

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
République Algérienne Démocratique et Populaire  
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique  
جامعة الاخوة منتوري  
Université des Frères Mentouri Constantine  
كلية علوم الطبيعة و الحياة  
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie



Département : Biochimie et Biologie Moléculaire et Cellulaire  
Mémoire Présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master  
Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie  
Filière : Sciences Biologiques  
Spécialité : Biochimie/Analyse Protéomique et Santé

## *Thème*

**Etude des hydrolases chez les levures. Purification et caractérisation  
de l' $\alpha$ -amylase chez *Clavispora lusitaniae* ABS7**

Présenté par: *AICHOOR Nour El Houda*

*Le : 02/07/2017*

**Jury d'évaluation :**

**Président du jury :** NOUADRI T. M.C.A, Université Frères MENTOURI, Constantine.  
**Rapportrice :** DAKHMOUCHE S. M.C.B, ENS, ASSIA DJEBAR, Constantine.  
**Examinatrice :** BENNAMOUN L. M.A.A., Université Frères MENTOURI, Constantine.

*Année universitaire :2016-2017*

## *Remerciements*

*Je remercie, tout d'abord, Dieu tout puissant, pour avoir guidé mes pas vers un avenir inchaallah prometteur, où le travail, la persévérance et la quête du savoir seront ma devise .*

*Je tiens à remercier très vivement madame Djekrif-Dakfhouche S. Docteur à l'université de Constantine, d'avoir encadré et suivi ce travail.*

*Un grand merci s'adresse aussi à madame Bennamoun L. Maitre assistante à l'université Frères Mentouri qui m'a énormément aidée avec ses précieux conseils.*

*Mes vifs remerciements s'adressent également aux membres de jury qui ont accepté de juger ce travail :*

*-Monsieur Nouadri T. Docteur à l'université Frères Mentouri, qui me fait l'honneur de présider le jury.*

*- Madame Bennamoun L. Maitre assistante à l'université Frères Mentouri d'avoir accepté de juger ce mémoire.*

*J'exprime aussi ma grande gratitude envers toutes les personnes, ayant contribué de prêt ou de loin, à la réalisation de ce mémoire.*

*Nour El Houda*

## *Dédicaces*

*Je dédie ce travail à mes chers parents que j'aime tant, sans lesquels je ne serai*

*jamais arrivée là où j'en suis.*

*A mon unique frère Ahmed Redha et mes soeurs Imen et Roufaïda*

*et Khawther et ma nièce meyssoune .Ainsi qu'à ma tante Warda*

*et mes cousins : Yazid, ,et Toufik, et a toute ma famille dont le soutien et les*

*encouragements m'ont été salutaires.*

*A tous les étudiants de ma promotion*

*A tous ceux que j'aime.*

***Nour El Houda***

# Sommaire

Liste des abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Introduction	1
<b>Chapitre 1 :Revue bibliographique</b>	
1-Les levures	3
1-1-Morphologie	3
1-2-Reproduction	3
1-3-Classification	5
1-4- Levure <i>Candida lusitaniae</i>	5
1-4-1-Taxonomie du modèle biologique <i>Clavispora lusitaniae</i>	6
1-4-2-Habitat	6
2-Enzymes	7
2-1- Généralités	7
2-2-Classification des enzymes	7
2-3-Hydrolases	8
2-3-1- L'alpha –amylase	8
2- 3-1-1- Définition	8
2- 3-1-2-Structure	8
2-3-1-3- Nomenclature	10
2-3-1-4- Caractéristiques et propriétés des alpha- amylases	10
2-3-1-5- Origines de l'alpha-amylase	13
2-3-1-6-Mécanisme d'action	15
2-3-1-7- Production d'alpha-amylase	16
2-3-1-8- Utilisation de l'α-amylase	17
2-3-2-Cellulase	19
2-3-2-1-Structure de la cellulase	19
2-3-2- 2- Les enzymes cellulolytiques	20
2-3-2-3- Caractéristiques des cellulases	21
2-3-2-4-Les différentes origines de la cellulase	21
2-3-2-5-Application industrielle de la cellulase	22
2-3-3- Les enzymes pectinolytiques	23
2-3-3-1-Définition	23

2-3-3-2-Classification des enzymes pectinolytiques	23
2-3-3-3-Origine des enzymes pectinolytiques	25
2-3-3-4-Application industrielle des pectinases	25
3- Lactosérum	26
3-1- Définition	26
3-2-Composition chimique	27
3-3- Intérêt industriel du lactosérum	28
<b>Chapitre 2 : Matériel et méthodes</b>	
1-Matériel biologique	31
2- Milieux de réactivation	31
3- Réactivation des souches	31
4-Mise en évidence des activités enzymatiques	31
4-1-Milieux de culture	32
4-2-Préparation de la suspension de cellules et ensemencement	32
4-3-Révélation des activités enzymatiques	32
5-Comparaison de la production enzymatique des souches L6 ,L7 et sélection de la souche la plus performante	32
6-Etude de la production enzymatique	32
6-1-Milieu de base	32
6-1-1-Traitement du lactosérum	33
6-2- Milieu de production	33
6-3-Dénombrement des cellules	33
7-Fermentation	33
8-Centrifugation	34
9-Dosage des activités enzymatiques	34
9-1-Le dosage de l'activité $\alpha$ -amylasique	34
9-2-Le dosage de l'activité pectinolytique	35
9-3- Le dosage de l'activité cellulasique	35
10-Dosage de protéines	36
10-1-principe	36
10-2- protocole	36
11-Purification de l'alpha-amylase	37
11-1- Précipitation des protéines par l'acétone	37
11-2-Ultrafiltration	37
11-3-Chromatographie sur gel filtration	37

12-Dosage des protéines et de l'activité enzymatique des fractions rassemblées	38
13-Détermination des propriétés physico-chimiques de l' $\alpha$ -amylase de <i>Clavispora lusitaniae</i> ABS7 et de l' $\alpha$ -amylase commerciale	38
13-1-Détermination du pH optimum	38
13-2- Détermination de la température optimale	38
13-3-Etude de la thermostabilité enzymatique	39
14- Effet de différents métaux et réactifs chimiques sur l'activité enzymatique	39
<b>Chapitre 3 :Résultats et discussion</b>	
1-Réactivation et morphologie des souches L6 et L7	40
2- Mise en évidence des activités enzymatiques de L6 ,L7 et sélection de la souche la plus performante pour l'activité $\alpha$ -amylasique	40
3-Etude de la production enzymatique chez <i>Clavispora lusitaniae</i> ABS7	44
4-Purification d'enzyme	44
5-Etude des propriétés physico-chimiques de l' $\alpha$ -amylase de <i>Clavispora lusitaniae</i> ABS7 et d'une $\alpha$ -amylase commerciale	46
5-1-Détermination du pH optimum	46
5-2- Détermination de la température optimale	47
5-3-Etude de la thermostabilité enzymatique	48
5-3-1-Etude de la thermostabilité de l' $\alpha$ -amylase de <i>Clavispora lusitaniae</i> ABS7	49
5-3-2-Etude de thermostabilité de l' $\alpha$ -amylase commerciale	51
6-Effet de différents métaux et réactifs chimiques sur l'activité enzymatique de l' $\alpha$ -amylase de <i>Clavispora lusitaniae</i> et l' $\alpha$ -amylase commerciale	53
6-1-Effet des sels	53
6-2- Influence de différents réactifs chimiques	54
Conclusion générale	56
Abstract	
ملخص	
Références	
Annexes	

# Liste des abréviations

**Abs** : Absorbance

**ADN**: Acide desoxyribonucléique.

**Asp** : Aspartate

**ATP** : Adénosine-Triphosphate

**BSA**: Bovine serum albumin

**C** : Celcius

**CaCl<sub>2</sub>** : Chlorure de calcium.

**CBH** : Cellobiohydrolases

**CMC** : Carboxyméthylcellulose

**DNSA**: 3,5 dinitrosalicylique acide

**EC** : Enzym Commission number.

**EDTA**: Ethylène diamine tétraacétique acide

**Egl A** :Endoglucanases A

**Egl B** :Endoglucanases B

**GH** : Glycosides hydrolases

**Glu** : Glutamate.

**ITDAS** : Institut technique du développement des agricultures sahariennes

**Kda** : kilo dalton.

**M** : Molaire

**PDA**: Pomme de terre-Dextrose-Agar.

**PE** : Pectinestérase

**PG** : Polygalacturonase.

**PGL** : Polygalacturonate lyase

**PM** : Poids moléculaire

**PMG** : Polyméthylgalacturonase

**PMGL** : Polyméthylgalacturonate lyase

**Pro**:Proline

**Rpm**: Revolutions per minute (tours par minute)

**SDS** : Sodium dodécylsulfate.

**Ser** :Sérine

*Sp.*: Espèce

**T** : Température

**TG** : Triglycéride

**Trp** : Tryptophane.

**UI** : Unité internationale

**YPGA**: Yeast extract-Peptone-Glucose-Agar

**YPMA**: Yeast extract-Peptone-Maltose-Agar

**YPPA**: Yeast extract-Peptone-Pectin-Agar

**YPSA**: Yeast extract-Peptone-Starch-Agar

## Liste des figures

Numéro	Titre	Page
<b>Figure 1</b>	Division de cellules levuriennes par bourgeonnement.	<b>4</b>
<b>Figure 2</b>	Cycle de reproduction de la levure.	<b>4</b>
<b>Figure 3</b>	Structure tridimensionnelle d' $\alpha$ -amylase d'après Kalis (1991).	<b>9</b>
<b>Figure 4</b>	Mécanisme catalytique des hydrolases glycosyliques.	<b>16</b>
<b>Figure 5</b>	Exocellulase CBHI(Ce 17A) de <i>Trichoderma reesei</i> .	<b>20</b>
<b>Figure 6</b>	Mode d'action des pectinase.	<b>23</b>
<b>Figure 7</b>	Voies technologiques permettant l'obtention des principaux types de lactosérums issus de la première transformation du lait.	<b>26</b>
<b>Figure 8</b>	Courbe étalon du maltose.	<b>34</b>
<b>Figure 9</b>	Courbe étalon de l'acide galacturonique	<b>35</b>
<b>Figure 10</b>	Courbe étalon du glucose.	<b>36</b>
<b>Figure 11</b>	Courbe étalon des protéines	<b>37</b>
<b>Figure 12</b>	Dispositif de la colonne de chromatographie sur gel filtration ( gel de séphacryl S200).	<b>38</b>
<b>Figure 13</b>	Caractères macroscopiques de :(A) <i>Clavispora lusitaniae</i> ABS7 sur YPGA (B) <i>Meyerozyma guilliermondii</i> sur PDA.	<b>40</b>
<b>Figure 14</b>	Etude de la production enzymatique par <i>Clavispora lusitaniae</i> après 28 h d'incubation à 45°C (sur milieu optimisé à base de lactosérum 100% décaséiné).	<b>44</b>
<b>Figure 15</b>	Profil chromatographique de l' $\alpha$ -amylase sur Séphacryl-S200.	<b>45</b>
<b>Figure 16</b>	Effet du pH sur l'activité de l' $\alpha$ -amylase de <i>Clavispora lusitaniae</i> et l' $\alpha$ -amylase commerciale	<b>46</b>
<b>Figure 17</b>	Effet de la température sur l'activité de l' $\alpha$ -amylase de <i>Clavisporalutaniae</i> et l' $\alpha$ -amylase commerciale	<b>47</b>
<b>Figure 18</b>	Etude de la thermostabilité de l' $\alpha$ -amylase de <i>Clavispora lusitaniae</i> après des différents temps d'incubation.	<b>49</b>
<b>Figure 19</b>	Etude de la thermostabilité de l' $\alpha$ -amylase commerciale après des différents temps d'incubation	<b>52</b>
<b>Figure 20</b>	Effet de quelques sels sur les activités $\alpha$ -amylasiques.	<b>53</b>
<b>Figure 21</b>	Effet de quelques substances chimiques sur les activités $\alpha$ -amylasiques	<b>55</b>



## Liste des tableaux

<b>Numéro</b>	<b>Titre</b>	<b>Page</b>
<b>Tableau 1</b>	Habitat de <i>Clavispora lusitaniae</i>	<b>6</b>
<b>Tableau 2</b>	Classification des enzymes.	<b>7</b>
<b>Tableau 3</b>	Poids moléculaire de quelques $\alpha$ -amylases de différentes sources	<b>10</b>
<b>Tableau 4</b>	Température optimale de quelques $\alpha$ -amylases de différentes sources.	<b>11</b>
<b>Tableau 5</b>	pH optimum et point isoélectrique de quelques $\alpha$ -amylases de différentes sources.	<b>12</b>
<b>Tableau 6</b>	Les différentes origines de l'alpha -amylase microbienne.	<b>15</b>
<b>Tableau 7</b>	Composition chimique des deux types du lactosérum en g/l .	<b>27</b>
<b>Tableau 8</b>	Activité biologique des protéines et des peptides du lactosérum.	<b>28</b>
<b>Tableau 9</b>	Mise en évidence des activités enzymatiques des deux souches amylolytiques (L6) et (L7) après 48 h d'incubation à différentes températures	<b>41</b>
<b>Tableau 10</b>	Purification de l' $\alpha$ -amylase produite par <i>Clavispora lusitaniae</i> ABS7	<b>45</b>

# *Introduction générale*

Au cours des deux dernières décennies, le développement de la microbiologie a abouti à l'obtention de matériels biologiques très divers, modifiés génétiquement ou non et susceptibles d'être utilisés dans des procédés de production de vitamines, d'hormones, de vaccins et d'enzymes. Les enzymes d'origine microbienne, présentent des propriétés et des spécificités diverses. Ces propriétés reflètent de plus en plus leurs utilisations dans divers domaines d'applications, tels que l'industrie alimentaire humaine et animale, les détergents pour lessives, l'industrie des tanneries et l'industrie pharmaceutique. Environ 40% des enzymes industrielles sont d'origine fongique (Botton *et al.*, 1999).

Dans ce contexte, les levures ont occupé une place primordiale dans les industries agroalimentaires (brasserie, cidrerie et fromagerie) (Botton *et al.*, 1999). Les levures sont des eucaryotes unicellulaires, ayant des capacités de se multiplier rapidement car elles sont moins exigeantes en nutriments. Elles sont facilement mis en oeuvre dans d'autres exploitations (culture, recherche et applications industrielles) par rapport aux procaryotes (Pol, 1996) et possèdent un capital génétique qui subit peu de mutations. Actuellement, ces eucaryotes, par leur capacité à produire des métabolites fonctionnels, sont mis à contribution dans l'élaboration de biomédicaments ; de plus ils constituent un vaste réservoir de catalyseurs biologiques (les enzymes) (Saci, 2012). Par ailleurs, l'usage des préparations enzymatiques s'est considérablement développé dans de nombreux secteurs de la bio-industrie. Les enzymes amylolytiques, les  $\alpha$ -amylases en particulier, sont les plus importantes parmi les enzymes commercialisées à cause de la diversité de leur application (tels que l'industrie alimentaire humaine et animale, les détergents pour lessives, l'industrie du textile, l'industrie du papier et l'industrie pharmaceutique) (Botton *et al.*, 1999).

Les amylases, proviennent de différentes sources (plantes, animaux et microorganismes), cependant celles d'origine microbienne sont les plus utilisées industriellement (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 les genres *Lipomyces*, *Saccharomycopsis* et *Schwanniomyces* (De mot et Verachtert., 1985). La culture des champignons pour la production d'enzymes s'effectue soit sur substrat solide, soit en culture submergée comme c'est le cas pour la production de la plupart des métabolites d'origine microbienne. Au cours des dernières années, un nombre important de ces fermentations est réalisé sur des déchets agroalimentaires (Nouadri *et al.*, 2010 ; Bennamoun *et al.*, 2004 ; Ait Kaki *et al.*, 2012 ). La valorisation de ces derniers par les microorganismes (valorisation biotechnologique) permet la création

d'emplois, de nouvelles sources de profits et une avancée technologique. En Algérie on rejette la plupart des déchets dans une décharge à ciel ouvert. Il devient donc urgent de mettre en place de nouvelles technologies permettant leur valorisation. Dans le cas particulier de l'industrie fromagère, le lactosérum représente 90% du volume original du lait utilisé ; il en est ainsi le principal coproduit (Moletta, 2002). Par sa richesse en protéines et en lactose, il devient un polluant, en particulier pour les écosystèmes aquatiques (Linden et Lorient, 1994) d'où la nécessité d'essayer de le valoriser. Par ailleurs, sa composition biochimique peut être un milieu favorable à la production d'enzymes. C'est cette caractéristique que nous avons exploité dans ce travail dans le but d'étudier la production des enzymes amylolytiques.

L'objectif principal de cette étude est la production d'une  $\alpha$ -amylase thermostable issue d'une levure prélevée en milieu extrême (Biskra- Sahara- Sud Algérien). Ainsi que l'étude de ses caractéristiques physico-chimiques (pH, température, thermostabilité).

Cette étude comprend une première partie relatant l'état des connaissances sur les levures, les enzymes, et le milieu de production : le lactosérum. La deuxième partie expérimentale renferme les techniques et les méthodes ainsi que les résultats et leur discussion.

*Revue*

*Bibliographique*

### 1-Les levures

Les levures sont des microorganismes eucaryotes, non photosynthétiques, chimio-hétérotrophes (puisent leur énergie dans la dégradation de substances organiques variées), champignons à thalle unicellulaire immobiles. Le thalle de la levure est l'appareil végétatif le plus simple, sans racine ni tige, sans rameau feuillu et non chlorophyllien (Larpen,1991 ; Bourgeois et *al.*,1996 ; Guiraud,1998 ;Leblonc,1988 ;Tchango,1996).

Les levures se développent, soit en surface, soit en profondeur des aliments (milieux solides ou liquides) (Fao,2007).

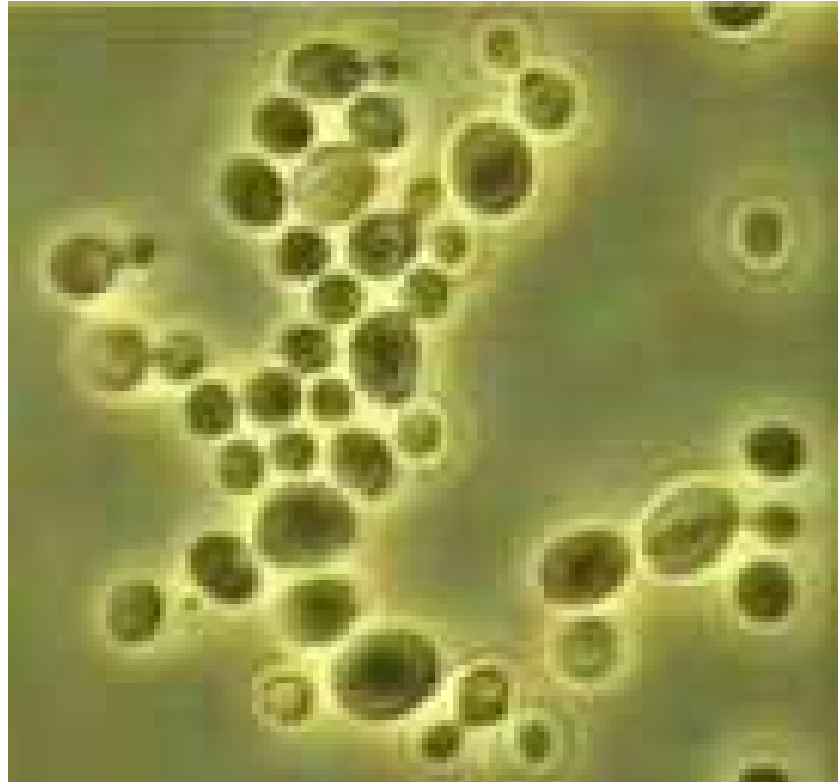
#### 1-1-Morphologie

Les levures présentent une structure plus complexe que celle des bactéries notamment par la présence d'un noyau, de mitochondrie, d'un appareil de Golgi et de plus d'un chromosome (*saccharomyces cerevisiae* a 16 chromosomes) (Labrecque, 2003).

Leur morphologie est d'une grande importance taxonomique. Les cellules sont de taille d'environ 20  $\mu\text{m}$  en longueur et de 1 à 10  $\mu\text{m}$  en largeur (Gournier et *al.*, 1994). Elles généralement ovoïdes ou sphériques, parfois cylindriques, allongées, apiculées ou de formes plus spécifiques : ogivales (genre *Dekkera*), en forme de bouteille (genre *Pityrosporium* (= *Malassezia*), triangulaires (*Trigonopsis*) ou en forme de citron (*Hanseniaspora*) (Bourgeois et *al.*,1996 ; Larpen et Larpen-Gourgaud, 1997 ; Leveau et Bouix,1993).

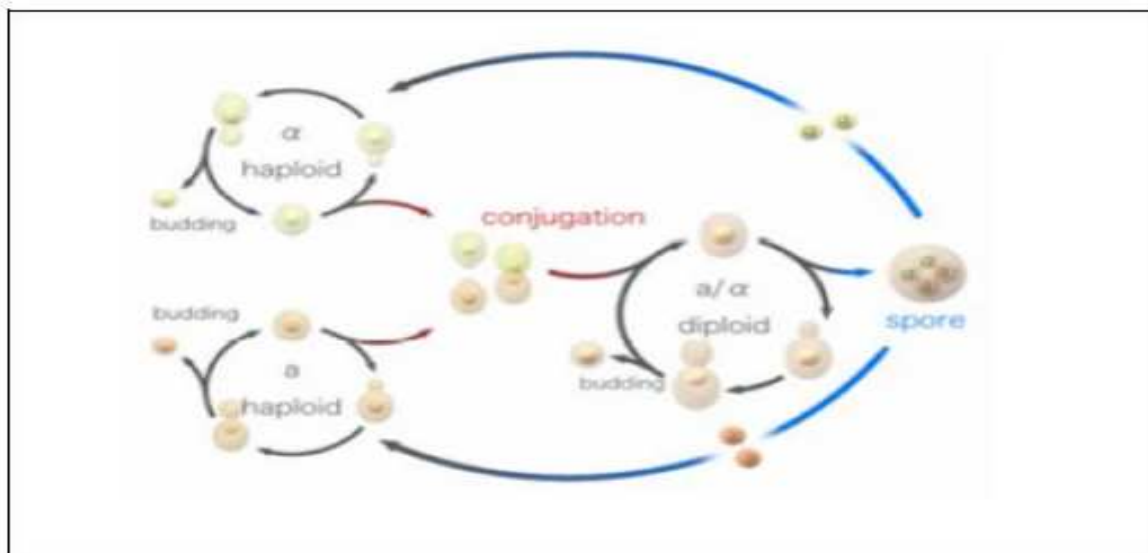
#### 1-2-Reproduction

Les levures ont un mode de multiplication bien spécial. Elles se reproduisent aussi bien par un cycle asexué (végétatif) que par un cycle sexué (sporulation) en fonction des conditions favorables ou défavorables du milieu (Larpen et Larpen-Gourgaud, 1997). Pour la plupart des levures, la reproduction asexuée est la forme majeure de multiplication (Bonaly, 1991). Elle s'effectue par bourgeonnement ou par fission (scissiparité) à partir d'une cellule mère (Figure1).



**Figure 1:** Division de cellules levuriennes par bourgeonnement (Kwon-Chung et Bennett, 1992).

La reproduction sexuée s'effectue par conjugaison des deux cellules qui donne naissance à un zygote. Après différenciation et méiose un asque à 4 ascospores haploïdes se forme (Oteng-Gyang, 1984) (Figure 2).



**Figure 2 :** Cycle de reproduction de la levure (Leclerc et *al.*, 1995).

### **1-3-Classification**

La classification de référence est actuellement celle de Kreger-Van (1984) qui présente des changements sensibles par rapport à la précédente classification de Lodder (1971). En particulier de nouveaux critères taxonomiques comme la composition en base de l'ADN, la structure de la paroi, le type de coenzyme sont pris en compte pour permettre des études plus rigoureuses.

La classification actuelle répertorie 60 genres et 500 espèces (Bouix et Leveau, 1991). Selon le mode de reproduction, les levures se divisent en 3 grandes classes :

#### **1-3- 1- Levures Ascomycètes**

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

#### **1-3-2- Levures Basidiomycètes**

Présentent une reproduction sexuée avec formation de basidiospores sur une baside.

#### **1-3-3- Levures Deutéromycètes (sans sexualité)**

Regroupent l'ensemble des levures ne présentant pas de mode connu de reproduction sexuée, ne se multipliant que par reproduction végétative.

#### **1-4- Levure *Candida lusitaniae***

*Candida lusitaniae* est une espèce hétérothallique, de forme variable rondes à allongées, non pigmentées, elle se reproduit par bourgeonnement multilatéral. Sa forme parfaite est *Clavispora lusitaniae*.



**1-4-1-Taxonomie du modèle biologique : *Clavispora lusitaniae***

Kurtzman (2011) décrit la classification de *Clavispora lusitaniae* suivante :

**Règne** : Champignon

**Phylum** : Ascomycota

**Subphylum** : Saccharomycotina

**Classe** : Saccharomycetes

**Ordre**: Saccharomycétales

**Famille**: Metschnikowiaceae

**Genre**: *Clavispora*

**Espèce** : *lusitaniae*

**1-4-2-Habitat**

*Candida lusitaniae* est un saprophyte du tube digestif de l'homme et de nombreux animaux (mammifères, oiseaux) (<http://coproweb.free.fr/mycoweb/texte/153.htm>):06/03/2009.

Dans l'environnement, *Clavispora lusitaniae* est isolée à partir d'une large gamme de substrats (Tableau 1): végétaux, animaux, déchets industriels et spécimens cliniques.

**Tableau 1:** Habitat de *Clavispora lusitaniae*.

Habitats	Références
<b>Cornichons</b>	Rezki et <i>al.</i> , 2013
<b>Dattes</b>	Rezki et <i>al.</i> , 2013
<b>Ecorces d'arbres</b>	Rao R. S. et <i>al.</i> , 2008
<b>Déchets de la pomme de terre</b>	Ouédraogo et <i>al.</i> , 2012
<b>Fromage</b>	Prillinger et <i>al.</i> , 1999 ; Jacques et <i>al.</i> , 2008 et Binetti et <i>al.</i> , 2013
<b>Lactosérum</b>	Jairath et <i>al.</i> , 2012
<b>Yaourt</b>	Lopandic et <i>al.</i> , 2006
<b>Jus d'orange</b>	Covadonga et <i>al.</i> , 2002
<b>Jus de fruits</b>	Jairath et <i>al.</i> , 2012
<b>Mezcal</b>	Verdugo Valdez et <i>al.</i> , 2011
<b>Pulque</b>	Ian Hornsey, 2012
<b>Déchets industriels</b>	Lachance, 2011b ; Ouédragao et <i>al.</i> , 2012
<b>Agave</b>	Pérez-Brito et <i>al.</i> , 2015
<b>Spécimens cliniques</b>	Zhang et <i>al.</i> , 2010; Lachance, 2011 et Ouédragao et <i>al.</i> , 2012

## 2-Enzymes

### 2-1- Généralités

Les enzymes sont les catalyseurs du monde biologique. Ce sont des macromolécules de haute masse moléculaire (10 à 100 kDa) présentes dans les cellules de tous les organismes vivants où elles jouent un rôle essentiel en contrôlant les procédés métaboliques permettant aux nutriments d'être transformés en énergie et en matériaux cellulaires (Bergmeyer et *al.*, 1979; Pelmont, 1995; Drouin, 2005).

En 2005, plus de 3000 activités enzymatiques différentes ont été isolées et identifiées (Patel et *al.*, 2005) ; la structure d'environ 1300 d'entre elles a été déterminée (Leisola et *al.*, 2001).

Les enzymes sont privilégiées en industrie car elles permettent de contourner les inconvénients des produits chimiques et améliorent les relations coûts-efficacité des procédés (Sandhya et *al.*, 2005). Le taux de croissance annuel pour une enzyme est de 3,3% et la vente annuelle des  $\alpha$ -amylases dans le marché mondiale est estimé à 11 millions \$ et la production mondiale d' $\alpha$ -amylases est d'environ 300 tonnes / an à partir de *B. licheniformis* et *Aspergillus sp.* Elles sont largement utilisées en industries : Panification, glucoiserie, confiserie, biocarburants, détergents, papeterie, industrie du textile et industrie pharmaceutique pour cela la demande de l'augmentation de leur production est en continue.

### 2-2-Classification des enzymes

Le pouvoir catalytique des enzymes permet de produire de nouvelles substances et de l'énergie, indispensables au bon fonctionnement des organismes vivants. C'est en fonction de leur activité catalytique que celles-ci sont classées. Une nomenclature a été proposée par la commission des enzymes de l'union internationale de biochimie divisant les enzymes en six grandes classes (Vincent, 1996) (Tableau 2).

**Tableau 2** : Classification des enzymes (Vincent, 1996).

E.C (classe)	Classification	Type de réaction catalysée
E.C.1	Oxydoréductases	Oxydoréduction
E.C.2	Transférases	Transfert de groupements fonctionnels
E.C.3	Hydrolases	Hydrolyse
E.C.4	Lyases	Elimination de groupement et formation de double liaisons
E.C.5	Isomérases	Isomérisation
E.C.6	Ligases	Formation de liaisons couplées à l'hydrolyse de l'ATP

### **2-3-Hydrolases**

Les hydrolases représentent la classe d'enzymes qui catalysent les réactions d'hydrolyse d'esters (estérases : carboxylester-hydrolases; peptidiques (peptidases : e-aminopeptido-aminoacido-hydrolases, peptido-peptide hydrolases : endopeptidases), et de liaisons osidiques (osidases : glucosidases). Ces enzymes ne nécessitent pas généralement de coenzymes. Elles sont activables par des cations ([univ.ency-education.com/.../1/3/.../bioch-enzymes\\_intro\\_proprietes\\_classification.](http://univ.ency-education.com/.../1/3/.../bioch-enzymes_intro_proprietes_classification.)).

