été purifiées jusqu'à homogénéité par plusieurs chercheurs (**Krishna, 201 ; Richardson et al., 2002 ; Gusakov et al., 2011 ; Naili et al., 2016**) Il existe différentes méthodes de purification enzymatique ; cependant, la sélection de la méthode finale dépend du marché, du coût, de la qualité finale et de la technologie disponible (**Elyasifar et al., 2019**).

Traditionnellement, la purification des amylases microbiennes à partir des milieux de fermentation a été effectuée en plusieurs étapes, qui comprennent la séparation du jus de la fermentation, par la centrifugation de la culture, la concentration sélective du surnageant généralement par l'ultrafiltration et la précipitation d'enzyme par le sulfate d'ammonium ou des solvants organiques comme l'acétone. Ensuite, l'enzyme est soumise à des techniques chromatographiques comme échangeuse des ions et/ou la gel filtration (**Rao et al., 2007 ; Kumari et al., 2019**).

En ce qui concerne les besoins de production des enzymes à grande échelle, les méthodes des purifications ont été améliorées pour offrir une efficacité, une rentabilité et une purification plus rapides et moins des étapes de traitement (**Elyasifar, et al., 2019**) **Le tableau 11** montre plusieurs méthodes de purification d'amylase.

Un certain nombre des rapports sont disponibles sur la purification et la caractérisation des α -amylases microbiennes (**Uddin et al., 2005 ; Ramachandran et al., 2004 ; Reddy et al., 2005 ; Indriati et Megahati, 2018 ; Milosavic et al., 2007**). **Le tableau 11** récapitule des stratégies de purification diverses adoptées pour des α -amylases microbiennes.

Cependant, il existe très peu des rapports décrivant la purification d' α -amylase des levures. L' α -amylase thermostable de la levure *Cryptococcus sp.* A été purifié par une seule étape en utilisant la colonne de α -cyclodextrin-Sepharose 6B (**Iefuji et al., 1996**). L'enzyme a montré quelques ressemblances avec l' α -amylase d'*A.oryzae* et avec la glucomylase d'*A.niger*. **Tsiomenko et al., (1992)**, ont purifié et caractérisé l' α - amylase de la levure *Filobasidium*

capsuligenum. L'enzyme n'était pas influencée les ions Ca^{2+} . **Prieto et al., (1995)**, ont purifié une nouvelle α -amylase de la levure *Lipomyces kononenkoae* par la précipitation par le sulfate d'affinité et la chromatographie DEAE-BiogelA.

α -Amylase

Tableau 11 : Différentes méthodes utilisées pour la purification d' α amylase.

<i>Organismes</i>	<i>Méthodes de purification</i>	<i>Références</i>
Levures		
<i>Schwanniomyces alluvius</i>	Chromatographie échangeuse des anions sur DEAE cellulose - Chromatographie de gel filtration sur sephadex G100.	Moranelli et al., 1987
<i>Schwanniomyces alluvius</i>	Dialyse contre le tampon citrate-phosphate 0,05-Centrifugation (8000 tr / min, 10 min) -Chromatographie sur cellulose DEAE.	Simoës-Mendes, 1984
<i>Aureobasidium pullulans N13d</i>	Ultrafiltration-Précipitation par le sulfate d'ammonium- Chromatographie de filtration sur gel de Sephadex (TM G-75).	Li et al., 2007
<i>Lipomyces kononenkoae</i> IGC4052B	Précipitation par sulfate d'ammonium-Chromatographie d'affinité- Chromatographie sur DEAE–Biogel.	Prieto et al., 1995
<i>Candida antarctica CBS 6678</i>	Précipitation par le sulfate d'ammonium- Filtration sur gel Sephadex G-75 Chromatographie par filtration sur gel AcA 54 (de marque Ultrogel) - Chromatographie d'échange des ions sur DEAE-Sephacel - Chromatographie d'adsorption sur hydroxyapatite.	Mot et Verachtert, 1987
<i>Clavispora lusitaniae ABS7</i>	Précipitation par l'acétone-Chromatographie sur gel séphacryl S200 - Chromatographie échangeuse des ions sur DEAE cellulose -Ultrafiltration.	Dakhmouche, 2016
<i>Cryptococcus flavus</i>	Chromatographie sur séphacryl S100.	Wanderley et al., 2004
Moisissures		

α -Amylase

<i>Aspergillus oryzae</i>	Précipitation des complexes insolubles.	Porfiri et al., 2012
<i>Aspergillus awamori</i>	Précipitation par l'éthanol-Chromatographie d'exclusion sur Séphacryl-200-Chromatographie échangeuse des anions sur résine Dowex (AGILX4).	Bhella et Altosaa, 1985
<i>Aspergillus terreus NCFT</i>	Précipitation par le sulfate d'ammonium – Dialyse -Chromatographie sur colonne Sephadex G-100.	Sethi et al., 2016
<i>Trichoderma harzianum</i>	Lyophilisation- Dialyse-Chromatographie échangeuse des ions sur sepharose DEAE- Chromatographie sur colonne de sephacryl S-200.	Mohamed et al., 2011
<i>Monascus sanguineus</i>	Précipitation par le sulfate d'ammonium- Dialyse.	Tallapragada et al., 2017
<i>Aspergillus oryzae et Humicola lanuginosa</i>	Précipitation par le sulfate d'ammonium- Chromatographie de gel filtration -Chromatographies des échanges des ions.	Kumari et al., 2019
Bactéries		
<i>Bacillus licheniformis</i>	Chromatofocalisation - Chromatographie gel filtration -Electrophorèse sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE)- Analyse Western blot.	Damodara Rao et al., 2002
<i>B. subtilis</i> MTCC 121	Précipitation par le sulfate d'ammonium- Dialyse- Electrophorèse SDS-PAGE native.	Raul et al., 2014
<i>B. licheniformis</i>	Séparation par le PEG-dextrane- Chromatographie gel filtration - Chromatographies d'échange des ions.	Ivanova et al., 1993
<i>Bacille sp. BBM1</i>	Précipitation par le sulfate d'ammonium-Centrifugation (20 minutes à 7000 g, 4 ° C).	Moreno et al., 2009
<i>B. subtilis KIBGE A</i>	Ultrafiltration avec 100 000 MrCO- Ultrafiltration avec 30 000 MrCO- Précipitation par le sulfate d'ammonium- Centrifugation à 35 000 × g	Bano et al., 2011

α -Amylase

	pendant 15 min à 0 ° C- Dialyse- Lyophilisation- Chromatographie liquide à haute performance (HPLC).	
<i>B. Subtilis US586</i>	Centrifugée à 8 000 tr / min pendant 30 min- Evaporation sous vide à 40 ° C, Traitée thermiquement pendant 30 min à 55 ° C -Précipitée par l'acétone- Filtration sur gel Superdex 200.	Trabelsi et al., 2019
<i>B. sonorensis GV2</i>	Précipitation par le sulfate d'ammonium- à 4°C-Centrifugées-Dialysée- colonne Sephadex G-75-Colonne de verre DEAE-cellulose.	Vyas et al., 2019
<i>Streptomyces gancidicus ASD</i>	Précipitation par le sulfate d'ammonium-Dialyse.	Ashwini et Shanmugam.,
<i>Streptococcus bovis JB1</i>	Précipitation par le sulfate d'ammonium - Chromatographie des échanges des ions.	Freer, 1993
<i>Streptomyces sp</i>	Précipitation par sulfate d'ammonium-Dialyse-Chromatographie.	Al-Dhabi et al., 2019
<i>Clostridium acetobutylicum</i> <i>ATCC 824</i>	Ultrafiltration- Chromatographie sur colonne- Chromatographie échangeuse des ions.	Paquet et al., 1991

10. Caractérisation d' α -Amylase

10.1. Température et thermostabilité

La température est l'un des paramètres les plus importants qui affectent le taux d'hydrolyse enzymatique (Rana et al., 2013). La thermostabilité de ces enzymes est aussi une caractéristique importante et détermine la structure primaire de la protéine (Sharma et Satyanarayana, 2013).

La température varie selon que la culture est mésophile, thermophile ou psychrophile. Parmi les champignons et les actinomycètes, la plupart des études de production d'amylase ont atteint les rendements optimaux dans la plage de 25 ° C à 40 ° C (El-Fallal et al., 2012).

Chez les bactéries, Une large gamme de température de 35 à 80°C a été rapportée pour une croissance optimale et la production d' α amylase. La production d' α -amylase était maximale à 37°C par *Bacillus amyloliquefaciens* (Mouas, 2016) ; à 35°C par *Bacillus cereus* (Raplong et al., 2014) ; à 37°C par *Bacillus licheniformis* (Divakaran et al., 2011) et à 60°C par *Bacillus megaterium* (Oyeleke et al., 2010).

D'après Sundarram et Thirupathihalli Pandurangappa, (2014), la production optimale d'amylase se situe entre 50 et 65 °C pour les cultures fongiques thermophiles, La production d' α -amylase était maximale à la température de 65°C par *Thermomonospora fusca* (Busch et Stutzenberger, 1997), à 60 °C par *Thermomyces lanuginosus F1* (Odibo et Ulbrich-Hofmann, 2001) et à 50 °C *Talaromyces emersonii* (Mahon et al., 2009).

Selon la suite pour l'amylase levurienne a des optimums de température, allant de 40°C à 60°C tels que : 60°C pour *Wickerhamia sp* (Hernández-Montañez et al., 2012), 50°C pour *Cryptococcus flavus* (Wanderley et al., 2004), 55°C pour *Talaromyces pinophilus I-95* (Xian et al., 2015), 40°C pour *Clavispora lusitaniae CB13* (Ranjan et al., 2016) et 54°C *Clavispora lusitaniae* (Djekrif, 2016). Alors qu'il y a des espèces caractérisées par une température de 70°C et plus comme l' α -amylase était de *Lipomyces starkeyi* (Ferhat et Laklouka, 2015) et de 80 °C par *thermophilic Anoxybacillus sp. YIM 342* (Zhang et al., 2015).

Pour l'utilisation industrielle, beaucoup des travaux ont étudié les propriétés des enzymes amylolytiques à sous la caractéristique la plus recherchée : la thermostabilité (Mouas, 2016) L' α -amylase peut résister à une température élevée de 80-90 ° C pour la liquéfaction à 100-110° C de gélatinisation. (Kumari et al., 2012). Ces dernières années, beaucoup des recherches ont été faites sur la production des amylases par les microorganismes thermophiles.

Les enzymes thermostables isolées à partir des organismes thermophiles ont trouvé un certain nombre d'applications commerciales en raison de leur stabilité. Comme la liquéfaction enzymatique et la saccharification d'amidon sont effectuées à des températures élevées.

D'après **Doley et al., (2004)**, ont trouvé que l'alpha amylase *Bacillus subtilis DM-03* est stable à 95°C pendant 10 min, ce pendant l'enzyme de *Bacillus stearothermophilus* 5 jours à 70°C et 45 min à 90°C (**Vihinen et Mäntsala, 1990**). *Bacillus amyloliquefaciens* produite une alpha amylase stable 72 h à 55°C (**Rai et Solanki, 2014**). Quant aux champignons est stable à 55°C pendant 1h pour *Aspergillus niger* sp (**Chimata et al., 2011**) ; 50 - 80°C pendant 1 h pour *Penicillium janthinellum* (**Sindhu et al., 2011**), alors que **Raviyan et al., (2003)**, ont déterminé que la thermostabilité d'alpha amylase *Aspergillus oryzae* est de 3 min à 75°C. Chez les levures l'alpha amylase est stable 50°C pendant 1h pour *Cryptococcus flavus* (**Wanderley et al., 2004**) et C pendant 2 h pour *Saccharomycopsis fibuligera ST 2* (**Gogoi et al., 1987**)

Aujourd'hui, le marché annuel des enzymes thermostables représente environ 250 millions de dollars et les α -amylases thermostables en occupent une bonne part (**Mouas, 2016**).

10.2. pH

Les valeurs de pH ont été signalées pour servir d'indicateur d'initiation et de la fin de la synthèse enzymatique car le changement de pH affecte la stabilité d' α -amylase dans le milieu. Il convient de noter que le site actif d' α -amylase consiste en un grand nombre des groupes chargés qui expliquent le fait que la plupart des α -amylases avaient un pH optimal dans la gamme acide (**El-Fallal et al., 2012**).

L' α -amylase fongique est stable dans une gamme de pH de 5 à 8 avec un optimum se situant entre 4 et 5 (**Ait kaki et al., 2012**).

Le pH d' α -amylase est 6 de 6.5 et 9.5 chez *Aspergillus awamori* (**Negi et Banerjee, 2009**). *Aspergillus terreus* NCFT 4269.10 (**Sethi et al., 2016**), l'*Aspergillus niger* JGI 24 (**Varalakshmi et al., 2009**) respectivement.

Selon l'origine, les α -amylases de levure présentent un pH généralement optimal compris entre 4 et 6 (**Djekrif et al., 2016**), **Takeuchi et al., (2006)**, ont défini que que l'activité maximale d' α -amylase à un pH 5.0 pour *Pichia burtonii* ; de 5.5 pour *Cryptococcus flavus* (**Wanderley et al., 2004**) ; de 4.5 pour *Aureobasidium pullulans N13d*, alors que à **Bdulaal, (2018)**, a déterminé que le pH idéal et large entre 4.5 et 8.5 pour *Trichoderma pseudokoningii* (**Tableau 12**).

Il existe des bactéries dont le pH supérieur à la neutralité 6 à 9. Des études de **Raplong et al., (2014)**, ont déterminé que l'activité maximale d' α -amylase à un pH de 6,5 pour *Bacillus cereus* ; de 7.0 pour *Bacillus subtilis* (**Madika et al., 2017**) et de 8.5 pour *Bacillus subtilis* A10 (**Aygan et al., 2014**).

10.3. Poids moléculaire

Les poids moléculaires des α -amylases varient d'environ 10 à 210 kDa. La valeur la plus basse 10 kDa pour *Bacillus caldolyticus* et la plus élevée de 210 kDa pour *Chloroflexus aurantiacus* a été rapportée. Les poids moléculaires des α -amylases microbiennes sont généralement de 50-60 kDa (**Gupta et al., 2003**).

Ce poids moléculaire peut être augmenté en raison de la glycosylation comme dans le cas d' α -amylase de *T. vulgaris* qui atteint 140 kDa. En revanche, la protéolyse peut entraîner une diminution du poids moléculaire. Par exemple, l' α -amylase de *T. vulgaris* 94-2A (AmyTV1) est une protéine de 53 kDa et des peptides plus petits de 33 et 18 kDa qui se sont révélés être des produits d'une protéolyse limitée d'AmyTV1 (**El-Fallal et al., 2012**).

