

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Mentouri Constantine
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biochimie et Microbiologie

N° de Série :

N° d'ordre :



Présenté pour obtenir le diplôme de Magistère
En : Microbiologie Appliquée
Option : Biotechnologies Microbiennes

Présenté par : Benaouida Karima

Thème

Etude de l'alpha amylase de levures isolées d'un écosystème extrême(sol environnant des sources thermales) et cultivées sur un milieu à base de lactosérum

Soutenu le : 02 / 07 /2008

Devant le jury :

<i>Président :</i>	<i>Bousseboua H.</i>	<i>Prof., Univ. Mentouri-Constantine.</i>
<i>Rapporteur :</i>	<i>Meraihi Z.</i>	<i>Prof., Univ. Mentouri-Constantine.</i>
<i>Examineur :</i>	<i>Mechakra A.</i>	<i>M.C., Univ. Mentouri-Constantine.</i>
	<i>Kacem-Chaouch N.</i>	<i>M.C., Univ. Mentouri-Constantine.</i>

Année Universitaire : 2007 /2008

Remerciements

C'est avec un grand plaisir que je tiens à exprimer toute ma gratitude à tous ceux qui ont contribué à la réalisation de ce mémoire.

Je tiens tout d'abord à remercier très vivement Madame Meraihi Z., Professeur à l'université de Constantine, d'avoir accepté de diriger ce travail.

Mes vifs remerciements s'adressent également à tous les membres de jury qui ont bien voulu juger ce travail :

- Monsieur le Professeur Bousseboua H., qui me fait l'honneur d'accepter la présidence du jury de soutenance.*
- Madame Mechakra A. et Monsieur Kacem-chaouche N., Maîtres de conférences, pour avoir accepté d'examiner ce travail.*

Un grand merci s'adresse aussi à toute notre équipe de recherche, particulièrement à M^{me} Djekrif-Dakfimouche C., M^{me} Bennamoun L., M^{me} Meziani F.Z et M^{lle} Leghlimi H., qui m'ont énormément aidé par leurs précieux conseils.

Je n'oublierai pas de remercier toute l'équipe du laboratoire d'analyse médicale et d'hygiène du secteur sanitaire de Mila, en particulier Monsieur Belahmer M., Monsieur Madjoudj H. et Zouaghi H., pour leur aimable aide, leur soutien et leur encouragement.

Enfin, je remercie tous mes collègues (Kenza, Amel, Sara, Salima, Madina, Rayen, Feriel et Hanen), qui ont fait que ce travail s'est passé dans une bonne ambiance.

Karima

Dédicaces

J'ai l'honneur de dédier ce modeste travail réalisé grâce à l'aide de Dieu
tout puissant

A

Celui qui m'a toujours encouragé et soutenu durant toutes mes
années d'études. Merci pour ton amour et ta confiance totale...A toi très
cher papa.

A

Celle qui m'a tant bercé, tant donné et tant enseigné, toi qui m'a guidé
dans le droit chemin, toi qui m'a appris que rien n'est impossible...A toi ma
maman.

A

Mes chères sœurs : Soumia, Fadila et Nadjoua

A

Mes chers frères : Mohamed, Amir et Yacine

A

Mes chères amies, pour tous les moments que nous avons partagés

A

La mémoire de mon cher grand-père Ali, que Dieu tout puissant t'accorde
sa sainte miséricorde et t'accueille en son vaste paradis.

** Karima **

Sommaire

Introduction	1
---------------------------	---

Revue bibliographique

Chapitre 1 : Les levures

1. Historique.....	3
2. Caractéristiques microbiologiques des levures.....	3
2.1. Définition.....	3
2.2. Habitat.....	4
2.3. Morphologie et structure.....	4
2.4. Reproduction de levure.....	4
2.5. Classification.....	6
3. Physiologie et croissance des levures.....	6
3.1. Les besoins nutritifs.....	6
3.2. Les conditions physicochimiques de croissance.....	8
3.3. Le métabolisme.....	9
4. Technique d'étude des levures.....	10
4.1. Isolement des levures.....	10
4.2. Critères et méthodes d'identification.....	10
4.2.1. Tests morphologiques.....	11
4.2.2. Tests physiologiques et biochimiques.....	12
5. Les levures en biotechnologie.....	13
5.1. Boissons alcoolisées	13
5.2. Panification.....	13
5.3. Affinage des fromages	13
5.4. Production de protéines	15
5.5. Production d'alcools industriels	15
5.6. Autres utilisations	15
5.7. Avantage des levures en industrie.....	16