#### **2-3-1- L'alpha –amylase**

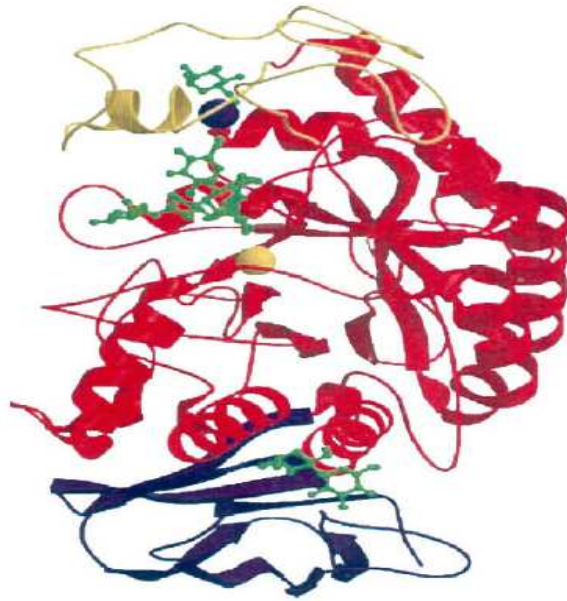
L' $\alpha$ -amylase est une protéine globulaire, dont le rôle biologique est de catalyser l'hydrolyse de l'amidon. L' $\alpha$ -amylase et les protéases sont les plus utilisés en bio-industrie (Saci., 2012). Par ailleurs, la part du marché mondial prise par les enzymes est de 59% pour les protéases et 28% pour les glucanases dont 13% pour l' $\alpha$ -amylase (Larpen-Gaugaud et Sanglier., 1992).

##### **2- 3-1-1- Définition**

L' $\alpha$  amylase est une enzyme ubiquitaire, (Janecek,1997). Elle appartient à la famille des glycosides hydrolases nommée GH13 ; regroupant maintenant plus de 1700 enzymes (Coutinho et Henrissat, 1999). Elle hydrolyse les liaisons osidiques de l'amylose, de l'amylopectine, de l'amidon, du glycogène et d'autres polysaccharides contenant plus de trois liaisons  $\alpha$  (1,4) D-Glucose (Keating et *al.*, 1998 ; Dauter et *al.*, 1999 ; Franco et *al.*, 2000).

##### **2- 3-1-2-Structure**

L' $\alpha$ -amylase est une glycoprotéines (Stefanova et Emanuilova, 1992) de structure, généralement, monomérique mais certaines peuvent être tétramériques ou dimériques (Kennedy, 1979). La partie glycosylée des enzymes protège les enzymes contre la dénaturation et la protéolyse (Mouranche et Costes, 1985). Bien que les  $\alpha$ -amylases de différentes origines aient très peu de séquences d'acides aminés identiques, leur structure tridimensionnelle et l'organisation de leur site actif sont similaires (Mercier,1985).



**Figure 3 :** Structure tridimensionnelle d'  $\alpha$ - amylase d'après Kalis (1991) :

Les trois domaines, ainsi que les ions de calcium et de chlorure, sont représentés : domaine A de couleur rouge, domaine B, jaune et domaine C, pourpre. L'ion de calcium (sphère bleue) et l'ion de chlorure (sphère jaune).

Leur chaîne polypeptidique est organisée en trois domaines (A, B et C) (figure 3) formé chacun d'un tonneau de huit segments bêta, entourés par huit hélices alpha. Leurs sites actifs sont constitués d'un ensemble de sous-sites (Scriban, 1999).

- Le **domaine A** est le plus long et renferme le site actif et le site de fixation du substrat. Il a la forme d'un cylindre appelé cylindre TIM (Banner et *al.*, 1975 et Mobini-Dehkoedi et Javan, 2012) et contient les acides aminés Glu et Asp de la catalyse (Fujimoto et *al.*, 1998). Ces deux acides aminés jouent aussi un rôle important dans la thermorésistance (Larpent et Larpent-Gourgaud, 1997).

- Le **domaine B** a une structure irrégulière (riche en feuillets  $\beta$ ) et variable selon la famille des amylases (Jespersen et *al.*, 1993). Il est impliqué dans la liaison des ions  $\text{Ca}^{2+}$  qui jouent un rôle structural et participent à la stabilité de l'enzyme (Boel et *al.*, 1990, Mobini-Dehkoedi et Javan, 2012, Elleuche et Antranikian, 2013). Le calcium est également indispensable pour préserver l'enzyme de l'attaque des protéases (Souza et Magalhaes, 2010 et Ozdemir et *al.*, 2013).

- Le **domaine C**, coté C-terminal et a une structure dite en sandwich de feuillets  $\beta$  (Brayer et *al.*, 1995 et Qian et *al.*, 1993) qui participe au repliement post-traductionnel de

l'amylase pancréatique de rat, garantissant ainsi l'activité et la sécrétion de cette enzyme (Doyon et *al.*, 2002).

### 2-3-1-3- Nomenclature

Nom codifié : EC 3.2.1.1

Nom systématique: 1,4 alpha -D-glucane-4-glucano hydrolase (Schamburget Slzmann, 1991 ; Brozowski et Davies, 1997 ; Dauter et *al.*, 1999).

Nom commun : alpha –amylase , d'autres nom (s): glycogenase,α-amylase; endoamylase; Taka-amylase A,maxilase.

### 2-3-1-4- Caractéristiques et propriétés des alpha- amylases

#### a-Poids moléculaire

Le poids moléculaire des α- amylases varie d'une origine à l'autre et d'une espèce à l'autre. Il est compris entre 40.000 et 90.000 daltons (Schombury et Salzman, 1991). Celui des α- amylases levuriennes, s'échelonne entre 40.000 et 70.000 daltons (Panchal, 1990).

**Tableau 3** : Poids moléculaire de quelques α-amylases de différentes sources.

Origine de l'α-amylase	Poids moléculaire	Source bibliographique
1/ <i>Candida Antarctica</i>	50000	De Mot and Varachtert,1986
2/ <i>Schwanniomyces alluvius</i>	52000	
	61900	Wilson et al. 1982
3/ <i>Aureobasidium pullulans</i> N13	98000	Li et al. 2007
4/ <i>Cryptococcus flavus</i>	66000	Wanderly et al. 2004
5/ <i>Saccharomycopsis fubiligera</i>	54000	Chi et al. 2009
6/ <i>Lipomyces kononenkoae</i> CBS5608	38000	Spencer-Martins et al. 1979
7/ <i>Lipomyces kononenkoae</i>	76000	Prieto et al. 1995
8/ <i>Filobasidium capsuligenum</i>	64000	De Mot R. and Verachtert, 1985

	56000	Tsiomenko et al. 1992
9/ <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	54100	DeMoraes et al., 1999

### b-Température optimale

Selon l'origine et les espèces, les alpha amylases ont des températures optimales comprises entre 40°C et 90°C (Schombury et Salzman, 1991). En effet, l'alpha amylase bactérienne est réputé pour sa grande thermostabilité, celle de *Bacillus amylolique faciens* est caractérisée par un optimum de température qui, selon les applications va de 70°C à 90°C, alors que la température optimale des alpha amylases fongiques se situe entre 50°C et 76°C (Sicard, 1982 ; Panchal, 1990 ; Prieto et al., 1995).

**Tableau 4 :**Température optimale de quelques  $\alpha$ -amylases de différentes sources.

Origine de l' $\alpha$ -amylase	Température optimale (°C)	Référence
1/ <i>Candida antractica</i>	62	De Mot and Varachtert,1986
2/ <i>Schwanniomyces alluvius</i>	45-50	Moranelli
<i>Schwanniomyces alluvius</i> UCD 5483	40	Wilson et al. 1982
3 / <i>Cryptococcus</i> sp.S-2		
4/ <i>Cryptococcus flavus</i>	50	
5/ <i>Filobasidium capsuligenum</i>	50	-De Mot and Varachtert, 1985
	45	-Tsiomenko et al. 1992
6/ <i>Schwanniomyces castellii</i>	45	Clementi and Rossi, 1986
7/ <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	50	De Moraes et al. 1999
8/ <i>Aureobasidium pullulans</i> N13	60	Li et al. 2007
/ <i>Aureobasidium pullulans</i>	50-60	Saha et al., 1993
9/ <i>Lipomyces kononenkoae</i> CBS5608	70	Prieto et al. 1995
B. subtilis	60	Ozdemir et al., 2011
Bacillus sp. PM1	50	Sharma et al. 2014
Bacillus cereus MTCC 1305	55	Singh et al., 2010

**c-pH optimum**

L'alpha -amylase est très sensible au pH. Par conséquent, le choix du pH optimum est très essentiel pour la production de cette enzyme (McMahon et *al.*, 1999). Selon Kindle (1983), l'optimum d'activité peut être obtenu à des pH compris entre 4 et 8.

Les  $\alpha$ -amylases bactériennes, ont un optimum supérieur à la neutralité, alors que les fongiques, ont des pH optimum compris entre 4 et 6 (Larpent et *al.*, 1992).

Pour les levures, l'enzyme requiert selon les espèces des pH entre 4 et 6 (Panchal, 1990 ;Avwioroko, 2015).

**Tableau 5:** pH optimum et point isoélectrique de quelques  $\alpha$ -amylases de différentes sources.

Origine de l' $\alpha$ -amylase	pH optimum	Point isoélectrique	Références
1/ <i>Candida antractica</i>	4.2	10.3	De Mot and Varachtert,1986
2 / <i>Schwanniomyces alluvius</i>	3.75-5.5	-	Moranelli
	-6,3	-	Wilson et al. 1982
3 / <i>Cryptococcus sp.S-2</i>	6	-	Iefuji et al.1996
4/ <i>Cryptococcus flavus</i>	5,5	-	
5/ <i>Filobasidium capsuligenum</i>	5,6	-	Tsiomenko et al. 1992
6/ <i>Schwanniomyces castellii</i>	4,5-7,2	-	Clementi and Rossi, 1986
7/ <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	5	-	De Moraes et al. 1999
8/ <i>Aureobasidium pullulans N13</i>	4,5	-	Li et al. 2007
<i>Aureobasidium pullulans</i>	5		Saha et al., 1993
9/ <i>Lipomyces kononenkoae</i>	4,5-5	-	Prieto et al. 1995
12/ <i>B.cereus</i>	5	-	(Singh et al. 2010)
14/ <i>B. substilis</i>	6	-	(Ozdemir et al. 2011)
15/ <i>Bacillus sp. PM1</i>	8	-	(Sharma et al. 2014)
16/ <i>Bacillus sp. PN5</i>	10	-	(Saxena et al. 2007)
17/ <i>Bacillus sp.IM D370</i>	10	4.9	Mc Tighe et al.1995

### **d-Effecteurs**

Toutes les alpha-amylases nécessitant au moins un ion de calcium, qui joue un rôle d'activateur allostérique et participe dans l'activation catalytique de l'enzyme et le maintien de sa structure tertiaire (Graham, 1996), sa présence augmente la stabilité de l'alpha-amylase vis-à-vis de la dénaturation thermique (Egas et *al.*, 1998). Cependant les ions  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  et  $\text{Fe}^{2+}$  sont également des activateurs de l'alpha-amylase (Schomburg et Salzmann, 1991).

Par ailleurs, l'alpha-amylase peut être sensible à plusieurs agents inhibiteurs comme l'EDTA (agent chélateur du calcium) et les métaux lourds. Lefuji et ses collaborateurs (1996) rapportent dans leur étude, sur l'alpha-amylase d'origine levurienne de *Cryptococcus sp*, que les métaux lourds comme  $\text{Hg}^{2+}$  (25%),  $\text{Ag}^+$  (51%),  $\text{Cu}^{2+}$  (52%) et  $\text{Zn}^{2+}$  (87%) inhibe l'activité enzymatique. Par contre, les ions  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  et l'EDTA n'ont aucune influence sur l'enzyme à une concentration de 1Mm (Lefuji et *al.*, 1996).

Les alpha-amylases peuvent être inactivées par la chaleur, l'urée à 8M (Hamilton et *al.*, 1999), l'acide formique, l'acide oxalique, l'acide lactique et l'acide citrique, par contre l'acide acétique stimule l'alpha-amylase (Ali et Abdelmoneim, 1989).

### **2-3-1-5- Origines de l'alpha-amylase**

Les  $\alpha$ -amylases sont abondantes dans tous les règnes, elles ont été isolées par extraction à partir des tissus végétaux et animaux ou par fermentation par des cellules microbiennes (Haq et *al.*, 2003 et Srinivasa et *al.*, 2004).

#### **a-Origine animale**

Les amylases d'origine animale sont généralement extraites à partir de la salive et du pancréas des mammifères (French, 1975). Les L'alpha -amylase animales sont incapables d'hydrolyser la liaison  $\alpha$  (1-6) de l'amylopectine ou du glycosyl oligosaccharides, l'hydrolyse complète de l'amylose et de l'amylopectine par les  $\alpha$ -amylases animales donne respectivement du maltose et du D-glucose pour l'amylose et du glucose, maltose et des dextrans limites pour l'amylopectine (Coolbear et *al.*, 1992).



### **b-Origine végétale**

Les alpha-amylases végétales possèdent une importance primordiale dans le métabolisme glucidique ou elles participent à la conversion de l'amidon en le réduisant en sucres réducteurs qui sont la source énergétique nécessaire à la germination (Octavio et *al.*, 2000). Ces enzymes végétales sont synthétisées par un mécanisme cellulaire compliqué, au cours de la germination des graines qui requiert une activité enzymatique très importante pour la mobilisation des réserves et le développement de l'embryon (Brawn et *al.*, 1993).

### **c-Origine microbienne**

#### ✓ **$\alpha$ -amylase bactérienne**

Ce type d'enzyme est obtenu principalement par fermentation de *Bacillacees* (Milner et *al.*, 1997). Historiquement la première enzyme a été produite à partir de souches de *Bacillus amyloliquefaciens*, *B. licheniformis* (Bousseboua, 2002) ou *B. Subtilis*, (Mctigue et *al.*, 1995).

Cependant d'autres espèces, produisant également cette enzyme telle que *Thermobifida fusca* (Chao-Hsun Yang et Wen-Hsiung Liu, 2004), *Streptomyces sp.* (SamratChakrabortya et *al.*, 2009). De nombreuses amylases aux propriétés industrielles ont été découvertes chez des bactéries acidophiles, alcalinophiles et thermophiles. Ces enzymes interviennent dans la transformation de l'amidon par fragmentation rapide en clivant les liaisons  $\alpha$  (1-4) (Nadirman et *al.*, 2006).

#### ✓ **$\alpha$ -amylase fongique**

La production industrielle d'enzymes à partir des microorganismes fongiques existe depuis longtemps du fait que la première production de l'alpha-amylase a été réussie par Takamine en 1894.

Les producteurs principaux de l'alpha-amylase sont les moisissures des genres *Aspergillus* et *Rhizopus* (tableau 3). En plus des moisissures, les levures participent également à la production de l'alpha- amylase (Bouix et Leveau, 1999) (tableau 6).

**Tableau 6 :** Les différentes origines de l'alpha -amylase microbienne.

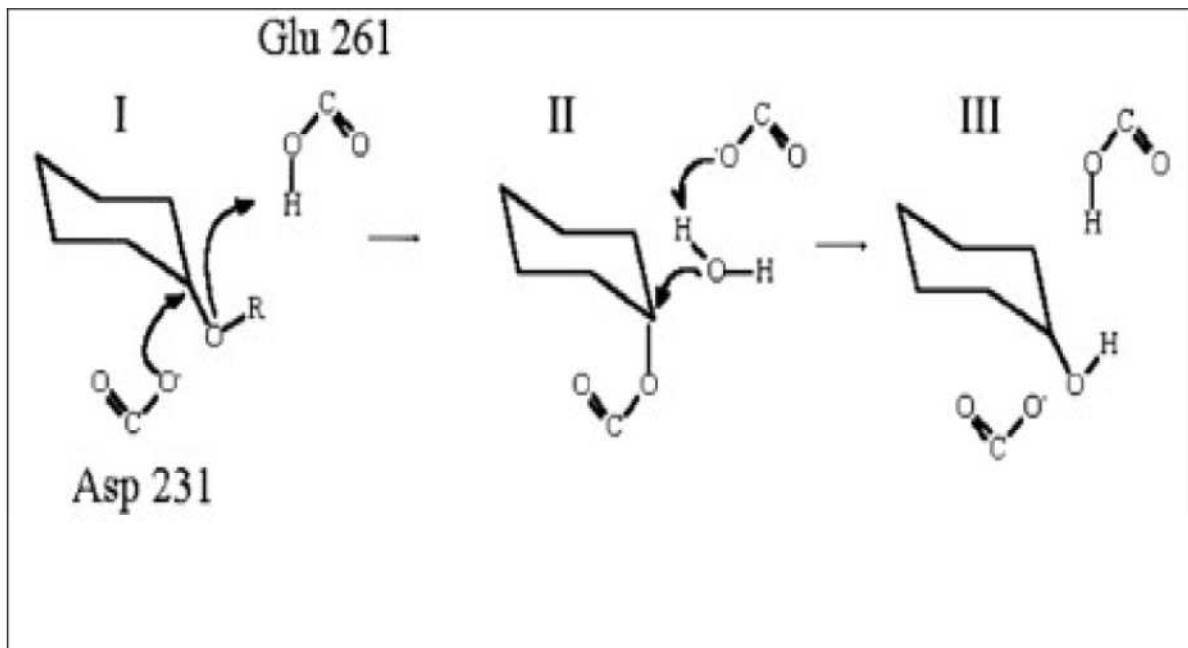
Origine microbienne	Références
<p><b>Bactéries</b></p> <p><i>Bacillus licheniformis</i>  <i>Bacillus steorothermophilus</i>  <i>Bacillus circulans</i>  <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>  <i>Bacillus coagulans</i>  <i>Thermomonospora fuska</i>  <i>Alteromonas haloplanktis</i>  <i>Termus filiformis</i>  <i>Streptomyces rimosus</i></p>	<p>(Kandra et al., 2002).  (Dauter et al., 1999).  (Dey et al., 2002).  (Uiger et çurakoglu ,2001).  (Babu et Satyanaray, 1993).  (Bush et Stutzenberger,1997).  (Feller et al., 1992).  (Egas et al., 1998).  (Vukelié et al., 1992).</p>
<p><b>Moisissure</b></p> <p><i>Aspergillus oryzae</i>  <i>Aspergillus niger</i>  <i>Aspergillus flavus</i>  <i>Aspergillus sojae</i>  <i>Rhizopus oryzae</i>  <i>Rhizopus sp.</i>  <i>Penicillium griseoroseum</i></p>	<p>(Agger et al.,1998).  (Botton et al., 1990).  (Aidoo et al.,1981 ; Khoo, 1994 ; Abou Zeid, 1997).  (Lucio et al., 1996 ; Cuveillier, 1999).  (Soccol et al., 1994 ; Cuveillier, 1991).  (Ray, 2001).</p>
<p><b>Levure</b></p> <p><i>Saccharomyces cerevisiae</i>  <i>Candida sp.</i>  <i>Pichia sp.</i>  <i>Endomycopsis sp.</i>  <i>Lipomyces sp.</i></p>	<p>(Ruohonen et al., 1991 ; Wang et Kuo, 2001).  (Bouix et Leveau, 1999).</p>

### 2-3-1-6- Mécanisme d'action

L'activité catalytique de l'enzyme implique la participation des trois acides aminés du site actif : Asp 231 (nucléophile catalytique), Glu 261(donneur catalytique de l'hydrogène) et Asp328 (l'aide de catalyse) (Mc carter et Withers, 1996 et Uitdehaag et al., 1999). En effet, la réaction catalytique est réalisée en trois étapes (figure 4) :

- a/ Protonation de l'oxygène glucosidique par le donneur de proton Glu 261 suivi d'une attaque nucléophile sur C1 du résidu du sucre en position 1 par Asp 231 et le départ de l'extrémité réductrice du substrat .

- b/ Activation d'une molécule d'eau, vrai semblablement par le maintien du Glu261 déprotonné.
- c/ Régénération de l'état initial et libération de l'autre fragment du substrat, par hydrolyse du lien covalent entre l'oxygène nucléophile de l'Asp 231 et le C1 de résidu du sucre en position 1 (Davies *et al.*, 1999 ; Nielson *et al.*, 2001).



**Figure 4 :** Mécanisme catalytique des hydrolases glycosyliques (Nielsen *et al.*, 2001).

### 2-3-1-7- Production d'alpha-amylase

Plusieurs auteurs travaillent au criblage des microorganismes pour la production d'enzymes, l'isolement et la production des alpha-amylases extracellulaires (Jensen *et al.*, 1987 ; Haasum *et al.*, 1991), ainsi que la purification et la caractérisation de ces dernières (Nguyen *et al.*, 2000). Des alpha-amylases microbiennes sont maintenant industriellement produites, par des espèces de *Bacillus*, *Aspergillus* et *Rhizopus*, par fermentation submergée ou semi solide (Niehaus *et al.*, 1999; Bel'en *et al.*, 2006).

Actuellement, la production d'alpha-amylase met en jeu des procédés biotechnologiques à moindre coût, utilisant comme substrat de fermentation des déchets organiques, tels que la pulpe de betterave (Baldwin *et al.*, 1986), les déchets d'oranges (Nouadri *et al.*, 2010 ; Djekrif *et al.*, 2006 ; Bennamoun *et al.*, 2004 et Diomi *et al.*, 2008), les produits céréaliers (Pascal et

Thomas, 1990 ), les rebuts des dattes (Açourène et Ammouche, 2011) et le lactosérum (Djekrif et *al.*, 2014 et Ait Kaki et *al.*, 2012). Le milieu de fermentation contient en général l'amidon, considérée comme meilleur inducteur de l' $\alpha$ -amylase bactérienne (*Lanuginosus thermomyces*) et fongique (*Aspergillus* et *Penicillium*) (Leveau et Bouix, 1993).

### **2-3-1-8- Utilisation de l' $\alpha$ -amylase**

La grande spécificité d'action de l' $\alpha$ -amylase et les conditions très douces dans lesquelles elle opère confèrent un avantage certain sur les catalyseurs chimiques ordinaires. Aussi, l'usage des préparations enzymatiques s'est considérablement développé dans de nombreux secteurs de la bio-industrie. En effet, de nombreux secteurs d'activité ont mis à profit depuis une trentaine d'année la bio-spécificité de l'enzyme et l'utilise comme agent de production de métabolites comme aides technologiques ou comme outils analytiques. Les industries pharmaceutique, alimentaire et chimique sont les principaux utilisateurs de cette enzyme (Cuveillier, 1999 ; Pandey et *al.*, 2000).

#### **a- Industrie alimentaire**

- **En panification**

L'amidon et les enzymes responsables de sa modification sont utilisés par les industries de cuisson en grande quantité dans le monde entier. L'un des problèmes majeur auquel est confronté l'industrie de cuisson est l'effet de rassissement (Zobel et Kulp, 1996). Ce dernier conduit à une augmentation de la fermeté de mie, une perte de netteté de la croûte, une réduction de la teneur en humidité de la mie et de la saveur du pain. Ceci réduit considérablement la qualité du pain et autres produits (Hug-Iten et *al.*, 2003). Ce problème est essentiellement résolu par les traitements chimiques. Mais de nos jours, les consommateurs préfèrent le traitement enzymatique, donc biologique, avec moins d'effets néfastes sur la santé. L'addition d'une petite quantité de l' $\alpha$ -amylase dans la farine augmente la production de gaz carbonique après fermentation et conduit ainsi à l'obtention d'un pain aéré et très léger (Pandey et *al.*, 2000).

- **En glucoserie**

Dans les industries de sirop de sucre, l' $\alpha$ -amylase conduit à la préparation de mélanges d'oligosides linéaires et ramifiés connus commercialement sous le nom de maltodextrines ou de sirop de glucose. Le traitement de l'amidon simultanément avec l' $\alpha$ -amylase stimule

l'efficacité de la réaction de saccharification et génère des rendements plus élevés du produit final (Saha *et al.*, 1988; Silva, 2005 ; Nair *et al.*, 2006).

- **En brasserie**

Pendant le brassage de la bière, l'amidon est décomposé par l' $\alpha$ -amylase en dextrines et en sucres fermentescibles pour former un moût sucré. Le houblon est bouilli avec le moût sucré pour produire le moût houblonné. Les levures agissent alors sur le moût houblonné ultimement pour produire de la bière (Prakash *et al.*, 2012).

**b- Industrie non alimentaire :**

- **En industrie du textile**

- Il forme une couche protectrice entourant les fils afin d'éviter leur désagrégation au cours du tissage.
- Il est utilisé pour la finition des vêtements afin de les rendre plus fermes, plus rigides et plus lourds.
- Il permet l'impression du tissu ou la création de certaines couleurs sur la surface du textile.

Les amylases alcalines (à  $\text{pH} \geq 8.0$ ) et thermostables conviennent parfaitement à l'industrie du textile pour la saccharification de l'amidon, en blanchisserie pour éliminer l'apprêt amylicé et les taches (De souza and De Oliveira, 2010).

- **En industrie des détergents**

L'utilisation d'enzymes dans les détergents a augmenté ces dernières années. De nos jours, 90 % de tous les détergents contiennent ces enzymes (Gupta *et al.*, 2003 et Mitidieri *et al.*, 2006).  $\alpha$ -amylase à  $\text{pH} \geq 8.0$  a des applications potentielles pour la saccharification de l'amidon et les textiles et est également utilisée dans l'industrie des détergents pour les lave-vaisselles automatiques et les blanchisseries (Kim *et al.*, 1995; Hatada *et al.*, 2001; Schallmey *et al.*, 2004 et Mukherjee *et al.*, 2009).

- **En papeterie**

L' $\alpha$ -amylase en papeterie sert à liquéfaction de l'amidon pour préparer la sauce de couchage permettant d'éliminer les irrégularités superficielles de la feuille (Tolan, 1996).

### **c-Utilisation de l' $\alpha$ -amylase dans le domaine médical et pharmaceutique**

Dans le domaine pharmaceutique, l' $\alpha$ -amylase est utilisée comme agent anti-inflammatoire en soutenant le traitement par des antibiotiques, ou comme un aide digestif pour éviter les dyspepsies et les fermentations intestinales (Vidal, 2003). Dans le domaine médical, l' $\alpha$ -amylase dans les liquides biologiques peut déceler certaines maladies : insuffisance cardiaque, oreillons, cancer du pancréas... (Pandey *et al.*, 2000).

### **d-Autres applications :**

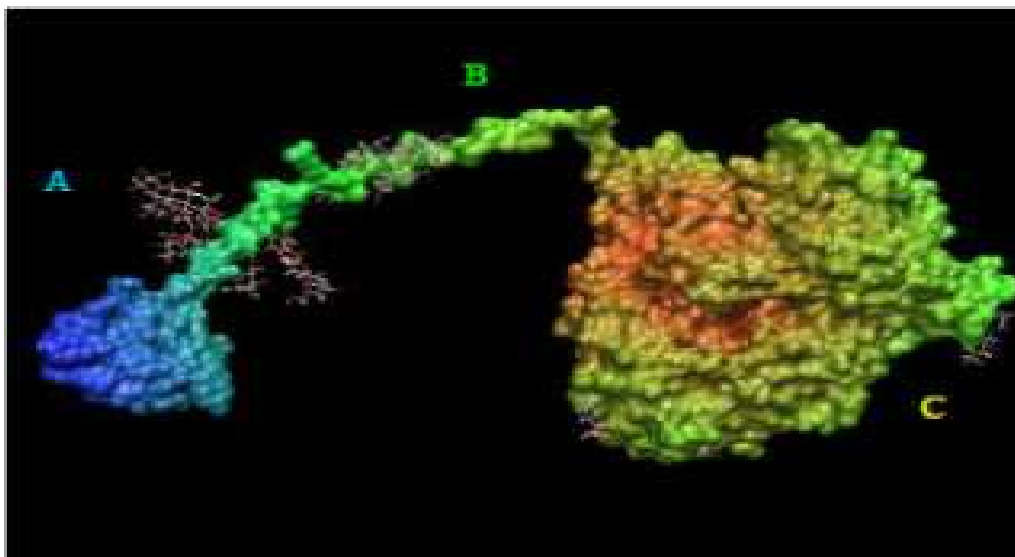
Les  $\alpha$ -amylases peuvent être employées dans les traitements des eaux résiduaires par élimination de l'amidon (Michelen et Castillo, 1984).

### **2-3-2-Cellulase (EC 3.2.1.4)**

Une cellulase (1,4- (1,3 ; 1,4) - beta-D - Glucan4 -glucanohydrolase) est une enzyme qui peut décomposer la cellulose. Elle est produite typiquement par des bactéries, des levures et des protozoaires, qui jouent un rôle majeur dans la digestion par les animaux, et dans la transformation de la matière organique végétale en humus dans le sol. Elles ont aussi des applications biotechnologiques et industrielles.

#### **2-3-2-1-Structure de la cellulase**

La majorité des cellulases microbiennes étudiées sont des glycoprotéines (Beldman *et al.*, 1985) et ne sont pas des métalloprotéines (Saha *et al.*, 1994). Elles ont généralement une structure modulaire avec deux domaines fonctionnels distincts : Le site catalytique et le site de fixation du substrat, habituellement reliés entre eux par un peptide glycosylé flexible riche en Ser / Pro et Thr appelé « linker » (Figure 5) (Cavako-Paulo, 1998 ; Receveur *et al.*, 2002 ; Hasper *et al.*, 2002).



**Figure 5:** Exocellulase CBHI(Ce 17A) de *Trichoderma reesei* (john *et al.*, 2005)

(A :le site de fixation, B :le linker glycosylé , C :le site catalytique)

### 2-3-2-2- Les enzymes cellulolytiques

Sous le nom de cellulase, sont regroupées plusieurs enzymes dont seule l'action synergique peut aboutir à l'hydrolyse complète de la cellulose cristalline.