D'après **Ferhat et Lakaklouka, (2015)**, Celui des α - amylases levuriennes, s'échelonne entre 40.000 et 70.000 daltons .**Sidkey et al., (2011)**, a rapporté que le poids moléculaire di- α -amylase est de 67 kDa chez *Cryptococcus flavus* (**Galdino et al., 2008**) ; chez *Pichia burtonii* (**Takeuchi et al., 2006**) et de 54 kDa chez *Wickerhamia sp. X-Fep* (**Hernández- Montañez et al., 2012**).

10.4. Substrat et paramètres cinétiques

La spécificité de substrat des α -amylases varie selon les micro-organismes (**Sharma et Satyanarayana, 2013**). En général, les α -amylases présentent la spécificité la plus élevée vis-à-vis d'amidon suivi par l'amylose, l'amylopectine, la cyclodextrine, le glycogène et le maltotriose (**Gupta et al., 2003**).

L'amidon comme substrat représente le stockage le plus abondant des polysaccharides dans les plantes, et à côté de la cellulose, il est le polysaccharide le plus abondant sur terre. Le polymère d'amidon se compose exclusivement des unités de glucose. Il existe deux formes, à savoir l'amylose et l'amylopectine (**Figure 10**). L'amylose est le polymère linéaire dans lequel les molécules successives de D-glucose sont liées par Les liaisons glycosidique α (1– 4) et pour l'amylopectine, en plus des chaines linéaire de glucose lié par les liaisons α (1– 4), en trouve

les brouchement liées aux chaines linéaires par les liaisons α (1– 6) (Elmarzugi et al., 2014).

Les propriétés cinétiques des alpha amylases en fonction de la source de leur production et du substrat utilisé des valeurs Km dans la plage de 0,19 mg ml⁻¹ à 5,75 mg ml⁻¹ et Vmax dans la plage de 0,016 U / ml à 7,35 U ml⁻¹ (Kumari et al., 2019). L' α -amylase d'*Aureobasidium pullulans N13d* de valeur Km et Vmax de 5.75 \pm 0.3 mg / ml et 0.25 \pm 0.02 U / ml respectivement (Li et al., 2007).

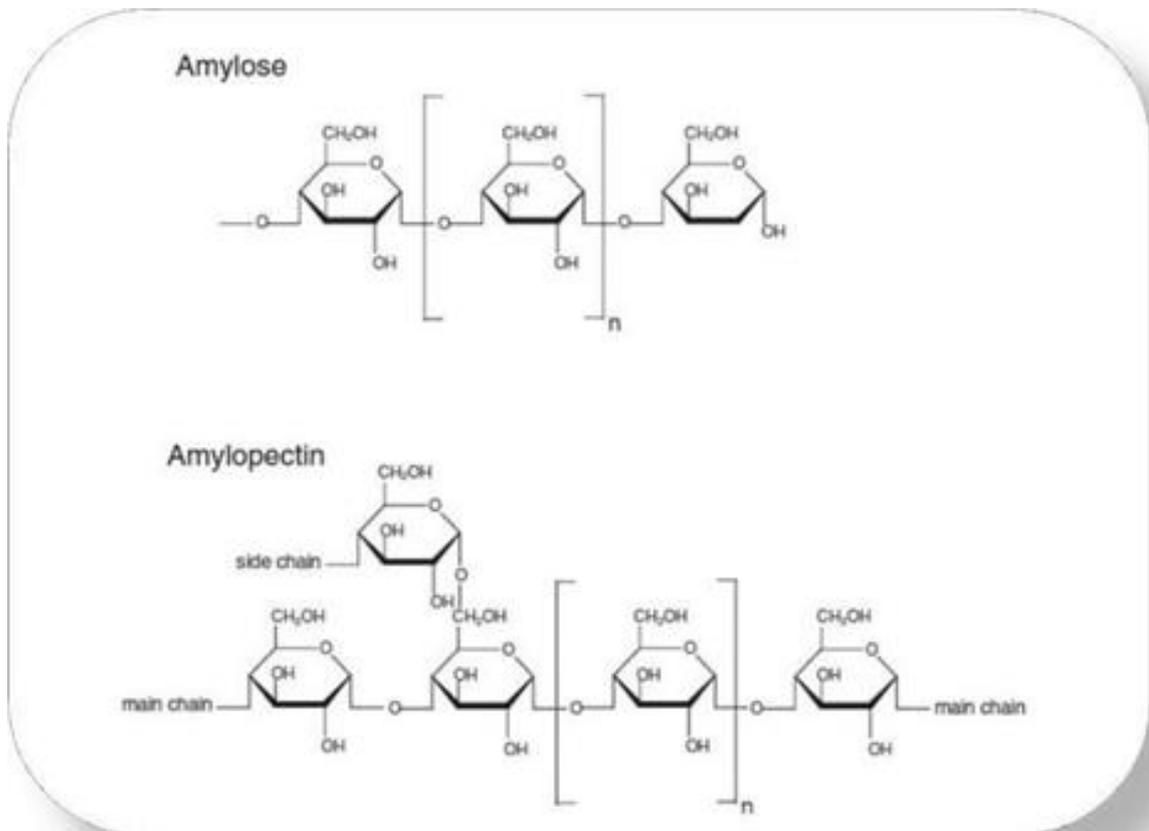


Figure 10 : Structures chimiques des amyloses et des amylopectines (El-Enshasy et al., 2013)

10.5. Effet du calcium

L' α -amylase est une métalloenzyme, qui contient au moins un ion Ca^{2+} (**Gupta et al., 2003**). Elles sont des enzymes activées par les métaux qui ont une affinité élevée pour l'ion Ca^{2+} . L'ion Ca^{2+} modifie l'activité et la stabilité thermique de la plupart d' α -amylase, et il est connu que leur stabilité thermique est généralement améliorée en présence de cet ion (**Sharma et Satyanarayana, 2013**).

Les ions Ca^{2+} jouent un rôle déférents rôles dans l'activité d' α -amylase tels que :

- En présence de Ca^{2+} , la stabilité thermique d' α -amylase est augmentée.
- Ca^{2+} joue un rôle important dans l'induction et la sécrétion d' α -amylase.
- Ca^{2+} aide à maintenir la structure tridimensionnelle de cette enzyme.
- CaCl_2 (5-7,5 mM) améliore la stabilité thermique d' α -amylase.

10.6. Stabilité d'alpha-amylase

Les enzymes industrielles devraient être stables dans des conditions difficiles comme la température élevée, le pH, l'oxydation et des autres conditions inévitables lors de l'hydrolyse de l'amidon. Jusqu'à présent, plusieurs méthodes ont été utilisées pour obtenir une amylase stable. La première consiste à l'isolement et le criblage d'enzyme à partir les micro-organismes extrémophiles tels que les bactéries thermophiles et la manipulation génétique des micro-organismes.

Le second, l'amélioration de la stabilité enzymatique via l'ingénierie des protéines, l'immobilisation des enzymes et l'ajout des additifs (**Dey et al., 2016**). Le recyclage des enzymes peut être considéré comme une stratégie pour sauver l'enzyme. La limitation du recyclage d'enzyme a été résolue par la méthode d'immobilisation (**Talekar et al., 2013**). En outre, l'immobilisation offre une stabilité plus élevée et un fonctionnement continu, et elle convient à plusieurs conceptions techniques diverses et améliore le contrôle de la réaction (**Cordeiro et al., 2011 ; Dey et al., 2016**). Etant donné que les alpha amylases fongiques ne sont pas néfaste ils sont plus préférées dans l'industrie d'amidon, mais elles doivent être plus stables et rentables. Une étude de **Bei Gao et al., (2016)**, ont montré une stabilité accrue et une durée de vie plus longue des alpha-amylases fongiques (AmyA1) via l'immobilisation sur des nanoparticules magnétiques (**He et al., 2017**).

Wang et al., (2018), ont montré l'effet de la mutagenèse sur la stabilité d'amylyase .La plupart des alpha-amylases sont actives dans le pH neutre. En raison du pH acide de la suspension d'amidon natif (3.2-4.5) qui désactive l'enzyme pendant le traitement d'amidon, la suspension d'amidon doit être ajustée au pH neutre. Lors d'une étude sur la production d' α -amylyase par *Bacillus subtilis*, il a été montré que l' α -amylyase mutée (dans le site actif) est plus active en condition acide.

Une autre méthode pour améliorer la stabilité d'alpha-amylase est la modification chimique (**Habibi et al., 2004**). Dans l'industrie d'amidon, des températures élevées sont nécessaires pour la synthèse du produit, qui inactive l' α -amylyase. **Siddiqui et al., (2010)**, ont rapporté que la modification des groupes carboxyle de TAA par le dichlorhydrate d'ester méthylique de l'arginine peut améliorer l'activité hydrolytique de l' α -amylyase à 60°C. Aussi, l'eau est cruciale pour l'activité d'alpha-amylase ; d'autre part, elle peut entraîner une dénaturation d'enzyme. Certains agents stabilisants tels que les sucres ou les polyols peuvent être ajoutés à l'alpha-amylase afin de modifier la structure d'eau et d'améliorer la force d'interaction hydrophobe dans la structure enzymatique (**Khajeh et Nemat-Gorgani, 2001 ; Dey et al., 2016 ; Samborska et al., 2006**) ,ont rapporté que le saccharose, le tréhalose et les polyols peuvent avoir un effet stabilisant remarquable sur l'alpha-amylase à l'état thermophile. **Le tableau 12** : récapitule les caractéristiques physico-chimiques des quelques espèces productrices des α -amylyases.

α -Amylase

Tableau 12 : Caractéristiques physico-chimiques des quelques espèces productrices des α -amylases.

<i>Micro-organismes</i>	PM (KD)	T (°C)	pH	<i>Substrat</i>	<i>paramètres cinétiques</i>		<i>Références</i>
					Km (mg ml ⁻¹)	Vm (U mg ⁻¹)	
Bactéries							
<i>Bacillus subtilis</i>	-	35	7.0	Enveloppe de	-	0.5165±0. 013	Madika et al., 2017
<i>Bacillus cereus</i>	-	35	6.5	Amidon	-	-	Raplong et al., 2014
<i>Bacillus subtilis</i> MTCC 121	-	40	7.1	Amidon	-	-	Raul et al., 2014
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	45	50-70	6-10	Amidon soluble	-	-	Rai et Solanki, 2014
Moisissures							
<i>Aspergillus flavus</i> NSH9	54	50	5	Amidon	4.22	65.52	Karim et al., 2018
<i>Penicillium camemberti</i> PL21	60.5	-	6	Amidon soluble	0.92	-	Nouadri et al., 2010
<i>Aspergillus oryzae</i>	66	50	5	Amidon	-	-	Patel et al., 2005
<i>A. oryzae</i> IFO-30103	51.3	50	5.5	Amidon soluble	0.5	1000	Bhanja Dey et Banerjee, 2015
Levures							
<i>Trichoderma</i> <i>pseudokoningii</i>	30	50	4.5-8.5	Amidon	4	0.74	Abdulaal, 2018

α -Amylase

<i>Pichia burtonii</i>	51	40	5	Amidon	-	-	Takeuchi et al., 2006
<i>Cryptococcus flavus</i>	75-84.5	50	5.5	Amidon	0.056	-	Wanderley et al., 2004
<i>Lipomyces kononenkoae</i>	76	70	4.5-5	Amidon soluble	0.008	-	Prieto et al., 1995
<i>Saccharomycopsis fibuligera ST 2</i>	40.9-50	60	4.8-6	Amidon soluble	0.572	-	Gogoi et al., 1987
<i>Saccharomycopsis fibuligera KZ</i>	-	40-50	5-6	Amidon	-	-	Hostinová et al., 2010
<i>Aureobasidium pullulans N13d</i>	33	60	4.5	Amidon	5.75 \pm 0.3	0.25 \pm 0.02	Li et al., 2007

11. Immobilisation d' α -Amylase

L'activité catalytique d'une enzyme dépend de sa structure tridimensionnelle et de sa conformation. Tout changement permanent ou temporaire de sa conformation naturelle affecte sa fonction catalytique ; donc il devient nécessaire de protéger les enzymes pour maintenir son activité catalytique. L'immobilisation des enzymes est une méthode utilisée pour protéger et stabiliser les enzymes et donc empêcher leur désactivation par divers agents dénaturants physiques ou chimiques (**Kumari et al., 2019**).

Les enzymes immobilisées sont actuellement utilisées en thérapeutique industrielle, analytique et pour des applications structurelles. La plupart des applications industrielles à grande échelle se trouvent dans l'industrie alimentaire et dans les réacteurs à colonne. Parmi ces applications, l'utilisation du glucose isomérase immobilisée pour produire du sirop de maïs à haute teneur en fructose (**Esmail Fathi Mobasher, 2009**).

Certaines techniques d'immobilisation développées pour les α -amylases sont données dans le (**Tableau13**) ; L'un des principaux avantages des enzymes immobilisées est leur réutilisation, récupération facile d'enzyme et du produit, un fonctionnement continu des processus enzymatiques. De plus elles améliorent le stockage, le pH opérationnel ; elles améliorent également l'activité enzymatique sur une gamme plus large de pH et de température, facilitent la prévention de la croissance microbienne et augmentent la durée de conservation (**Esmail Fathi Mobasher, 2009**), leur stabilité structurale est augmentée : cela permet d'effectuer des réactions à des températures plus élevées que dans le cas de l'enzyme libre en solution (**Kumari et al., 2019**).

En revanche, leur activité est parfois diminuée car une partie des sites actifs peuvent être masqués (détruite).

Une immobilisation enzymatique efficace d'alpha amylase peut être obtenue par utilisation (**Kumari et al., 2019**) deux méthodes (**Figure 11**). Les méthodes physiques là où existent des faibles interactions entre l'enzyme et le matériel, elles comprennent : L'adsorption, piégeage ; ou par des méthodes chimiques dans lesquelles des liaisons covalentes se forment entre l'enzyme et le matériau de support ; elles comprennent, Liaison ionique et la réticulation (**Esmail Fathi Mobasher, 2009**), avec un rendement d'immobilisation déférent (**Kumari et al., 2019**). L'immobilisation des amylases sur des supports insolubles dans l'eau a été considérée comme le moyen le plus prometteur d'obtenir des formes des enzymes plus stables et réutilisables (**Bryjak, 2003**).