Chapitre 2 : L' α -amylase

1. Introduction.....	18
2. Définition.....	18
3. Nomenclature de l' α -amylase.....	18
4. Structure.....	20
5. Les différentes origines.....	20
6. Mode d'action.....	22
7. Mécanisme d'action.....	24
8. Caractéristiques de l' α -amylase.....	26
9. Intérêt et utilisation industrielle.....	27

Chapitre 3 : Lactosérum

1. Généralité sur le lactosérum.....	29
2. Sources industrielles du lactosérum.....	29
3. Différents types de lactosérum.....	30
4. Composition chimique du lactosérum.....	30
5. Intérêt industriel du lactosérum.....	31

Matériel et méthodes

1. Isolement des souches levuriennes productrices d' α -amylase.....	32
1.1. Echantillonnage.....	32
1.2. Détermination du pH des échantillons.....	33
1.3. Isolement des levures.....	33
1.4. Conservation.....	33
1.5. Sélection des souches amylolytiques.....	34
2. Etude de la composition chimique de lactosérum.....	34
2.1. Détermination de la matière sèche.....	34
2.2. Détermination des cendres.....	34
2.3. Détermination de l'acidité.....	34
2.4. Détermination du pH.....	35
2.5. Dosage de l'azote totale.....	35
2.6. Dosage des sucres totaux.....	35
2.7. Dosage de la matière grasse.....	35
2.8. Dosage des sels minéraux.....	36
3. Production de l'enzyme.....	36
3.1. Milieu de base.....	36
3.2. Préparation de milieu de base.....	36
3.3. Inoculum.....	38
3.4. Conduite de la fermentation.....	38
4. Etude de la thermostabilité de l' α -amylase des souches sélectionnées.....	38
5. Identification de la souche productrice de l' α -amylase.....	38
5.1. Tests morphologiques.....	39
5.2. Tests physiologiques et biochimiques.....	40
6. Cinétique de production de l' α -amylase par la souche sélectionnée.....	41
6.1. Mesure du PH.....	41
6.2. Mesure de la biomasse.....	41
6.3. Dosage de l'activité amylasique.....	41
6.4. Dosage des protéines.....	42
6.5. Dosage des sucres.....	43
7. Etude de quelques propriétés physico-chimiques de l' α -amylase.....	43
7.1. Effet du pH.....	43
7.2. Effet de la température.....	43
7.3. Etude de la thermostabilité.....	43

Résultats et discussion

1. Isolement des souches levuriennes.....	44
2. La mise en évidence de l'activité amylasique.....	48
3. Production de l' α -amylase levurienne.....	48

3.1. Composition chimique du lactosérum.....	48
3.2. Détermination de la concentration optimale du lactosérum.....	50
3.3. Sélection de la souche productrices d' α -amylase thermostable.....	52
4. Identification du genre de la souche sélectionnée.....	54
4.1. Tests morphologiques.....	54
4.2. Tests physiologiques et biochimiques	56
5. Etude Cinétique	57
5.1. Cinétique de croissance de la levure <i>Schwanniomyces sp</i>	57
5.2. Cinétique de la production de l' α -amylase de la levure <i>Schwanniomyces sp</i>	59
5.3. Evolution des concentrations des glucides.....	59
5.4. Evolution du pH et des protéines au cours de la fermentation.....	61
6. Etude de quelques caractéristiques de l' α -amylase de <i>Schwanniomyces sp</i>	63
6.1. Effet de la variation du pH sur l'activité amylasique.....	63
6.2. Effet de la température sur l'activité amylasique.....	63
6.3. Etude de la thermostabilité de l' α -amylase.....	65

Conclusion.....	67
------------------------	-----------

Références bibliographiques

Annexes

Résumé

Liste des abréviations

ANOVA : Analyse de la variance

C° : Degré CELSIUS

DNSA : L'acide 3,5 dinitosalicylique

EDTA : L'éthylène-diamine tetra acetate

g : Gravité

h : heure

KDa : Kilo Dalton

M : Molaire

MA : Malt Agar

ME : Malt Extract

min: minutes.