L'activité cellulolytique se traduit par l'action de trois types d'enzymes :

#### a- L'exo $\beta$ (1-4) glucanase ou Cellobiohydrolase : EC (3.2.1.91)

Cet enzyme attaque les polymères de cellulose par les extrémités non réductrices et libère exclusivement du cellobiose. L'enzyme seul attaque les celluloses partiellement dégradées. Le rôle essentiel de cet enzyme est de permettre l'action de l'endocellulase sur la cellulose cristalline. Quelques champignons filamenteux (*Trichoderma reesei*, *Trichoderma koningii*, *Fusarium solani*, *Chaetomium thermophile*, *Sporotrichum pulverulentum*) seulement semblent disposer d'une cellobiohydrolase (Scriban, 1999).

#### b- Endo $\beta$ (1-4) glucanase ou Endocellulase : EC (3.2.1.4)

L'endocellulase est capable de rompre les liaisons internes de la chaîne cellulosique. Elle attaque au hasard et entraîne la libération de cellodextrines, de cellobiose et de glucose. L'endocellulase est très active sur les celluloses solubles. (Hasper *et al.*, 2002).

La complémentarité des deux types d'enzymes cités ci-dessous explique en partie l'effet synergique du mélange.

### **c- B(1-4) glucosidase ou Cellobiase : EC (3.2.1.21)**

La cellobiase hydrolyse la liaison  $\beta$  glucosidique du cellobiose et libère deux molécules de glucose. Selon sa spécificité, la cellobiase peut être active sur les  $\beta$  (1-4) oligoglucosides, mais l'activité diminue rapidement quand la longueur de la chaîne augmente. (Scriban, 1993, Jossefsson, 2006).

Le complexe enzymatique de la cellulase travaille en synergie, c'est-à-dire qu'une coopération d'action entre les trois composantes d'enzymes, dans laquelle le produit d'une réaction enzymatique devient le substrat pour une autre (Fang, 2008).

### **2-3-2-3 Caractéristiques des cellulases**

#### **a-pH optimum**

La plupart des préparations cellulolytiques étudiées ont un pH optimum variant de 3 à 7 (Lynd *et al.*, 2002). Celles d'origine fongique ont une gamme plus limitée (pH de 4 à 5) contrairement aux cellulases bactériennes dont le pH optimum est proche de la neutralité (Buchholz *et al.*, 1983).

#### **b-Température optimale**

La température optimale des cellulases fongiques varie entre 40 et 70 °C alors que celle des bactéries varie entre 50 et 100°C, ce qui explique leur utilisation en industrie du textile (Ando *et al.*, 2002).

### **2-3-2-4-Les différentes origines de la cellulase**

Les cellulases sont largement répandues dans la nature (Xu *et al.*, 2000). Elles sont recensées chez des organismes très divers : bactéries, champignons, plantes, protozoaires, vers, mollusques, insectes etc...(Odier et Rouau, 1985). De ce fait, les cellulases peuvent avoir plusieurs origines : animale, végétale ou microbienne.

#### **a- Origine animale**

Plusieurs espèces animales (omnivores et herbivores) utilisent la cellulose comme source d'énergie, malgré leur incapacité à produire des cellulases endogènes, mais ceci est dû à une vie symbiotique des microorganismes dans leur système digestif (Smant *et al.*, 1998). Ainsi, peu de cellulases endogènes ont été décrites chez des organismes supérieurs (Xu *et al.*, 2000).



### **b- Origine végétale**

Les cellulases jouent un rôle important dans la maturation des fruits où elles participent à la libération des arômes (Cordonnier *et al.*, 1986). Ces enzymes végétales sont généralement obtenues par extraction à partir des fruits tels que les grains de raisin, les amandes douces (Ricci *et al.*, 1999), de l'avocat *Persea americana* (Blume et Ennis, 1991), des céréales tels que l'orge (Dan *et al.*, 2000) et le riz de la variété *Oryza sativa* (Xu *et al.*, 2000).

### **c- Origine microbienne**

Chez les levures, les genres pouvant présenter une activité cellulasique, sont beaucoup plus rares, néanmoins on peut citer le genre *Trichosporon* (Scriban, 1999), *Candida wickerhamii* dont l'activité cellulasique est uniquement de type  $\beta$ -glucosidase (Gunata *et al.*, 1990), ainsi que *Khryveromyces lactis* avec deux endoglucanases Egl A et Egl B (Hasper *et al.*, 2002). Tous ces microorganismes sont capables de dégrader la cellulose native (Williams et Orpin, 1987 ; Hebraud, 1988). Chez des champignons aérobies strictes, (*Neocallimastix frontalis*, *Sphaeromonas communis* et *Piromonas communis*) il a été mis en évidence un équipement enzymatique très complet leur permettant d'hydrolyser les polysaccharides des parois cellulaires végétales. D'autres espèces anaérobies telles que les *Chytridomycètes* sont connues pour leur capacité à dégrader la cellulose dans les appareils gastro-intestinaux des ruminants (Carlile *et al.*, 1997).

### **2-3-2-5-Application industrielle de la cellulase**

La biotechnologie des cellulases a débuté vers les années 1980 dans l'alimentation animale (Chesson, 1987) et ensuite dans l'industrie du textile, de la lessive et du papier. Actuellement, elle occupe environ 20 % du marché mondial des enzymes (Bhat, 2000, Lekchiri *et al.*, 2006). Les performances élevées atteintes leurs ouvrent des perspectives intéressantes pour différentes applications industrielles (Scriban, 1993), dans les industries de transformation de l'amidon, de brasserie, l'extraction de jus de fruits et légumes (Gao *et al.*, 2008). L'une des applications potentielles des cellulases est la production d'éthanol-carburant à partir de la biomasse lignocellulosique.

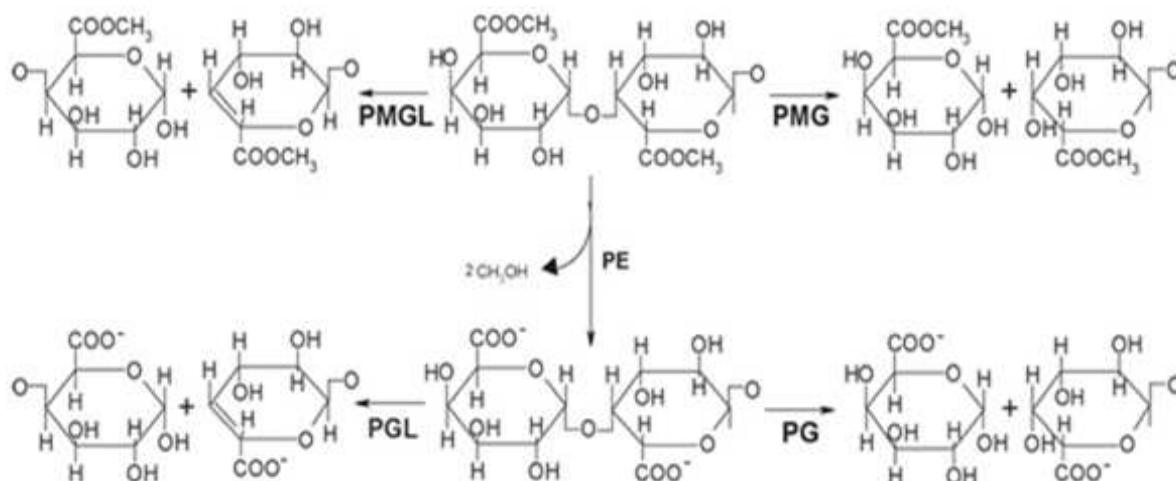
## 2- 3-3- Les enzymes pectinolytiques

### 2-3-3-1-Définition

Les enzymes pectinolytiques ou pectinases sont un groupe hétérogène d'enzymes qui hydrolysent les substances pectiques et qui sont largement distribuées dans les plantes supérieures et dans les micro-organismes. Cette famille d'enzymes est capable d'attaquer une variété de liaisons chimiques des pectines. Le terme « enzyme pectinolytique » ne concerne que les enzymes qui agissent sur la partie galacturonique des substances pectiques et les enzymes capables de dégrader les chaînes latérales ne sont pas classées parmi les enzymes pectinolytiques (Parenicova *et al.*, 2000 et Torres *et al.*, 2013).

### 2-3-3-2- Classification des enzymes pectinolytiques

Les enzymes pectinolytiques sont classées selon la nature du substrat (pectine, acide pectique, oligogalacturonate), le mécanisme de dégradation (trans-élimination ou hydrolyse) (figure 6), et le type de clivage (endo ou exo) (Favela-Torres *et al.*, 2006). Ces enzymes peuvent être divisées en deux grands groupes : les pectinestérases (PE) ou pectine-méthylestérases (PME) et les dépolymérase (polygalacturonases et lyases).



**Figure 6** : Mode d'action des pectinase PMGL : polyméthylgalacturonate lyase ; PMG : polyméthylgalacturonase ; PE : pectinestérase ; PGL : polygalacturonate lyase ; PG : polygalacturonase (Kouhonde *et al.*, 2014).

#### 2-3-3-2-1-Pectinestérases (PE) ou pectine-méthylestérases (PME)

Les PE catalysent l'hydrolyse des liaisons esters méthyliques des pectines HM, entraînant la libération de méthanol et la formation d'acide polygalacturonique. L'activité de la PE peut être

suivie soit par le dosage du méthanol libéré, soit par la détermination de l'augmentation du nombre de carboxyles libres ou encore en utilisant un régulateur de pH. En effet, l'ionisation du groupe carboxyle produit un proton dans le milieu, ce qui cause une variation du pH (Jayani et *al.*, 2005).

### **2-3-3-2-2-Dépolymérase**

Les dépolymérase sont des hydrolases (polygalacturonases et lyases) qui possèdent des activités endo- ou exo-galacturonases. Les dépolymérase peuvent être subdivisées, en fonction du substrat et du mécanisme de clivage des liaisons glycosidiques, en quatre catégories différentes :

les polygalacturonases (PG), les polyméthylgalacturonases (PMG), les polygalacturonate lyases (PGL) et les polyméthylgalacturonate lyases (PMGL).

#### **a-Les polygalacturonases (PG)**

Les PG sont des enzymes pectolytiques qui catalysent l'hydrolyse des liaisons glycosidiques  $\alpha$ -(1-4) des pectines acides (acide polygalacturonique). Ces enzymes sont spécifiques des substances pectiques non ou partiellement estérifiées par du méthanol. Elles sont les plus étudiées parmi la famille des enzymes pectolytiques. Les PG impliquées dans l'hydrolyse des substances pectiques sont des endo-PG (EC 3.2.1.15) et des exo-PG (EC 3.2.1.67) (Jayani et *al.*, 2005).

#### **b-Polyméthylgalacturonase (PMG)**

Les polyméthylgalacturonases hydrolysent la liaison  $\alpha$  -(1-4) entre deux résidus d'acide galacturonique. Ce sont des glycosyl hydrolases. Selon leur mode d'action, il est possible de distinguer les endo- et les exo-polyméthylgalacturonases.

#### **c-Les lyases ou transéliminases**

Les lyases dégradent la pectine, les oligomères et les polymères d'acide galacturonique. Ce sont des enzymes qui rompent la liaison glycosidique C-O par un mécanisme de  $\beta$ -élimination. Leur action dépolymérisant entraîne la libération d'uronides insaturés et d'oligomères de petite taille.

Comme pour les PG, selon que la réaction enzymatique se fait au hasard ou à l'extrémité de la chaîne, on distingue les endo- et les exo-lyases. Les réactions catalysées par les lyases sont illustrées à la figure 6.

### **d-Polyméthylgalacturonate Lyase (PMGL) (E.C. 4.2.2.10)**

- Les endopolyméthylgalacturonate Lyases qui hydrolysent de façon aléatoire les liaisons  $\alpha$  1-4 des pectines.
- Les exopolyméthylgalacturonate Lyases qui hydrolysent de façon récurrente les pectines par réaction de transélimination.

Les PMGL sont les seules dépolymérase capable de dégrader les pectines HM sans action préalable d'autres enzymes (Jayani et *al.*, 2005).

### **2-3-3-3- Origine des enzymes pectinolytiques**

La plupart des préparations commerciales de pectinases sont d'origine fongique. *Aspergillus niger* est la source fongique la plus communément utilisée pour la production industrielle d'enzymes pectinolytiques (Jayani et *al.*, 2005). Par ailleurs, différentes espèces de levures productrices de polygalacturonase sont utilisées industriellement pour améliorer la qualité des jus fruits, telles que : *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Candida*, *Cryptococcus* et *Geotrichum* (Merin Maria Gabriel et *al.*, 2015 ; Naumov et *al.*, 2016 ; Pagani et *al.*, 2016 ; Belda et *al.*, 2016 ; Moubasher et *al.*, 2016)

### **2-3-3-4- Application industrielle des pectinases**

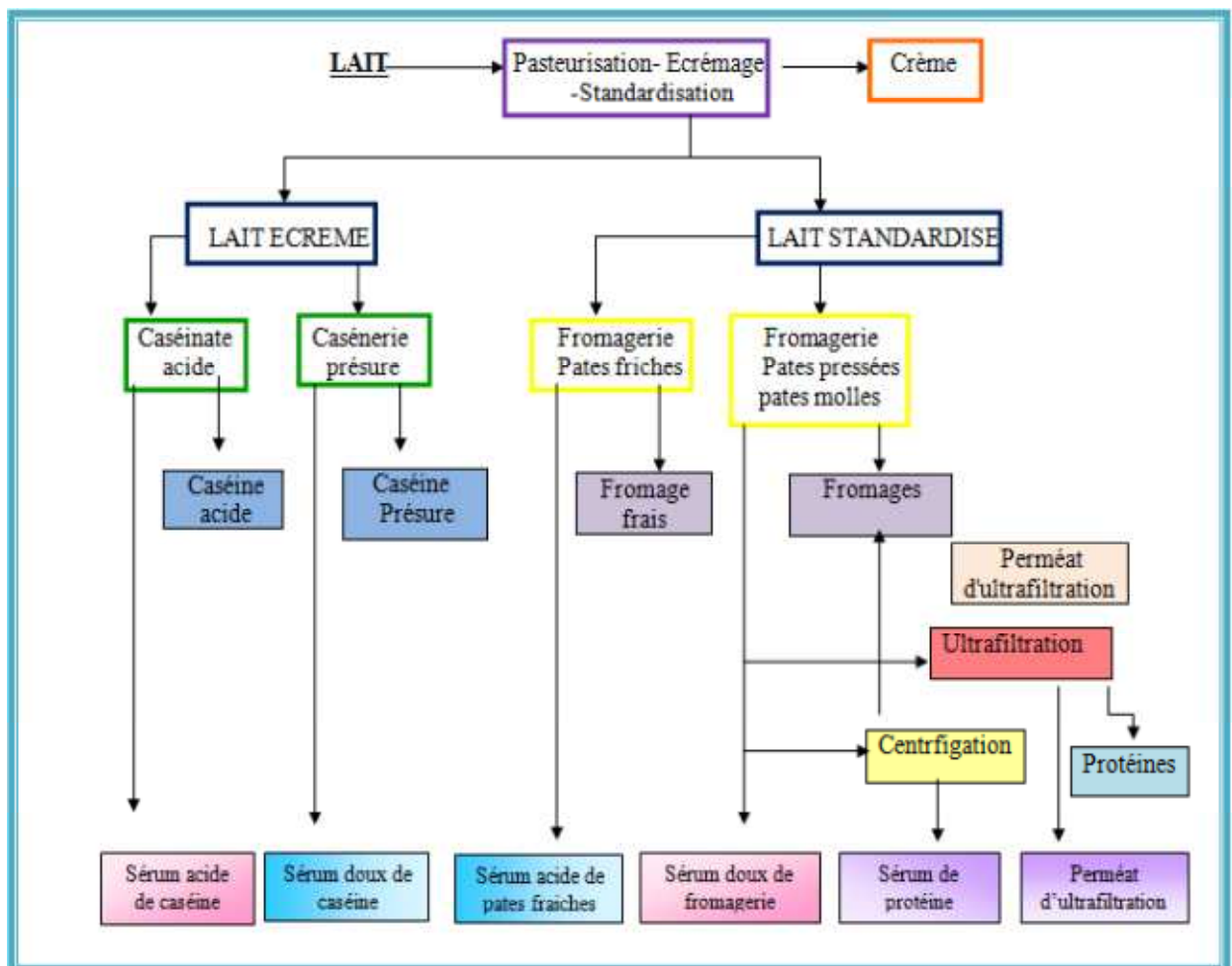
L'industrie des jus offre, aux dépolymérase des substances pectiques, un large champ d'utilisation dans la transformation des produits végétaux. Ces enzymes trouvent ainsi, plusieurs applications dans les productions diverses, telles que les boissons à base de fruits ou de légumes et autres. Parmi ces enzymes, les polygalacturonases (PG) ont un effet considérable sur la modification des propriétés physico-chimiques des pectines et des pectates (Rzedowski, 1972; Durand et Monsan, 1982).

Le champ d'application de ces enzymes s'élargit, actuellement à d'autres productions que celles des jus de fruits et de légumes : comme pour l'extraction des huiles essentielles et des pigments caroténoïdes à partir des écorces d'agrumes (Bonnin et *al.*, 1997).

### 3- Lactosérum

#### 3-1- Définition

C'est un produit laitier liquide de couleur jaune obtenu durant la fabrication du fromage, de la caséine ou de produits similaires, par séparation du caillé après coagulation du lait et/ou des produits dérivés du lait. Le caillé représente l'ensemble des protéines non solubles et la matière grasse alors que le lactosérum contient toutes les substances solubles du lait (lactose, protéines et minéraux solubles, un peu de matière grasse) (Dion et *al.*, 1978; Luquet et Bonjean-Linczowski, 1985). Lors de la transformation du lait et la fabrication du fromage, les différentes voies technologiques (figure 7) permettent l'obtention de deux principaux types de lactosérum.



**Figure 7:** Voies technologiques permettant l'obtention des principaux types de lactosérums issus de la première transformation du lait (Alais, 1984).

- **Lactosérum doux**

C'est un coproduit des fromages à pâte cuite, à pâte pressé et de la caséine, obtenu après le traitement du lait par voie enzymatique, généralement par la présure, avec un pH variant entre 5,7 et 6,5.

- **Lactosérum acide**

C'est la phase aqueuse résultant de la fabrication des fromages à pâtes molles ou fraîches ou de caséines, pour lesquels le caillage à lieu sans emprésurage c'est-à-dire par acidification (coagulation lactique) d'où leur nom. Le pH du lactosérum acide varie entre 4 et 5 (Imbert-pondaven, 1977 ; Alais, 1975, Luquet et Bonjean-Linczowski, 1985).

### 3-2-Composition chimique

La composition chimique du lactosérum varie considérablement selon la source du lait (tableau 4), les différents traitements que l'on fait subir pour le transformer en produits consommables et les procédés de fabrication (Laplanche, 2004).

**Tableau 7 :** Composition chimique des deux types du lactosérum en g/l (Alais, 1975).

Composant Chimique	Lactosérum doux	Lactosérum acide
Matière sèche	55 à 75	55 à 65
Lactose	40 à 57	38 à 55
Lipides	0 à 5,0	0 à 2,0
Matières azotées totales	7,0 à 11,0	4,8 à 10,5
Cendres	4,0 à 6,0	6,0 à 8,0
Calcium	0,4 à 0,6	1,2 à 1,4
Phosphore	0,4 à 0,7	0,5 à 0,8
Potassium	1,4 à 1,6	1,4 à 1,6
Chlorure	2,0 à 2,2	2,0 à 2,2
Acide lactique	0 à 0,3	7,0 à 8,0

**Tableau 8** : Activité biologique des protéines et des peptides du lactosérum (McIntoch, 1998 ; Berry, 2000).

Protéine ou peptide	Activité probable
Protéines du lactosérum brut	Anti-cancérogène Stimule le système immunitaire Prolonge la durée de vie Réduit le cholestérol
$\beta$ lactoglobuline $\beta$ lactorphine $\alpha$ lactalbumine $\alpha$ lactorphine	Facilite la digestion Augmente le contrôle de la douleur Anti-cancérogène Augmente le contrôle de la douleur
Lactoferrine  Lactoferricine	Antimicrobien (antibactérien/antiviral) Contrôle le transport du fer Stimule le système immunitaire Anti-inflammatoire Favorise la croissance des cellules Anti-cancérogène Antimicrobien
Immunoglobuline	Immunité passive
Lactoperoxydase	Antibactérien
Sérum-albumine sérorphine	Augmente le contrôle de la douleur
Glycomacropéptide	Facilite la digestion

### 3-3- Intérêt industriel du lactosérum

Il n'y a pas si longtemps, le lactosérum liquide était souvent traité comme un déchet tandis qu'aujourd'hui on le considère comme un sous-produit (si ce n'est un produit) utile de la production laitière. Les produits à base de lactosérum constituent un segment relativement

neuf des marchés laitiers mondiaux. Depuis 1994, le commerce international du lactosérum a connu une hausse annuelle de près de 25% (Nakais et Modler, 2000).

### **3-3-1- Intérêt alimentaire**

Une quantité considérable de lactosérum est utilisée dans l'alimentation animale, et le marché international de l'alimentation animale et des ingrédients connexes est en pleine expansion. De plus, il constitue un ingrédient alimentaire à valeur ajoutée, utilisé dans une vaste gamme d'aliments et de boissons (Granger et Jean-Blain, 1982 ; Lowisfert, 1994 ; Dryer et al., 2001).

### **3-3-2- Intérêt médical**

Actuellement, les scientifiques évaluent les effets bénéfiques des fractions de protéines de lactosérum et leur intérêt qui pourraient offrir des avantages fonctionnels en matière de santé.

L'utilisation de ces fractions est fort prometteuse pour ce qui est d'offrir, aux secteurs de l'alimentation et de la nutrition, des occasions de développer de nouveaux produits vraiment efficaces contre les maladies du cœur (réduction du cholestérol et de la tension artérielle), les ulcères, les cancers, etc. (voir tableau 6) (Girard, 2000 ; Berry, 2000).

### **3-3-3- Intérêt biotechnologique**

En biotechnologie, le lactosérum par sa composition biochimique (riche en lactose et en protéines) possède d'intéressantes propriétés comme milieu de fermentation pour plusieurs microorganismes assimilant le lactose comme source de carbone et d'énergie. Il s'agit des levures de boulangerie telles que *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida kefyr* et *Kluyveromyces fragilis* (Metz et al., 1968 ; Ecalard, 1990 ; Gana et Touzi, 2001), cette dernière est cultivée sur le lactosérum doux déprotéiné et enrichi par des facteurs de croissance dans le but de produire de la biomasse (Gana et Touzi, 2001).

L'utilisation du lactosérum comme milieu de culture est également favorable au développement de moisissures. *Penicillium camemberti* a permis la production des protéases acides, neutres et alcalines en utilisant plusieurs facteurs de croissance sélectionnés par des méthodes statistiques (Jollivet et Belin, 1993 ; Mechakra et al., 1999 ; Benlounissi, 2004). Ce coproduit laitier a été utilisé aussi pour la fermentation de *Mucor miehei* et *Endothia parasitica* produisant des aspartylprotéases (Saint-Paul et al., 1984 ; Seker et al., 1999). Le lactosérum déprotéiné a servi comme milieu de base pour la production de la cellulase par



la moisissure *Aspergillus niger* (Leghlimi, 2004). Certaines espèces bactériennes comme *Lactobacillus bulgaricus* fermentent sur des milieux de cultures à base de lactosérum pour la production d'acides organiques et de différentes enzymes (Jannot et *al.*, 1984 ; Ecalard, 1990).

*Matériel*

*et*

*méthodes*

## 1-Matériel biologique

Les microorganismes utilisés dans notre étude sont les deux souches levuriennes *Clavispora lusitaniae* ABS7 (L7) et *Meyerozyma guilliermondi* (L6) isolées par Dr Dakhmouche-Djekrif Scheherazed à partir des grains de blé dur cultivés et stockés dans la région de Biskra :région aride du Sahara Algérien . Les grains de blé sont fournis par l'Institut Technique du développement des Agricultures Sahariennes (I.T.D.A.S.) de Biskra. Les souches sont conservé à -20° C en milieu YPGA avec glycérol comme cryoprotecteur et entre -20 et -70°C dans des Cryo-Billes.

## 2- Milieux de réactivation

Les milieux utilisés pour la réactivation des souches sont les suivants :

- YPGA: yeast extract peptone glucose agar (voir annexe)
- PDA :potatoes dextrose agar (voir annexe)
- Sabouraud commercial

Les milieux préparés sont répartis dans des flacons de 250 ml et stérilisés à 120°C pendant 20 min.

## 3- Réactivation des souches

- Couler les milieux stériles dans des boites de Pétri.
- Préparer, à partir d'une culture de 48h maximum, une suspension dense dans de l'eau stérile (1ml).
- Une fois les milieux solidifiés, ensemercer les boites avec une goutte de la suspension par étalement en stries.
- Incuber les boites de Pétri à 40°C pendant 48 à 72 h.
- Conserver à 4°C.

## 4-Mise en évidence des activités enzymatiques

Pour la mise en évidence des différentes activités enzymatiques maltasique, amylolytique, cellulasique, pectinolytique, protéique, 5 milieux de cultures sont préparés (Annexe1) :

## 4-1-Milieus de culture

Les Milieus de maltose, d'amidon, de cellulose, de pectine et de caséine sont préparés à raison de 1litre pour chaque milieu. Après stérilisation à 120 °C pendant 20 min, les milieux sont coulés dans des boites de Pétri.

## 4-2-Préparation de la suspension de cellules et ensemencement

- A partir d'une culture de 48h maximum, quelques colonies de L6 et L7 sont transférées séparément dans de l'eau distillée stérile jusqu'à une opacité Mac Farland 3.
- Repiquer 2 gouttes de chaque suspension au centre de la surface des milieux coulés.
- Incuber les boites ensemencées à 40°C, 50°C, et à 60 °C pendant 48 à 72 h.

## 4-3 -Révélation des activités enzymatiques

-L'activité  $\alpha$ -amylasique est révélée par le lugol, laissé agir 20 min

-L'activité enzymatique de la cellulase et de la maltase est révélée par le rouge congo 1%, laissé agir 20 à 30 min puis rinçage par le NaCl 5M, laissé agir 40 min.

-L'activité enzymatique de la pectinase est révélée par une solution d'iode-potassium iodide (Annexe 2).

## 5-Comparaison de la production enzymatique des souches L6, L7 et sélection de la souche la plus performante

La production des 5 enzymes :  $\alpha$ -amylase, pectinase, maltase, cellulase et protéase est étudiée et comparée chez les deux levures *Clavispora lusitaniae* ABS7 et *Meyerozyma guilliermondi* afin de sélectionner la souche la plus performante.

## 6-Etude de la production enzymatique

Pour réaliser cette étape, une fermentation submergée est effectuée dans des erlenmeyers de 500 ml contenant 100 ml de milieu de production à base de lactosérum.

### 6-1-Milieu de base

Le lactosérum traité a un pH de 4,46, issu de la fabrication des fromages. Le lactosérum renferme les composants solubles du lait : lactose, protéines, sels minéraux et des traces de matière grasse (Larpen et Sanglier, 1992).

Celui qui est utilisé dans notre travail, est fourni par la laiterie de Chaab Erssas, Constantine. Il est conservé à 4°C pour une courte durée de 24-48h ou à -20°C pour une durée plus longue.

### 6-1-1-Traitement du lactosérum

Le lactosérum est filtré à travers la gaze afin d'éliminer les impuretés. Avant son utilisation, le lactosérum subit un traitement de thermocoagulation sous l'action combinée du pH (ajusté à 4,6) et de la température à 100°C pendant 30 min afin de précipiter les caséines qui seront ensuite éliminées par filtration. Le filtrat constitue le milieu de base et sert à préparer le milieu de culture.

### 6- 2- Milieu de production

Pour l'alpha amylase : 500 ml milieu A + 1.34g d'amidon

Pour la cellulase : 500 ml milieu A +1.35g de CMC

Pour la pectinase : 500 ml milieu A +1.35g de pectine

La composition de milieu A est la suivante :

Lactosérum traité (milieu de base) 600 ml (Larpent-Gourgaud et Sanglier, 1992) +extrait de levure 0 ,22g+solution de sels 5,3 ml+ solution d'oligo-éléments 2,6 ml (Annexe 3).

### 6-3-Dénombrement des cellules

Le dénombrement cellulaire se fait par comptage sur la cellule de Thomas (0.100mm/0.0025mm<sup>2</sup>) par observation optique après une dilution de 1/10 de la solution mère de façon à obtenir une densité optique mesurable par spectrophotomètre. La densité optique de la suspension est déterminée à 600nm (Abs < 0.500) (Annexe 4).

## 7-Fermentation

Pour la production enzymatique par *C. lusitaniae* ABS7, la fermentation est réalisée en erlenmeyers de 250ml. Après stérilisation des erlenmeyers à 110°C pendant 15 min, les milieux à base de lactosérum traité sont ensemencés avec de  $2,5 \times 10^6$  cellules /ml de *Clavispora lusitaniae* ABS7. Les cultures sont incubées sous agitation à 110 rpm à température 45°C pendant 28 h.

## 8-Centrifugation

A la fin de la fermentation, le jus de la fermentation est centrifugé à 8000 g pendant 20 min . Le surnageant est récupéré et utilisé pour la détermination des activités enzymatiques et l'étude de la thermostabilité.