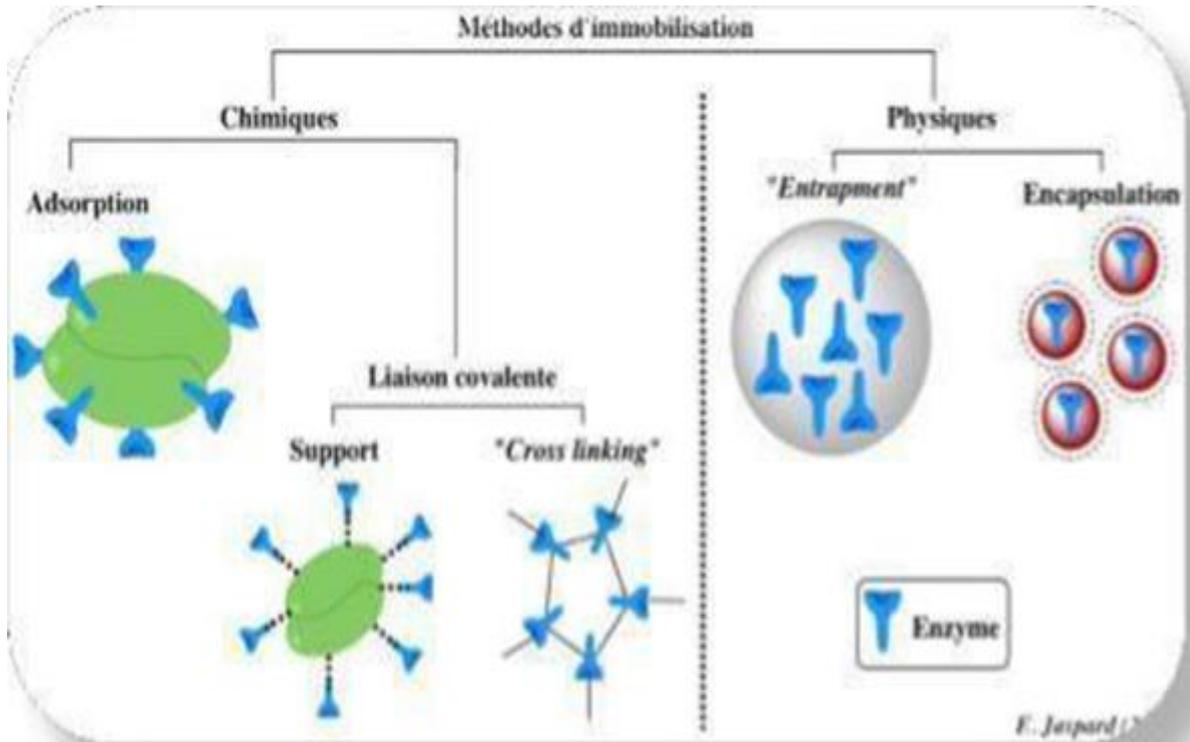


Figure 11 : Techniques des immobilisations (Jaspard, 2012)

Les méthodes des immobilisations des enzymes, en général, sont l'adsorption, la microencapsulation, l'inclusion, la réticulation et la fixation chimique sur un support insoluble (tableau 13). Toutes ces méthodes opèrent en milieu aqueux tamponné.

α -Amylase

Tableau 13 : Différentes méthodes utilisées pour l'immobilisation d' α -amylase.

<i>Méthodes d'immobilisation</i>	<i>Matrice utilise</i>	<i>Références</i>
Adsorption	Charbon.	Kumari et al., 2019
Piégeage	Billes d'alginate et de carraghénane.	Talekar et Chavare., 2012
	Billes de nanocomposite chitosane-montmorillonite.	Mardani et al., 2018
	Mélange aqueux d'alginate de sodium.	Demirkan, 2011
	Billes d'alginate de calcium.	Jamuna et Ramakrishna., 1992
		Argirakos et al., 2007
		Talekar et Chavare., 2012
Liaison covalente	Liaisons amide entre les groupes amines sur la protéine et les groupes chlorurent d'acide	Kahraman et al., 2007
Réticulation	Polyaniline modifiée au glutaraldé hyde (PANIGAMY).	Pascoal et al., 2011
	Glutaraldéhyde et du dextrane polyaldéhyde.	Sahutoglu et Akgul., 2015

12. Application industrielle d' α -Amylase

Dans les procédés industriels les α -amylases sont les plus utilisés tel que : le textile, la lessive, papier, alimentaire, Détergents... (Figure 12) (Behal et al., 2006).

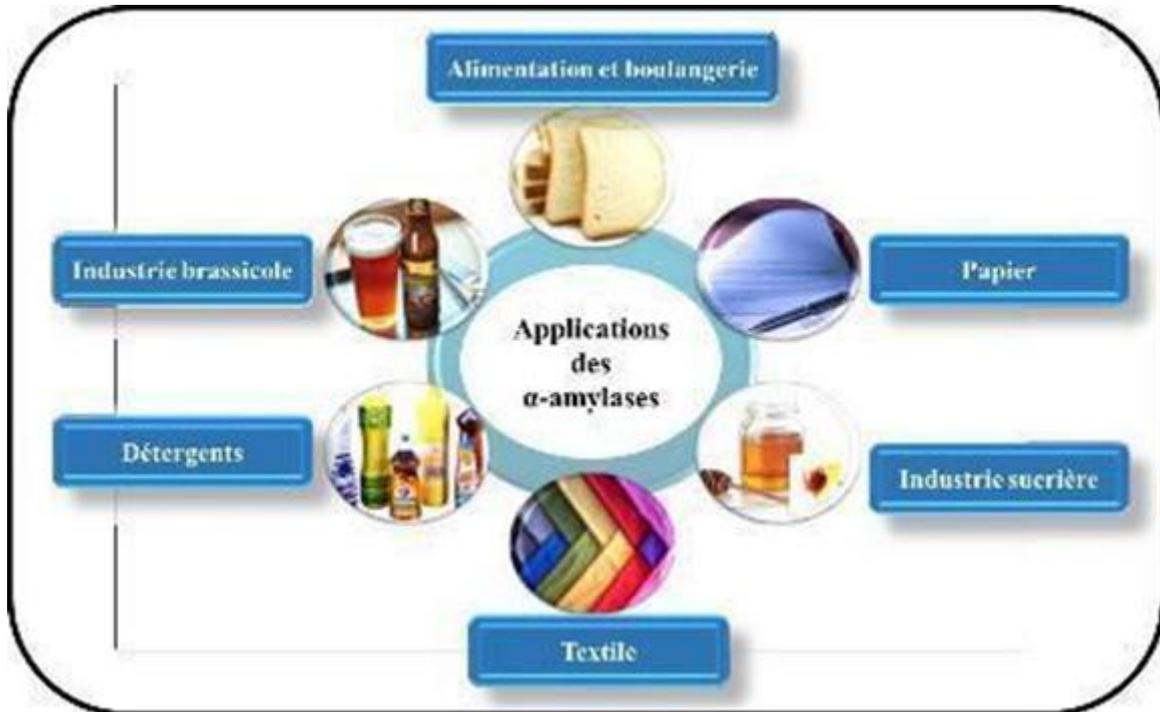


Figure 12 : Applications des α -amylases (Mehta et Satyanarayana, 2016)

12.1. Amidonrie

Des nombreuses industries utilisent l' α -amylase pour la production de glucose. Cette enzyme hydrolyse l'amidon et le convertit en maltose et glucose. Les liaisons glucosidiques α -(1, 4) dans les polymères d'amidon sont hydrolysées de manière aléatoire pour produire du maltose et du glucose (Hussain et al., 2013). Ce processus comporte trois étapes : la gélatinisation, la liquéfaction et la saccharification. La gélatinisation implique la dissolution des granules d'amidon dans l'eau pour former une suspension visqueuse d'amidon. L'amylose et l'amylopectine sont dispersées dans l'eau lors de la dissolution. La liquéfaction de l'amidon est son hydrolyse partielle en dextrans à chaîne courte par l' α -amylase, ceci permet la réduction de la viscosité de la suspension d'amidon. Quant à la saccharification, c'est la production du glucose et de sirop de fructose par une hydrolyse supplémentaire (Sundarram et Thirupathihalli Pandurangappa, 2014).

12.2. Alimentation et boulangerie

Les amylases sont largement utilisées dans diverses industries alimentaires transformées telles que la boulangerie, le brassage, la préparation d'aide digestive, la production de gâteaux, de jus de fruits et de sirop d'amidon (**Vaidya et al., 2015**). L'addition d' α -amylase à la pâte entraîne une augmentation de la vitesse de fermentation et une réduction de la viscosité de la pâte. De plus, il génère du sucre supplémentaire dans la pâte, ce qui améliore le goût, la couleur de la croûte et la qualité du pain (**Rana et al., 2013**).

Durant le brassage de la bière, l'amidon est séparé par l' α -amylase en dextrines et en sucres pour former un moût sucré. Le houblon est bouilli avec le moût sucré pour produire le moût houblonné (**Djekrif et al., 2016**).

12.3. Papier

Les applications des amylases dans cette industrie comprennent le revêtement d'amidon, le désencrage, l'amélioration du drainage et le nettoyage du papier. L'application principale de l' α -amylase dans l'industrie du papier est de produire de l'amidon de poids moléculaire élevé avec une faible viscosité par modification de l'amidon du papier couché. Ce processus rend le papier lisse et solide pour améliorer la qualité d'écriture (**Singh et al., 2016**).

L'amidon est un bon agent d'encollage pour la finition du papier, améliorant la qualité et l'effaçabilité, en plus d'être un bon revêtement pour le papier. L' α -amylase, active à froid, est également très utile pour l'industrie du papier car elle réduit la viscosité de l'amidon pour un revêtement approprié du papier (**Mobini-Dehkordi et Afzal Javan, 2012**).

12.4. Textile

Les premiers mouvements pour appliquer la biotechnologie ont été principalement dans la finition du textile. Les procédés biotechnologiques se sont déjà révélés plus avantageux que les procédés chimiques dans la transformation des fibres naturelles, comme le coton et la laine (**Elmarzugi et al., 2014**).

Les industries textiles utilisent largement les α -amylases pour hydrolyser et solubiliser l'amidon, qui se lave ensuite du tissu pour augmenter la rigidité des produits finis. L' α -amylase est utilisé comme agent de désencollage pour éliminer l'amidon du tissu gris avant son traitement ultérieur dans le blanchiment et la teinture (**Tiwari et al., 2015**).

12.5. Détergents

Les industries des détergents sont les principaux consommateurs des enzymes, tant en termes de volume que de valeur. Les amylases sont le deuxième type des enzymes utilisées dans la formulation du détergent enzymatique, et 90% des tous les détergents liquides contiennent ces enzymes (**Souza et Magalhães, 2010**). Ils sont utilisés dans les détergents pour la lessive et le lavage automatique de la vaisselle pour dégrader les résidus des féculents tels que les pommes des terres, les sauces, la crème anglaise, le chocolat, etc... Les amylases sont le deuxième type des enzymes utilisées dans la formulation des détergents enzymatiques (**Rana et al., 2013**).

12.6. Production d'alcool et biocarburant

Parmi les biocarburants, l'éthanol est le plus largement utilisé. L'amidon étant un matériau de départ économique, il est utilisé pour la production d'éthanol comme biocarburant. Cela se fait en une série des étapes. Premièrement, l'amidon est soumis à une liquéfaction pour former une suspension d'amidon visqueux. Ceci est suivi du processus de saccharification où l'amidon est hydrolysé par l' α -amylase pour donner des sucres fermentescibles. Ces sucres sont ensuite fermentés par la levure pour produire de l'alcool (**Sundarram et Thirupathihalli Pandurangappa, 2014**).

12.7. Applications cliniques et médicales

Selon **Ferhat et Laklouka, (2015)**, Dans le domaine médical, le taux d' α -amylase dans les liquides biologiques peut être utilisé pour détecter certaines maladies : insuffisance cardiaque, oreillons, cancer du pancréas (**Benaouida, 2008**).

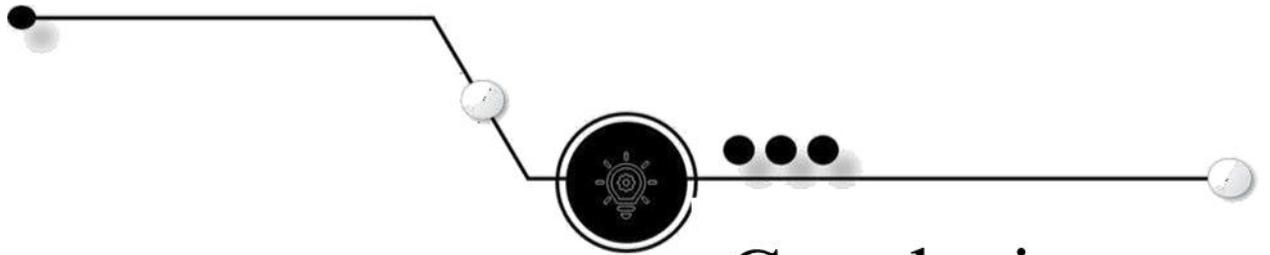
Les applications d'amylase comprenaient des nombreux autres domaines, tels que la chimie clinique et analytique, par exemple :

- L'application d'un réactif stable liquide, à base d' α -amylase, est décrite pour le système de chimie clinique.
- Développer un processus pour détecter des niveaux élevés de sucres.

Une concentration plus élevée que la normale d'amylase peut refléter l'une de plusieurs conditions médicales, y compris une inflammation aiguë du pancréas (en même temps que la lipase plus spécifique), mais aussi un ulcère gastroduodéal perforé ... L'amylase peut être mesurée dans des autres fluides corporels, y compris l'urine (**Tiwari et al., 2015**).

Dans le domaine pharmaceutique, les α -amylases sont utilisées comme agent anti-inflammatoire (**Merabti, 2006**).

Les α -amylases fongiques sont utilisées comme : aide digestif pour éviter les dyspepsies et les fermentations intestinales par exemple : Danilase (**Singh et al., 2014**)



Conclusion

Conclusion

L' α -amylase est une hydrolase active sur l'amidon et les domaines d'applications industrielles la considèrent comme un outil clé de la biotechnologie ; elle est largement produite par les bactéries et les moisissures, tandis que peu d'études ont été réalisées sur sa production à partir des levures. L'intérêt de notre travail est l'étude de l' α -amylase d'origine levurienne, une enzyme avec de nouvelles caractéristiques permettant son utilisation industrielle. La production de l'amylase à partir des souches locale cultivées sur les déchets agro-alimentaires permet l'amélioration de l'économie (baisse du coût de l'importation des enzymes) et aussi la diminution de la pollution d'environnement.

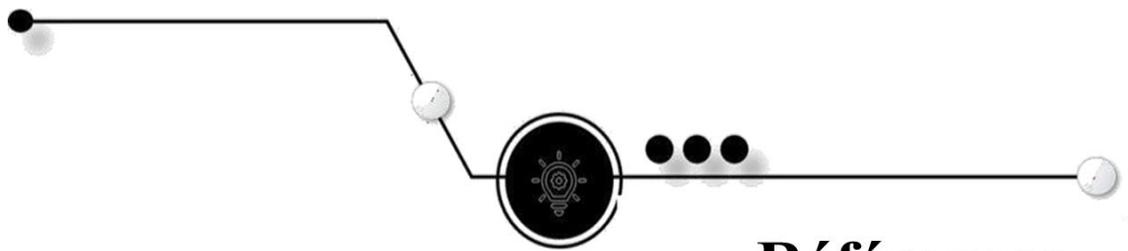
Dans ce contexte, notre étude comporte deux volets :

Le premier renferme les caractéristiques morphologiques culturelles et nutritionnelles des levures ; leurs habitats, les facteurs influençant leur croissance (facteurs physiques et chimiques) et nous nous sommes basées sur les levures amylolytique.

Le deuxième volet concerne l' α amylase, nous avons élaboré son origine, sa structure, sa production par fermentation liquide et solide, sur des milieux à base de divers sous-produits industriels (déchets de dattes, déchets d'agrumes, lactosérum...). Et comme l'utilisation des α -amylases dans l'industrie est en augmentation, son amélioration est nécessaire, pour cela nous avons décrit les différentes approches statistiques utilisées à savoir : les plans de Plackett – Burman, les plans de Box et Wilson ...et aussi, la manipulation de la souche par les modifications génétiques (la mutagenèse) ou par la technologie d'ADN recombinant. Ces dernières assurent la stabilité de l'enzyme et l'augmentation de sa production. Le besoin impérieux de l'industrie en enzymes thermostable nous a poussés à étudier aussi, après sa purification, son immobilisation qui permet non seulement l'augmentation de son thermostabilité mais aussi son réutilisation.

Au terme de cette étude, nous envisageons les perspectives suivantes :

- Réaliser des expériences sur la production de l' α -amylase à partir de levures locales.
- Améliorer le rendement enzymatique par l'optimisation du milieu de production en utilisant l'outil statistique.
- Purifier l'enzyme produite, pour un usage alimentaire ou pharmaceutique.
- Etudier l'immobilisation pour augmenter la thermostabilité et recycler l' α -amylase.



Références bibliographiques

Références bibliographiques

- Abdel-Fattah, Y. R., Soliman, N. A., El-Toukhy, N. M., El-Gendi, H., and Ahmed, R. S. 2013.** Production, Purification, and characterization of thermostable α -amylase produced by *Bacillus licheniformis* Isolate AI20. Journal of Chemistry, 2013 :1–11.
- Abd-Elhalem, B.T., El-Sawy, M., Gamal, R. F et Abou-Taleb, K. A. 2015.** Production d'amylases à partir de *Bacillus amyloliquefaciens* sous fermentation immergée à l'aide de certains sous-produits agro-industriels. Annals of Agricultural Sciences, 60(2) :193-202.
- Abdulaal, W. H. 2018.** Purification and characterization of α -amylase from *Trichoderma pseudokoningii*. BMC Biochemistry, 19(1) :1-6.
- Abdullah, R., Nadeem, S., Iqtedar, M., Kaleem, A., Iftikhar, T., Naz, S. 2017.** Influence of growth conditions on enhanced production of alpha amylase from *Penicillium species* in solid state fermentation. Indian J Biotechnol, 16(3) :426-32.
- Abou-Elala, G., El-Sersy, N. A., Wefky, S. 2009.** Statistical optimization of cold adapted α -amylase production by free and immobilized cells of nocardiosis aegyptia. J Appl Sci, 5(3) :2869-2916.
- Abu, E. A., Ado, S. A. and James, D. B. 2005.** Raw starch degrading amylase production by mixed culture of *Aspergillus niger* and *Saccharomyces cerevisiae* grown on sorghum pomace. African Journal of Biotechnology, 4(8) :785-790.
- Acourene, S and Ammouche, A. 2011.** Optimization of ethanol, citric acid, and α -amylase production from date wastes by strains of *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus niger*, and *Candida guilliermondii*. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 39(5) :759–766.
- Ahuja, S. K., Ferreira, G. M et Moreira, A. R. 2004.** Application de la conception de Plackett-Burman et de la méthodologie de la surface de réponse pour obtenir une croissance exponentielle de la bactérie agrophile Biotechnology and Bioengineering, 85 (6) :666–675.
- Ait kaki-El-Hadef El-Okki, A., Leghlimi, H., Dakhmouche, S., Bennamoun, L., et Meraihi Z. 2010.** Utilisation de la planification expérimentale pour l'optimisation de la production de l' α amylase par *Rhizopus oryzae*. Microbiol. Ind. San et Environn, 6(1) :1-17.
- Akbar, A., Aamir, Sh., Moazzam, R. K., Muhammad, S. A., Muhammad, R. A. 2012.** Levure, ses types et leur rôle dans la fermentation lors de la fabrication du pain processus. PAK. J. Food Sei, 22 (3) : 171-179.

- Akcan, N. 2011.** High level production of extracellular α -Amylase from *Bacillus licheniformis* ATCC 12759 in submerged fermentation. Romanian Biotechnological Letters, 16 (6) :6833- 6840.
- Al-Dhabi, N. A., Esmail, G. A., Ghilan, A. K .M., Arasu, M.V., Duraipandiyan, V., et Ponmurugan, K. 2019.** Isolement et purification de l'amylase hydrolysant l'amylase de *Streptomyces sp.* Al-Dhabi-46 obtenu de la région de Jazan en Arabie saoudite avec des applications industrielles. Journal de l'Université King Saud - Science. 32 (2020) :1226-1232.
- Ali, S., Rafi, H., et ul-Haq, I. 2010.** Production d'une lipase extracellulaire à partir de *Candida lipolytica* et analyse de la signification des paramètres par la conception de Plackett-Burman. Engineering in Life Sciences, 10 (5) :465–473.
- Aliyah, A., Alamsyah, G., Ramadhani, R., and Hermansyah, H. 2017.** Production of α -amylase and β -glucosidase from *Aspergillus niger* by solid state fermentation method on biomass waste substrates from rice husk, bagasse and corn cob. Energy Procedia, 136 :418–423.
- Almanaa, T. N., Vijayaraghavan, p., Alharbi, N. S., Kadaikunnan, S., Khaled, J. m., et Alyahya, S. A. 2020.** Solid state fermentation of amylase production from *Bacillus subtilis* 19 using agro-residues. Journal of King Saud university-Science, 32(2) :1555-1561.
- Ana, P. A. de O., Maria, A. S., Heloiza, F. A.-P., Andre, R., Marcelo, F. da P., Gustavo, F., et Rodrigo, S. R. L. 2015.** Bioprospecting of yeasts for amylase production in solid state fermentation and evaluation of the catalytic properties of enzymatic extracts. African Journal of Biotechnology, 14(14) :1215–1223.
- Andries, J. C., Steyn, I., Pretorius, S.1995.** Characterization of a novel -amylase from *Lipomyces kononenkoae* and expression of its gene (LKA1) in *Saccharomyces cerevisiae*. Curr Genet ,28 :526-533.
- Argirakos, G., Thayanithy, K., and John Wase, D. A. 2007.** Effect of Immobilisation on the Production of α -Amylase by an Industrial Strain of *Bacillus amyloliquefaciens*. Journal of Chemical Technology & Biotechnology, 53(1) :33–38.
- Asghar, M., Asa, M. J., Arshad, M. 2000.** A-amylase from *Aspergillus niger* in waste bread medium. Proc. 2nd International Symposium, New Technology for Environmental Monitoring and Agro-Application.

- Ashwini, K & Shanmugam, S.2019.** Enhanced alpha-amylase production using *Streptomyces gancidicus* ASD by process optimization. Indian Journal of Geo Marine Sciences, 48 (06):845-852.
- Assamoi, A. A., Destain, J., Thonart, Ph. 2009.** Aspects microbiologiques de la production par fermentation solide des endo- β -1,4-xylanases de moisissures : le cas de *Penicillium canescens*. Biotechnol. Agron. Soc. Environ, 13(2) :281-294.
- Atolagbe Oluwabunmi M, Ajayi Adesola A and Olasehinde Grace I.2019.** Production and Characterization of Partially Purified α -amylase from *Aspergillus niger*. Journal of Physics : Conference Series :1-6.
- Aygan, A., Sariturk, S., Kostekci, S., and Tanis, H .2014.** Production and characterization of alkaliphilic alpha amylase from *Bacillus subtilis* A10 isolated from soils of Kahramanmaras, Turkey. African Journal of Microbiology Research, 8(21) :2168-2173.
- Ayşe, K., Mehmet, Ö, Ibrahim, H. K and Sibel, B. O. 2019.** Identification and isolation of the yeasts in traditional yogurts collected from villages in gaziantep, Turkey. Biomed J Sci et Tech Res Bjstr.Ms.Id.002478, 13(5) :10325-10328.
- Babak, E., Ahmadi, Y., Khosroushahi, A. Y., Dilmaghani, A.2019.** Microbial alpha-amylase production : Progress, Challenges and Perspectives.1-19.
- Bacha, A. 2008.** Production et étude de l'activité de l'invertase produite par la levure *saccharomyces cerevisiae* sur substrat à base de datte. Diplôme de Magister : technologie alimentaire. Batna. Université El Hadj Lakhdar. p 98.
- Baldino, A., Macias, M and Cantero, D. 2001.** Immobilization of glucose oxidase with calcium alginate gel capsules. Process Biochem ,36 :601-606.
- Balkan, B et Ertan, F. 2010.** La production d'une nouvelle α -amylase fongique a dégradé l'amidon brut au moyen de la fermentation à l'état solide. Biochimie préparative et biotechnologie, 40 (3) :213-228.
- Bano, S., Ul Qader, S. A., Aman, A., Syed, M. N et Azhar, A.2011.** Purification et caractérisation d'un roman α - amylase de *Bacillus subtilis*. Aaps PharmSciTech, 12(1) :255-261.
- Basaran, P and Hang, Y. D. 2000.** Purification and characterization of acetyl esterase from *Candida guilliermondii*. Letters in Applied Microbiology, 30(2) :167–171.
- Bekatorou, A., Psarianos, C et Athanasios, A. Koutinas. 2006.** Production of food grade yeasts. Food Technol. Biotechnol. 44 (3) :407–415.
- Belda, I., Conchillo, L.B, Ruiz, J., Navascués, E., Marquina, D., et Santos, A. 2016.** Slection et utilisation des levures pectinolytiques pour améliorer la clarification et

l'extraction phénolique en vinification. Journal International de Microbiologie Alimentaire, 223 :1–8.

- Belmessikh, A. 2011.** Optimisation de la production de la protéase neutre par *Aspergillus oryzae* sur milieu à base des déchets des tomates comparaison entre milieu solide et milieu liquide. Mémoire de magister en microbiologie appliquée. Université Mentouri Constantine, p129.
- Benabda, O., M'hir, S., Kasmi, M., Mnif, W., Hamdi, M. 2019.** Optimization of protease and amylase production by *Rhizopus Oryzae* cultivated on bread waste using solid-state fermentation. Journal of Chemistry : 1-10.
- Benabda, O., M'hir, S., Kasmi, M., Mnif, W., et Hamdi, M. 2019.** Optimisation de la production de protéase et d'amylase par *Rhizopus oryzae* cultivé sur les déchets de pain à l'aide de la fermentation à l'état solide. Journal of Chemistry : 1-9.
- Bennamoun, L., Meraihi, Z., Dakhmouche, S. 2004.** Utilisation de la planification expérimentale pour l'optimisation de la production de l' α -amylase par *Aspergillus oryzae* Ahlburg (Cohen) 1042.72 cultivé sur milieu à base de déchets d'oranges. Journal of Food Engineering, 64:257–264.
- Berriha, A et Boukhris, A. 2019.** Effet des extraits de polysaccharides sur l'inhibition de l' α -glucosidase et de l' α -amylase. Master Académique. Science de la Nature et de la Vie. Université Kasdi Merbah, Ouargla. pp55.
- Bertoldo, C and Antranikian, G. 2002.** Starch-hydrolyzing enzymes from *Thermophilic Archaea* and bacteria. Current Opinion in Chemical Biology, 6:151-160.
- Bhanja Dey, T., & Banerjee, R. 2015.** Purification, biochemical characterization and application of α -amylase produced by *Aspergillus oryzae* IFO-30103. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 4(1) :83–90.
- Bhardwaj, N., Kumar, B and Verma, P. 2019.** A detailed overview of xylanases : an emerging biomolecule for current and future prospective. Bioresour. Bioprocess, 6(40) : 1-36.
- Bhella, R. S et Altosaar, I. 1985.** Purification et quelques propriétés de l' α -amylase extracellulaire d'*Aspergillus awamori*. Journal Canadien de Microbiologie, 31 (2) :149– 153.
- Bignell, G. R., Bruce, I. J., & Evans, I. H. 2000.** Amylolytic enzymes of *Lipomyces starkeyi* : purification and size-determination, Biotechnology Letters, 22(21) :1713–1718.

- Botton, B., Breton, A., Fever, M., Gauthier, S., Guy, P., Larpent, J.P., Reymond, P., Sanglier, J.J., Vayssier, Y and Veau, P. 1990.** Moisissures utiles et nuisibles. Importance industrielle. 2^{ème} édition. Masson. Collection Biotechnologies, :34-381.
- Bousmaha, L., Laarousi, EL., Ouhssine, M., EL- Yachioui, M. 2007.** Souche de *candida guilliermondii* isolée de la saumure de carotte productrice d'une β -fructofuranosidase extracellulaire. Bull. Soc. Pharm. Bordeaux, 146 :51-62.
- Box, G. E. P., and Wilson, K. B. 1951.** On the experimental attainment of optimum conditions. Journal of Royal Statistical Society, XIII(1) :1-49.
- Bryjak, J. 2003.** Immobilisation de glucoamylase, α -amylase et β -amylase sur des supports acryliques. Biochemical Engineering Journal, 16 (3) :347-355.
- Burhan, A., Unaldi, N., Coral, G., Colak, O., Aygan, A., Gulnaz, O. 2003.** Enzymatic properties of a novel thermostable, thermophilic, alkaline and chelator resistant amylase from an alkaliphilic *Bacillus sp.* Isolate ANT-6. Process Biochemistry, 38 :1397-1403.
- Busch, J. E., and Stutzenberger, F. J. 1997.** World Journal of Microbiology and Biotechnology, 13(6) :637-642.
- Butinar, L., Spencer-Martins, I et Gunde-Cimerman, N. 2006.** Levures dans les glaciers d'Haut-Arctique. Découverte d'un nouvel habitat pour les micro-organismes eucaryotes. Antonie van Leeuwenhoek, 91 (3) :277-289.
- Cabañes, FJ., Vega, S et Castellá, G. 2011.** *Malassezia cuniculi sp.*, une nouvelle espèce de levure isolée de la peau de lapin. Mycologie Médicale, 49 (1) :40-48.
- Câmara Júnior, A. D'A. 2018.** Conservation et préservation fonctionnelle de levures d'intérêt en agro-alimentaire. Thèse de doctorat en sciences de l'alimentation : biotechnologie, microbiologie, biochimie et génie des procédés. Université de Bourgogne Franche-comté, p202.
- Carmelo, V., Bogaerts, P., and Sá-Correia, I. 1996.** Activity of plasma membrane H⁺-ATPase and expression of PMA1 and PMA2 genes in *Saccharomyces cerevisiae* cells grown at optimal and low pH. Archives of Microbiology, 166(5) :315-320.
- Castro, A. M de., Teixeira, M. M. P., Carvalho, D. F., Freire, D. M. G et Castilho, L. D.R. 2011.** Optimisation multiréponse des conditions de l'inoculum pour la production d'amylases et de protéases par *Aspergillus awamori* in fermentation à l'état solide de babassu cake. Enzyme Research :-9.