## 9-Dosage des activités enzymatiques

### 9-1-Dosage de l'activité $\alpha$ -amylasique

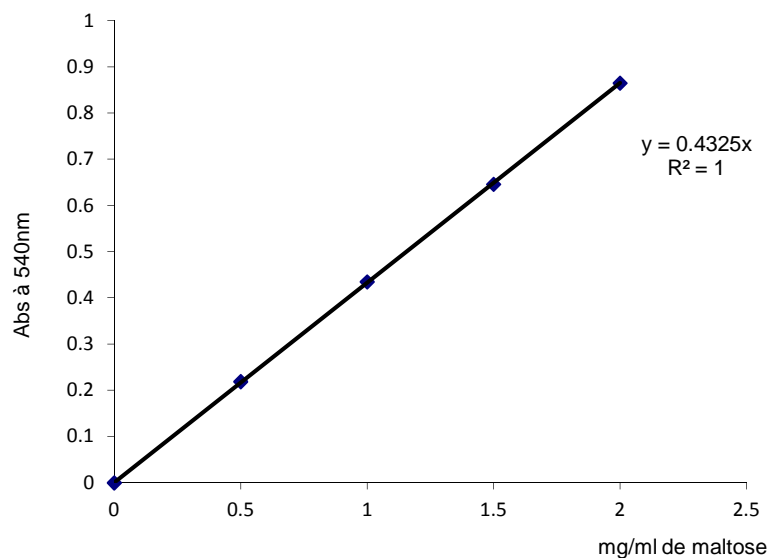
-Ajouter 0,5 ml de l'extrait enzymatique dilué à 0,5ml d'amidon à 1% dans du tampon Tris- HCl pH 8.

-Incuber le mélange réactionnel à 40°C pendant 30 min.

-Stopper la réaction par addition de 1 ml de solution DNSA (Annexe 5) et incuber à 100°C pendant 10 minutes.

-Lire l'absorbance des échantillons à 540 nm.

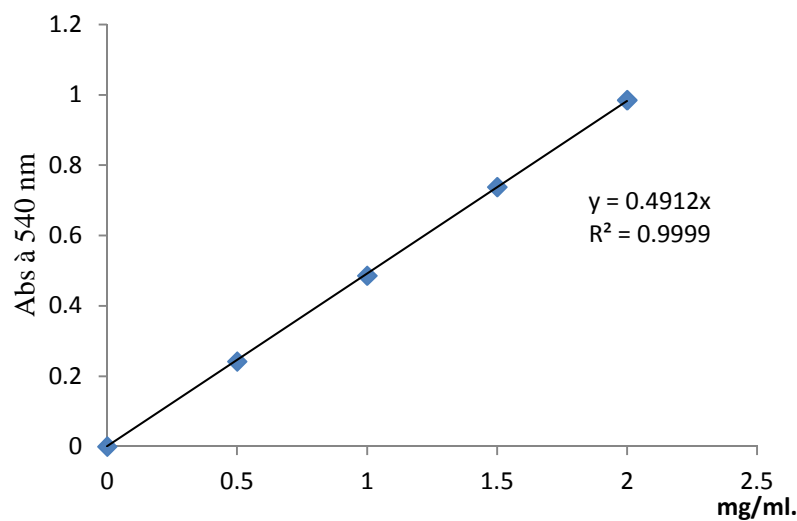
La réaction est colorimétrique et l'intensité de la coloration est proportionnelle à la quantité de sucre réducteur libéré par la réaction d'hydrolyse. L'activité  $\alpha$ -amylasique est définie comme la quantité d'extrait enzymatique nécessaire pour produire 1  $\mu$ mole de sucre réducteur (équivalent au maltose) par min (Bernfeld, 1955). L'absorbance est déterminée à 540 nm par rapport à une gamme d'étalon de 0 à 2 mg/ml de maltose (figure 8 ). L'unité amylasique est le nombre de  $\mu$ mole de maltose libéré par minute.



**Figure 8:** Courbe étalon du maltose

## 9-2-Dosage de l'activité pectinolytique

- Ajouter 100  $\mu$ l de l'extrait enzymatique dilué à 1/10 dans le tampon tris HCl pH 8 à 100 $\mu$ l pectine 1% dans du tampon tris HCl,pH 8
- Incubation à 40°C pendant 20 min
- Ajouter 400 $\mu$ l de DNSA
- Incuber à 100°C pendant 15 min puis refroidir.
- Ajouter 4,4 ml de l'eau distillée
- Lire l'absorbance à 540 nm, une courbe étalon de l'acide galacturonique est réalisée (Miller, 1959) (figure 9).



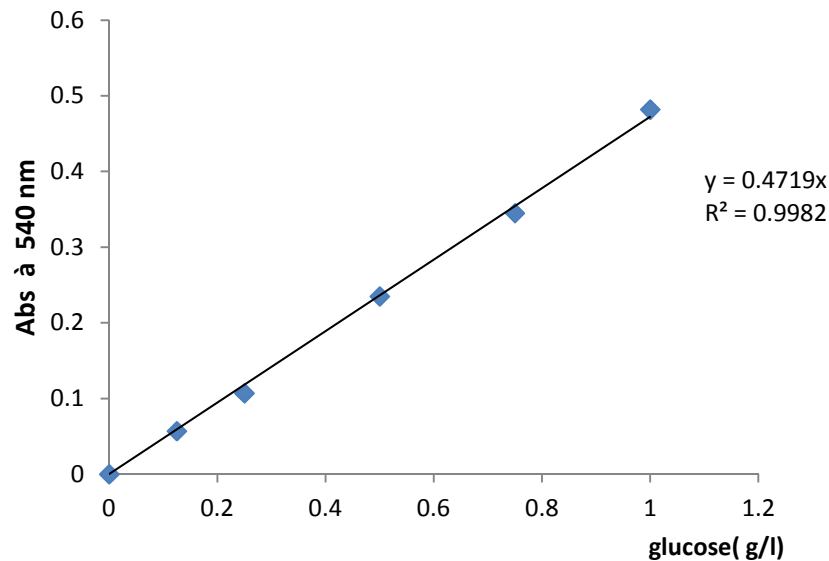
**Figure 9** : Courbe étalon de l'acide galacturonique

## 9-3- Dosage de l'activité cellulosique

Mélange réactionnel :

- Ajouter à 0.25 ml de l'extrait enzymatique dilué à 1/10 dans le tampon citrate, 0.25 ml CMC (1%)(Annexe 5)
- Incuber à 50 °C pendant 30min
- Ajouter 0.5 ml DNS et agiter
- Incuber à 100°C pendant 5 min
- Ajouter 2.5 ml de l'eau distillée
- Lire l'absorbance des échantillons à 540 nm.

-La courbe étalon du glucose est utilisée comme référence pour le calcul de l'activité enzymatique (Miller, 1959) en UI (figure 10 ).



**Figure10** : Courbe étalon du glucose

### 10-Dosage de protéines (méthode de Lowry)

#### 10-1-principe

Le principe de la méthode consiste à réduire le réactif de Folin-Ciocalteu (acides phosphomolybdique et phosphotungstique) en présence de protéines en un complexe bleu de molybdène. La réaction est précédée d'un prétraitement par un réactif de cuivre en milieu basique, ce qui permet d'en augmenter la sensibilité. Deux colorations sont mises en jeu :

- celle donnée par le réactif Folin-Ciocalteu (réactif des phénols)
- celle donnée par le sulfate de cuivre ( $\text{CuSO}_4$ ).

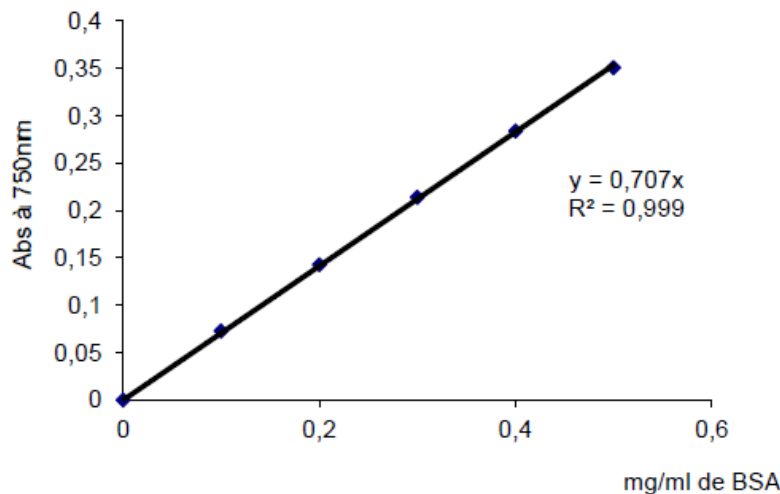
La lecture de la coloration s'effectue à 650 nm

#### 10-2- protocole

Le dosage des protéines est déterminé comme suit

- Ajouter à 0,5ml d'échantillon, 2,5 ml de la solution M (Annexe 6). Agiter et laisser reposer 10min à température ambiante.
- Ajouter 0,25 ml de réactif de Folin dilué et agiter.
- Laisser la réaction colorée se développer 30 min à l'obscurité, et lire l'absorbance à 650nm.
- La courbe étalon de BSA est présentée dans la figure 11.





**Figure11** : Courbe étalon des protéines

## 11-Purification de l'alpha-amylase

### 11-1- Précipitation des protéines par l'acétone

Le protocole consiste à mettre sous agitation un volume de l'extrait brut et quatre volumes d'acétone. Le mélange est mis à 4°C pendant une nuit avant d'être centrifugé à 12000 g pendant 20 min (Singh et al., 2012 et Asha et al., 2013).

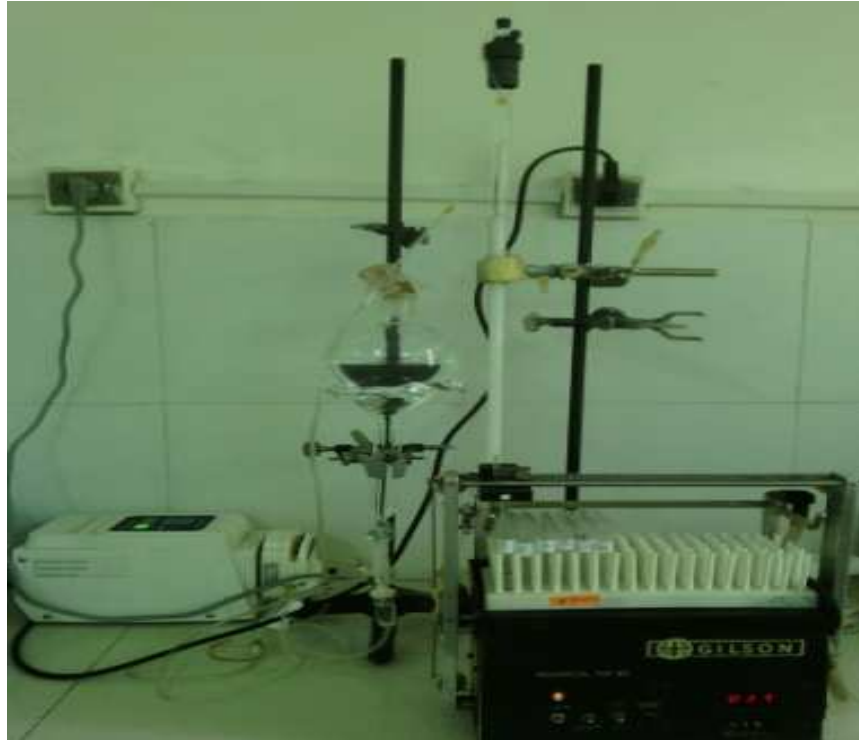
### 11-2-Ultrafiltration

Des tubes d'ultrafiltration AMICON 10 KD, permettant une concentration des protéines dont le poids moléculaire varie entre 30 et 90 KD, de 15 ml sont utilisés. Ce sont des dispositifs de filtre qui fournissent une ultrafiltration rapide, avec une concentration élevée et une récupération facile du concentré à partir d'un échantillon dilué.

Le concentrât est obtenu après une centrifugation à 7000 g pendant 30 min.

### 11-3-Chromatographie sur gel filtration

Un échantillon de 2ml de l'échantillon concentré est chargé sur un gel de séphacryl S200 dans une colonne de 1m x 1,6cm (figure 12), équilibré avec un tampon Tris HCl 0,2M à pH 8. Le débit d'élution est réglé à 0.5 ml/mn. L'éluat est collecté par fraction de 2 ml. Sur chaque fraction collectée, la densité optique à 280 nm et l'activité  $\alpha$ -amylasique sont mesurées. Les fractions ayant des activités enzymatiques élevées sont rassemblées.



**Figure12** : Dispositif de la colonne de chromatographie sur gel filtration (gel de séphacryl S200)

### **12-Dosage des protéines et de l'activité enzymatique des fractions rassemblées :**

Après rassemblement des fractions ayant des activités enzymatiques élevées, le Dosage des protéines ainsi de l'activité enzymatique sont effectuées.

### **13-Détermination des propriétés physico-chimiques de l' $\alpha$ -amylase de *Clavispora lusitaniae* ABS7 et d'une $\alpha$ -amylase commerciale**

#### **13-1-Détermination du pH optimum**

L'influence du pH sur les activités  $\alpha$ -amylasiques est déterminée par la mesure de l'activité à différents pH, variant de 5 à 12. Le tampon citrate phosphate 0,5 M est utilisé pour le pH 5, le tampon phosphate 0,05 M est utilisé pour le pH 6 et 7, ainsi que le tampon tris-HCl 0,02M pour le pH 8 et le tampon glycine-NaOH 0,05M pour les pH de 9 à 12 (Kamoun, 1997 et Hii et al, 2009 ).

#### **13-2- Détermination de la température optimale**

L'effet de la température a été étudié par la mesure des activités  $\alpha$ -amylasiques à pH 8 et à différentes températures variant de 40°C à 100°C avec un incrément de 10°C (Arikan, 2007).

### **13-3-Etude de la thermostabilité enzymatique**

La thermostabilité des deux enzymes est étudiée à 70 et à 100 °C pour l'enzyme purifiée et à 50 et à 100°C pour l'enzyme commerciale. La mesure de l'activité enzymatique résiduelle est effectuée après incubation de l'extrait enzymatique brut pendant une durée variable, allant de 0 à 180 min.

L'extrait enzymatique est réparti en volumes de 2ml dans des tubes placés au bain marie (Pelmont, 2000). Les différents échantillons des deux enzymes sont retirés les uns après les autres séparément à des temps déterminés et refroidis instantanément dans un bain de glace. Le protocole de dosage de l'activité amylasique est appliqué à chaque échantillon.

### **14- Effet de différents métaux et réactifs chimiques sur l'activité enzymatique**

Pour l'étude de l'effet des ions sur l'activité  $\alpha$ -amylasique, différents sels tels que le  $\text{FeCl}_2$ , le  $\text{ZnCl}_2$ , le  $\text{CuCl}_2$ , le  $\text{MgCl}_2$ , le  $\text{CaCl}_2$ , et le  $\text{MnCl}_2$  ont été utilisés. Les échantillons d' $\alpha$ -amylase purifiée et commerciale sont incubés avec chaque ion métallique (0,5ml) séparément, à 60°C pendant 30 min dans le tampon Tris HCl 0,2M, pH 8 puis les activités  $\alpha$ -amylasiques sont mesurées.

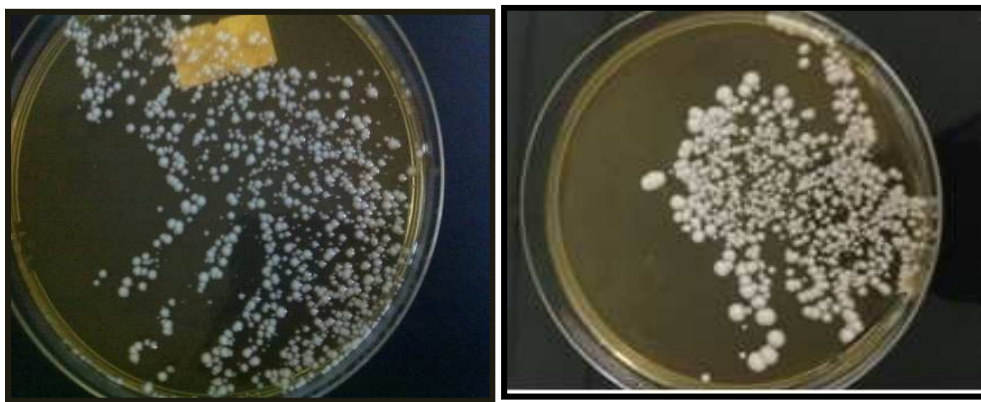
D'autres substances chimiques sont testées comme l'EDTA (2mM), l'urée (2M), le SDS (1%, w/v), le  $\beta$ -mercaptoéthanol (1%) et le tween 80 (1%) et le tris sur les deux activités  $\alpha$ -amylasiques .

Les activités enzymatiques sont déterminées après le traitement de l'enzyme : pré-incubation des enzymes avec chaque réactif à 60°C pendant 30 min.

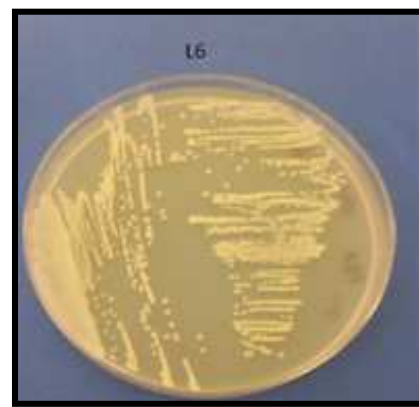
*Résultats*  
*et*  
*discussion*

### 1-Réactivation et morphologie des souches L6 et L7

Les deux souches L6 (*Meyerozyma guilliermondii*) et L7 (*Clavispora lusitaniae* ABS7) isolées d'écosystèmes arides, région de Biskra, Sud Algérien sont cultivées à 40°C pendant 48 h sur YPGA. Les deux souches ont bien poussé sur les différents milieux : YPGA, PDA et Sabouraud. La souche L7 pousse rapidement sur le milieu YPGA. Ses colonies sont blanches, crémeuses, lisses, bombée et d'aspect brillant. Sur le milieu PDA, les colonies de la levure L6 sont plates, humides, lisses et de couleur crème (figure 13).



**(A)**



**(B)**

**Figure 13:** Caractères macroscopiques de :


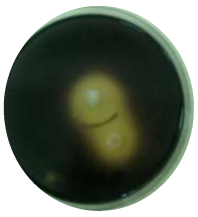

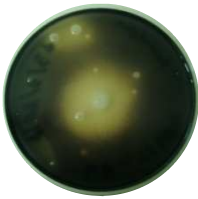

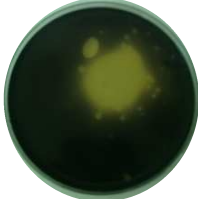

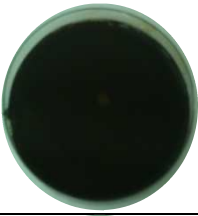



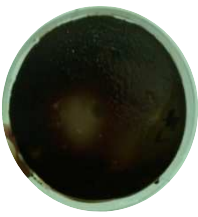

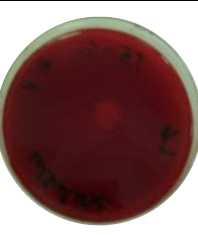

(A) *Clavispora lusitaniae* ABS7 sur YPGA





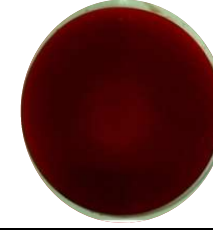
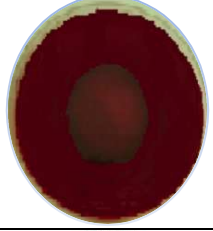


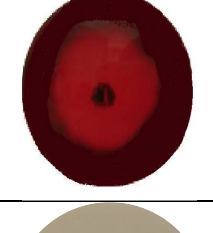



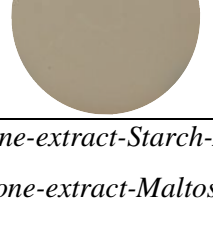
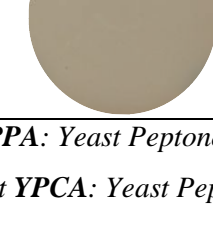
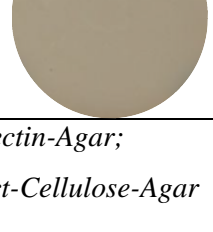
(B) *Meyerozyma guilliermondii* sur PDA.

**2- Mise en évidence des activités enzymatiques de L6 et L7 et sélection de la souche la plus performante pour l'activité  $\alpha$ -amylasique**

Pour la mise en évidence de la production des 5 enzymes ( $\alpha$ -amylase, pectinase, maltase, cellulase et protéase) sur des milieux solides et spécifiques par les deux souches de levure L6 et L7, une révélation spécifique des activités enzymatiques est réalisée (voir chapitre matériel et méthodes). Le tableau 9 récapitule les résultats obtenus.

**Tableau 9:** Mise en évidence des activités enzymatiques des deux souches amylolytiques (L6) et (L7) après 48 h d'incubation à différentes températures.

Milieu	Souche	40°C	Zone de lyse (mm)	50°C	Zone de lyse (mm)	60°C	Zone de lyse (mm)
YPSA	L6		19		23		25
	L7		28		25		30
YPPA	L6		10		0,5		36
	L7		10		0,5		20
YPCA	L6		55		13		36

	L7		16		25		40
YPMA	L6		20		23		45
	L7		23		20		53
Gélose casiénée	L6		0		0		0
	L7		0		0		0

**YPSA:** Yeast Peptone-extract-Starch-Agar; **YPPA:** Yeast Peptone-extract-Pectin-Agar;

**YPMA:** Yeast Peptone-extract-Maltose-Agar et **YPCA:** Yeast Peptone-extract-Cellulose-Agar

Selon les résultats obtenus dans le tableau 9, après la révélation spécifique des activités enzymatiques, les deux souches levuriennes L6 et L7 montrent une activité  $\alpha$ -amylasique, maltasique, cellulasique et pectique après 48h d'incubation aux différentes températures (40°C, 50°C et 60°C). Les souches productrices d'activités enzymatiques significativement sont celles ayant provoqué une zone d'hydrolyse de diamètre  $\geq 0,5$  cm.

- ✓ Après incubation à différentes températures de 40°C, 50°C et 60°C, les deux souches levuriennes montrent une activité  $\alpha$ -amylasique significative (zone de lyse supérieure à 0,5 cm). Les résultats indiquent que l'activité  $\alpha$ -amylasique est mieux exprimée par la souche *Clavispora lusitaniae* pour les trois températures. Et la température optimale de cette production est de 60°C avec une zone de lyse de 30 mm.

- ✓ Les deux souches *Clavispora lusitaniae* et *Meyerozyma guilliermondi* montrent aussi une activité pectique à 40°C, 50°C et 60°C mais cette activité est plus significative chez la souche *Meyerozyma guilliermondi* à température 60°C avec une zone d'hydrolyse de 36 mm.
- ✓ Pour l'activité cellulasique, elle est exprimée par la souche L6 et la souche L7 à différentes températures 40°C, 50°C et 60°C, elle est meilleure chez L6 après incubation à 40°C avec une zone de lyse de 55 mm.
- ✓ Quant à l'activité maltasique, elle est présente significativement chez L6 et L7 aux différentes températures étudiées avec une zone de lyse  $\geq 20$ mm. Cette activité est importante chez la souche L7 avec une zone de lyse de 53 mm, après incubation à 60°C.
- ✓ Par contre, les deux souches *Clavispora lusitaniae* ABS7 et *Meyerozyma guilliermondi* ne sont pas productrices de protéases

Les deux souches L6 et L7 possèdent la capacité de produire différentes enzymes à savoir l' $\alpha$ -amylase, la pectinase, la maltase et la cellulase avec une activité cellulasique et maltasique relativement plus importante que l'activité  $\alpha$ -amylasique et pectique après 48 h d'incubation à 40°C, 50°C et 60°C. Nous remarquons aussi que l'activité cellulasique est mieux exprimée chez la levure L6 à 40°C (zone de lyse de 55 mm), tandis que les autres activités enzymatiques ( $\alpha$ -amylasique, maltasique et pectique) chez les deux levures L6 et L7 sont plus significatives à 60°C : à cette température d'incubation, la souche **L7** montre les meilleures **activités  $\alpha$ -amylasique et maltasique** avec des zones de lyse de 30mm et 53mm respectivement. La souche **L6** est la plus performante pour la production de **la pectinase** avec une zone de lyse de 36mm. Les deux souches de levures L6 et L7 ne possèdent d'activité protéolytique.

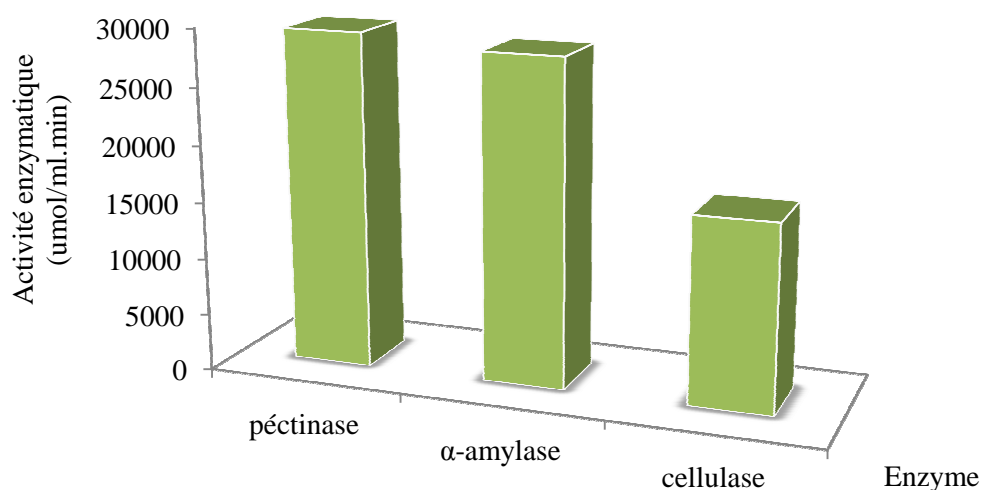
En conclusion, Les levures L6 et L7 ont une production mixte de l' $\alpha$ -amylase, de pectinase, de cellulase et de maltase. Les deux levures poussent à 40°C, 50°C et 60°C avec une meilleure production  $\alpha$ -amylasique, maltasique et pectinolytique à 60°C et cellulasique à 40°C. Ces caractéristiques de croissance permettent de classer ces levures parmi les microorganismes thermophiles modérés. Selon Rudiger et *al.*, (1995) et Madigan et Martino (2006), les micro-organismes qui poussent entre 45°C et 80°C sont appelés micro-organismes thermophiles.



Par conséquent, la souche L7 de *Clavispora lusitaniae*, par sa performance dans sa production de l' $\alpha$ -amylase sera donc sélectionnée pour la suite de notre étude sur la production de l'enzyme par culture en batch et la détermination de ses caractérisations.

### 3-Etude de la production enzymatique chez *Clavispora lusitaniae* ABS7

Les résultats de l'étude de la production des enzymes ( $\alpha$ -amylase, Cellulase, Pectinase) présentés dans la figure 14 montrent qu'après 28 h d'incubation à température 45°C et sous une agitation de 110 rpm, la souche *Clavispora lusitaniae* produit respectivement, des activités de l'ordre de **29530 U** pour la **pectinase**, de **28518,52U** pour l' **$\alpha$ -amylase** et de **16324,8 U** pour la **cellulase**.



**Figure 14:** Etude de la production enzymatique par *Clavispora lusitaniae* après 28 h d'incubation à 45°C (sur milieu optimisé à base de lactosérum 100% décaséiné).

On conclue que, chez *Clavispora lusitaniae*, la production de la pectinase et de l' $\alpha$ -amylase est meilleure que celle de la cellulase. Nous avons choisi de continuer notre travail avec l' $\alpha$ -amylase et comparer ses caractéristiques, après purification, avec ceux d'une  $\alpha$ -amylase commerciale d'*Aspergillus oryzae*.

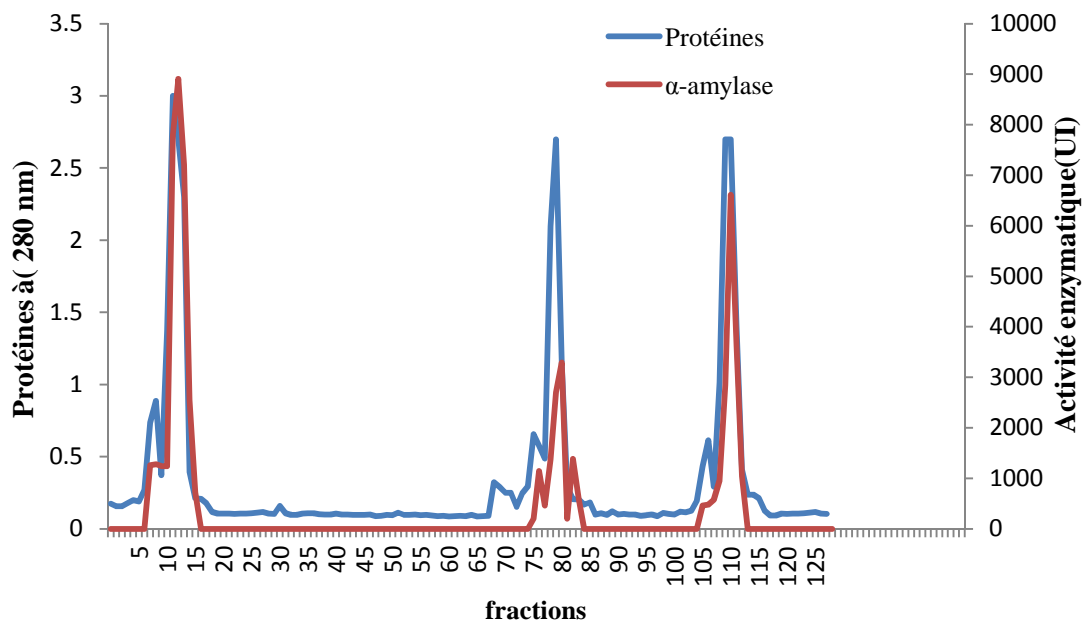
### 4-Purification d'enzyme

*Clavispora lusitaniae* ABS7 produit une activité  $\alpha$ -amylasique de 28518,52 UI. L'utilisation de l'acétone a permis l'augmentation de l'activité spécifique de l' $\alpha$ -amylase de 320,073 à 806,32 U/mg de protéines avec une récupération de 97,4 % (tableau 10).