- Chakraborty k, Dutta A, Raychaudhuri U, Chakraborty R.2014.** Structure-function relationship and their application in industry of α , β and glucoamylase. *i.j.s.n*, 5 (3) :388-398.
- Chen, L., Chi, Z.M., Chi, Z., et Li, M. 2009.** Production d'amylase par *Saccharomyces fibuligera A11* en fermentation à l'état solide pour l'hydrolyse de l'amidon de manioc. *Biochimie appliquée et biotechnologie*, 162 (1) :252-263.
- Chimata, M. K., Chetty, C. S., and Suresh, C. 2011.** Fermentative production and thermostability characterization of amylase from *Aspergillus* species and its application potential evaluation in desizing of cotton cloth. *Biotechnology Research International*, 2011 :1–8.
- Chinnasamy, M., Duraisamy, G., Dugganaboyana, G. K., Ganesan, R., Manokaran, K and Chandrasekar, U.2011.** Production, purification and characterization of protease by *Aspergillus flavus* under solid state fermentation. *Jordan Journal of Biological Sciences*, 4(3) :137 – 148.
- Clementi, F et Rossi, J. 1986.** Production d' α -amylase et glucoamylase par *Schwanniomyces castellii*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 52 (4) :343–352.
- Cordeiro AL, Lenk T, Werner C. 2011.** Immobilization of *Bacillus licheniformis* alpha-amylase onto reactive polymer films. *J Biotechnol*, 154(4) :216-21.
- Dakhmouche-Djekrif, S .2016.** Production et caractérisation de l'amylopullulanase de la levure *Clavispora lusitaniae ABS7* isolée de blé cultivé et stocké en zones arides. Thèse de doctorat. *Biochimie et Biologie Moléculaire et Cellulaire*. Université des Frères Mentouri, Constantine. Université de Technologie Compiègne, France.pp 211.
- Dali, N. S et Hamame, A. 2016.** Recherche des levures productrices d'enzymes glycolytiques exocellulaires thermostables : Production (sur boîte de Pétri et en batch) et caractérisation des enzymes produites. Mémoire du magistère en Biochimie- Analyse Protéomique et Santé. Université Mentouri, Constantine, p115.
- Damodara Rao, M., Purnima, A., Ramesh, DV et Ayyanna, C. 2002.** *Journal mondial de Microbiologie et de Biotechnologie*, 18(6) :547–550.
- De Mot, R., Demeersman, M., et Verachtert, H. 1984.** Comparative study of starch degradation and amylase production by non-ascomycetous yeast species. *Systematic and Applied Microbiology*, 5(3) :421–432.
- Defosse, T. A., Le Govic, Y., Courdavault, V., Clastre, M., Vandeputte, P., Chabasse, D., Papon, N. 2018.** Les levures du clade CTG (*clade Candida*) : biologie,

incidence en santé humaine et applications en biotechnologie. *Journal de Mycologie Médicale*, 28(2) : 257– 268.

- Demirkan, E., Dincbas, S., Sevinc, N and Ertan, F.2011.** Immobilization of *B. amyloliquefaciens* α -amylase and comparison of some of its enzymatic properties with the free form. *Romanian Biotechnological Letters*, 16(6) :6690-6701.
- Dey, G., Mitra, A., Banerjee, R., et Maiti, B. 2001.** Amélioration de la production d'amylase par l'optimisation des constituants nutritionnels en utilisant la méthodologie de surface de réponse. *Biochemical Engineering Journal*, 7 (3) :227– 231.
- Dey, T. B., Kumar, A., Banerjee, R., Chandna, P., Kuhad, R. C. 2016.** Improvement of microbial α -amylase stability : strategic approaches. *Process Biochem* ,51(10) :1380-90.
- Dias, C., Silva, C., Freitas, C., Reis, A., & da Silva, T. L. 2016.** Effect of Medium pH on *Rhodospiridium toruloides* NCYC 921 Carotenoid and Lipid Production Evaluated by Flow Cytometry. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 179(5) :776–787.
- Divakaran, D., Chandran, A ., Chandran, P. R. 2011.** Comparative study on production of α -amylase from *Bacillus Licheniformis* strains. *Brazilian Journal of Microbiology* 42: 1397- 1404.
- Djekrif D, S., Gillmann, L ., Bennamoun, L., Ait-Kaki, A ., Labbani, K ., Nouadri, T .,Meraihi, Z. 2016.** Amyolytic Yeasts : Producers of α -amylase and Pullulanase. *Int.J. Life. Sci. Scienti. Res*, 2(4) :339-354.
- Djekrif-Dakhmouche, S., Gillmann, L., Saunier, M., Meraihi, Z.2008.** Production d'une α -amylase thermostable par culture mixte des microorganismes :1-9.
- Djekrif-Dkhmouch, S., Gillmann, L ., Bennamoun, L., Ait-Kaki, A ., Labbani, K ., Nouadri, T , Meraihi, Z.2016.** Amyolytic yeasts : Producers of α -amylase and Pullulanase. *Int. J. Life. Sci. Scienti. Res*, 2(4) :339-354.
- Doley, R., Das, K., and Mukherjee, A. K. 2004.** Purification and biochemical characterization of a thermostable, alkaliphilic, extracellular α -amylase from *Bacillus subtilis* DM-03, a strain isolated from the traditional fermented food of India. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 40(3) :291-298.
- Eksteen, J. M., Steyn, A. J. C ., Rensburg, P., van, C., Otero, R .R et Pretorius, I. S .2002.** Clonage et caractérisation d'un second gène de l'a-amylase (LKA2) de *Lipomyces kononenkoae* IGC4052B et son expression dans *Saccharomyces cerevisiae*. *Levure*, 20 (1) :69–78.

- El-Enshasy, H. A., Abdel Fattah, Y. R., & Othman, N. Z. 2013.** Amylases : characteristics, sources, production, and applications. *Bioprocessing technologies in biorefinery for sustainable production of fuels, Chemicals, and Polymers* :111–130.
- El-Fallal, A., Abou Dohara, M., El-Sayed, A ., and Omar, N. 2012.** Starch and microbial α - amylases : From Concepts to Biotechnological Applications. *Carbohydrates – Comprehensive Studies on Glycobiology and Glycotechnology* :459-488.
- Elmarzugi, N. A., El Enshasy, H. A ., AbdulHamid, M., Hasham, R., Aziz A , Elsayed E. A, Othman N Z , Salama M.2014.** α -Amylase economic and application value *World Journal of Pharmaceutical ReseaRch*, 3(3) :4890-4906.
- Elyasifar, B ., Ahmadi, Y ., Khosroushahi, A .Y., Dilmaghani, A .2019.** Microbial alpha-amylase production : Progress, Challenges and Perspectives. Accepted Manuscript (unedited) :1-15.
- Elyasi-Far, B., Ahmadi, Y., Khosroushahi, A. Y., Dilmaghani, A. 2020.** Microbial alpha-amylase production : progress, Challenges and Perspectives. *Adv Pharm Bull*, 10(3) :350- 358.
- Esmail Fathi Mobasher, E .2003.** Production and Immobilization of alpha amylase using biotechnology techniques for use in biological and medical applications. Mansoura University Faculty of Science (Damietta) Chemistry Department.p127.
- Fasiolo, F., Befort, N., Boulanger, Y., et Ebel, J.-P. 1970.** Purification et quelques propriétés de la phénylalanyl-ARNt synthétase de levure de boulangerie. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Synthèse des acides nucléiques et des protéines*, 217 (2) :305–318.
- Ferhat, H et Laklouka, N. 2015.** Contribution a l'étude d'alpha amylase. Master académique. Biochimie appliquée. Université Echahid Hamma Lakhdar D'EL-Oued. p 97.
- Fickers, P., Nicaud, J. M., Gaillardin, C., Destain, J., & Thonart, P. 2004.** Carbon and nitrogen sources modulate lipase production in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Journal of Applied Microbiology*, 96(4) :742–749.
- Fraga, J., Penha, A., da S.Pereira, A., Silva, K., Akil, E., Torres, A., et Amaral, P. 2018.** Utilisation de *Yarrowia lipolytica* Lipase immobilisée dans des débris cellulaires pour la production de graisse de lait lipolysée (LMF). *Journal international des sciences moléculaires*, 19 (11) :3413.

- Francis, F., Sabu, A., Nampoothiri, KM, Ramachandran, S., Ghosh, S., Szakacs, G., et Pandey, A. 2003.** Utilisation de la méthodologie des surfaces de réponse pour optimiser les paramètres du processus de production d' α -amylase par *Aspergillus oryzae*. *Biochemical Engineering Journal*, 15 (2) :107-115.
- Freer, S. N. 1993.** Purification and characterization of the extracellular α -amylase from *Streptococcus bovis* JBI. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(5) :1398-1402.
- Galdino, A. S., Ulhoa, C. J., Moraes, L. M. P., Prates, M. V., Jr, C. B., and Torres, F. A. G. 2008.** Cloning, molecular characterization and heterologous expression of AMY1 α -amylase gene from *Cryptococcus favus*. *FEMS Microbiol Lett* ,280 :189–194.
- Gangadharan D, Sivaramakrishnan S, Nampoothiri K M, Sukumaran R K, Pandey A. 2008.** Response surface methodology for the optimization of alpha amylase production by *Bacillus amyloliquefaciens*. *Bioresour Technol* ,99(11) :4597-602.
- Gao, B., Youzhi, M., Lujia, Z., Lei, H and Wei, D. 2016.** A novel saccharifying α -amylase of Antarctic psychrotolerant fungi *Geomyces pannorum* : Gene cloning, functional expression, and characterization. *Starch/Stärke*, 68 :20–28.
- Gazali F, Suwastika I, editors. 2018.** *Thermostable Journal of Physics : Conference Series*. IOP Publishing.
- Gerngross, T. U. 2004.** Progrès dans la production de protéines thérapeutiques humaines dans les levures et les champignons filamenteux. *Nature Biotechnology*, 22(11) :1409–1414.
- Gmoser, r., Sintca, c., Taherzadeh, m. J., and lennartsson, p. r. (2019).** Combining submerged and solid state fermentation to convert waste bread into protein and pigment using the edible filamentous fungus *N. intermedia*. *Waste management*, 97 :63-70.
- Gogoi, B. K., Bezbaruah, R. L., Pillai, K. R., and Baruah, J. N. 1987.** Production, purification and characterization of an α -amylase produced by *Saccharomycopsis fibuligera*. *Journal of Applied Bacteriology*, 63(5) :373–379.
- Gomes, J., Gomes, I. et Steiner, W. 2000.** Xylanase thermolabile de la levure antarctique *Cryptococcus adeliae* : production et propriétés. *Extrémophiles*, 4 (4) :22-235.
- Gong, F., Sheng, J., Chi, Z., et Li, J. 2006.** Production d'inulinase par une levure marine *Pichia guilliermondii* et hydrolyse de l'inuline par l'inulinase brute. *Journal of Industrial Microbiology et Biotechnology*, 34 (3) :179–185.

- González, C. F., Fariña, J. I and de Figueroa, L. I. C. 2008.** Optimized amylolytic enzymes production in *Saccharomycopsis fibuligera* DSM-70554. *Enzyme and Microbial Technology*, 42(3) :272–277.
- Gopinath SCB, Anbu P, Arshad MKM, Lakshmipriya T, Chun Hong Voon CH, Uda Hashim U et al. 2017.** Biotechnological Processes in Microbial Amylase Production. *BioMed Research International* ,1-9. 14.
- Gopinath, S. C. B., Anbu, P., Arshad, M. K. M. d., Lakshmipriya, T. h., Voon, C. H., Hashim, U and Chinni, S. V. 2017.** Biotechnological Processes in Microbial Amylase Production. *BioMed Research International*, 1-9.
- Greppi, A., Krych, Ł., Costantini, A., Rantsiou, K., Hounhouigan, D. J., Arneborg, N., Jespersen, L. 2015.** Phytase-producing capacity of yeasts isolated from traditional African fermented food products and PHYPk gene expression of *Pichia kudriavzevii* strains. *International Journal of Food Microbiology*, 205 :81–89.
- Gupta A, Gautam N, Modi DR. 2010.** Optimization of α -amylase production from free and immobilized cells of *aspergillus niger*. *J Biotech Pharma*, 1(1) :1-8.
- Gupta, R., Gigras, P., Mohapatra, H., Goswami, V. K., & Chauhan, B. 2003.** Microbial α -amylases : a biotechnological perspective. *Process Biochemistry*, 38(11) :1599–1616.
- Gusakov, A. V., Kondratyeva, E. G., Sinitsyn, A. P. 2011.** Comparison of two methods for assaying reducing sugars in the determination of carbohydrase activities. *Int j anal chem*.
- Habibi AE, Khajeh K, Nemat-Gorgani M. 2004.** Chemical modification of lysine residues in *Bacillus licheniformis* alpha-amylase : conversion of an endo- to an exo-type enzyme. *J Biochem Mol Biol*, 37(6) : 642-7.
- Haq, I. U, Ashraf, H., Omar, S., Qadeer, M. A. 2002.** Biosynthesis of amyloglucosidase by *Aspergillus niger* using wheat bran as substrate. *Pakistan Journal of Biological Science*.5(9) :962-964.
- Hasan, K., Tirta Ismaya, W., Kardi, I., Andiyana, Y., Kusumawidjaya, S., Ishmayana, S., Soemitro, S. 2008.** Proteolysis of α -amylase from *Saccharomycopsis fibuligera* : characterization of digestion products. *Biologia*, 63(6) : 1044—1050.
- He L, Mao Y, Zhang L, Wang H, Alias SA, Gao B, et al. 2017.** Functional expression of a novel alpha-amylase from Antarctic psychrotolerant fungus for baking industry and its magnetic immobilization. *BMC Biotechnol*, 17(1) :1-22.
- Hencke, S. 2000.** Utilisation alimentaire des levures. Mémoire de Docteur en Pharmacie. Université Henri Poincare, Nancy i : p188.