**Tableau 10:** Purification de l' $\alpha$ -amylase produite par *Clavispora lusitaniae* ABS7

Etape	Protéines totaux (mg/ml)	Activité totale (UI)	Activité spécifique UI/mg	Taux de purification	Rendement (%)
Extrait brut	89,1	28518,52	320,073	1	100
Précipitation par l'acétone	34,45	27777,77	806,32	2,51	97,4
Séphacryl S 200	1,36	5277,77	3880,71	12,12	18,5

Le profil d'éluion de l'enzyme sur colonne de Séphacryl S200 est représenté sur la figure 15.



**Figure 15 :** Profil chromatographique de l' $\alpha$ -amylase sur Séphacryl-S200

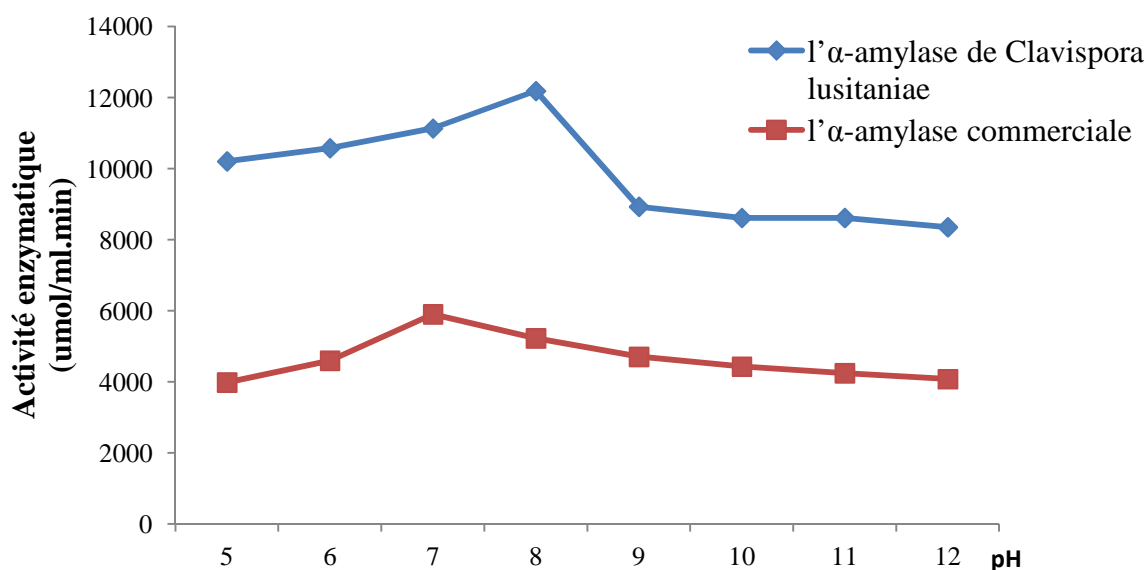
L'éluion sur une colonne de Séphacryl S200 (figure 15) montre l'existence de trois fractions protéiques contenant des activités  $\alpha$ -amylasiques.

Nous nous sommes intéressés au 1er pic car il contient la fraction protéique et l'activité enzymatique les plus élevées.

**5-Etude des propriétés physico-chimiques de l' $\alpha$ -amylase de *Clavispora lusitaniae* ABS7 et comparaison avec ceux d'une  $\alpha$ -amylase commerciale**

**5-1-Détermination du pH optimum**

L'étude de l'effet du pH sur les activités  $\alpha$ -amylasiques est effectuée dans l'intervalle de pH 5 à 12 (figure 16). Les résultats révèlent que l'activité de l' $\alpha$ -amylase de *Clavispora lusitaniae* et de l' $\alpha$ -amylase commerciale augmente progressivement avec la variation du pH jusqu'à l'optimum de 12185,18U à pH 8 pour l' $\alpha$ -amylase de *Clavispora lusitaniae* et de 5899,7 à pH 7 pour l' $\alpha$ -amylase commerciale.



**Figure 16 :** Effet du pH sur l'activité de l' $\alpha$ -amylase de *Clavispora lusitaniae* et l' $\alpha$ -amylase commerciale

Au delà de ces valeurs, l'activité enzymatique commence à diminuer, et on remarque une perte respective de l'activité de 32 % et 31 %. Cette perte d'activité est due certainement à l'effet du pH sur l'ionisation des groupements des chaînes latérales qui maintiennent la structure de l'enzyme d'une part et interviennent dans l'activité du site actif d'autre part (Save, 2011, Giancarlo Viberti *et al.*, 1994 et Soro, 2007). Différentes études ont été menées sur la détermination du pH optimum de l' $\alpha$ -amylase chez différentes levures. Et il a été révélé que le pH optimum de l' $\alpha$ -amylase est de 6.3 chez la levure *Schwanniomyces alluvius* (Wilson et Ingledew, 1982), de 5.6 pour l'enzyme de *Filobasidium capsuligenum* (De Mot et Verachlert, 1985) de 6 chez *Lipomyces sp* (Merabti, 2006). Cependant, il est de 5.5 pour l' $\alpha$ -amylase de *Schwanniomyces occidentalis* (Wang *et al.*, 1989) et 4.5-5 pour celle de

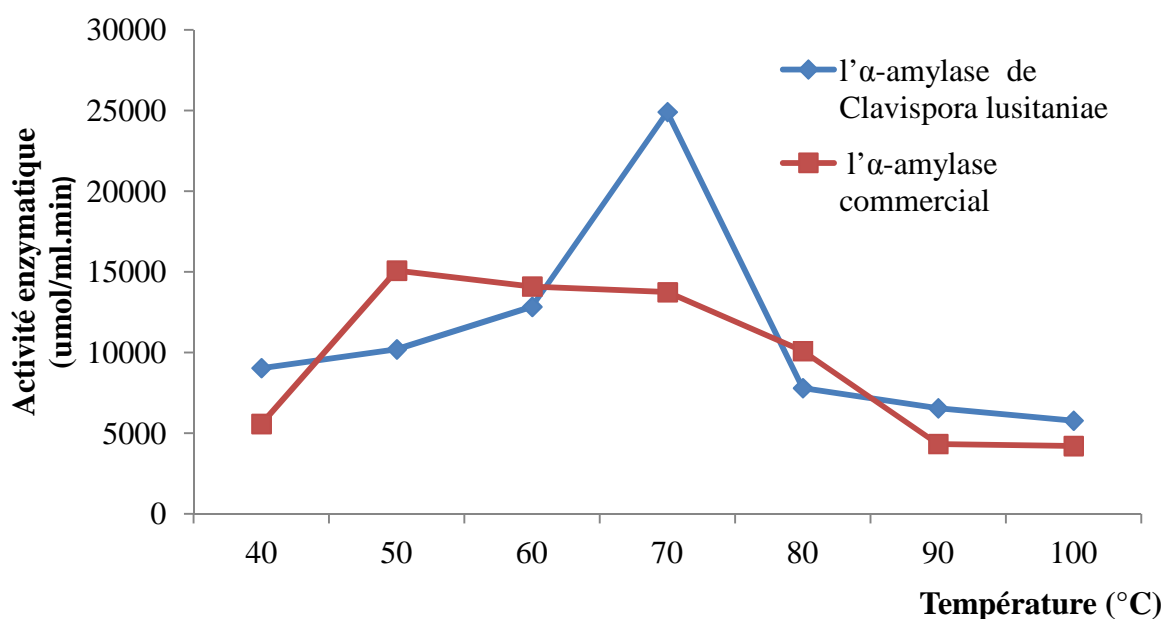
*Lipomyces kononenkoae* (Prieto et al., 1995). Ces différences sont probablement dues à la composition du milieu de culture et à la variation de la composition en acides aminés, où chaque  $\alpha$ -amylase développe un état de protonation spécifique (Giannesi et al., 1994 et Soro, 2007).

En conclusion, le pH optimum de l' $\alpha$ -amylase de *Clavispora lusitaniae* est alcalin de 8 et celui de l'enzyme commerciale est neutre de 7. Ces valeurs rapprochées de celles des bactéries : *Bacillus sp.* PM1 pH8 (Sharma et al. 2014), *Bacillus sp.* PN5 pH10 (Saxena et al. 2007) et *Bacillus sp.* IM D370 pH10 (Mc Tighe et al. 1995).

De ces résultats, il ressort que l' $\alpha$ -amylase de *Clavispora lusitaniae* ABS7 possédant un pH alcalin de 8 conviendra mieux à l'industrie des détergents, du textile et du papier (Joo et Chang, 2006).

### 5-2- Détermination de la température optimale

L'influence de la température sur les activités  $\alpha$ -amylasiques est testée sur une gamme de température de 40 à 100°C (figure 17).



**Figure 17 :** Effet de la température sur l'activité de l' $\alpha$ -amylase de *Clavispora lusitaniae* et l' $\alpha$ -amylase commerciale

Ces résultats montrent que la température exerce un effet significatif sur l'activité des enzymes. L'activité  $\alpha$ -amylasique de *Clavispora lusitaniae* atteint son maximum à 70°C

( 24907,4 UI) tandis que pour l' $\alpha$ -amylase commerciale, l'activité enzymatique croit dans la zone de température de 40 à 50°C, où elle atteint son maximum de 15074,07 UI . Au delà de cette valeur, elle commence à diminuer. Ceci peut être expliqué par un changement structural et fonctionnel des enzymes suite à la rupture des liaisons fortes qui les stabilisent et par conséquent, leur dénaturation (Wolberg *et al.*, 2004 et Qiao W *et al.*,2014). On conclue que la température optimale de l' $\alpha$ -amylase de *Clavispora lusitaniae* est plus élevée que celle de l' $\alpha$ -amylase commerciale.

En effet, la température optimale des amylases levuriennes varie entre 40°C et 60 °C et peut atteindre 70°C chez (Panchal, 1990) et chez *Lipomyces kononenkoae* (Prieto et al.,1995). D'autres études ont montré des températures optimales des  $\alpha$ -amylases levuriennes plus élevées que celle de l'enzyme de notre souche : 75° C (Djekrif, 2016) ou 37°C (Ranjan et Sahay, 2015). La température optimale élevée de l'enzyme de L7 (70 °C) est identique à celle d'autres espèces de levures : *Pichia polymorpha* et *Lipomyces starkeyi* (Kelly et al., 1985, Panchal, 1990, Kang *et al.*,2004). Par ailleurs, l' $\alpha$ -amylase de certaines souches levuriennes à une température optimale inférieure à celle de l'enzyme de notre souche: 40°C pour *Saccaromyces alluvirus* et *Schwanniomyces alluvius* (Fogarty et Kelly, 1980 et Panchal, 1990), 50°C pour *Filobasidium capsuligenum* (De mot et Verachtert, 1985), *Cryptococcus flavus* (Wanderley *et al.*, 2004), et *Schwanniomyces alluvius* (Moranelli et al., 1987),*Schwanniomyces occidentalis* (Wang *et al.*, 1989), 55°C pour *Lipomyces sp* (Merabti, 2006) et 60°C pour *Schwanniomyces sp* (Benaouida, 2008) , *Lipomyces kononenkoa* et *Saccharomyces castelli* (Kelly *et al.*, 1985 et Prieto *et al.*, 1995).

Comparés de celle des  $\alpha$ -amylases des bactéries et moisissures, cette température est proche des bactéries thermophiles, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Thermonospora viridis* et *Bacillus cohnii* (Fogarty et Kelly, 1980 ; Panchal, 1990 ; Cordeiro *et al.*, 2002 et Yasser *et al.*, 2013) avec des températures optimales oscillant de 65 à 76°C.

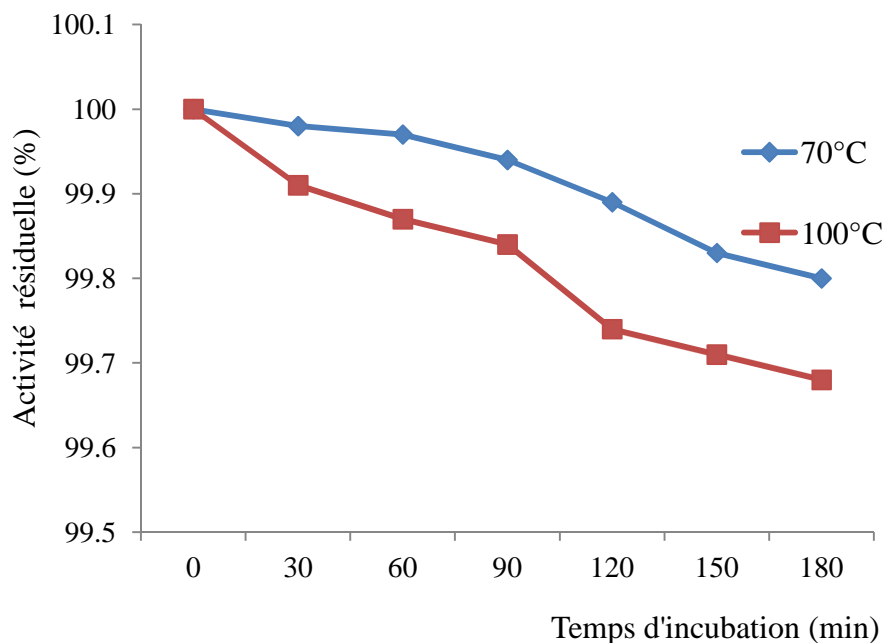
Le comportement thermique de l' $\alpha$ -amylase de notre souche peut être expliqué par la caractéristique du climat aride de la niche écologique (Sahara Algérien :Biskra) (Daniel *et al.*, 2009 et Bhalla *et al.*, 2013).

### 5-3-Etude de la thermostabilité enzymatique

La stabilité thermique de l'enzyme est étudiée après son incubation à 70°C et à 100°C pour l' $\alpha$ -amylase de *Clavispora lusitaniae* et à 50°C et 100°C pour l' $\alpha$ -amylase commerciale pour une durée de 30-180 min . Les résultats sont représentés dans les figures 18 et 19.

### 5-3-1-Etude de la thermostabilité de l' $\alpha$ -amylase de *Clavispora lusitaniae* ABS7

L'étude de la thermostabilité est réalisé sur l' $\alpha$ -amylase de *Clavispora lusitaniae* ABS7 après un traitement thermique à 70 et 100°C pendant 3 heures (Figure 18).



**Figure 18:** Etude de la thermostabilité de l'  $\alpha$ -amylase de *Clavispora lusitaniae* ABS7

D'après la figure 18,il ressort que :

-A 70°C , l' $\alpha$ -amylase de *Clavispora lusitaniae* conserve 99,97% de son activité initiale pour un traitement thermique de 60 min. Après 180 min d'incubation, l'enzyme maintien 99,80% de son activité.

-A 100°C, l'enzyme garde 99,74% de son activité après 120 min d'incubation, et après 180 min, elle garde 99,68% de son activité. Cette étude montre que l' $\alpha$ -amylase de la souche levurienne *Clavispora lusitaniae* est très thermostable.

En effet, l' $\alpha$ -amylase de plusieurs souches isolées du blé de la même région que *Clavispora lusitaniae* , montre des demi-vies de 150 min à 80°C et de 90 min à 90°C pour la moisissure *Rhizopus oryzae* (Ait kaki, 2004) et des demi-vies respectives de : 150 min et 130 min à 80C et à 90°C pour *Lipomyces sp.* (Merabti, 2006). La levure *Candida sp.* a une thermostabilité relativement faible à 60°C, avec une demi-vie de 30 min (Boukhennane et Boudebza, 2014). D'autres souches de *Schwanniomyces sp.* isolées de différents sites de deux régions de

sources thermales (Hammam Debagh-Guelma et Hammam Téleghma-Mila; considérés comme des écosystèmes extrêmes) montrent une thermostabilité assez élevée, avec une demi-vie de 180 min à 90°C (Benaouida, 2008).

Nos résultats se rapprochent également de ceux obtenus à partir **des levures** : Moranelli *et al.*, 1987 ont étudié l' $\alpha$ -amylase chez *Schwanniomyces alluvius* et ils ont trouvé que l'activité maximale est obtenue entre 40°C et 50°C et ils ont révélé que cette enzyme est très thermostable montrant que ceci est dû à la composition de l'enzyme en acides aminés acides. Prieto *et al.*, 1995 ont expliqué la thermostabilité de l' $\alpha$ -amylase de *Lipomyces kononenkoae* est due à la nature glycoprotéique de l'enzyme (la partie glucidique augmente la thermostabilité de l'enzyme) et **certaines bactéries** telle que *Bacillus sp.* (Cordeiro *et al.*, 2002) qui produit une  $\alpha$ -amylase possédant une température optimale de 70°C et qui perd 38% de son activité initiale après une incubation à 90°C pendant 2h. Par ailleurs certaines levures et moisissures comme : *Pichia burtonii* (Powers *et al.*, 2001) et *Paecilomyces sp.* (Zenin *et al.*, 1993), produisent des  $\alpha$ -amylases qui possèdent à 45°C (température assez faible) une thermostabilité inférieure à celle enregistrée chez *Clavispora lusitaniae* avec des demi-vies respectives de : 10 min et 120 min.

En revanche, la thermostabilité de notre enzyme dépasse largement les valeurs rapportées par Ranjan et ses collaborateurs (2015) sur la même levure dans une gamme de température de 5 à 40°C où l' $\alpha$ -amylase est stable à 37°C pendant 48h ; celle de *Cryptomyces sp.* (Lefuji *et al.*, 1996) qui conserve uniquement 20% et 10% de son activité après des traitements thermiques de 30 min à 80°C et à 90°C. A 45°C, *Pichia burtonii* a une demi-vie de 120 min (Powers *et al.*, 2001). L' $\alpha$ -amylase recombinante de *Pichia pastoris* est thermostable à 60°C pendant 60 min avec une conservation de 80% de son activité initiale, les demi-vies sont de 40 min à 80°C et 10 min à 90°C (Chen *et al.*, 2007).

Ces différences de comportement vis-à-vis du traitement thermique s'expliquent probablement par le patrimoine génétique particulier à chaque espèce, leur origine, l'influence du biotope (zone aride désertique et semi-aride) ainsi que les conditions expérimentales (la température, le pH et la composition du milieu de fermentation) qui font que les souches développent des mécanismes de lutte et d'adaptation, spécifiques à leur niche écologique (Hasper *et al.*, 2002 et Michele Michelin *et al.*, 2010) entraînant la sécrétion d'enzymes dont la structure particulière est en lien avec la thermostabilité, en particulier grâce à la richesse en résidus cystéines et en glucides (une glycosylation excessive) (Xu *et al.*, 2002 ; Prakash et Jaiswal, 2010 et Vieille et Zeikus, 2011).

Les levures ne sont pas connues par leur résistance à la température élevée, alors que certaines bactéries sont considérées comme thermorésistantes. Des études ont montré que la cohabitation des bactéries et des levures dans le même milieu peut avoir pour conséquence un transfert de gènes des bactéries vers les levures, justifiant ainsi le comportement thermique inhabituel de l' $\alpha$ -amylase de la souche levurienne étudiée, *Clavispora lusitaniae*, comparable à celui des amylases bactériennes (Fossi *et al.*, 2005). En effet, la transformation génétique se produit lorsque différents microorganismes sont cultivés sur le même milieu (Gasson et Davies, 1984 ; Hofer, 1985; Deak *et al.*, 1986 ; Cocconcelli *et al.*, 1986). La composition du milieu et les conditions environnementales sont des facteurs qui régissent ce processus (Fossi *et al.*, 2005).

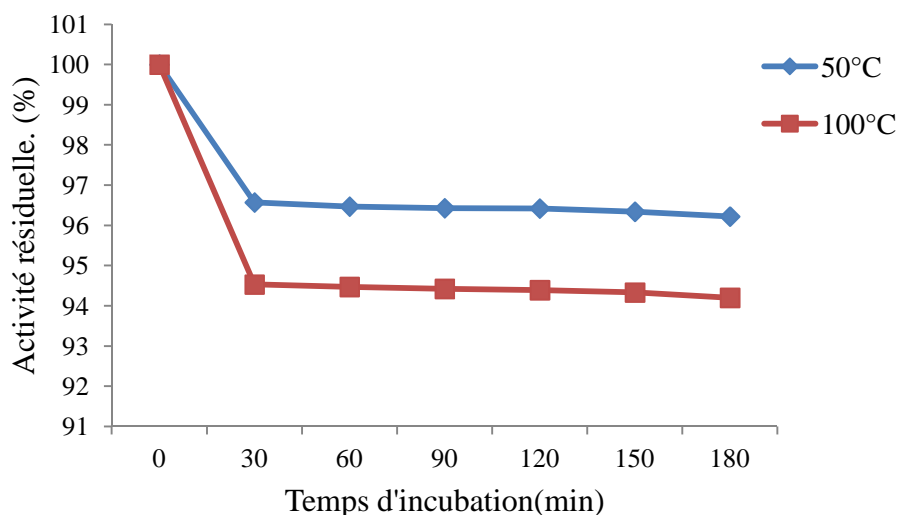
Par ailleurs, d'autres facteurs, comme la composition en acides aminés, les interactions hydrophobes (Dill, 1990), la présence de certaines liaisons dans la structure secondaire et tertiaire des protéines enzymatiques : liaisons hydrogènes, liaisons secondaires, liaisons ioniques et ponts disulfures (Matsumura *et al.*, 1989 et Boel *et al.*, 1990, Mallick *et al.*, 2002 ; Roovers *et al.*, 2004 et Elleuche et Antranikian, 2013), ponts salins et cofacteurs (Vieille *et al.*, 2001), permettent de consolider la structure de l'enzyme et donc sa résistance au traitement thermique (Scriban, 1999).

D'autres paramètres extrinsèques, comme les sels et le substrat influencent également la stabilité (Vieille et Zeikus, 2001). Tous ces facteurs accentuent la résistance des enzymes à des traitements thermiques élevés (Mallick *et al.*, 2002 ; Roovers *et al.*, 2004). Par ailleurs, les ions  $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{Zn}^{2+}$  participent à la structure des amylases (métallo-enzyme à  $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{Zn}^{2+}$ ) et augmentent considérablement leur stabilité (Saxena et Singh, 2011 et Smitha *et al.*, 2015). La thermostabilité de notre enzyme s'explique probablement par l'un ou l'ensemble des facteurs évoqués.

### 5-3-2-Etude de thermostabilité de l' $\alpha$ -amylase commerciale

D'après la figure 19, l' $\alpha$ -amylase commerciale conserve après 30min de traitement thermique 96,57 % et 94,53% de son activité initiale à 50°C et 100°C respectivement. Après 120 min d'incubation l'enzyme garde 96,42% de son activité à 50°C et 94,39% à 100°C. L'enzyme conserve 96,22 et 94,20 % de son activité initiale à 50°C et 100°C respectivement, après 180 min d'incubation.





**Figure 19:** Etude de la thermostabilité de l'α-amylase commerciale après des différents temps d'incubation .

Ces résultats montrent que l'α-amylase de *Clavispora lusitaniae* ABS7 est aussi thermostable que l'α-amylase commerciale.

En conclusion, les taux particulièrement élevés de conservation de l'activité enzymatique à 100°C : 99,68% pour l'enzyme de L7 et 94,2% pour l'enzyme commerciale, et dépassant largement les valeurs rapportées par la littérature permettent de qualifier l'α-amylase produite par la levure *Clavispora lusitaniae* ABS7 isolée du blé d'une région aride (Sahara Algérien) parmi les enzymes thermostables.

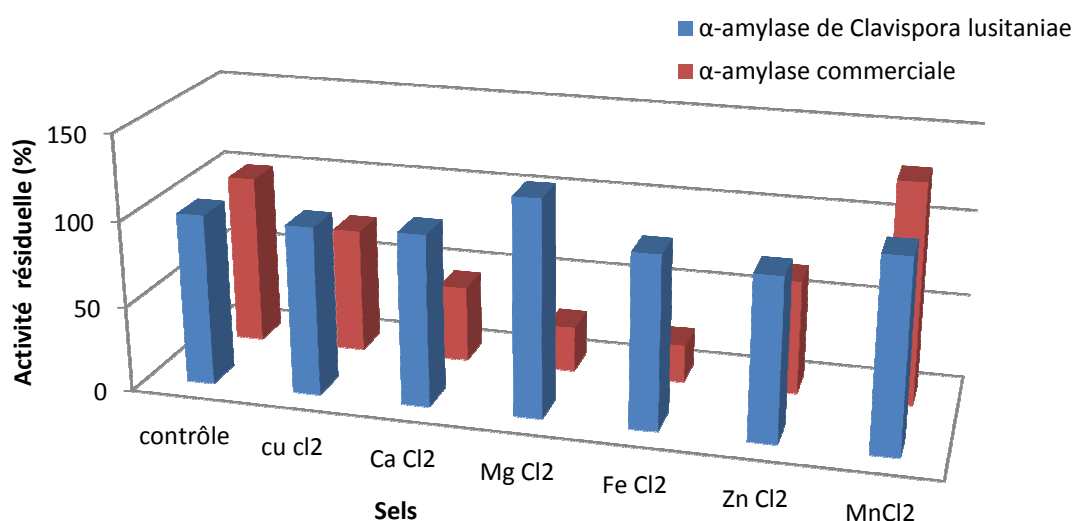
L'α-amylase produite par la levure *Clavispora lusitaniae* semble être plus stable que la l' α-amylase commerciale . Cette propriété thermique, confère aux enzymes une grande stabilité, une activité élevée et donc un meilleur rendement pendant des durées prolongées d'hydrolyse. De plus, le risque de contamination par des bactéries mésophiles communes diminue ; un avantage important du point de la production enzymatique ainsi que la purification (Vieille et Zeikus, 2001) ce qui offrent des aptitudes industrielles.

## 6-Effet de différents métaux et réactifs chimiques sur l'activité enzymatique de l' $\alpha$ -amylase de *Clavispora lusitaniae* et l' $\alpha$ -amylase commerciale

### 6-1-Effet des sels

Les ions métalliques sont connus pour stabiliser et activer les enzymes (Swamy, 1994; Leveque et *al.*, 2000 et Vieille et Zeikus, 2011).

L'activité de l' $\alpha$ -amylase de *Clavispora lusitaniae* est activée par les cations  $Mg^{2+}$  (125,82%),  $Mn^{2+}$  (111,25%), et légèrement par les cations  $Fe^{2+}$  (100,66%), et les cations  $Ca^{2+}$  (100%) n'ont aucun effet sur l'activité, Cependant elle est légèrement inhibée par les cations  $Cu^{2+}$  (98,67%),  $Zn^{2+}$  (94,70%), ainsi que celle de l'enzyme commerciale est inhibée presque par tout les cations utilisés  $Cu^{2+}$  (73,33%),  $Zn^{2+}$  (66,67%),  $Ca^{2+}$  (44,44%),  $Mg^{2+}$  (26,66%),  $Fe^{2+}$  (22,22%). L' $\alpha$ -amylase recombinante de la levure *Cryptococcus flavus* maintient son activité initiale, après l'ajout de  $CaCl_2$  (Galdino et *al.*, 2011). La même observation est indiquée pour l' $\alpha$ -amylase de *Cryptococcus sp.* S-2 en présence des cations  $Ca^{2+}$  1mM (Iefuji et *al.*, 1996).



**Figure 20:** Effet de quelques sels sur les activités  $\alpha$ -amylasiques.

Le calcium augmente l'activité amylasique (Leveque et *al.*, 2000; Al Quadan et *al.*, 2009 et Hii et *al.*, 2009). L'effet stabilisateur de calcium sur la thermostabilité de l'enzyme peut être expliqué par le relargage des résidus hydrophobes par les ions de  $Ca^{2+}$  dans la protéine, engendrant une structure compacte (Al Quadan et *al.*, 2009). Les ions de calcium rendent la molécule de la protéine plus rigide, ce qui conduit à une augmentation de la stabilité

thermique de l' $\alpha$ -amylase de *Streptomyces avermitilis* (Hwang et al., 2013). Mais certaines amylases sont indépendantes de calcium: comme l' $\alpha$ -amylase de notre souche, l'amylase de *Bacillus thermoleovorans* NP 54 (Malhota et al., 2000) n'exige pas le calcium pour son activité ou sa production. Vishnu et al., 2006 ont montré que le  $\text{CaCl}_2$  à 2,5mM augmente l'activité  $\alpha$ -amylasique de *Lactobacillus amylophilus* GV6 mais à 5mM, il devient inhibiteur de l'enzyme.

Les ions de  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$  et  $\text{Li}^{2+}$  à 5 mM inhibent l'activité  $\alpha$ -amylasique de *Clostridium thermosulfurogenes* SVM17 (Mrudula et al., 2011b).

L'effet inhibiteur provoqué par les ions  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  sur l'activité de l' $\alpha$ -amylase de notre souche et par les ions  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$  sur l'activité de l' $\alpha$ -amylase commerciale peut être dû à la compétition entre les cations exogènes et les cations associés à la protéine, conduisant à une diminution de l'activité (Lin et al., 1998).

Les ions  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$  stimulent l'activité  $\alpha$ -amylasique de notre souche, alors que l'activité de l' $\alpha$ -amylase commerciale est stimulée uniquement par les ions  $\text{Mn}^{2+}$ .