- Henni, N. 2011.** Utilisation des bactéries lactique pour la fabrication d'un yaourt probiotique à partir de lait de Brebis. Mémoire de magister en microbiologie alimentaire et industrielle. Université d'Oran, p171.
- Hernández-Montañez, Z., Juárez-Montiel, M., Velázquez-Ávila, M., Cristiani-Urbina, E., Hernández-Rodríguez, C., Villa-Tanaca, L., et Chávez-Camarillo, G. 2012.** Production et caractérisation de l' α -amylase extracellulaire produite par *Wickerhamia sp. X-Fep*. Biochimie appliquée et biotechnologie, 167 (7) :2117–2129.
- Hernández-Montañez, Z., Juárez-Montiel, M., Velázquez-Ávila, M., Cristiani-Urbina, E., Hernández-Rodríguez, C., Villa-Tanaca, L., et Chávez-Camarillo, G. 2012.** Production and Characterization of Extracellular α -Amylase Produced by *Wickerhamia sp. X-Fep*. Applied Biochemistry and Biotechnology, 167 : 2117–2129.
- Hernández-Montañez, Z., Juárez-Montiel, M., Velázquez-Ávila, M., Cristiani-Urbina, E., Hernández-Rodríguez, C., Villa-Tanaca, L., & Chávez-Camarillo, G. 2012.** Production and Characterization of Extracellular α -Amylase Produced by *Wickerhamia sp. X-Fep*. Applied Biochemistry and Biotechnology, 167(7) :2117–2129.
- Hinzelin, F. et Lectard, P. 1976.** Les levures des eaux saumâtres de lorraine. Hydrobiologia, 49 (1) :27–32.
- Hostinová, E., Janeček, Š., and Gašperík, J. 2010.** Gene sequence, Bioinformatics and enzymatic characterization of α -Amylase from *Saccharomycopsis fibuligera* KZ. The Protein Journal, 29(5) :355–364.
- Hu, X. Q., Liu, Q., Hu, J.P., Zhou, J.J., Zhang, X., Peng, S.Y., Wang, X.D. 2018.** Identification et caractérisation des levures probiotiques isolées du tube digestif des canards. Poultry Science, 97 (8) :2902–2908.
- Hussain, I., Siddique, F., Mahmood, M. S., and Ahmed, S. I. 2013.** A Review of the Microbiological Aspect of α -amylase Production. I J A B, 15: 1029–1034.
- Iefuji, H., Chino, M., Kato, M. and Iimura, Y. 1996.** Raw – starch- digesting and thermostable alpha-amylase from the yeast *Cryptococcus sp. S-2* : Purification, characterization cloning and sequencing. Biochem. J, 318: 989-996.
- Ikram-ul-Haq, Ashraf, H., Iqbal, J., & Qadeer, M. 2003.** Production of alpha amylase by *Bacillus licheniformis* using an economical medium. Bioresource Technology, 87(1) : 57–61.

- Indriati, G., Megahati, R. R. P. 2018.** Isolation of Thermophilic Bacteria and Optimizing the Medium Growth Conditions. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 7:1457-64. 27.
- Ivanova, V.N., Dobрева, E.P., et Emanuilova, E.I. 1993.** Purification et caractérisation d'une alpha-amylase thermostable de *Bacillus licheniformis*. *Journal of Biotechnology*, 28 (2-3) :277-289.
- Jain, S. C., Jain, P. C and Kango, N.2012.** Production of inulinase from *Kluyveromyces marxianus* using Dahlia tuber extract. *Brazilian Journal of Microbiology*, 43(1) :62–69.
- Jamuna, R. et Ramakrishna, S.V. 1992.** Synthèse continue d' α -amylase thermostable par des cellules de *Bacillus* immobilisées dans de l'alginate de calcium. *Enzyme and Microbial Technology*, 14 (1):36–41.
- Jansen, M. L. A., Krook, D. J. J., De Graaf, K., van Dijken, J. P., Pronk, J. T., & de Winde, J. H. 2006.** Physiological characterization and fed-batch production of an extracellular maltase of *Schizosaccharomyces pombe* CBS 356. *FEMS Yeast Research*, 6(6), 888–901.
- Johnson, E. A et Echavarri-Erasun, C. 2011.** Biotechnologie des levures. Les levures, 21–44.
- Kadziola, A., Søgaard, M., Svensson, B., and Haser, R. 1998.** Molecular structure of a barley α -amylase-inhibitor complex : implications for starch binding and catalysis. *Journal of Molecular Biology*, 278(1) :205–217.
- Kahraman, M., Bayramoglu, G., Kayamanapohan, N., and Gungor, A. 2007.** Immobilisation de l' α -amylase sur des billes de verre fonctionnalisées par fixation covalente. *Chimie alimentaire*, 104 (4) :1385–1392.
- Kalaiarasi, K., and parvatham, r. 2015.** Optimization of process parameters for α -amylase production under solid-state fermentation by *Aspergillus awamori* mTcc 9997.
- Kamlesh, R., Lone, M. A., Sahay, S. 2016.** Detergent compatible alkaline active a froid amylases de *clavispora lusitaniae* cb13. *j microbiol biotech food*, 5(4) : 306-310.
- Kammoun, R., Naili, B. et Bejar, S. 2008.** Application d'une conception statistique à l'optimisation des paramètres et du milieu de culture pour la production d' α -amylase par *Aspergillus oryzae* CBS 819.72 cultivé sur bouillie (sous-produit de broyage du blé). *Bioresource Technology*, 99 (13) :5602–5609.

- Karim, K. M. R., Husaini, A., Sing, N. N., Sinang, F. M., Roslan, H. A., and Hussain, H. 2018.** Purification of an alpha amylase from *Aspergillus flavus* NSH9 and molecular characterization of its nucleotide gene sequence. 3 Biotech, 8(4) :1-14.
- Kenya, J., Wanderley, F. A. G., Torres, L. M. P., Moraes, C. J. U .2004.** Biochemical characterization of K-amylase from the yeast *Cryptococcus favus*. FEMS Microbiology Letters ,231 :165-169.
- Khajeh K, Nemat-Gorgani M. 2001.** Comparative studies on a mesophilic and à thermophilic alpha-amylase. Appl Biochem Biotechnol, 90(1) : 47-55.
- Kherraz, Z et Lorbi, S. 2015.** Contribution à l'étude de l'influence des paramètres physico-chimiques sur l'activité amylolytiques des levures. Diplôme de master académique. Biochimie appliquée. Université Echahid Hamma Lakhdar D'EL-Oued. p89
- Kieliszek, M., Kot, AM, Bzducha-Wróbel, A., BŁażej, S., Gientka, I., et Kurcz, A. 2017.** Utilisation biotechnologique des levures *Candida* dans l'industrie alimentaire. Revues de biologie fongique, 31(4) :185–198.
- Kizhakedathil, M. P. J., Chandrasekaran, S. D .2018.** Media optimization for extracellular amylase production by *pseudomonas balearica vitps19* using response surface methodology. Fron in Bio ,13(2) :123-9.
- Kolli, N., et Zatout, R.2015.** Production de l'alpha amylase par certaines souches fongiques sur différents substrats. Diplôme de master. Sciences de la nature et de vie. Université des frères Mentouri Canstantine.p64.
- Konsoula, Z., Liakopoulou-Kyriakides, M. 2007.** Co-production of α -amylase and β -galactosidase by *Bacillus subtilis* in complex organic substrates. Bio Tech, 98(1) : 150-7.
- Kopecka, J., Dagmar, M. 2012.** Levures et leur utilisation. S N Y P R U M, 58 (11–12) : 326-335.
- Krishna PN. 2011.** Enzyme technology : Pacemaker of biotechnology : PHI Learning Pvt. Ltd.
- Krishna, C. 2005.** Solid-state fermentation system-an overview. Critical reviews in biotechnology, vol. 25, n°1-2, p. 1-30.
- Melnichuk, N., braia, m. J., Anselmi, p. A., meini, m. r., and romanini, d. 2020.** Valorization of two agro industrial wastes to produce alpha-amylase enzyme from *Aspergillus oryzae* by solid-state fermentation. Waste management, 106:155-161.

- Merabti, R. 2006.** Isolement et caractérisation de souches levuriennes amylolytiques à partir de sol saharien algérien. Mémoire de magister en biochimie et microbiologie appliquées, p85.
- Ilosavic N, Prodanovic R, Jovanovic S, Vujic Z. 2007.** Immobilization of glucoamylase via its carbohydrate moiety on macroporous poly (GMA-CO-EGDMA). *Enzyme and Microbial Technology*, 40 :1422-1426.
- Mobini-Dehkordi, M and Afzal-Javan, F.2012.** Application of alpha-amylase in biotechnology. *Journal of Biology and today's world*, 1(1) : 39-50.
- Mohamed, S .A ., Azhar, E. I ., Ba-Akdah, M. M ., Tashkandy, N. R and Kumosani, T. A .2011.** Production, purification and characterization of α -amylase from *Trichoderma harzianum* grown on mandarin peel. *African Journal of Microbiology Research* ,5(7) :930-940.
- Mojumdar, A et Deka, J. 2019.** Recycler les déchets agro-industriels pour produire de l'amylase et caractériser la composite amylase–nanoparticules d'or. *Journal international de recyclage des déchets organiques en agriculture*, 8 (1) :263–269.
- Moranelli, F., Yaguchi, M., Calleja, G. B., & Nasim, A.1987.** Purification and characterization of the extracellular α -amylase activity of the yeast *Schwanniomyces alluvius*. *Biochemistry and Cell Biology*, 65(10), 899–908.
- Moreno, M. Q .2009.** Purification et caractérisation d'un α -amylase produit par *Bacille sp.*Bbm1. *Dyna*, 77 (162) : 31-38.
- Mot, R et Verachtert, H. 1987.** Purification et caractérisation de l'alpha-amylase extracellulaire et de la glucoamylase de la levure *Candida antarctica* CBS 6678. *European Journal of Biochemistry*, 164 (3) :643–654.
- Mouas, K.2016.** Extraction, Purification et Caractérisation d'un enzyme amylolytique de *Bacillus amyloliquefaciens*. Master en Genie des Procedes. Université M'hamed Bougara Boumerdes. p93.
- Moubasher, H., Wahsh, S. S and El-Kassem, N. A. 2013.** Isolation of *Aureobasidium pullulans* and the effect of different conditions for pullulanase and pullulan production. *Microbiology*, 82(2) :155–161.
- Mohapatra, P. K. 2017.** Acidophilic α -Amylase Production from *Aspergillus niger* RBP7 Using Potato Peel as Substrate : A Waste to Value Added Approach. *Waste and Biomass Valorization*, 1-13.
- Muralikrishna, G., and Nirmala, M. 2005.** Cereal α -amylases—an overview. *Carbohydrate Polymers*, 60(2) :163–173.

- Nahabieh, F., Schmidt, J. L. 1990.** Contribution à l'étude de la flore levure de quelques grands types de fromages de chèvre. *Lait* (1990) 70, 325-343.
- Naili B, Sahnoun M, Bejar S, Kammoun R. 2016.** Optimization of submerged *Aspergillus oryzae* S2 alpha-amylase production. *Food Sci Biotechnol*, 25(1):185-92.
- Naili, B., Sahnoun, M., Bejar, S., et Kammoun, R. 2016.** Optimisation de la production submergée d'*Aspergillus oryzae* S2 α -amylase. *Science et biotechnologie alimentaires*, 25 (1) :185–192.
- Narendranath, N. V., and Power, R. 2005.** Relationship between pH and Medium Dissolved Solids in Terms of Growth and Metabolism of *Lactobacilli* and *Saccharomyces cerevisiae* during Ethanol Production. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(5) : 2239– 2243.
- Naumov, G. I., Shalamitskiy, M. Y., and Naumova, E. S. 2016.** New family of pectinase genes PGU1b–PGU3b of the pectinolytic yeast *Saccharomyces bayanus* var. uvarum. *Doklady Biochemistry and Biophysics*, 467(1) : 89–91.
- Negi, S., and Banerjee, R. 2009.** Characterization of amylase and protease produced by *Aspergillus awamori* in a single bioreactor. *Food Research International*, 42(4) : 443– 448.
- Nickzad, A .2016.** La régulation et l'optimisation de la production des rhamnolipides chez *Burkholderia glumae*. Thèse de doctorant en biologie, Université du Québec, p139.
- Nithya, K., Muthukumar, C., Kadaikunnan, S., Alharbi, N. S., Khaled, J. M., Dhanasekaran, D.** Purification, characterization, and statistical optimization of a thermostable α -amylase from desert *actinobacterium streptomyces fragilis* ,7(5) :350.
- Nouadri, T., Meraihi, Z., Djekrif-Dakhmouche, S and Bennamoun, L.2010.** Purification and characterization of the α -amylase isolated from *Penicillium camemberti* PL21. *African Journal of Biochemistry Research*, 4(6) : 155-162.
- Noudri, T. 2011.** L' α -amylase de *Penicillium camemberti* PL21 : Production, Purification, Caractérisation et Immobilisation. Diplôme de Doctorat d'Etat. Biochimie et Biotechnologies. Université Mentouri Constantine.p160.
- Octave Stéphane et Thomas Daniel.2009.** Biorefinery : Toward an industrial metabolism. *Biochimie*, 91 (6):659-664.

- Odibo, F. J. C., and Ulbrich-Hofmann, R. 2001.** Thermostable α -Amylase and Glucoamylase from *Thermomyces lanuginosus* Fl. Acta Biotechnologica, 21(2) : 141–153.
- Olemska-Beer Z.2004.** Alpha-Amylase from *Bacillus Licheniformis* containing a genetically engineered Alpha-Amylase gene from *Bacillus Licheniformis* (Thermostable). Chemical and Technical Assessment (CTA) ,61 :1-6.
- Oluwabunmi, M. A., Ajayi Adesola, A. A. and Olasehinde Grace, I. O.2019.** Production and caractéresation of partailly α -amylase from *Aspergillus niger*. International Conference on Engineering for Sustainable World, 1378 :1-6.
- Oluwadamilare, L. A., Oluwatofunmi, O. E., Dzorbenya, A. G., Adekunle, O. F. 2019.** Areview of literature on isolation of bacteria α -amylase. International Research Journal of Engineering and Technology ,6(01) : 1333- 1342
- Oshoma, c. E., Eguakun-owie, S. o., & obuekwe, I. S. 2019.** Utilization of banana peel as a Substrate for Single cell protein and Amylase production by *Aspergillus niger*. African Scientist, 18(3), /143-150.
- Ouédraogo, N., Savadogo, A., Zongo, C., Somda, K. M. A., Traoré, S. 2012.** High performance amylyolytic yeast strains isolation and identification for valorization of potatoes waste available in Burkina Faso. Int. Food Res. J, 19(4) : 1463-1469.
- Oyeleke, S. B., Auta, S. H and Egwim, E. C.2010.** Production and characterization of amylase produced by *Bacillus megaterium* isolated from a local yam peel dumpsite in Minna, Niger State. Journal of Microbiology and Antimicrobials ,2(7) : 88-92.
- Pal, S. P., Navjot, K .2015.** Characterization of enzyme naringinase and the production of debittered low alcoholic kinnow (*Citrus raticulata blanco*) beverage. International Journal of Advanced Research, 3 (6) : 1220-1233.
- Paquet,V., Croux, C., Goma, G., and Soucaille, P. H .1991.** Purification and Characterization of the Extracellular o-Amylase from *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. Applied and environmental microbiology, 57 (1) :212-218.
- Pascoal, A. M., Mitidieri, S., et Fernandes, K.F. 2011.** Immobilisation de l' α -amylase d'*Aspergillus niger* sur la polyaniline. Transformation des aliments et des bioproduits, 89 (4) :300–306.
- Pasin, T. m., dos Anjos moreira, E., de lucas, r. c., benassi, V. m., Ziotti, l. S.,cereaia, m., & de Moraes, m. d. l. T. 2020.** Novel amylase-producing fungus hydrolyzing wheat and brewing residues, *Aspergillus carbonarius*, discovered in tropical forest remnant. Folia microbiologica, 65(1), /173-184.