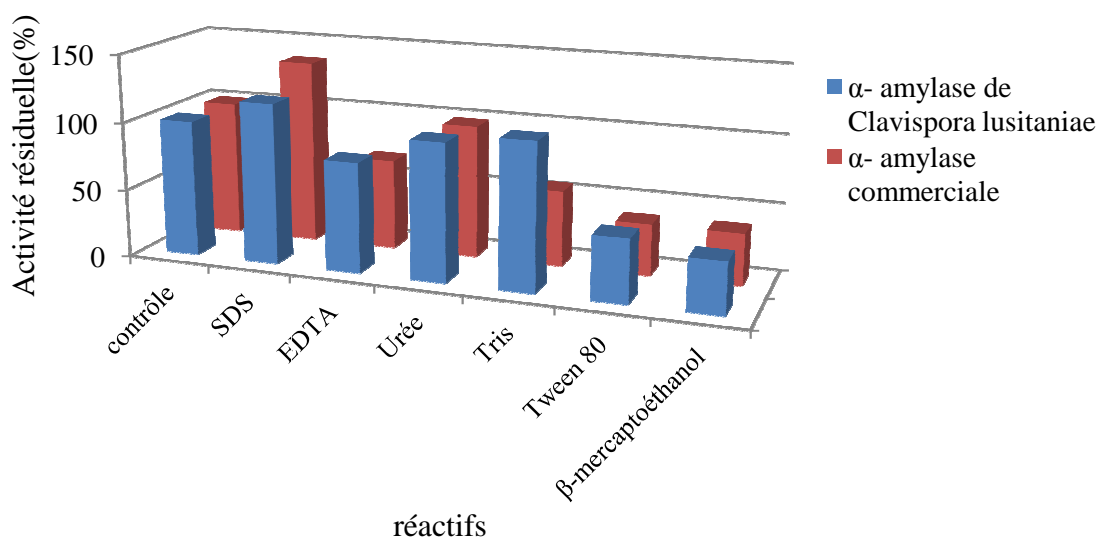
Les ions qui stimulent l'activité enzymatique de l' $\alpha$ -amylase comme  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$  peuvent agir comme cofacteurs nécessaires pour augmenter l'activité enzymatique.

### 6-2- Influence de différents réactifs chimiques

L'influence de différents réactifs chimiques sur l'activité  $\alpha$ -amylasique de notre enzyme et celle de l'enzyme commerciale est également étudiée et les résultats sont présentés dans la figure 21.

L'activité de l' $\alpha$ -amylase de *Clavispora lusitaniae* est inhibée par l'EDTA (2mM) (80,79%), le  $\beta$ -mercaptoéthanol(1%) (47,68%), tween 80 (1%) (46,36%) ainsi qu'elle est activée par le tris(107,28%),le SDS(1%,w/v) (117,88%) et légèrement par l'urée (2M) (100,66%).

L'activité de l' $\alpha$ -amylase commerciale est inhibée presque par tout les réactifs, le  $\beta$ -mercaptoéthanol et le tween ont le même effet sur l'activité (37,78%), tris(55,56%), l'EDTA(66,67%), l'urée(97,78%),sauf le SDSa un effet d'activateur (135,55%).



**Figure 21:** Effet de quelques substances chimiques sur les activités  $\alpha$ -amylasiques.

Nous remarquons que l'effet activateur du SDS est plus important sur l' $\alpha$ -amylase commerciale que sur l' $\alpha$ -amylase levurienne. L'inhibition de l' $\alpha$ -amylase levurienne et commerciale par l'EDTA, qui est un agent chélateur fort de métal, suggère que les deux enzymes peuvent être des métalloenzymes. La présence de  $\text{CaCl}_2$  n'a pas d'effet sur l'activité  $\alpha$ -amylasique levurienne (Figure 21) ce qui nous permet de conclure que les ions de  $\text{Ca}^{2+}$  ne sont pas nécessaires à l'activité de cette  $\alpha$ -amylase et probablement importants pour la stabilité de l'enzyme et le maintien de sa conformation. En revanche, l'EDTA inhibe l'activité de l'enzyme levurienne et commerciale, avec une perte respective de 19,21% et 33,33% de leur activité résiduelle. Ce résultat indique que les deux enzymes sont des métalloenzymes et l'activité est indépendante de  $\text{CaCl}_2$  pour l'enzyme levurienne car en présence des ions de calcium, l'activité reste stable (Figure 20). L'effet nul de l'EDTA sur l' $\alpha$ -amylase levurienne est signalé par Iefuji *et al.* (1996), chez la levure *Cryptococcus sp.* S-2. L'effet inhibiteur de l'urée sur l' $\alpha$ -amylase a été aussi signalé chez *Thermomyces lanuginosus* F1 (Odibo et Ulbrich-Hofmann, 2001).

# *Conclusion générale*

Cette étude a permis d'étudier la production d'une  $\alpha$ -amylase thermostable par la levure *Clavispora lusitaniae* ABS7 (isolée d'écosystèmes arides, région de Biskra, Sud Algérien).

La mise en évidence de la production des 05enzymes ( $\alpha$ -amylase ,pectinase, maltase,cellulase et protéase) est effectué sur milieu solide (Boite de Pétri) par deux souches levuriennes(L6 et L7).Après 48 h d'incubation à différentes températures 40°C, 50°C, 60°C les deux souches ont montré une bonne croissance et ont produit 03 enzymes amylolytiques( $\alpha$ -amylase,pectinase,maltase) et cellulase.

La souche de levure L7 soit *Clavispora lusitaniae* ABS7 semble être la plus performante dans la production de  $\alpha$ -amylase thermostable, donc elle est sélectionnée pour la suite de l'étude. L'étude de la production enzymatique(  $\alpha$ -amylase,pectinase,cellulase) par la souche *Clavispora lusitaniae* ABS7 est effectuée par une fermentation en batch :erlenmeyers de 500 ml contenant 500 ml de milieu de production à base de lactosérum traité (traitement de thermocoagulation sous l'action combinée du pH (ajusté à 4,6) et de la température à 100°C pendant 30 min afin de précipiter et éliminer les caséines) supplémenté d'extrait de levure 0,22g+solution de sels 5,3 ml+ solution d'oligo-éléments 2,6 ml pour 600 ml de lactosérum+ substrats inducteur pour  $\alpha$ -amylase,pectinase,cellulase. La souche *Clavispora lusitaniae* ABS7 après 28 h d'incubation à température 45°C et sous une agitation de 110 rpm produit respectivement, des activités de l'ordre de **29530 U** pour la **pectinase** et de **28518,52U** pour **l' $\alpha$ -amylase** et de **16324,8 U** pour la **cellulase**. La purification de l'alpha-amylase consiste l'utilisation de l'acétone qui a permis l'augmentation de l'activité spécifique de l' $\alpha$ -amylase de 320,073 à 806,32 U/mg de protéines avec une récupération de 97,4 % , et le profil chromatographique de l' $\alpha$ -amylase sur Séphacryl-S200 montre l'existence de trois fractions protéiques contenant des activités  $\alpha$ -amylasiques dont le premier pic renferme la fraction protéique et l'activité enzymatique les plus élevées.

L'étude des paramètres physico-chimiques de l' $\alpha$ -amylase de *Clavispora lusitaniae* ABS7 et sa comparaison avec une  $\alpha$ -amylase commerciale montre que dans l'intervalle de pH 5 à 12. les courbes des activités des deux enzymes en fonction du pH indiquant des valeurs maximales de 12185,18U à pH 8 pour l' $\alpha$ -amylase de *Clavispora lusitaniae* et 5899,7 à pH 7 pour l'  $\alpha$ -amylase commerciale ainsi que pour l'influence de la température sur les activités  $\alpha$ -amylasiques est testée sur une gamme de température de 40 à 100°C dont l'activité enzymatique de l' $\alpha$ -amylase de *Clavispora lusitaniae* atteint son maximum à 70°C ( 24907,4 UI) tandis que pour l' $\alpha$ -amylase commerciale, l'activité enzymatique croit dans la zone de température de 40 à 50°C, et atteindre son maximum (15074,07 UI) à 50°C. Au delà de cette valeur, elle commence à diminuer. On conclue que la température optimale de l' $\alpha$ -amylase de *Clavispora lusitaniae* est plus élevée que celle de l' $\alpha$ -amylase commerciale.

Le comportement thermique de l' $\alpha$ -amylase de notre souche peut être expliqué par la caractéristique du climat aride (Biskra, Algérie) (Daniel *et al.*, 2009 et Bhalla *et al.*, 2013).

L'enzyme produite par *Clavispora lusitaniae* ABS7 possède un pH optimum de 8.0 et une température optimale de 70°C. Cette température optimale élevée nous a poussé à pour suivre la stabilité de l'enzyme à des température encore plus élevées. En effet, la stabilité thermique de l'enzyme est étudiée après son incubation à température 70°C et 100°C pour l' $\alpha$ -amylase de *Clavispora lusitaniae* et à 50°C et 100°C pour l' $\alpha$ -amylase commerciale pendant 30-180 min, et les résultats montrent que à 70°C l' $\alpha$ -amylase de *Clavispora lusitaniae* conserve 99,97% de son activité initiale pour un traitement thermique de 60 min, et pour une durée de 180 min d'incubation, l'enzyme conserve 99,80% de son activité. A 100°C et après 120 min d'incubation l'enzyme garde 99,74% de son activité, et pour une durée de 150min d'incubation elle maintient 99,71% de son activité initiale. Après 180 min d'incubation à 100°C l'enzyme garde 99,68% de son activité. De cette étude l' $\alpha$ -amylase de la souche levurienne *Clavispora lusitaniae* est très thermostable. Tandis que l' $\alpha$ -amylase commerciale conserve après 30min de traitement thermique 96,57% et 94,53% de son activité initiale à 50 et 100°C respectivement. Après 120 min d'incubation l'enzyme garde 96,42% de son activité à 50°C et 94,39% à 100°C. L'enzyme conserve 96,22 et 94,2 % de son activité initiale à 50 et 100°C respectivement, après 180 min d'incubation. Les sels et les substances chimiques ont des effets variables sur l'activité de l' $\alpha$ -amylase de *Clavispora lusitaniae* ABS 7 et l'activité de l' $\alpha$ -amylase commerciale. Les cations  $Mg^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$  augmentent l'activité  $\alpha$ -amylasique de *Clavispora lusitaniae* ABS 7, alors qu'ils inhibent celle de l' $\alpha$ -amylase commerciale respectivement de 26,66%, 22,22%, le  $Mn^{2+}$  augmente les deux activités. Les cations  $cu^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$  sont des inhibiteurs de l' $\alpha$ -amylase de *Clavispora lusitaniae* ABS 7 respectivement de 98,67%, 94,70% et de l' $\alpha$ -amylase commerciale respectivement de 73,33, 66,67%. Le  $Ca^{2+}$  étant sans effet pour l' $\alpha$ -amylase de *Clavispora lusitaniae*, cependant il est un inhibiteur pour l' $\alpha$ -amylase commerciale (44,44%). L'effet activateur de le SDS est plus important sur l' $\alpha$ -amylase commerciale que sur l' $\alpha$ -amylase levurienne.

En revanche, l'EDTA inhibe l'activité de l'enzyme levurienne et commerciale, avec une perte respective de 19,21% et 33,33% de leur activité résiduelle. Donc les deux enzymes sont des métallo-enzymes et l'activité de l'enzyme levurienne est indépendante de  $CaCl_2$  car en présence des ions de calcium, l'activité reste stable.

En conclusion, une température optimale de 70°C et une thermorésistance à 70°C et 100°C pendant un traitement thermique de 3 heures, permet donc de qualifier l' $\alpha$ -amylase produite par *Clavispora lusitaniae* ABS7 comme une enzyme thermostable pouvant éventuellement être utilisée en industries. Ces résultats ouvrent d'autres perspectives qui seront réalisés dans le cadre du Doctorat :

- Une optimisation du milieu de production, pour un meilleur rendement.
- Une immobilisation pour augmenter la thermostabilité et recycler les enzymes en fin de processus.

- Une analyse protéomique de l'enzyme pour connaître les raisons de cette stabilité Thermique et le fonctionnement à pH alcalin.
- Rechercher chez *Clavispora lusitaniae* ABS7 d'autres enzymes d'intérêt, pouvant ouvrir à d'autres applications industrielles.



**Abstract:** This work aims to study yeasts's hydrolases and to produce an  $\alpha$ -amylase thermostable by yeasts contaminating wheat grown and harvested in an arid zone (Biskra, Sahara, South Algeria). Enzymes:  $\alpha$ -amylase, pectinase, maltase, cellulase and protease is carried out on a solid medium (Petri dish) by two yeast strains (L6: *Meyerozyma guilliermondi* and L7: *Clavispora lusitaniae* ABS7). After 48 h of incubation at 40°C., 50°C. and 60°C., the two strains showed good growth and produced 03 amyolytic enzymes: ( $\alpha$ -amylase, pectinase, maltase )and cellulase. The yeast strain L7: *Clavispora lusitaniae* ABS7 appears to be the most efficient in the production of thermostable  $\alpha$ -amylase, and is therefore selected for the rest of the study. The study of the  $\alpha$ -amylase, pectinolytic and cellulase enzyme production by the strain *Clavispora lusitaniae* ABS7 is carried out by batch fermentation in 500 ml Erlenmeyer flasks containing 500 ml of production medium based on treated whey, supplemented with 0.22 g of yeast extract, 5.3 ml of saline solution and 2.6 ml of the trace element solution and inducer substrate for each enzyme separately. The strain *Clavispora lusitaniae* ABS7 produced, respectively, activities of the order of 29530 U for pectinase and 28518,52 IU for  $\alpha$ -amylase and 16324,8 IU for cellulase. We chose to continue our work with  $\alpha$ -amylase and compare its characteristics, after purification, with those of a commercial  $\alpha$ -amylase of *Aspergillus oryzae*. The purification of alpha-amylase consists of the use of acetone which allowed the increase of the specific activity of  $\alpha$ -amylase from 320.073 to 806.32 IU / mg of proteins with a recovery of 97, 4%. The chromatographic profile on Sephacryl S200 reveals the existence of three protein fractions containing  $\alpha$ -amylase activities, but the first peak of which contains the highest protein fraction and enzymatic activity. The study of the effect of pH on the activity of *Clavispora lusitaniae*  $\alpha$ -amylase and commercial  $\alpha$ -amylase shows maximum values of 12185.18IU at pH 8 for *Clavispora lusitaniae*  $\alpha$ -amylase and 5899.7IU at pH 7 for the commercial  $\alpha$ -amylase. On the other hand, the study of the effect of temperature on  $\alpha$ -amylase activities indicates that the enzymatic activity of *Clavispora lusitaniae*  $\alpha$ -amylase reaches its maximum at 70°C (24907.4 IU) while the maximum temperature for commercial  $\alpha$ -amylase is 50°C (15074.07 IU). The results of the study of the enzymatic thermostability show that at 70°C. *Clavispora lusitaniae*  $\alpha$ -amylase retains 99.97% of its initial activity after 180 min at 70°C, the enzyme will maintain 99.80% of its activity. At 100°C. and after 180 min, the enzyme retains 99.68% of its activity. The commercial  $\alpha$ -amylase retains 96.57% and 94.53% of its initial activity after 30 min at 50°C. and 100° respectively, and after 180 min, it maintains 96.22% and 94.20 % of its initial activity at 50°C and 100°C respectively. Salts and chemicals have varying effects on the activity of both enzymes.  $\text{Ca}^{2+}$  does not affect *Clavispora lusitaniae*  $\alpha$ -amylase, however it is an inhibitor for commercial  $\alpha$ -amylase (44.44%). In contrast, EDTA inhibits the activity of the L7 enzyme and that of the commercial enzyme, with a respective loss of 19.21% and 33.33% of their residual activity. From this study, it appears that the activity of *Clavispora lusitaniae* ABS7 ( $\alpha$ -amylase) (24907.4 IU) is better than that of the commercial enzyme (15074.07 IU) and it appears that  $\alpha$ -amylase Alkaline of L7 is as thermostable as the commercial enzyme: maximum activity at 70°C, and heat resistance at 100°C (maintaining 99.68% of activity) during a 3 hour heat treatment. Thus to qualify the  $\alpha$ -amylase produced by *Clavispora lusitaniae* ABS7 as a thermostable enzyme that can be used in industries.

**Key words:**  $\alpha$ -amylase, *Clavispora lusitaniae*, yeast, thermostability, purification

**ملخص:** يهدف هذا العمل إلى دراسة إنزيمات التحليل (Hydrolase) عند الخمائر وإنتاج  $\alpha$  أميلاز مقاوم للحرارة وذلك من قبل خمائر ملوثة لقمح المناطق الجافة (بسكرة، صحراء الجزائر). تم تسليط الضوء على إنتاج 05 أنزيمات ( $\alpha$  أميلاز، بكتيناز، مالتاز، سلولاز والبروتياز) على وسط صلب من قبل سلالتين L6 و L7، وبعد 48 ساعة من الحضانة عند درجات حرارة مختلفة 40، 50، 60 °م، أظهرت كلتا السلالتين نمو جيد وأنتجت 03 أنزيمات محللة للنشاء ( $\alpha$  الأميلاز، بكتيناز، مالتاز) و السلولوز. يبدو أن سلالة الخميرة L7 : *Clavispora lusitaniae* ABS7 هي الأكثر كفاءة في إنتاج  $\alpha$  أميلاز مقاوم للحرارة، وذلك تم إختيارها للمراحل التالية من عملنا. كما أجريت دراسة الإنتاج الأنزيمي ( $\alpha$  أميلاز، بكتيناز، سلولاز) من قبل السلالة *Clavispora lusitaniae* ABS7 في Erlen-Meyers ذات حجم 500 مل تحتوي على 500 مل من وسط الإنتاج المكون من مصلى اللبن المعالج مضاف إليه 22,0 غ من مستخلص الخميرة، 5.3 مل من محلول الاملاح و 2.6 مل من محلول العناصر الصغرى و مادة التفاعل. فبينت النتائج أن السلالة L7 تنتج أنشطة إنزيمية بقدر **UI 29530** للبكتيناز و **UI 28518,52** للالفا اميلاز، و **UI 16324,8** للسلولوز. اخترنا الالفا اميلاز لمتابعة الدراسة و قارنا خصائصه بعد تنقيته بخصائص نصل الفاميلاز تجاري ل *Aspergillus oryzae*. من جهة أخرى تمت تنقية الالفا اميلاز باستعمال ال *acétone* الذي سمح بارتفاع النشاط الأنزيمي للالفا اميلاز من 320,073 وحدة الى 806,32 وحدة/مغ من البروتين بمرود يقدر ب 97,4 %، و بين الفصل الكروماتوغرافي للالفا اميلاز على Séphacryl-S200 وجود 3 بروتينات ذات نشاط الفاميلاز، إلا ان الذروة الاولى تحتوي على الجزء البروتيني و الأنزيمي الاعلى نشاطا و لهذا السبب تم أختيارها. دراسة تأثير درجة الحموضة على نشاط الفاميلاز السلالة *Clavispora lusitaniae* ABS7 و الالفا اميلاز التجاري تبين قيم قصوى تقدر ب **UI 12185,18** عند درجة حموضة 8 للالفا اميلاز السلالة *Clavispora lusitaniae* ABS7 و **UI 5899,7** عند درجة الحموضة 7 للالفا اميلاز التجاري. من جهة اخرى دراسة تأثير الحرارة على الأنشطة الالفا اميلاز تبين ان النشاط الأنزيمي للالفا اميلاز السلالة *Clavispora lusitaniae* ABS7 يبلغ نروته عند 70 درجة مئوية ( **UI 24907,4** )، في حين ان درجة الحرارة القصوى للالفا اميلاز التجاري هي 50 درجة مئوية (**UI 15074,07**). تبين من نتائج دراسة المقاومة للحرارة انه عند 70 °م الفاميلاز ال *Clavispora lusitaniae* تحتفظ ب 99,97 % و 99,80 % من نشاطها الاولى و بعد الحضانة لمدة 60 د 180 د على التوالي. عند 100°C وبعد مدة زمنية قدرها 180 د يحافظ الأنزيم على 99,68 % من نشاطه. أما الالفا اميلاز التجاري يحافظ بعد 30 د من التأثير الحراري على 96,57 % من نشاطه الاولى عند 50 °م و 94,53% عند درجة الحرارة 100°C. و من خلال دراسة تأثير الاملاح و المواد الكيميائية، تبين أن لها تأثير متغير على نشاط الأنزيمين: حيث أن شوارد ال  $Ca^{2+}$  لا تؤثر على الفاميلاز السلالة *Clavispora lusitaniae* ABS7 في حين انها تثبط الالفا اميلاز التجاري (44,44%)، من ناحية اخرى ال EDTA يثبط نشاط الأنزيم السلالة L7 و كذلك نشاط الالفا اميلاز التجاري مع انخفاض نشاطهما بقدر 19,21 % و 33,33 % على التوالي. من هذه الدراسة يتبين ان نشاط الفاميلاز السلالة *Clavispora lusitaniae* ABS7 افضل من نشاط الالفا اميلاز التجاري (**UI 15074,07**) كما يبدو ان الفاميلاز السلالة L7 القاعدي هو الأكثر مقاومة للحرارة من الأنزيم التجاري: نشاط اقصى عند 70 °C ومقاومة حرارية عند 100°C (الحفاظ على 99,68 % من النشاط الأنزيمي) خلال تأثير حراري مدته 3 ساعات، كل هذه النتائج تسمح بتأهيل الفاميلاز السلالة *Clavispora lusitaniae* ABS7 كأنزيم مقاوم للحرارة قابل للاستعمال صناعيا.

**الكلمات المفتاحية:**  $\alpha$  أميلاز، *Clavispora lusitaniae*، خميرة، مقاومة حرارية، تنقية.

*Références*

*bibliographiques*

- Açourène S.** et Ammouche A., (2011). Optimization of ethanol, citric acid, and  $\alpha$ -amylase production from date wastes by strains of *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus niger*, and *Candida guilliermondii*. J. Ind. Microbiol. and Biotechnol.39 (5): 759-66.
- Agger T.**, Sphor A B., Carlesen M. et Nielsen J. (1998). Growth and product formation of *Aspergillus oryzae* during submerged cultivations verification of morphologically structured model using fluorescent probes. Biotechnol. bioeng. 57, 321-329.
- Aidoo E. F.**, Herdey R. et Wood B. J. B. (1981). Estimation of fungal growth in a solid state fermentation system. European J. Appl. Microbiol. Biochem. 33, 6284-6294.
- Aït Kaki A.** (2004). Isolement de la moisissure *Rhizopus oryzae* et optimisation d'un milieu à base de lactosérum pour la production de l' $\alpha$ -amylase. Thèse de magistère. Université Mentouri Constantine.
- Ait kaki-** El-Hadef El-Okki A., Leghlimi H., Dakhmouche S., Bennamoun L. et Meraihi Z.(2012). Utilisation de la planification expérimentale pour l'optimisation de la production de l' $\alpha$  amylase par *Rhizopus oryzae*. Rev. Microbiol. Ind. San et Environn. Vol 6, (1), pp. 1-17.
- Alais C.** (1975). Sciences du lait. Principes et techniques laitières. Masson. Paris. P. 108-645.
- Alais C.** (1984). Sciences du lait. Principes des Techniques Laitières. Ed. SEPAIC (4ed) , Paris. In SCHUCK P *et al.* , 2004.
- Ali F.S.** and Abdel Moneim A.A. (1989). Effet of chemicals on fungal-amylase activity. *Zentralbl Microbiol.*, 114(8), p: 623-628.
- Al-Quadan F.**, Akel H. and Natshi R. (2009). Characteristics of a novel highly thermostable and extremely thermophilic alkalitolerant amylase from hyperthermophilic *Bacillus* Strain HUTBS71. J. Biol. Sci.,(3): 67-74.
- Ando S.**, Ishia H., Kosugi Y., Ishikawa K. (2002). Hyperthermostable Endoglucanase from *Pyrococcus horikoshii*. Applied and Environmental Microbiology. 68(1) :430-433.
- Arikan B.** (2007) Highly thermostable, thermophilic, alkaline, SDS and chelator resistant amylase from a thermophilic *Bacillus sp.* Isolate A3-15. Bioresource Technology, , 99(8): 3071-6.
- Asha R.**, Niyonzima F. N. and Sunil S. M. (2013). Purification and properties of pullulanase from *Bacillus halodurans*. Int. Res. J. Biol. Sci., 2(3): 35-43.
- Babu K. R.** et Satyanarayana T.(1993). Extracellular calcium inhibited  $\alpha$ -amylase of *Bacillus coagulans* B49. Enzyme Microbiol. Technol.15,1066-1069.
- Baldwin P.**, Van E. C., Istasse L. et Bienfait J.M. (1986). Fermentation en silos de laboratoire de pulpes de betteraves sucrières. Belgian Journal of Food Chemistry and Biotechnology. (98),.792-797.
- Bel'en O.**, Juliana K., Ana M., Pedregos A., Inmaculada F. Monistro L., Fernando L. et Carmen S.E.,(2006). Bacterial biofilm removal using fungal enzymes, Enzyme and Microbial Technology, (40), pp.51-56.
- Belda,** Ignacio, Lorena B. Conchillo, Javier Ruiz, Eva Navascués, Domingo Marquina, Antonio Santos. (2016). Selection and use of pectinolytic yeasts for improving clarification and phenolic extraction in winemaking. International journal of food microbiology. 223(45): 1–8.
- Beldman G.**, Searle-Van Leewen M.F., Rombouts F.M., Voorzangen F.G.J.(1985). The cellulose of *Trichoderma viride*. Purification, characterisation and comparaison of all detectable endoglucanases, exoglucanases and s-glucosidases. Eur. J. Biochem. 146.: 301-308.
- Benaouida K.** (2008). Etude de l' $\alpha$ -amylase des levures isolées d'un écosystème extrême (sol environnant les sources thermale) et cultivées sur milieu à base de lactosérum. Thèse de Magister ; Option Biotechnologie microbienne. Université Mentouri, Constantine, 67p.

- Benlounissi A. (2004).** La protéase acide de *Penicillium camemberti*. Production sur lactosérum, précipitation par le sulfate d'ammonium et action sur le lait de chèvre. Thèse de magistère. Université Mentouri. Constantine.
- Bennamoun L., Meraihi Z., Dakhmouche S., (2004).** Utilisation de la planification expérimentale pour l'optimisation de la production de l'  $\alpha$ -amylase par *Aspergillus oryzae* Ahlburg (Cohen) 1042.72 cultivé sur milieu à base de déchets d'oranges, Journal of Food Engineering. (64), 257- 264.
- Bergmeyer H.U., Gawekn K., et al., (1979).** Principes de l'analyse enzymatique. Tech. et Doc. Lavoisier. Paris. pp. 17.
- Bernfeld P. (1955).** Amylase  $\alpha$  and  $\beta$ . In Colowick, S. P., Kaplan, O. N. (Eds), Methods in enzymology. Academic Press. New York, p. 140-146.
- Berry D. (2000).** Ingredient Outlook: Functional dairy foods. *Dairy Foods*. **101** (4): 32.
- Bhalla, Aditya, Namita Bansal, Sudhir Kumar, Kenneth M. Bischoff, et Rajesh K. Sani. (2013).** Improved lignocellulose conversion to biofuels with thermophilic bacteria and thermostable enzymes. *Bioresource Technology*. 128(2) :751–759.
- Bhat M K. (2000).** Cellulases and related enzymes in Biotechnology. *Biotechnol Adv*. 18:355-383.
- Binetti A., Carrasco M., Reinheimer J. and Suarez V. (2013).** Yeasts from autochthonal cheese starters: technological and functional properties. *Journal of Applied Microbiology*, 115:434-444.
- Biotechnologie des levures. Masson, Milan Barcelone Bonn. Paris. p : 4-18.
- Boel E., Brady L., Brzozowski A., Derewenda Z., Dodson G., Jensen V., Petersen S., Swift H., Thim L and Woldike., H. (1990).** Calcium binding in  $\alpha$ -amylases: an xraydiffraction study at 2.1-Å resolution of two enzymes from *Aspergillus*. *Biochemistry*. 29 : 6244–6249.
- Bonaly R. (1991).** Morphologie et reproduction asexuée des levures Ds : Larpent J.P., Biotechnologie des levures. Masson, Milan Barcelone Bonn. Paris. p : 4-18.
- Bonnin, E., Renard, C.M.J.C., Thibault, J.F. et Ducro, P. (1997).** Les enzymes de dégradation des parois végétales: mode d'action et utilisation alimentaires. Dans : *Enzymes en Agro-alimentaire*. Larreta-Garde V., Eds. Techniques et Documentations Lavoisier, **6**, pp: 168-200.
- 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<sup>ème</sup> édition. Masson. Collection Biotechnologies. p : 34-381.
- Botton B., Breton A., Fevre M., Gauthier S., Guy P., Larpent J.P., Reymond P., Sanglier J.J., Vayssier Y. & Veau P. (1999).** Moisissures utiles et nuisibles. Importance industrielle. Masson. Paris. P. 12-426.
- Bouix M. et Leveau J. Y. (1999).** Production des enzymes. In Scriban R (Ed) : *Biotechnologie* Ed. Lavoisier. 344-400.
- Bouix M., Leveau J .Y. (1991).** Les levures dans : Bourgeois C. M., Leveau J.Y., techniques d'analyse et de contrôle dans les industries agroalimentaires. Edition 2 Lavoisier-Tec & Doc, Paris. 3: 206-229.
- Boukhennane M. et Boudebza D. (2014).** Production mixte d' $\alpha$ -amylase et de maltase par *Candida sp.* Fermentation dans un milieu de culture, cinétique de production et caractérisation des enzymes. Mémoire de Master. Université Mentouri. Constantine.
- Bourgeois CM, (1996)** Mesclé J-F, Zucca J *Microbiologie alimentaire* Tome 1 : Aspect microbiologique de la sécurité et de la qualité des aliments-2<sup>ème</sup> édition Ed. Tec & Doc,- 672 p.

- Bousseboua H. (2002).** Eléments de Microbiologie Générale. Programme graduation. Editions de l'Université Mentouri. Constantine, Algeria. p.230-231.
- Brawn S.H. et Kelly R.M. (1993).** Characterization of amylolytic enzymes having both (alpha)-1,4 and (alpha)-1,6 hydrolytic activity from the thermophilic archaea *Pyrococcus furiosus* and *Thermococcus litoralis*. *Applied and Environmental Microbiology*; 59; (8), 2614–2621.
- Brzozowski, A. M., et Davies G. (1997).** Structure of the *Aspergillus oryzae* alpha amylase complexed with the inhibitor acarbose at 2.0 Å resolution. *Biochemistry* 36, 10837-10845.
- Buchholz K. Rapp P., Zadrazil F. (1983).** Methods of enzymatic analysis. Volume II. Edition Bergmaeyer, H.U. Verlag Chemie, Weinheim. p: 178-180.
- Carlile, M. J., and Watkinson S. C. (1997).** The fungi, p:269-275. Academic Press, New York, N.Y.
- Cavaco-Paulo A. (1998).** Processing textile fibers with enzymes. In : Erikson K.E., Cavaco-Paulo A., editors. Enzyme application in fiber processing. ACS. Symp. Ser. 687. p :180-189.
- Chao-Hsun Y. et Wen-Hsuing L. (2004)** Purification and properties of a maltotriose producing Alpha amylase from *Thermobifida fusca*, Institute of Microbiology and Biochemistry, National Taiwan University; *Enzyme and Microbial Technology*. (35):254-59.
- Chen, J., Y.Q. Zhang, C. Q. Zhao, A. N. Li, Q.-X. Zhou, D.-C. Li. (1 décembre 2007).** Cloning of a gene encoding thermostable glucoamylase from *Chaetomium thermophilum* and its expression in *Pichia pastoris*. *Journal of applied microbiology*. 103(6) : 2277-84.
- Chesson A. (1987).** Supplementary enzymes to improve the utilization of pigs and poultry diets. In: Hresign W, Cole DJA, editors. Recent Advances in Animal Nutrition. London, Butterworths, p. 71-89.
- Clementi Francesca and Jone Rossi. (1986).**  $\alpha$ -amylase and glucoamylase production by *Schwanniomyces castellii*. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 52: 343-352.
- Cocconcelli P. S., Morelli L., Vescovo M. and Bottazzi V. (1986).** Intergeneric protoplast fusion in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 35(2-3): 211-214.
- Coolbear T., Daniel R.M. et Morgan H.W. (1992).** The enzymes from extreme thermophiles: bacterial sources, thermostabilities and industrial relevance. *Advanced Biochemistry and Engineering Biotechnology*. (45): 57–97.
- Cordeiro C.A., Leal M.L. and Luciano A.B. (2002).** Production and properties of  $\alpha$ -amylase from thermophilic *Bacillus sp. Braz. J. Microbial*. 33(1).
- Coutinho P. M and Henrissat B. (1999).** Recent Advances in Carbohydrate Engineering, edited by H.J. Gilbert, G. J.
- Covadonga R. Arias, Jacqueline K. Burns, Lorrie M. Friedrich, Renee M. Goodrich, and Mickey E. (2002).** Parish. Yeast species associated with orange juice: Evaluation of different identification methods. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(4): 1955-1961.
- Cuveillier G. F. (1999).** Réacteurs enzymatiques à enzymes libres. In Scriban R. (Ed): *Biotechnologie*. Ed. Lavoisier. 401-425.
- Daniel J.R., Francslete R. M., Carlos Bloch J.R., Carlos P. S., et Maria F.G. (2000).** Activity of wheat  $\alpha$ -amylase inhibitor towards birched  $\alpha$ -amylases and structural explanation of observed specificities. *Eur. J. Biochem.* 2(67):6673.
- Daniel R. M., Peterson M. E., Danson M. J., Price N. C., Kelly S. M., Monk C. R., Weinberg C. S., Oudshoorn M. L., Lee C. K. (2009).** The molecular basis of the effect of temperature on enzyme activity. *Biochemical Journal*. 425:353-60.

- Dauter. Z.,** Dauter. M., Brzozowski .A.M., Christensen .S. Borchert T.V., Beier .L., Wilson K.S., Davies G.J.(1999). X-ray structure of Novamyl, the five-domain "maltogenic" alphaamylase from *Bacillus stearothermophilus*: maltose and acarbose complexes at 1.7Å resolution. *Biochem.* (38): 8385-8392.
- Davies G-J.,** Wilson K-S. et Henrissat B. (1999). Nomenclature for sugar binding subsites in the glycosylhydrolases. *Biochem. J.*, **321**, p: 557-559.
- De Mot et Verachlert (1985).** Purification and Characterization of Extracellular Amyolytic Enzymes from the Yeast *Filobasidium capsuligenum*. *Applied and Environmental Microbiology*,p: 1474-1482.
- De Mot R. and Verachtert H.(1986).** Secretion of alpha-amylase and multiple forms of glucoamylase by the yeast *Trichosporon pullulans*. *can j microbial.* 32 (1): 47-51.
- De Souza PM and De Oliveira Magalhães P. (2010).** Application of microbial  $\alpha$ -amylase in industry. A review *Braz J.microbiol.* 41(4) : 850-61.
- Deak M.,** Kiss G. B., Koncz C. and Dudits D. (1986). Transformation of Medicago by *Agrobacterium* mediated gene transfer. *Plant Cell Rep.* 5(2): 97-100.
- Dey G.,** Palit S., Banerjee R. et Maiti B. (2002). Purification and characterization of maltooligosacharides forming amylase from *Bacillus circulans* GR 9313. *Ind. Microbiol.biotechnol.* 4,193-200.
- Diomi M.,** Elisavet K. et Paul C.( 2008).Fungalmultienzyme production on industrial byproducts of the citrus processing industry, *Biotechnology Laboratory. Technology .* (99),pp.2373-2383.
- Dion S.,** Elda R., Kaczorek D. & Hermier J. T. (1978). Milk clotting by enzymes from mould and yeast. *J. Biochem.* 32 : 471-478.
- Djekrif D. S.,** Gillmann L., Cochet N., Bennamoun L., Ait-kaki A., Labbani K., Nouadri T. and Meraihi Z. (2014).Optimization of thermophilic pullulanase and  $\alpha$ -amylase production by amyolytic yeast. *International journal of microbiology research.* 6 (2) : 559-569.
- Djekrif-Dakhmouche S. (2016).** Production et caractérisation de l'amylopullulanase de la levure *Clavispora lusitaniae* ABS7 isolée de blé cultivé et stocké en zones arides. Thèse de Doctorat .Université Mentouri Constantine.
- Djekrif-Dakhmouche S.,**GheribiAolmiZ.,Meraihi Z.et Bennaoum L.(2006). Application of a statistical design to the optimization of culture medium for  $\alpha$  amylase production by *Aspergillus niger* ATCC 16404 grown on orange waste powder. *J. Food Eng.*(73):190-197.
- Drouin M., (2005).** Etude de production de protéases alcalines par *Bacillus licheniformis* en utilisant des boues d'épuration municipales comme substrat. Mémoire de Maître ès sciences (M.Sc.). Canada.
- Dryer J. (2001).** La grande diversité du lactosérum. *Dairy foods* .102 (5) : 35.
- Durand, G. et Monsan, P. (1982).** Les enzymes. Production et utilisations industrielles. Eds. Gauthier-Villars.
- Elleuche S. and Antranikian G. (2013).** Starch-hydrolyzing enzymes from thermophiles. In: *Satyanarayana T, Littlechild J, Kawarabayasi Y* (Ed.), thermophilic microbes environmental and industrial biotechnology. Springer Verlag,Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo. 509-533.
- Fang X. (2008).** Hydrolysis of amorphous and crystalline cellulose by heterologously produced cellulases of *Melanocarpus albomyces*. *J. Biotechnol.* 136: 140-147.
- Fao., (2007).** Les bonnes pratiques d'hygiène dans la préparation et la vente des aliments de rue en Afrique: Outils pour la formation. Ed. Food & Agriculture Org, Italie. 175p.
- Favela-Torres E.,** Volke-Sepúlveda T. & Vniegra-Gonzalez G., (2006). Production of hydrolytic depolymerising pectinases. *Food Technol. Biotechnol.*, **44**(2), 221-227.

- Fossi Bertrand Tatsinkou**, Tavea Frederic and Ndjouenkeu Robert. (2005). Production and partial characterization of a thermostable amylase from *ascomycetes* yeast strain isolated from starchy soils. *African Journal of Biotechnology*. 4(1): 14-18.
- Franco O. L.**, Rigden D. J., Melo F. R., Bloch C., Silva J. C. P. et Crossi de Sa F.(2000). Activity of wheat amylase inhibitors towards bruchid  $\alpha$ -amylase and structural explanation of observed specificities. *Eu. J. Biochem.* 267 : 2166-2173. fructosides. L'institut National Des Sciences Appliquées de Toulouse. Thèse de Doctort. N° d'ordre 890. 84.
- Galdino Alexandro Sobreira** , Roberto Nascimento Silva, Muriele Taborda Lottermann, Alice Cunha Moraes Álvares, Lídia Maria Pepe de Moraes, Fernando Araripe Gonçalves Torres, Sonia Maria de Freitas, and Cirano José Ulhoa. (2011). Biochemical and Structural Characterization of Amy1: An Alpha-Amylase from *Cryptococcus flavus* Expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme Research* Volume, Article ID 157294, p. 1-7.
- Gana S. & Touzi A.** (2001). Volarisation du lactosérum par la production de levures lactiques avec les procédés de fermentation discontinue et continue. *Rev. Energ. Ren* : 51-58.
- Gao J.**, Weng H., Zhou D., Yuan M., Guan F., Xi Y. (2008). Production and characterization of cellulolytic enzymes from the thermoacidophilic fungal *Aspergillus terreus* M11 under solid state cultivation of corn stover. *Bioressour Technol.* 99: 7623-7629.
- Gasson M. J.** and Davies F. L. (1984). The genetics of dairy lactic-acid bacteria. In : Davies F. L. and Law B. A. (eds). *Advances in the microbiology and biochemistry of cheese and fermented-milk*. Elsevier applied science publishers Ltd.; Barking, Essex; UK. 99-126.
- Giannesi Giovana Cristina.**, de Lourdes Teixeira de Moraes Polizeli Maria., Francisco Héctor Tierenz ., Gournier-Chateau N., Larpent J.P., Castellanos M.I., Larpent J.L.(1994). Les Probiotiques en alimentation animale et humaine, Ed. Tee & Doc – Lavoisier. 192.
- Girard D.** (1982). Le lactosérum et l'industrie. *Food technology*. 56 (4) : 32-44: 32. glycosyltransferase elucidate catalysis in the amylase family. *Nat. Struct. Biol.* 6, p : 432-436.
- Gournier-Chateau n.**, Larpent J.-P, Castellanos M.-l., Larpent J.-L. (1994).-Les probiotiques en alimentation animale et humaine Ed. Tee & Doc - Lavoisier, 192 p.
- Graham T.** (1996). *Acid -amylase biochemistry*. 2nd Ed., Rathews & Van Holde, p:132.
- Granger D. & Jean-Blain C. L.** (1982). Utilisation du lactosérum dans l'alimentation des vaches laitières. *Rev. Med. Vet.* 133 (7) : 472-479.
- Guiraud J.** P. Microbiologie alimentaire Ed. Dunod, (1998). '652 p.
- Gunata Y.Z.**, Bayonove C.L., Arnaud A., Galzy P. (1990). Hydrolysis of grape monoterpenyl glycosides by *Candida molishiana* and *Candida wickerhamii*  $\beta$ -glucosidases. *J.Sci. Foòod Agrie*, 50. p: 499-509.
- Gupta R.**, Gigras P, Mohapatra H.(2003). Microbial  $\alpha$ - amylases: a biotechnological perspective. *Process biochem.* 38 :1599 -1616.
- Haasum I.**, Eriksen S. H. Jensen B. et Olsen J. (1991). Growth and glucoamylase production by the thermophilic fungus, *Thermomyces lanuginosus* in a synthetic medium. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 34, pp.656–660.
- Hamilton L.M.**, Kelly C.T. and Forgyat W.M. (1999). Purification and proprieties of the row starch degrading -amylase of *Bacillus sp.* IMD 434. *Biotechnl. Letters.*, 21, p : 111-115.



- Haq I.,** Ahsraf H., Iabal J. and Qadeer M.A. (2003). Production of  $\alpha$ -amylase by *Bacillus licheniformis* using an economical medium, *In: Behal A., Singh J., Sharama M.K., Pur P and Batra N., Characterisation of Alkaline  $\alpha$ -Amylase from *Bacillus sp* AB 04. International Journal of Agriculture & Biology., 08(1), p : 80-83.*
- Hasper A.A.,** Dekkers E., Mil M.V., Van de Vondervoort P.j.i., De Graaff L.H. (2002). Egl C, a new endoglucanase from *Aspergillus niger* with major activity towards xyloglucan. *Appl. Environ. Microbiol.* 68(4). p: 1556-1560.
- Hatada Y.,** Saito K., Hagihara H., Ozaki K. and Ito S. (2001). Nucleotide and deduced amino acid sequences of an alkaline pullulanase from the alkaliphilic bacterium *Bacillus sp.* KSM-1876. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1545(1-2): 367-371. 1224.
- Hebraud M. (1988).** Production et caractérisation des hydrolases secrétées par les champignons anaérobies du rumen .Thèse de doctorat, Université Claud Bernard, Lyon1.
- Hii S. L.,** Ling T. C., Mohamed R. and Ariff A.B(2009). Characterization of pullulanase type II from *Bacillus cereus* HI5. *Am J. Biochem. Biotechnol* , 5(4):170-179.
- Hofer F. (1985).** Transfer of lactose fermenting ability in *Lactobacillus lactis*. *New Zealand J. Dairy Sci. Technol.* 20(3): 179-183.
- Hug-Iten S.,** Escher F. and Conde-Petit B. (2003). Staling of Bread: Role of Amylose and Amylopectin and Influence of Starch-Degrading Enzymes *Cereal Chem*, 80: 654-661.
- Hwang S. Y.,** Nakashima K., Okai N., Okazaki F., Miyake M., Harazono K., Ogino C. and Kondo A. (2013) Thermal stability and starch degradation profile of  $\alpha$ -amylase from *Streptomyces avermitilis*. *Biosci Biotechnol Biochem.*, 77(12):2449-53.
- Ian Spencer Homsey. (2012).** Alcohol and its role in the evolution of human society. RSC publishing, page 471.
- Imbert-Pondaven A. (1977).** Etude de l'évolution de la composition des lactosérums au cours de leur conservation. *J. Dairy Sci.* 568: 521-546.
- Jacques Noémie** and Serge Caseregola. (2008). Safety assessment of dairy microorganisms: The hemiascomycetous yeasts. *International Journal of Food Microbiology*, 126: 321-326.
- Jairath Saloni,** Parampal Sahota and Gulab Pandove. (2012). Preparation of Non-Alcoholic Naturally Carbonated Beverage Using Yeast Isolate from Whey Beverage. *Czech J. Food Sci.*, 30 (2): 135-143.
- Janecek S. (1994).** Sequences similarities and evolutionary relationships of microbial, plant and animal  $\alpha$ -amylase. *Eur. J. Biochem.*, 224, p: 519-524. J. E. et Stutzenberger F. J. (1997). Amyolytic activity of *Thermomonospora fusca*. *World J. of Microbiol and Biotechnol.* 13 (6) : 637-642.
- Jannot P.,** Luu Tien H., Divies C. & Cachia J. P. (1984). Utilisation de la méthodologie expérimentale pour quantifier l'action des facteurs du milieu sur la croissance et l'activité microbienne. Cas des bactéries lactiques. *Sci. Aliments.* 4 :55-59.
- Jayani R.S.,** Saxena S. & Gupta R., (2005). Microbial pectinolytic enzymes: a review. *Process Biochem.*, 40, 2931-2944.
- Jensen B.,** Olsen J. et Allermann K. (1987). Effect of media composition on the production of extracellular amylase from the thermophilic fungus, *Thermomyces lanuginosus*. *Biotechnol. Lett.*, 9, pp. 313-316.
- John W. B,** Michael E. H, Linghao .Z, Michael F. C, and Mark R. N.(2005). Towards Understanding the Action of Cellulases: Molecular Dynamics Simulation of T. reesei Cellobiohydrolase I and Crystalline Cellulose. Department of Food Science.
- Jollivet N. & Belin J.M. (1993).** Comparison of volatile flavor compounds produced by ten strains of *Penicillium camemberti* thom. *J. Dairy Sci.* 76: 1837-1844.

- Joo H.** and Chang C. (2006). Production of an oxidant and SDS-stable alkaline protease from an alkaloiphilic *Bacillus clausii* I-52 by submerged fermentation: Feasibility as a laundry detergent additive. *Enzyme Microbiol. Technol.*, 38:176-183.
- Josefsson P.** (2006). Biochemical modification of wood components. KTH, the royal institute of Technology, Department of Fiber and Polymer technology, Stockholm.
- Jun H.**, Bing Y., Keying Z., Xuemei D., Daiwen C. (2009). Strain improvement of *Trichoderma reesei* Rut C-30 for increased cellulase production. *Indian J Microbiol.* B 49: 00-00.
- Kang H.K.** , Lee J.H., Kim D., Day D.F., Robyt J.F., Park K .H and Moon T.W. (2004). Cloning and expression of *Lipomyces starkeyi* alpha-amylase in *Escherichia coli* and determination of some of its properties. *FEMSMicrobiol. Lett.* 233 (1) : 53-64.
- Keating L.**, Kelly C. et Forgartry W. (1998). Mechanism of action and the substrate dependent pH maximum shift of the  $\alpha$ -amylase of *Bacillus coagulans*. *Carbohydrate Research.* 309, 311-318.
- Kelly C. T.**, Moriarty M . E and Fogarty W. M. (1985). Thermostable extracellular  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase of *Lipomyces starkeyi*. *Applied microbiology and biotechnology* publisher : Springer-Verlag GmbH. 22 (5) : 352–358.
- Kraulis P. J.** (1991). Molscript: a program to produce both detailed and schematic plots of protein structures. *J. Appl. Cryst.* 24, p : 946-950.
- Kwon-Chung K., J.** (1992). *Cryptococcosis*, in *Medical Mycology*, Kwon-Chung K., J and Bennett J-E., eds. Lea & Febiger, Philadelphia.Press, Amsterdam. 397-446.
- Labrecque M-H.**, (2003)-Etude de la capacité de deux souches de levures à dégrader le xylène.Mémoire, Faculté des sciences de l agriculture et de l'alimentation, Université LAVAL : 19-24.
- Lachance Marc-André.** (2011). Chapitre 21: *Clavispora Rodrigues de Miranda* (1979) in Kurtzman C; P., Fzll J. W. and Boekhout T. *The yeast. A taxonomic study.* Volume 2. Fifth edition Elsevier.
- Laplanche J.** (2004). Système d'épuration du lactosérum d'alpage par culture fixée sur lit de compost. *Revue suisse Agric.* 36 (5) : 220-224.
- Larpent J.P.** et Larpent-Gourgaud M. (1997). Mémento technique de microbiologie.3e édition, Lavoisier-Tec &Doc, Paris. 8, p : 217-240.
- Larpent I-P.**, Larpent-Gourgaud M. (1991)Mémento technique de microbiologie - 3éme éditionEd. Tec & Doc, 1997,-1039p.
- Larpent I-P.**Les ferments microbiens dans les industries agro-alimentaires (produits laitiers et carnés)Ed. APRIA, -242 p.
- Larpent-Gourgaud m.** and Sanglier J-J., (1992) . *Biotechnologies. Principes et méthodes :* 574-581.
- Leblonc.**Etude des levures de vinification et des facteurs agissant sur la fermentation alcoolique.235p.Thèse: Pharmacie: Nancy 1 : 1988 ; n°51
- Leclerc H.**, Meyer A. et Deiana J. (1995). Cours de microbiologie générale. Nouveau programme. Biosciences et Techniques. doin éditeurs, Paris. p : 73-92.
- Lefuji H.**, Chino M. and Imura Y. (1996). Raw-starch-digesting and thermostable  $\alpha$ -amylase from the yeast *Cryptococcus* sp. S-2: purification, characterization, cloning and sequencing. *Biochem. J.*, 318, p: 989-996.
- Leghlimi H.** (2004). Optimisation de la production de la cellulase d'*Aspergillus niger* ATCC 16 404 cultivé sur un milieu à base de lactosérum : étude comparative entre *Aspergillus niger* ATCC 16 404 et *Aspergillus niger* O.Z isolée localement. Thèse de magistère. Université Mentouri. Constantine.

- Leisola M.**, Jokela J., Pastinen O., Turunen O., (2001). Industrial use of enzymes. *Laboratory Bioproc. Eng.*, Helsinki University of Technology, Finland, nd Hans Schoemker, DMS Reserch, MD Geleen, The Netherlnds.
- Lekchiri S.**, Moueqqit M., Lekchiri A. (2006). Mise en évidence d'une activité cellulase chez *Fusarium oxysporum f.sp albedinis* induite par une nouvelle forme d'hydrocellulose purifiée. Faculté des Sciences, Département de Biologie, Faculté des Sciences, Université Mohamed Ier, Oujda, Maroc.
- Leveau J.Y.** et Bouix M. (1993). Microbiologie industrielle. Les micro-organismes d'intérêt industriel. Lavoisier TEC& DOC, Paris. 08, p : 2-92.
- Leveau j.y.**, Bouix M. (1993)Microbiologie industrielle: les micro-organismes d'intérêt industriel Ed. Tec & Doc Lavoisier,-612 p.
- Leveque E.**, Janeček Š., Haye B. and Belarbi A.(2000). Thermophilic archaeal amylolytic enzymes. *Enzyme and Microbial Technology*, , 26 (1): 3-14.
- Li Heifeng**, Chi Zhenming, Wang Xiadohong, Duan Xiaohui, Ma Liyan and Gao Lingmei. Purification and characterization of extracellular amylase from the marine yeast *Aureobasidium pullulans* N13d and its raw potato starch digestion.
- Lin L.**, Chyau C. C. and Hsu W. H. (1998). Production and properties of a raw starch-degrading amylase from the thermophilic and alkaliphilic *Bacillus sp.* TS-23. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 28: 61-68.
- Lopandic K.**, Zelger S., Banzsky L. K., Eliskases-Lechner F. and Prillinger H. Identification of yeasts associated with milk products using traditional and molecular techniques. *Food Microbiol.*, 2006, 23: 341-350.
- Lowisfert S.** (1994). Recyclage du lactosérum issu de la transformation fromagère dans l'alimentation animale. Belletin technique UC AAB. 2 : 11-17.
- Lowry O. H.**, Rosebrough N. J., Farr A. L. and Randall R. J. (1951). Protein measurement with folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193: 265-275.
- Lucio de Souza E.**, Erika M. E. H., Castilho V. M., Delima A., Bellini M. Z., Cruz D.et Cruz Z. R. (1996). Purification and characterization of  $\alpha$ -amylase from *Rhizopus sp.* *Arq.Biol.Technol.* 39 (4), 831-839.
- Luquet F. M.** & Bonjeau-Linczowski Y. (1985). Lait et produits laitiers vache–brebis - chèvre. 2 les produits laitiers transformation et technologie. APRIA. Paris. P. 1-108.
- Lynd L. R.**, Weimer P. J., Van Zyl W.H., and Pretorius I. S.(2002). Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*,66 (3), p: 506-577.
- Madigan M. T.**, Martino J. M. (2006). Brock biology of microorganisms. pearson education. Upper Saddle River, NJ,USA.
- Malhotra R.**, Noorwez SM, Satyanarayana T. (2000). Production and partial characterization of thermostable and calcium independent  $\alpha$ - amylase of extreme thermophile *Bacillus thermooleovorans* NP54. *Lett. Appl. Microbiol.*, 31: 378-384.
- Mallick P.**, Broutz D. R., Eisenberg D., Yeates T O. (2002). Genomic evidence that the intracellular proteins of archaeal microbes contain disulfide bonds. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99 (15) : 9679-9684.
- Mc Carter J.D** and Withers S.G. (1996). Unequivocal identification of Asp-214 as the catalytic nucleophile of *Saccharomyces cervisiae* -glucosidase using 5-fluoro glycosyl fluorides. *J. Biol. Chem.*, 271, p: 6889-6894.
- Mc Tigie**, Kelley C.T., Doyle E.M.et Fogarty W.M. (1995). The alkaline amylase of the alkalophilic *Bacillus sp.* IMD 370. *Enzyme and MicrobialTechnology.* (17):570-573.
- McMahon E .M.**, Kelly C.T. et FogartyW.M. (1999). High maltose producingamylolytic system of a *Streptomyces* species. *BiotechnologyLetters.* 21,p: 23-26.

- Mechakra A.,** Auberger B., Remeuf F. & Lenoir J. (1999). Optimisation d'un milieu de culture pour la production d'enzymes protéolytiques acides par *Penicillium camemberti*. *Sci.Aliments*. **19** (6) : 663-675.
- Merabti R. (2006).** Isolement et caractérisation de souches levuriennes amylolytiques à partir de sol saharien algérien. Thèse de Magistère. Université Mentouri Constantine.
- Mercier C. (1985).** Les enzymes amylolytiques. In Mauranch A & Costes C. (Ed): Hydrolase et polymerases.Ed. Gauthier Villars. p: 109-142.
- Merín,** María Gabriela, María Carolina Martín, Kalliopi Rantsiou, Luca Cocolin, et Vilma Inés Morata de Ambrosini.(2015).Characterization of pectinase activity for enology from yeasts occurring in *Argentine bonarda* grape.Brazilian journal of microbiology. 46(3) : 815–823.
- Metz J.,** Zalusky R. & Herbert V. (1968). Folic acid binding by serum and milk. *Amer. J.clin. Nutr.* 21: 289-297.
- Michelen V. V.,** Castillo E. J. (1984). Production of amylase by *Aspergillus foetidus* on rice flour medium and characterization of enzyme. *J. Appl. bacteriol.* 56(3) : 395-407.
- Michelin M.,** Silva T.M., Benassi V.M., Peixoto-Nogueira S.C., Moraes L.A., Leao J.M., Jorge J.A., Terenzi H.F. and Polizeli Mde L. (2010). Purification and characterization of a thermostable  $\alpha$ -amylase produced by the fungus *Paecilomyces variotii*. *Carbohydr. Res.* 345 (16): 2348-2353.
- Miller G L. (1959).** Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analyt Chem.* 31: 426-428.
- Milner J.A.,** Martin D.J.et Smith A. (1997).Two-stage inoculate for the production of alphaamylase by *Bacillus amyloliquefaciens*. *Enzyme and MicrobialTechnology.* (21):382–386.
- Mitidieri S.,** Martinelli A. H. S., Schrank A and Vainstein M. H. (2006 ) Enzymatic detergent formulation containing amylase from *Aspergillus niger*: A comparative study with commercial detergent formulations, *Bioresource Technology*, 97(10): 1217- 1224.
- Moranelli F.,** Yaguchi M ., Calleja G. B and Nasim A.(1987). Purification and characterization of the extracellular alpha-amylase activity of the yeast *Schwanniomyces alluvius*. *Biochem Cell Biol.* 65(10): 899-908.
- Moubasher,** Abdel-Aal H., Mady Ahmed Ismail, Nemmat A. Hussein, Hassan A. Gouda. (2016). Enzyme producing capabilities of some extremophilic fungal strains isolated from different habitats of Wadi El-Natron, Egypt : Cellulase, xylanase and pectinase. *European journal of biological research.* 6(2) : 103–111.
- Mrudula Soma,** Gopal Reddy and Seenayya Gunda. (2011). Purification and characterization of highly thermostable amylopullulanase from a thermophilic, anaerobic bacterium *Clostridium thermosulfurogenes* SVM17. *Malaysian Journal of Microbiology*, 7(2): 97-106.
- Mukherjee Ashis K.,** Borah Munindra and Rai Sudhir K. (2009).To study the influence of different components of fermentable substrates on induction of extracellular  $\alpha$ -amylase synthesis by *Bacillus subtilis* DM-03 in solid-state fermentation and exploration of feasibility for inclusion of  $\alpha$ -amylase in laundry detergent formulations. *Biochemical Engineering Journal*, 43: 149-156.
- Nadirman H.** et Yoshiyuki O. (2006).Mechanism of Hydrolysis of the TreatedStarch Granules by RawStarchDigesting Amylase from *Penicillium brunneum*, *Journal Starch Starke*, (7): 25-28.
- Nair S. U.,** Singhal R. S. and Kamat M. Y. (2006).Enhanced production of thermostable pullulanase type1 using *Bacillus cereus* FDTA13 and its mutant. *Food Technol. Biotechnol.*, 44 (2): 275-282.