- Patel A K, Nampoothiri K M , Ramachandran S , Szakacs G and Pandey A.2005.** Partial purification and characterization of α -amylase produced by *Aspergillus oryzae* using spent-brewing grains. Indian Journal of Biotechnology ,4 : 336-341
- Peña, A., Sánchez, N. S., Álvarez, H., Calahorra, M., and Ramírez, J. 2015.** Effects of high medium pH on growth, metabolism and transport in *Saccharomyces cerevisiae*. FEMS Yeast Research, 15(2) :1-13
- Pereira, A. D. S., Fontan, R. I. D. C., Franco, M ., Júnior, E. C. D. S ., Veloso, C. M ., Sampaio, V. S ., Bonomo1,P and Bonomo, R. C. F .2018.** Study of alpha-amylaseobtained by solid state fermentation of cassava residue in aqueous two-phase systems. brazilian journal of chemical engineering, 35(03) : 1141-1152.
- Péter, G. et Rosa, C. 2006.** Biodiversité et écophysiologie des levures. The Yeast Handbook.
- Phale, S.2018.** Levure : Caractéristiques et importance économique, Phale, J Bioprocess Biotech, 8(5) :1-3.
- Plackett, K. L., and Burman, J. P. 1946.** The design of optimum multifactoriel experiments. Biometrika, 33 : 305–325.
- Ponnusamy, S ., Haldar, S ., Mulani, F., Zinjarde, S ., Thulasiram, H., RaviKumar, A. 2015.** Gedunin and Azadiradione : Human Pancreatic Alpha-Amylase Inhibiting Limonoids from Neem (*Azadirachta indica*) as Anti-Diabetic Agents. PLoS ONE 1,1-19.
- Porfiri, M.C., Farruggia, B.M et Romanini, D. 2012.** Bioséparation de l'alpha-amylase en formant des complexes insolubles avec du polyacrylate à partir d'une culture d'*Aspergillus oryzae* cultivée dans des déchets agricoles.Technologie de séparation et de purification, 92:11-16.
- Prajapati VS, Trivedi UB, Patel KC.2015.** A statistical approach for the production of thermostable and alklophilic alpha-amylase from *Bacillus amyloliquefaciens KCP2* under solid-state fermentation. 3 Biotech, 5(2):211-20.
- Prajapati, VS, Trivedi, UB et Patel, KC .2014.** Une approche statistique pour la production d'alpha-amylase thermostable et alcalophile à partir de *Bacillus amyloliquefaciens KCP2* sous fermentation à l'état solide. 3 Biotech, 5(2) :211-220.
- Prasanna, A. V. 2005.** Amylases and their applications. African Journal of Biotechnology, 4 (13) :1525-1529.
- Prieto, J. A., Bort, B. R., Martínez, J., Randez-Gil, F., Sanz, P., et Buesa, C.1995.**Purification and characterization of a new α -amylase of intermediate

thermal stability from the yeast *Lipomyces kononenkoae*. *Biochemistry and Cell Biology*, 73:41–49.

- Prieto, J. A., Bort, B. R., Martínez, J., Randez-Gil, F., Sanz, P., and Buesa, C. 1995.** Purification and characterization of a new α -amylase of intermediate thermal stability from the yeast *Lipomyces kononenkoae*. *Biochemistry and Cell Biology*, 73(1- 2) :41–49.
- Raha, M., Kawagishi, I., Müller, V., Kihara, M., and Macnab, R. M. 1992.** *Escherichia coli* produces a cytoplasmic alpha-amylase, AmyA. *Journal of Bacteriology*, 174(20), 6644– 6652.
- Rai, S et Solanki, M. K. 2014.** Optimization of Thermostable Alpha-Amylase Production Via Mix Agricultural-Residues and *Bacillus amyloliquefaciens*. *Not Sci Biol*, 6(1) :105-111.
- Raimbault, Maurice. 1998.** General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. *Electronic Journal of Biotechnology*, vol. 1, n°3, p. 174-188.
- Rajagopalan, G., Krishnan C. 2008.** Alpha-amylase production from catabolite derepressed *Bacillus subtilis* KCC103 utilizing sugarcane bagasse hydrolysate. *Bioresour Technol.* ,99:3044–3050.
- Rajeeva, G., Ranjan, S., Monika, G et Manogya, K. G. 2010.** *Aureobasidium pullulans*, an economically important polymorphic yeast with special reference to pullulan. *African Journal of Biotechnology*, 9(47) : 7989–7997.
- Ramachandran, S., Patel, A. K., Nampoothiri, K. M., Chandran, S., Szakacs, G., Soccol, C. R And Pandey, A. 2004.** Alpha amylase from a fungal culture grown on oil cakes and its properties. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 47 (2).
- Ramesh, M. V., and Lonsane, B. K. 1990.** Critical importance of moisture content of the medium in alpha-amylase production by *Bacillus licheniformis* M27 in a solid-state fermentation system. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 33(5) : 501-505.
- Rana, N ., Walia, A., Gaur, A. 2013.** α -Amylases from Microbial Sources and Its Potential Applications in Various Industries. *Natl. Acad. Sci. Lett* ; 36(1):9–17.
- Randrianantoandro, M. H. 2014.** Isolement et identification des levures du fruit du figuier de barbarie " opuntia ficus-indica " de la region de vakinankaratra. Mémoire du magister en sciences de la vie. Université d'Antananarivo, p108.

- Ranjan, K., Lone, M. A., Sahay, S. 2016.** Detergent Compatible Cold-Active alkaline amylases from *Clavispora Lusitaniae* CB13. J Microbiol Biotech Food Sci , 5 (4) : 306- 310.
- Rao, D. M., Swamy, A. V. N., Siva Ramakrishan, G . 2007.** Bioprocess technology strategies, production and purification of amylases. An overview. The Internet Journal of Genomics and Proteomics. 2:342-351.
- Raplong, H. H., Odeleye, P. O., Hammuel, Ch., Idoko, M. O., Asanato, J. I., and Odeke E. H. 2014.** Production of Alpha Amylase by *Bacillus cereus* in Submerged Fermentation. Aceh Int. J. Sci. Technol., 3(3): 124-130.
- Raul, D., Biswas, T., Mukhopadhyay, S., Kumar Das, S., & Gupta, S. 2014.** Production and Partial Purification of Alpha Amylase from *Bacillus subtilis* (MTCC 121) Using Solid State Fermentation. Biochemistry Research International, 2014 : 1–5.
- Raviyan, P., Tang, J., ant Rasco, B. A. 2003.** Thermal Stability of α -Amylase from *Aspergillus oryzae* Entrapped in Polyacrylamide Gel. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51(18) : 5462–5466.
- Reddy, L. V. A., Reddy, O. V. S., Basappa, S.C. 2005.** Potentiality of amylolytic yeast for direct fermentation of starchy substrates to ethanol. Indian Journal of Microbiology, 5:1- 15.
- Rezki-Bekki, M. 2014.** Production de métabolite par les levures : caractérisation et identification des arômes et des alcools. Thèse doctorat biotechnologie. Université d’Oran. PP 161.
- Richardson, T. H., Tan, X., Frey, G., Callen, W., Cabell, M., Lam, D. 2002.** A novel, high performance enzyme for starch liquefaction discovery and optimization of a low pH, thermostable α -amylase. J Bio Chem, 277(29) :26501-7
- Rifkin, J. 2012.** La troisième révolution industrielle : comment le pouvoir latéral va transformer l’énergie, l’économie et le monde. Paris (France) : Les Liens qui Libèrent, p380.
- Rodríguez-Gómez, F., Arroyo-López, F. N., López-López, A., Bautista-Gallego, J., et Garrido-Fernández, A. 2010.** Activité lipolytique des espèces de levure associée à la phase de fermentation stockage de la transformation des olives mûres. Microbiologie alimentaire, 27 (5) :604–612.
- Rosa, C.A., Resende, M.A., Barbosa, F.A.R., Morais, P.B et Franzot, S.P. 1995.** Diversité des levures dans un lac mésotrophique sur le plateau karstique de Lagoa Santa, MG-Brésil. Hydrobiologia, 308 (2) :103–108.

- Ruohonen, L., Penttilä, M. et Keränen, S. 1991.** Optimisation de la production de *Bacillus* α -amylase par *Saccharomyces cerevisiae*. *Levure*, 7 (4) : 337–346.
- Saci, A. 2012.** Production d'alpha-amylase par *Streptomyces sp.* Optimisation d'un milieu de production à base de déchets d'orange. Thèse magister en Ecologie, université Mentouri, Constantine, p 92.
- Sahutoglu, A. S et Akgul, C. 2015.** Immobilisation des enzymes *Aspergillus oryzae* α -amylase et *Aspergillus niger* glucoamylase sous forme d'agrégats d'enzymes réticulés. *Papiers chimiques*, 69(3) : 433–439.
- Samborska K, Guiavarc'h Y, Van Loey A, Hendrickx M. 2006.** The thermal stability of *Aspergillus oryzae* alpha-amylase in presence of sugars and polyols. *J Food Process Eng*, 29(3):287-303.
- Schmidt, J et Daudin, J. 1983.** Étude de l'homogénéité d'une population de levures isolées partir de fromages de camembert. *Annales de l'Institut Pasteur / Microbiologie*, 134(3) : 399–409.
- Serkan, E., Mesut, T. 2010.** Production of α -amylase by *Penicillium expansum MT-1* in solid-state fermentation using waste Loquat (*Eriobotrya japonica* Lindley) kernels as substrate. *Romanian Biotechnological Letters*, 15(3): 5342- 5350
- Sethi, B. K., Jana, A., Nanda, P. K, DasMohapatra, P. K, Sahoo, S. L et Patra, J. K .2016.** Production d' α -amylase par *Aspergillus terreus NCFT 4269.10* à l'aide de Pearl Millet et sa caractérisation structurale. *Frontiers in Plant Science*, 7. 13
- Sethi, B. K., Jana, A., Nanda, P. K., DasMohapatra, P. K., Sahoo, S. L., & Patra, J. K. 2016.** Production of α -Amylase by *Aspergillus terreus NCFT 4269.10* Using Pearl Millet and Its Structural Characterization. *Frontiers in Plant Science*, 7 :1-7.
- Sharma, A., and Satyanarayana, T. 2013.** Microbial acid-stable α -amylases : Characteristics, genetic engineering and applications. xxx : 1-11.
- Sherrington, S. L., Sorsby, E., Mahtey, N., Kumwenda, P., Lenardon, M. D., Brown, I., Hall, R. A. 2017.** Adaptation of *Candida albicans* to environmental pH induces cell wall remodelling and enhances innate immune recognition. *PLOS Pathogens*, 13(5) :1-28.
- Shigechi, H., Fujita, Y., Koh, J., Ueda, M., Fukuda, H., et Kondo, A. 2004.** Production directe d'éthanol à économie d'énergie à partir d'amidon de maïs cuit à basse température à l'aide d'une souche de levure modifiée à la surface cellulaire co-affichant la glucoamylase et l' α -amylase. *Biochemical Engineering Journal*, 18 (2) :149–153.

- Shin, K. S., Shin, Y. K., Yoon, J. H and Park, Y. H. 2001.** *Candida thermophila sp. nov.* a novel thermophilic yeast isolated from soil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol*, 51: 2167-2170.
- Siddiqui KS, Poljak A, De Francisci D, Guerriero G, Pilak O, Burg D, et al. 2010.** A chemically modified alpha-amylase with a molten-globule state has entropically driven enhanced thermal stability. *Protein Eng Des Sel*, 23(10):769-780.
- Sidkey, N. M., Abo-Shadi, M. A., Balahmar, R., Sabry, R., Badrany, G. 2011.** Purification and characterization of α -amylase from a newly isolated *Aspergillus flavus F2Mbb*. *International Research Journal of Microbiology*, 2(3) :096-103.
- Simões-Mendes, B. 1984.** Purification et caractérisation des amylases extracellulaires de la levure *Schwanniomyces alluvius*. *Journal canadien de microbiologie*, 30 (9) :1163– 1170.
- Sindhu, R., Suprabha, G.N., Shashidhar, S.2011.** Purification and characterization of α -amylase from *Penicillium janthinellum (NCIM 4960)* and its application in detergent industry. *Research Article, Biotechnol. Bioinf. Bioeng*, 1(1) :25-32
- Singh, R., Mittal, A., Kumar, M., and Mehta, P. K. 2016.** Amylases : A Note on Current Applications. *International Research Journal of Biological Sciences*, 5(11) : 27-32.
- Singh, S., Singh,S., Bali,V., Sharma,L., and Mangla,j.2014.** Production of Fungal Amylases Using Cheap, Readily Available Agriresidues, for Potential Application in Textile Industry. *Hindawi Publishing Corporation BioMed Research International* ,2014(9) :1- 10.
- Sivaramakrishnan, S., Gangadharan, D., Nampoothiri, K. M., Soccol, C. R and Pandey, A.2006.** α -Amylases from Microbial Sources.An Overview on Recent Developments. *Food Technol. Biotechnol*, 44 (2) :173–184.
- Sodhi, H. K., Sharma, K., Gupta, J. K., and Soni, S. K. 2005.** Production of a thermostable α -amylase from *Bacillus sp. PS-7* by solid state fermentation and its synergistic use in the hydrolysis of malt starch for alcohol production. *Process Biochemistry*, 40(2) :525–534.
- Souza,P. M. de and Magalhães, P. de O. e. 2010.** Application of microbial α -amylase in industry – A review. *Brazilian Journal of Microbiology*, 41(4), 850–861.
- Srinivasa-Rao, M., Reddy, N.S., Venkateswara-Rao, G and Sambasiva-Rao, K .R .S .2005.** Studies on the extraction and characterization of thermostable α -amylase from pericarp of *Borassus indica*. *African Journal of Biotechnology*, 4 (3) : 289-291.