- Nakais S.** & Modler H. W. (2000). Processing applications milk. *Ameri. J. clinical nutrition*.59: 929-934.
- Naumov, G. I., M. Yu Shalamitskiy, et E. S. Naumova.** (2016). New family of pectinase genes PGU1b–PGU3b of the pectinolytic yeast *Saccharomyces bayanus var uvarum*. In doklady biochemistry and biophysics. 467:89–91.
- Nguyen Q.D.,** Rezessy-szab J.M. et Hoschke D. (2000). Optimisation of composition of media for the production of amylolytic enzymes by *Thermomyces lanuginosus* ATCC 34626. *Food Technol. Biotechnol.* 38 (3), pp.229-234.
- Niehaus F.,** Bertoldo C., Kahler M. et Antranikian G. (1999). Extremophiles as a source of novel enzymes for industrial application. *Applied Microbiology and Biotechnology*.(50),pp.711-729.
- Nielson J-E.,** Borchert T-V et Vriend G. (2001). The determinant of  $\alpha$ -amylase pH-activity profiles. *Protein Engineering*. Oxford University Press. 14(7), p: 505-512.
- Nouadri Tahar, Zahia Meraihi, Djekrif-Dakhmouche Shahrzed and Bennamoun Leila.** (2010). Purification and characterization of the  $\alpha$ -amylase isolated from *Penicillium camemberti* PL21. *African Journal of Biochemistry Research*, 4(6) :155-162 .
- Octaveo L. F.,** Danial J.R., Francslete R. M., Carlos Bloch J.R., Carlos P. S., et Maria F.G. (2000). Activity of wheat  $\alpha$ -amylase inhibitor towards birched  $\alpha$ -amylases and structural explanation of observed specificities. *Eur. J. Biochem.*2(67):6673.
- Odier E.,** Rouau X.(1985). Les cellulases et les enzymes de dépolymérisation de la lignine. p:199-214. . Edition Gauthier-Villard, Paris.
- Oteng-Gyang K.** (1984). Introduction à la microbiologie alimentaire dans les pays chauds. *Technique & Documentation Lavoisier*, Paris. 8, p : 43-51.
- Ouédraogo N.,** Savadogo A., Zongo C., Somda K. M. A. and Traoré S. (2012). High performance amylolytic yeast strains isolation and identification for valorization of potatoes waste available in Burkina Faso. *Int. Food Res. J.*, 19(4): 1463-1469.
- Pagani, Danielle M., Daiane Heidrich, Gustavo VB Paulino, Karine de Oliveira Alves, Paula T. Dalbem, Caroline F. de Oliveira, Zélia MM Andrade.** (2016). Susceptibility to antifungal agents and enzymatic activity of *Candida haemulonii* and *Cutaneotrichosporon dermatis* isolated from soft corals on the Brazilian reefs. *Archives of microbiology*. 45(2) : 1–9.
- Panchal C.J.** (1990). Yeasts strains selection. Marcel Dekker (ed) USA, p: 189.
- Pandey A.,** Nigam P., Soccol C. R., Soccol U. T., Singh D. et Mohan R. (2000). Advances in microbial analyses. *Biotechnol. appl. Biochem.* 31(2) : 135-152.
- Pařenicová, Lucie, Harry Kester, Jacques AE Benen, Jaap Visser.** (2000). Characterization of a novel endopolygalacturonase from *Aspergillus niger* with unique kinetic properties. *FEBS letters*. 467(23) : 333–336.
- Pascal B.** et Thomas-Jeffries W. (1990). Selective Production of Extracellular Peroxidases from *chryso sporium* in an Airlift Bioreactor, *Journal of fermentation and Bioengineering*. 70(3), pp.158-163.
- Patel R.,** Dodia M., Singh S.P., (2005). Extracellular alkaline protease from a newly isolated haloalkaliphilic *Bacillus sp.* : Production and optimization. *Proc. Biochem.*, 40; 3569–3575.
- Pelmont J.,** (1995). Enzymes : catalyseurs du monde vivant. *Presse Universitaire de Grenoble*. pp. 7; 621; 652–654.
- Pelmont Jean.** (2000). Enzymes Catalyseurs du monde vivant. *Collection Grenoble Sciences*, p.290-295.
- Pérez-Brito D.,** Magaña-Alvarez A., Lappe-Oliveras P., Cortes-Velazquez A., Torres-Calzada C., Herrera-Suarez T., Larqué-Saavedra A. and Tapia-Tussell R. (2015).

- Genetic diversity of *Clavispora lusitaniae* isolated from *Agave fourcroydes* Lem, as revealed by DNA fingerprinting. *J Microbiol.*, 53(1): 14-20.
- Pol D., (1996).** Travaux pratiques de biologie des levures. Guide de laboratoire.
- Powers, David B., Peter Amersdorfer, Marie-Alix Poul, Ulrik B. Nielsen, M. Refaat Shalaby, Gregory P. Adams, Louis M. Weiner, James D. Marks. (1 mai 2001).** Expression of single-chain Fv-Fc fusions in *Pichia pastoris*. *Journal of immunological methods.* 251(2) : 123-35.
- Prakash N., Gupta S., Ansari M., Khan Z. A. and Suneetha V. (2012).** Production of economically important products by the use of pullulanase enzyme. *International Journal of Science Innovations and Discoveries*, 2(2): 266-273.
- Prakash O. and Jaiswal N. (2010).** alpha-Amylase: an ideal representative of thermostable enzymes. *Appl Biochem Biotechnol.* 160(8): 2401-14.
- Prieto J.A., Bort B. R., Martinez J., Randez G.F., Buesa Cand Sanz P. (1995).** Purification and Characterisation of new alpha- amylase of intermediate thermal stability from the yeast *Lipomyces kononenkoae*. *Biochem Cell Biol.*, 73 (1-2), p: 41-9.
- Prillinger Hansjorg, Molnar Orsolya, Frieda Eliskases- Lechner and Ksenga Lapandic. (1999).** Phenotypic and genotypic identification of yeast from cheese. *Antonie Van Leeuwenhoek.*, 75: 267-283.
- Ranjan K. and Sahay S. (2015).** *Clavispora lusitaniae* produce pH and temperature tolerant extracellular amylase. *Point J. Bot. Microbiol. Res.* 1(1): 007-014.
- Rao R. S., Bhadra B. and Shivaji S. (2008).** Isolation and characterization of ethanol-producing yeasts from fruits and tree barks . *Letters in Applied Microbiology.*, 47 (1): 19-24.
- Ray R. R. (2001).** Production of  $\alpha$ -amylase and xylanase by an alkalophilic strain of *Penicillium griseoroseum* RR-99. *Acta Microbio. Pol.*, 50(3-4) : 305-309.
- Receveur V., Czjek M., Schulein M., Panine P., Henrissat B. (2002).** Dimension, shape, and conformational flexibility of two domains of fungal cellulases in solution probed by small angle X-ray scattering. *The journal of Biological Chemistry.* 277 (43). p: 40887-40892.
- Rezki-Bekki Meriem Amina, Laurent Benbadis, Gustavo DeBillerbeck, Zoubida Benbayer and Jean Marie François. (2013).** Isolation and physiological characterization of indigenous yeasts from some Algerian agricultural and dairy products. *Journal of Yeast and Fungal Research.*, 4(6): 75-83.
- Roovers Martine, Wouters Johan, Bujnicki Janusz M. , Tricot Catherine, Stalon Victor, Grosjean Henri and Droogmans Louis. (2014).** A primordial RNA modification enzyme: the case of tRNA (m1A) methyltransferase. *Nucleic Acids Res.* 32 (2): 465-476.
- Rudiger A., P. L. Jorgensen, and G. Antranikian. (1995).** Isolation and characterization of a heat-stable pullulanase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus woesei* after cloning and expression of its gene in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology.* 61(2): 567-575.
- Ruohonen L., Penttilä M. et Keränen S. (1991).** Optimisation of *Bacillus*  $\alpha$ -amylase production by *Saccharomyces Cerevisiae*. *Biotechnol.* 7(4) : 337-346.
- Rzedowski, W. (1972).** Utilisation des enzymes dans l'industrie des fruits et légumes. *Annual Review of Agriculture and Technology*, 21, pp 535-543.
- SACI A., (2012)** -Production d'alpha-amylase par *Streptomyces* sp. Optimisation d'un milieu de production à base de déchets d'orange. Mémoire de Magister. Université Mentouri. Constantine. p 92.
- Saha B. C., Mathupala S. P. and Zeikus J. G. (1988).** Purification and characterization of a highly thermostable novel pullulanase from *Clostridium thermohydrosulfuricum*. *Biochemical Journal*, 252: 343-348.

- Saha B.C.**, Freer S.N., Bothast R.J.(1994). Production, purification and proprieties of a thermostable (beta)-glucosidase from a color variant strain from *Aureobasidium pullulans*. *Appl. Environ. Microbiol.* 60(10).p : 3774-3780.
- Saint-Paul F.**, Humbert G., Paquet D. & Linden G. (1984). Hydrolyse enzymatique de protéines laitières industriellement : incidences sur leur solubilité. *Sci. Aliment.* 4 : 259-264.
- Samrat Chakraborty**, AbhijitKhopade, ChandrakantKokare, Kakasaheb Mahadik, BalasahebChopade. (2009). Isolation and characterization of novel  $\alpha$ -amylase from marine *Streptomyces* sp. D1. *Journal of MolecularCatalysis B : Enzymatic* 58 : 17–23.
- Sandhya C.**, Nampoothiri K.M., Pandey A., (2005). Microbial proteases. *Methods Biotechnol.*, 17; 165–179.
- Saxena R. K.**, Dutt K., Agarwal L. and Nayyar P. (2007). A highly thermostable and alkaline amylase from a *Bacillus* sp. PN5. *Bioresource Technol.*, 98: 260-265.
- Saxena Rajshree** and Singh Rajni. (2011).Amylase production by solid-state fermentation of agro-industrial wastes using *Bacillus* sp. *Braz J Microbiol.*, 42(4): 1334-1342.
- Schallmeyer M.**, Singh A., Ward O.P. (2004) .Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. *Can. J. Microbiol.*, 50:1-17.
- Schomburg D** and Salzmann M. (1991). *Enzyme Hand book* 4. Classe 3: Hydrolases.Springer-Verlag (ed). Berlin Heidelberg. Germany. p: 1-12.
- Scriban R.** (1993). *Biotechnologie*. 4<sup>ème</sup> édition. Technique et Documentation Lavoisier,Paris. P: 40.
- Scriban R.** (1993). *Biotechnologie*. p:32-690. 4<sup>ème</sup> édition. Technique de documentation-Lavoisier (éd.).
- Scriban R.** (1999). *Biotechnologie*. 5<sup>eme</sup> édition. Technique et Documentation. Lavoisier. Paris. :149-159.
- Seker S.**, Beyenal H. & Tanyolaç A. (1999). Modeling milk-clotting activity in the continuous production of microbial rennet from *Mucor miehei*. *J. food sci.* 64 (3): 525-529.
- Sharma Kinshuk** , Sarita Bhutty, S. M. Pau, Khurana Urvashi and Kumar Kohli. (2014). Isolation, Identification and Optimization of Culture Conditions of *Bacillus* sp. Strain PM1 for Alkalo-thermostable Amylase Production. *Brit. Microbiol. Res. J.* 4(4): 369-380.
- Sicard P.** (1982). Applications industrielles des enzymes . In : Les enzymes production et utilisations industrielles . Durand G., Monson P. Editions Gauthier – Villars, Paris.p:121-164.
- Silva T. M.**, Attili Angelis, Carvalho A. F. A., Silva R. D., Boscolo M. and Gomes E. (2005) Production of Saccharogenic and Dextrinogenic Amylases by *Rhizomucor Pusillus* A 13.36, *Journal of Microbiology*, 43: 561-568.
- Singh Pushpendra**, Gupta Paras, Singh Ravindra and Sharma Rajesh. (2012).Activity and stability of immobilized alpha-amylase produced by *Bacillus acidocaldarius*. *International Journal of Pharmacy and Life Sciences*, Vol. 3, Issue 12 (Suppl.): 2247-2253.
- Smitha Robinson Babysarojam**, Sreedharan Sajith, Prakasan Priji, Kizhakepowathial Nair Unni, Trikaryoor Asokan Nidheesh Roy and Sailas Benjamin. (2015). Purification and characterization of amylase from *Bacillus thuringiensis* subsp.kurstaki,Bt Research.6(3):1-8.
- Soro Yade Rene** .(2007). Purification et caractérisation de l'alpha-glucosidase du Suc Digestif de *Archachatina ventricosa* (*Achatinidae*). Application à la synthèse de polyglucosyl fructosides. L'institut National Des Sciences Appliquées de Toulouse. Thèse de Doctorat. N° d'ordre 890. 84.

- Srinivasa Rao M.** Reddy G. Venkateswara Rao G and Sambasiva Rao K. R.S. (2004) Studies on the extraction and characterisation of thermostable  $\alpha$ -amylase from pericarp of *Borassus indica*. African Journal of Biotechnology.4 : 289-291.
- Swamy M. V.**, Sai Ram M. and Seenayya G. (1994)  $\beta$ -Amylase from *Clostridium thermocellum* SS8-A thermophilic, anaerobic, cellulolytic bacterium. Letters in Applied Microbiology, 18, 301-304.
- Tchango Tchango (1996)**1. Qualité microbiologique des jus et nectars de fruits exotiques. Croissance et thermorésistance des levures d'altération, -217 p.Thèse: Sciences: Lille: n° 50376-1996-25.
- Tolan J-S. (1996)**. Pulp and paper. In: Godfrey T, West S., editors. Industrial enzymology, 2nd ed. New York: Stockton Press, pp.327-38.
- Torres, Ernesto, Tania Volke-Sepúlveda, Gustavo Viniegra-González. (2013)**. Production of hydrolytic depolymerising pectinases. Food technology and biotechnology 44(2) : 221-320.
- Uitdehaag J.C.**, Mosi R., Kalk K.H., van der Veen B.A.,Dijkhuizen L., Withers S.G and Dijkstra B.W. (1999). X-ray structures along the reaction pathway of cyclodextrin glycosyltransferase elucidate catalysis in the amylase family. Nature Struct. Biol. 6: 432-436.
- Ülger C.** et Çurakoğ Ç. (2001). $\alpha$ -amylase production by *Bacillus Subtilis* and *B.amylolique faciens* in different PEG solution. W. J. Microbiol. Biotechnol. 17, 93-94.
- Verdugo Valdez A.**, Segura Garcia L., Kirchmayr M., Ramírez Rodríguez P., González Esquinca A., Coria R. and Gschaedler Mathis A. (2011). Yeast communities associated with artisanal mezcal fermentations from Agave salmiana. Antonie Van Leeuwenhoek., 100 (4):497-506.
- vidal, (2003)**.-[http//.vidal.fr](http://.vidal.fr).
- Vieille C** and Zeikus J.G. (2001). Hyperthermophilic enzymes: Sources, uses, and molecular mechanisms for thermostability. Microbiology and molecular biology reviews. 65(1) : 1-43.
- Vincent M.(1996)**. Blood glucose: Its measurement and clinical importance. Clinica Chimica.
- Wanderley K. J.**, Torres F. A. G., Moraes L. M. P., Ulhoa C. G. (2004). Biochemical characterization of  $\alpha$ -amylase from the yeast *Cryptococcus flavus*. Fems microbiology letters. 231(2) : 165-169.
- Wang T.T.**, Lin L.L. and Hsu W.H. (1989). Cloning and expression of *Schwanniomyces occidentalis* -amylase gene in *Saccharomyces cervisiae*. Applid and environmental microbiology. 55(12) : 3167-3172.
- Williams A.C.**, Orpin C.G.(1987).B-Glycoside hydrolase enzymes present in the zoospore and vegetative growth stage of the rumen fungi *Neocallimastix patriciarum*, *Piromonas communis* and an unidentified isolate, grown on a range of carbohydrates. Canned J Microbiol, 33. p: 427-434.
- Wilson J.J.** and Ingledew W. M. (1982). Isolation and characterisation of *Schwanniomyces alluvius* amylolytic enzymes. Applid and Environmental Microbiology., 44(2) p: 301-307.
- Wolberg, Alisa S.**, Zhi Hong Meng, Dougald M. Monroe III, Maureane Hoffman. (2004). A systematic evaluation of the effect of temperature on coagulation enzyme activity and platelet function. Journal of trauma and acute care surgery. 56(6) : 1221-1228.
- Xu B.**, Hellman U., Ersson B. and Janson J.C. (2002).Purification,charaterization and amino-acid sequence analysis of a thermostable, low molecular mass endo-1,4 glucanase from blue mussel, *Mytilus edulis*. Euro.J.Biochem., 267, p: 4970-4977.
- Yasser R.** Abdel-Fattah, Nadia A. Soliman, Nabil M. El-Toukhy, Hamada El-Gendi, and Rania S. Ahmed. (2013).Production, purification, and characterisation of thermostable  $\alpha$ - amylase produced by *Bacillus licheniformis*.Isolate AI20. Journal of chemistry.



Article ID 673173 : 1-11.

**Zenin**, Celia t., et Yong k. Park. (1993). Purification and characterization of acid  $\alpha$ -amylase from *Paecilomyces sp.* Journal of fermentation technology. 61(1) : 109–112.

**Zhang Hao**, Yuping Ran Dongming Li, Yongfang Liu, Yun Xiang, Ruifeng Zhang and Yaling Dai. (2010) *Clavispora lusitaniae* and *Chaetomium atrobrunneum* as Rare Agents of Cutaneous Infection. Mycopathologia, 169 (5): 373-380.

**Zobel H. F.** and Kulp K., (1996). The staling mechanism. In: R. E. Hebeda and H. F. Zobel, Baked Goods Freshness: Technology, Evaluation, and Inhibition Staling, New York, Marcel Dekker, p. 1-64.

([univ.ency-education.com/.../1/3/.../bioch-enzymes\\_intro\\_proprietes\\_classification.](http://univ.ency-education.com/.../1/3/.../bioch-enzymes_intro_proprietes_classification.))

(<http://coproweb.free.fr/mycoweb/texte/153.htm>):06/03/2009

# *Annexes*

## **Annexe 1 : Composition des milieux de culture**

### **1-Milieux de réactivation des souches**

- **YPGA(yeast extract peptone glucose agar)**

- Extrait de levure :5 g/l
- Peptone :10 g /l
- Glucose :20 g /l
- Agar :15 g /l

- **PDA(potatoes dextrose agar)**

- Extrait de pomme de terre : 1000ml
- Glucose : 20g
- Agar : 15g

#### **Préparation de l'extrait de pomme de terre**

200g de pomme de terre tranchées lavées mais non pelées et bouillies pendant 45 min,ils sont ensuite écrasés puis filtrés et dilués avec de l'eau distillée pour un volume final d'1 litre .

- **Sabouraud**

Un flacon de 200ml du milieu Sabouraud a été fourni par le laboratoire Pasteur d'Alger.

- Eau distillée : 1000ml
- Glucose : 20g
- Agar : 15g
- Peptone : 10g

### **2-Milieux de la mise en évidence des activités enzymatiques**

- **YPMA ( *Yeast Peptone Maltose Agar* )**

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

- **YPSA ( *Yeast Peptone Starch Agar* )**

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

- **YPPA (Yeast Peptone Pectin Agar)**
  - Extrait de levure : 15g
  - Peptone : 20g
  - Pectine : 20g
  - Agar : 20g
  - Eau distillée : 1000ml
  
- **YPCA (Yeast Peptone Cellulose Agar)**
  - Extrait de levure : 15g
  - Peptone : 20g
  - Cellulose : 20g
  - Agar : 20g
  - Eau distillée : 1000ml
  
- **Gélose Caséinée**
  - Caséine : 100 g
  - Agar : 20 g
  - Eau distillée : 1000 ml.

## **Annexe 2 : Composition des réactifs révélateurs**

- ✓ **Rouge Congo pour les milieux YPMA et YPCA**
  - 1% de poudre de Rouge Congo dans 100ml d'eau distillée.
  
- ✓ **Lugol pour le milieu YPSA**
  - Eau distillée : 100 ml
  - Iodure de potassium : 2 g
  - Iode métalloïde I<sub>2</sub> : 1 g
  
- ✓ **Lugol pour le milieu YPPA**
  - 1g de diiode (I<sub>2</sub>)
  - 5g d'iodure de potassium (KI)
  - Eau distillée : 330ml

## **Annexe 3 : Milieu de production des enzymes**

- ✓ **solution de sels**

(KH<sub>2</sub>P O<sub>4</sub>: 850 mg /l ,K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>: 150 mg /l,MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O : 500 mg /l,CaCl<sub>2</sub> 6H<sub>2</sub>O:100mg /l)
  
- ✓ **La solution d'oligo-éléments :**

(CuSO<sub>4</sub> 5H<sub>2</sub>O : 40 µg/l, KI : 100 µg/l, FeCl<sub>3</sub> 6H<sub>2</sub>O : 200 µg/l et MnSO<sub>4</sub> 4H<sub>2</sub>O : 400µg/l).

## **Annexe 4 : Le dénombrement cellulaire par comptage sur la cellule de Thomas**

Aire = 0,05 mm x 0,05 mm = 0,0025 mm<sup>2</sup>

Volume = 0,0025 mm<sup>2</sup> x 0,1 mm = 2,5 x 10<sup>-4</sup> mm<sup>3</sup> = 2,5 x 10<sup>-7</sup> ml

[Concentration cellulaire] = nombre de cellules comptées x le facteur de dilution x le facteur de conversion / nombre de carées x le volume d'un carré

[Concentration cellulaire] = 136 x 10 x 10<sup>6</sup> / 128 x 0,00025 = 42,5 x 10<sup>6</sup> cellules/ml

Pour une concentration cellulaire de 2.10<sup>6</sup> et par application numérique, nous aurons besoin de : 59µl.

## **Annexe 5 : Dosage des activités enzymatique**

### **1-Dosage de l'activité amylasique (méthode de Bernfeld 1955)**

#### **✓ Principe**

L'activité de l' $\alpha$ -amylase est évaluée par l'hydrolyse de l'amidon par les extraits enzymatiques. L'amidon hydrolysé libère du maltose dosé par la méthode de Bernfeld (1955) qui utilise l'acide 3,5-dinitrosalicylique (DNSA) comme inhibiteur de l'amylase. La réaction est colorimétrique et l'intensité de la coloration est proportionnelle à la quantité du maltose libérée.

#### **✓ Préparation du substrat**

-Dissoudre 1 g d'amidon dans 100 ml de tampon phosphate pH 6,5 ou Tris HCl 8 (selon le cas)

#### **✓ Préparation du réactif DNSA**

-Dissoudre 1g de l'acide 3,5-dinitrosalicylique dans 20 ml de NaOH 2N et 50 ml d'eau distillée  
-Ajouter 30g de tartrate double de sodium et potassium, compléter à 100 ml avec de l'eau distillée, filtrer.

### **2-Dosage de l'activité cellulasique**

- ✓ **CMC 1%** : 1g de CMC dissoudre dans un petit volume de tampon citrate ,puis compléter à 100ml par le tampon.

✓

✓ **Protocole de la courbe étalon glucose**

Concentration g/l	0	0,125	0,25	0,5	0,75	1
Solution mère glucose(ml)	0	0,125	0,25	0,5	0,75	1
Eau distillée	1	0,875	0,75	0,5	0,25	0
Agitation						
DNSA(ml)	1	1	1	1	1	1
Incubation à 100 pendant 5min						
Refroidissement dans un bain de glace						
Diluer avec 10ml de l'eau distillée						
Agiter						
Lire l'absorbance à 540 nm contre le blanc(eau distillée)						

**Annexe 6: Dosage des protéines (méthode de Lowry 1951)**

✓ **Principe**

Les protéines sont quantifiées en utilisant la méthode du Folin Ciocalteu (Lowry et al 1951). L'addition successive à une solution protéique diluée d'un sel de cuivre en milieu alcalin et du réactif des phénols de Folin Ciocalteu donne une coloration bleue foncée. Celle-ci résulte de la réaction du cuivre sur les liaisons peptidiques.

✓ **Réactifs**

- **Solution A** : Carbonate de sodium ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) à 2% dans NaOH (0.1N)
- **Solution B** : Tartrate double de sodium et potassium à 2% .
- **Solution C** : Sulfate de cuivre ( $\text{CuSO}_4$ ) à 1% .

Préparer extemporanément la solution réactive M en respectant l'ordre d'addition des réactifs et en agitant bien après chaque addition :

- Solution C : 0,5 ml
- Solution B : 0,5 ml
- Solution A : 50 ml

- ✓ **Réactif de Folin** : Le Folin Ciocalteu commercial à dilué 3 fois dans l'eau distillée au moment de l'emploi.

<b>Master: BIOCHIMIE Analyse Protéomique et Santé</b> <b>AICHOOR Nour El Houda</b>	<b>Date de soutenance : 02Juillet 2017</b> <b>Faculté SNV, Université Frères Mentouri</b>
<b>Intitulé :Etude des hydrolases chez les levures.Purification et caractérisation de <math>\alpha</math>-amylase chez <i>Clavispora lusitaniae</i> ABS7</b>	
<p><b>Résumé :</b> Ce travail vise à étudier les hydrolases chez les levures et produire une <math>\alpha</math>-amylase thermostable par des levures contaminant le blé cultivé et récolté dans une zone aride (Biskra, Sahara, Sud Algérie).La mise en évidence de la production des 05 enzymes :<math>\alpha</math>-amylase, pectinase, maltase, cellulase et protéase est effectué sur milieu solide (Boite de Pétri) par deux souches levuriennes (L6 : <i>Meyerozyma guilliermondi</i> et L7 : <i>Clavispora lusitaniae</i> ABS7). Après 48 h d'incubation à différentes températures 40°C, 50°C, 60°C les deux souches ont montré une bonne croissance et ont produit 03 enzymes amylolytiques à savoir (l'<math>\alpha</math>-amylase, la pectinase, la maltase) et la cellulase.La souche de levure L7 : <i>Clavispora lusitaniae</i> ABS7 semble être la plus performante dans la production de <math>\alpha</math>-amylase thermostable, donc elle est sélectionnée pour la suite de l'étude. L'étude de la production enzymatique <math>\alpha</math>-amylase, pectinolytique et cellulasique par la souche <i>Clavispora lusitaniae</i> ABS7 est effectuée par une fermentation en batch en erlenmeyers de 500 ml contenant 500 ml de milieu de production à base de lactosérum traité, supplémenté de 0,22g d'extrait de levure, 5,3 ml de solution de sels et 2,6 ml de la solution d'oligo-éléments et de substrat inducteur pour chaque enzyme séparément. la souche <i>Clavispora lusitaniae</i> ABS7 produit respectivement, des activités de l'ordre de <b>29530 U</b> pour la <b>pectinase</b> et de <b>28518,52U</b> pour l'<b><math>\alpha</math>-amylase</b> et de <b>16324,8 U</b> pour la <b>cellulase</b>. Nous avons choisi de continuer notre travail avec l'<math>\alpha</math>-amylase, comparer ses caractéristiques, après purification, avec ceux d'une <math>\alpha</math>-amylase commerciale d'<i>Aspergillus oryzae</i>. La purification de l'alpha-amylase consiste à l'utilisation de l'acétone qui a permis l'augmentation de l'activité spécifique de l'<math>\alpha</math>-amylase de 320,073 à 806,32 U/mg de protéines avec une récupération de 97,4 % , et le profil chromatographique de l'<math>\alpha</math>-amylase sur Séphacryl-S200 montre l'existence de trois fractions protéiques contenant des activités <math>\alpha</math>-amylasiques dont le premier pic renferme la fraction protéique et l'activité enzymatique les plus élevées. L'étude de l'effet du pH sur l'activité de l'<math>\alpha</math>-amylase de <i>Clavispora lusitaniae</i> et l'<math>\alpha</math>-amylase commerciale montre des valeurs maximales de 12185,18U à pH 8 pour l'<math>\alpha</math>-amylase de <i>Clavispora lusitaniae</i> et 5899,7 à pH 7 pour l' <math>\alpha</math>-amylase commerciale. D'autre part, l'étude de l'effet de la température sur les activités <math>\alpha</math>-amylasiques indique que l'activité enzymatique de l'<math>\alpha</math>-amylase de <i>Clavispora lusitaniae</i> atteint son maximum à 70°C (24907,4 UI) ,tandis que la température maximale pour l'<math>\alpha</math>-amylase commerciale est de 50°C (15074,07 UI) . Les résultats de l'étude de la thermostabilité enzymatique montrent qu'à 70°C l'<math>\alpha</math>-amylase de <i>Clavispora lusitaniae</i> conserve 99,97% de son activité initiale pour un traitement thermique de 60 min, et pour une durée de 180 min d'incubation, l'enzyme maintien 99,80% de son activité. A 100°C et après 120 min d'incubation l'enzyme garde 99,74% de son activité, et pour une durée de 180 min, l'enzyme conserve 99,68% de son activité. L'<math>\alpha</math>-amylase commerciale conserve après 30min de traitement thermique 96,57 % et 94,53% de son activité initiale à 50°C et 100C° respectivement, ainsi qu'après 180 min ,elle maintien 96,22 et 94,20 % de son activité initiale à 50°C et 100C° respectivement.. Les sels et les substances chimiques ont des effets variables sur l'activité des deux enzymes. Le Ca<sup>2+</sup> n'affecte pasl'<math>\alpha</math>-amylase de <i>Clavispora lusitaniae</i>,cependant il est un inhibiteur pour l'<math>\alpha</math>-amylase commerciale (44,44%). En revanche, l'EDTA inhibe l'activité de l'enzyme de L7 et celle de l'enzyme commerciale, avec une perte respectives de 19,21% et 33,33% de leur activité résiduelle. De cette étude,il ressort que l'activité de l'<math>\alpha</math>-amylase de <i>Clavispora lusitaniae</i> ABS7 (24907,4 UI) est meilleure que celle de l'enzyme commerciale (15074,07 UI) et il semble que l'<math>\alpha</math>-amylase alcaline de L7 est aussi thermostable que l'enzyme commerciale :l'activité maximale à 70°C et une thermorésistance à 100°C (maintien 99,68% de l'activité) pendant un traitement thermique de 3 heures, Tous ces résultats permettent donc de qualifier l'<math>\alpha</math>-amylase produite par <i>Clavispora lusitaniae</i> ABS7 comme une enzyme thermostable pouvant éventuellement être utilisée en industries.</p> <p><b>Mots clés :</b> <math>\alpha</math>-amylase, <i>Clavispora lusitaniae</i>, levure, thermostabilité, purification.</p>	
<b>Laboratoire de recherche : Laboratoire de Génie Microbiologie et Applications (GMA)</b>	
<b>Devant le Jury</b>	
<b>Président du jury : NOUADRI T.</b>	M.C.A,Univerité Frères MENTOURI Constantine.
<b>Rapportrice :DAKHOUCHE S</b>	M.C.B, ENS, ASSIA DJEBAR Constantine.
<b>Examinatrice : BENNAMOUN L.</b>	M.A.A.,Univerité Frères MENTOURI Constantine