- Steyn, A. J. C. et Pretorius, I. S. 1995.** Curr. Genet. 28 : 526–533.
- Suganthi, R., Benazir, J.F., Santhi,R., Ramesh Kumar, V., Anjana Hari, Nitya Meenakshi, Nidhiya, K. A., Kavitha, G., Lakshmi, R.2011.** Amylase production by *Aspergillus niger* under solid state fermentation using agroindustrial wastes. International Journal of Engineering Science and Technology, 3(2) : 1756- 1763.
- Sundarram A, Murthy T P K. 2014.** A-amylase production and applications. A review. J Appl and Enviro Micro, 2(4) : 166-75.
- Sundarram, A., Thirupathihalli Pandurangappa, K. M. 2014.** α -Amylase Production and Applications : A Review. Journal of Applied & Environmental Microbiology, 2(4) :166- 175.
- Taghreed, N. A., Vijayaraghavan, P., Naiyf, S. A., Shine, K., Jamal, M. K.h ., Sami, A. A.2019.** Solid state fermentation of amylase production from *Bacillus subtilis* D19 using agro-residues. Journal of King Saud University – Science, 1-7.
- Takeuchi, A., Shilizu-Ibuka, A., Nishiyama, Y., Mura, K., Okada, S., Tokue, C., and Arai, S.2006.** Purification and Characterization of an α -Amylase of *Pichia burtonii* Isolated from the Traditional Starter “Murcha” in Nepal. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 70(12) : 3019–3024.
- Talekar S, Pandharbale A, Ladole M, Nadar S, Mulla M, Japhalekar K, et al. 2013.** Carrier free co-immobilization of alpha amylase, glucoamylase and pullulanase as combined cross-linked enzyme aggregates (combi-CLEAs): a tri-enzyme biocatalyst with one pot starch hydrolytic activity. Bioresour Technol, 147:269-75.
- Talekar, S and Chavare, S.2012.** Optimization of immobilization of α -amylase in alginate gel and its comparative biochemical studies with free α -amylase. Recent Research in Science and Technology, 4(2) : 01-05.
- Tallapragada, P., Dikshit, R., Jadhav, A., et Sarah, U. 2017.** Purification partielle et caractérisation de l'enzyme amylase sous fermentation à l'état solide à partir de *Monascus sanguineus*. Journal of Genetic Engineering and Biotechnology, 15 (1) : 95–101.
- Tanyildizi, M. S., D. Ozer, M. Elibol. 2005.** Optimization of a-amylase production by *Bacillus sp.* Using response surface methodology, Process Biochem, 40 : 2291–2296.
- Tarhriz V, Hamidi A, Rahimi E, Eramabadi M, Eramabadi P, Yahaghi E, et al. 2014.** Isolation and characterization of naphthalene-degradation bacteria from qurugol lake located at azerbaijan. Biosci Biotechnol Res Asia,11(2):715.

- Thongekkaew, J., Ikeda, H., Masaki, K., et Iefuji, H. 2008.** Une carboxyméthyl cellulase acide et thermostable de la levure *Cryptococcus sp. S-2* : Purification, caractérisation et amélioration de sa production d'enzymes recombinantes par fermentation à haute densité cellulaire de *Pichia pastoris*. Expression et purification des protéines, 60 (2) : 140–146.
- Tiwari, S .P., Srivastava, R., Singh, C. S., Shukla, K., Singh, R. K., Singh, P., Singh, R., Singh, N. L., and Sharma, R. 2015.** Amylase : An Overview with special reference to α -Amylase. Journal of Global Biosciences, 4(1) : 1886-1901.
- Toumi, S. 2018.** Isolement et caractérisation des souches levuriennes productrices d'amylose à partir de sol saharien Algérien et cultivée sur un milieu à base de lactosérum. Thèse de doctorat en Sciences. Université Djilali Liabes de Sidi Bel Abbès, p129.
- Trabelsi, S., Ben Mabrouk, S., Kriaa, M., Ameri, R ., Sahnoun, M ., Mezghani M.M., Bejar, S. 2018.** The optimized production, purification, characterization, and application in the bread making industry of three acid-stable alpha-amylases isoforms from a new isolated *Bacillus subtilis* strain US586. J Food Biochem, 2019(12826) :1-13.
- Tsiomenk, A. B., Musae, D. S. ., Lupashin, V. V., et Kulaev, I. S. 1992.** Secreted alpha amylase of the basidiomycetous yeast *Filobasidium capsuligenum*-isolation, purification, and properties, biochemistry (mosciw) ,57:297-303.
- Uddin, S. N., Hasan, A. M., Anower, M. R., Salam, M. A, Alam, M. J, Islam, S . 2005.** Commercial enzymes production by Recombinant DNA Technology : A conceptual works. Pakistan Journal of Biological Sciences, 8:345-355.
- Ul-Haq, I., Ashraf, H., Iqbal, J., et Qadeer, M. 2003.** Production d'alpha amylase par *Bacillus licheniformis* à l'aide d'un milieu économique. Bioresource Technology, 87 (1) :57– 61.
- Vadkertiová, R., Molnárová, J., Vránová, D., and Sláviková, E. 2012.** Yeasts and yeast-like organisms associated with fruits and blossoms of different fruit trees. Canadian Journal of Microbiology, 58(12):1344–1352.
- Vaidya, S., Srivastava, P. K ., Rathore, P., and Pandey, A. K. 2015.** Amylases : A Prospective enzyme in the field of biotechnology. J. Appl. Biosci, 41(1) : 1-18.
- Varalakshmi, K.N., Kumudini, B.S., Nandini, B.N., Solomon, J., Suhas, R., Mahesh, B., and Kavitha, A.P. 2009.** Production and Characterization of α -Amylase from *Aspergillus niger* JGI 24 Isolated in Bangalore. Polish Journal of Microbiology, 58(1) : 29-36.

- Vihinen, M and Mäntsälä, P.1990.**Characterization of a Thermostable *Bacillus Stearothermophilus* Alpha-Amylase. *Biotechnol Appl Biochem*, 12(4):427-35.
- Viswanathan, P et Surlikar, N.R. 2001.** Production d' α -amylase avec *Aspergillus flavus* sur des grains d'*Amaranthus* par fermentation à l'état solide. *Journal of Basic Microbiology*, :41 (1) : 57–64
- Vohra, A et Satyanarayana, T. 2003.** Phytases sources microbiennes, production, purification et applications biotechnologiques potentielles. *Revue critiques en biotechnologie*, 23 (1) : 29–60.
- Vyas, G., Sharma, N et Sharma, N.2019.** Purification et caractérisation de l' α -amylase à partir d'une nouvelle souche thermoalcalalophile de *Bacillus sonorensis* GV2 isolé du compost de champignons. *Journal international de recherche de chimie pure et appliquée* ,19 (3): 1-14.
- Walker, G. M. 2010.** *Pichia anomala* : physiologie cellulaire et biotechnologie par rapport aux autres levures. *Antonie van Leeuwenhoek*, 99 (1) :25–34.
- Wanderley, K. J., Torres, F. A. G., Moraes, L. M. P and Ulhoa, C. J. 2004.** Biochemical characterization of α -amylase from the yeast *Cryptococcus flavus*. *FEMS Microbiology Letters* ,231: 165-169.
- Wang CH, Liu XL, Huang RB, He BF, Zhao MM. 2018.** Enhanced acidic adaptation of *Bacillus subtilis* Ca-independent alpha-amylase by rational engineering of pKa values. *Biochem Eng J*, 139:146-53.
- Wang, K., Sipilä, T. P et Overmyer, K. 2016.** Isolement et caractérisation des levures résidentes du phylloplan d'*Arabidopsis thaliana*. *Rapports scientifiques*, 6 (1) :13.
- Warnasuriya, D., Liyanage, A. A. W., Weerawansa, G. G., Athauda, P. K. et Jayatissa, P.M.1985.** Isolation and characterization of yeasts of some fruits and fruit products of sri lanka. *J. Natn. Sci Coun. Sri Lanka* ,13 (1) : 71-75.
- Xian,L.,Wang, F., Luo, X., Feng, Y.-L., and Feng, J.-X. 2015.** Purification and Characterization of a Highly Efficient Calcium-Independent α -Amylase from *Talaromyces pinophilus* 1-95. *PLOS ONE*,10(3) :1-18.
- Yalcin, S. k., Ozbas,Z. Y .2008.** Effects of pH and temperature on growth and glycerol production kinetics from Turkey. *Brazilian Journal of Microbiology* ,39: 325-332.
- Yamakawa, S., Yamada, R., Tanaka, T., Ogino, C., et Kondo, A. 2012.** Fermentation répétée à partir d'amidon brut à l'aide de *Saccharomyces cerevisiae* présentant à la fois de la glucoamylase et de l' α -amylase. *Enzyme and Microbial Technology*, 50 (6-7) :343– 347.

- Zainab Mohsin, S. A., Shamsheer, N., and Khan, F. S. 2017.** Application of microbial α -Amylase in sugar, baling, textile and other industries. I.J.R.D.O-Journal of Biological Science, 3(6) :36-51.
- Zhang, F., Yang, X., Geng, L., Zhang, Z., Yin, Y., and Li, W.2015.** Purification and characterization of a novel and versatile α -amylase from *thermophilic Anoxybacillus sp. YIM 342*. Starch - Stärke, 68(5-6) :446–453.
- Zhao W, Zheng J, Wang YG, Zhou HB. 2011.** A marked enhancement in production of amylase by *Bacillus amyloliquefaciens* in flask fermentation using statistical methods. J Cent South Univ Technol, 18(4):1054-62.
- Zoubiri, L. 2012.** Production d'alpha amylase par des moisissures cultivées sur milieu à base de rebuts de dattes. Diplôme de magistère en sciences Alimentaires. Universite mentouri- constantine.p104.
- Morvan, J. 2010.** Marché européen des enzymes dans les applications alimentaires. M55B <http://www.frost.com>.
- Net1 <https://www.google.com/url> consulte (3-7-2020).**
- Net2 <https://www.google.com/url> consulte (3-7-2020).**

Résumé

Il est bien connu que l' α -amylase utilisée dans les différentes industries est produites à partir des bactéries ou des moisissures alors que peu d'études ont été réalisées sur cette enzyme d'origine levurienne. Les applications accrues des α -amylases ont conduit à l'augmentation de la demande des nouvelles amylases. Afin d'améliorer l'économie et diminuer le coût d'importation des enzymes, il serait intéressant de produire les α -amylases à partir des souches locales. Pour cette raison, nous nous sommes intéressés à l'étude de la production d' α -amylase à partir des levures.

Nous avons étudié les levures amylolytiques, leur habitat, leurs caractéristiques morphologiques et culturelles nutritionnelles. Aussi, nous avons élaboré l' α -amylase, sa structure, son origine, sa purification et ses caractéristiques et ses applications. En industrie, la demande d'amélioration de la production de cette enzyme est en continue. Nous avons donc abordé la production de l'amylase, son amélioration par les approches statistiques, la manipulation de la souche par le génie génétique (la mutagenèse, l'ADN recombinant). En plus, en industrie, il est économiquement intéressant de récupérer des enzymes et d'améliorer leur thermostabilité. L'immobilisation est une technique recommandée pour la stabilité et le recyclage des enzymes. Lors de ce travail, différentes méthodes d'immobilisation ont été décrites.

Mots clés : Levures amylolytique, alpha amylase, immobilisation, thermostabilité.

Abstract

It is well known that the α -amylase used in the various industries is produced from bacteria or mold, while few studies have been carried out of this enzyme of yeast origin. The increased applications of α -amylases have led to an increased demand for new amylases. In order to improve the economy and reduce the cost of importing enzymes, it would be interesting to produce α -amylases from local strains. For this reason, we are interested in studying the production of α -amylase from yeasts.

We have studied amylolytic yeasts, their habitat, their nutritional morphological and cultural characteristics, and we have, also developed α -amylase, its structure, its origin, its purification and its characteristics and applications. In industry, the demand for improved production of this enzyme is continuous. We therefore approached the production of amylase, its improvement by statistical approaches, the manipulation of the strain by genetic engineering (mutagenesis, recombinant DNA). In addition, in industry, it is economically interesting to recover enzymes and improve their thermostability. Immobilization is the recommended technique for the stability and recycling of enzymes. During this work, different methods of immobilization were described.

Key words : Amylolytic yeasts, alpha amylase, immobilization, thermostability.

ملخص

من المعروف أن α -amylase المستخدم في صناعات مختلفة يتم إنتاجه من البكتيريا أو العفن، بينما تم إجراء القليل من الدراسات على هذا الإنزيم من أصل الخميرة. أدت زيادة تطبيقات الأميليز ألفا إلى زيادة الطلب على الأميليزات الجديدة. من أجل تحسين الاقتصاد وتقليل تكلفة استيراد الإنزيمات، سيكون من المثير للاهتمام إنتاج α amylases من السلالات المحلية. لهذا السبب، نحن مهتمون بدراسة إنتاج ألفا أميليز من الخمائر.

لقد قمنا بدراسة الخمائر **Amylolytique** وموطنها وخصائصها التغذوية المورفولوجية والثقافية، كما قمنا ب تطوير α -amylase وهيكله وأصلها وتنقيتها وخصائصها وتطبيقاته في الصناعة، ان زيادة الطلب على تحسين إنتاج هذا الإنزيم مستمر. لذلك ناقشنا إنتاج الأميليز، وتحسينه من خلال الأساليب الإحصائية، والتلاعب بالسلسلة عن طريق الهندسة الوراثية (الطفرات، الحمض النووي المؤتلف). بالإضافة إلى ذلك، في الصناعة، من المفيد اقتصاديًا استعادة الإنزيمات وتحسين ثباتها الحراري.

التثبيت (**immobilisation**) هو الأسلوب الموصى به الاستقرار وإعادة تدوير الإنزيمات. خلال هذا العمل، تم وصف طرق مختلفة للتثبيت.

الكلمات المفتاحية: الخميرة **Amylolytique**، **alpha amylase**، التثبيت، الثبات الحراري.

Soutenu le 7 juillet 2020

Présenté par :

- Mahious Rayane.
- Rehahlia Narimane.

Résumé :

Il est bien connu que l' α -amylase utilisée dans les différentes industries est produites à partir des bactéries ou des moisissures alors que peu d'études ont été réalisées sur cette enzyme d'origine levurienne. Les applications accrues des α -amylases ont conduit à l'augmentation de la demande de nouvelles amylases. Afin d'améliorer l'économie et diminuer le coût d'importation des enzymes, il serait intéressant de produire les α -amylases à partir des souches locales. Pour cette raison, nous nous sommes intéressés à l'étude de la production d' α -amylase à partir des levures.

Nous avons étudié les levures amylolytiques, leur habitat, leurs caractéristiques morphologiques et culturelles nutritionnelles. Aussi, nous avons élaboré l' α -amylase, sa structure, son origine, sa purification et ses caractéristiques et ses applications. En industrie, la demande d'amélioration de la production de cette enzyme est en continue. Nous avons donc abordé la production d'amylase, son amélioration par les approches statistiques, la manipulation de la souche par le génie génétique (la mutagenèse, l'ADN recombinant). En plus, en industrie, il est économiquement intéressant de récupérer des enzymes et d'améliorer leur thermostabilité. L'immobilisation est une technique recommandée pour la stabilité et le recyclage des enzymes. Lors de ce travail, différentes méthodes de l'immobilisation ont été décrites.

Mots clés : Levures amylolytique, α -amylase, immobilisation, thermostabilité.

Jury d'évaluation :

- Présidentes : Mme Bennamoun L., MCB, UMC Constantine.
- Encadreuse : Mme Dakhmouche S., MCA, ENS Assia Djébar, Constantine.
- Examinatrice : Mme Labbani F.Z.K., MCB, ENS Assia Djébar, Constantine.

Année universitaire

2019-2020