PDA : Potato Dextros Agar

rpm : rotation par minute

SM : Solution mère

sp : espèce

YMA : Yeast Malt Agar

YG : Yeast Glucose

YM: Yeast Malt

YPG: Yeast Peptone Glucose

µm: micro-mole

Liste des figures

Figure 1 : Division de cellules levuriennes par bourgeonnement.....	5
Figure 2 : Cycle de reproduction de la levure.....	5
Figure 3 : La représentation des domaines et des éléments de la structure secondaire.....	19
Figure 4 : Structure tridimensionnelle de l' α -amylase.....	21
Figure 5 : Mécanisme catalytique des hydrolases glucosyliques.....	23
Figure 6 : Courbe étalon des cellules.....	37
Figure 7 : Aspect macroscopique des cinq souches levuriennes isolées.....	45
Figure 8 : Test de sélection de souches amylolytiques.....	47
Figure 9 : Diamètre des zones de lyse des souches levuriennes amylolytiques.....	49
Figure 10 : Effet de la dilution du lactosérum sur la production de l' α -amylase	51
Figure 11 : Thermostabilité de l' α -amylase des deux souches S₂ et S₃	53
Figure 12 : Aspect macroscopique et cultural de la souche S₃	55
Figure 13: Aspect des cellules de la souche S₃ . Grossissement x 1000.....	55
Figure 14 : Evolution cinétique de la croissance, la production de l' α -amylase et la consommation des glucides au cours de la fermentation de <i>Schwanniomyces sp</i>	58
Figure 15 : Evolution cinétique des protéines et de pH au cours de la fermentation de <i>Schwanniomyces sp</i>	60
Figure 16 : Effet du pH sur l'activité de l' α -amylase de <i>Schwanniomyces sp</i>	62
Figure 17: Effet de la température sur l'activité de l' α -amylase de <i>Schwanniomyces sp</i>	62
Figure 18 : Effet de la thermostabilité de l' α -amylase de <i>Schwanniomyces sp</i>	64

Liste des tableaux

Tableau 1 : Classification des levures.....	7
Tableau 2 : Production et utilisation de certaines enzymes levuriennes.....	14
Tableau 3 : Classification et nomenclature des Amylases.....	17
Tableau 4 : Quelques propriétés des α -amylases.....	25
Tableau 5 : Composition chimique du lactosérum en (g/l).....	30
Tableau 6 : Caractéristiques des sites d'échantillonnages.....	32
Tableau 7 : Isolement des levures à partir des différents échantillons.....	44
Tableau 8 : Analyse de sol prélevée à partir de zone de Téléghma et Guelma.....	46
Tableau 9 : Composition chimique de lactosérum (g/l).....	49

Introduction

Un grand nombre de substances que nous utilisons chaque jour, résulte de l'exploitation des microorganismes dont l'origine remonte à la plus haute antiquité. Cependant, il a fallu attendre les découvertes de Pasteur pour voir s'établir les connaissances précises qui ont permis la naissance de l'industrie des fermentations. Le développement de cette nouvelle industrie a donné une preuve éclatante du rôle utile des microorganismes (Simon et Meunier, 1970).

Dans ce contexte, les levures ont occupé une place primordiale dans des industries agro-alimentaires (brasserie, cidrerie, vinification et fromagerie...). Ce sont des microorganismes eucaryotes et unicellulaires ayant des capacités à se multiplier rapidement car elles sont moins exigeantes en nutriments. Elles sont facilement mis en œuvre 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 protéines glycosylées fonctionnelles, sont mis à contribution dans l'élaboration de biomédicaments comme l'insuline, les interférons, le vaccin de l'hépatite B, l'hémoglobine et la transferrine etc. (Mercier, 1997 et Blin, 2002 ; <http://asso.objectif-sciences.com/Une-nouvelle-methode-de-production-de-proteines.html>).

Par ailleurs, l'usage des préparations enzymatiques s'est considérablement développé dans de nombreux secteurs de la bio-industrie. Les enzymes amylolytiques, les α -amylases en particulier, sont les plus importantes parmi les enzymes commercialisées à cause de la diversité de leur application (amidonnerie, glucoserie, brasserie...) (Monsan, 1982 et Pandey et al., 2000). Les applications industrielles sont dues à la thermorésistance des α -amylases de souches sélectionnées et à leur adaptation au processus industriel dont les températures dépassent parfois les 60°C (Burhan et al, 2003). Avec l'arrivée de nouvelles frontières en biotechnologie, le spectre de l'application de l' α -amylase s'est élargi à d'autres domaines comme les chimies : clinique, pharmaceutique ou analytique (Alva et al., 2007).

Comme nous l'avons mentionné ci-dessus, les industries nécessitent des souches productrices d'enzymes thermostables capables de résister au processus industriel. Pour répondre à cette exigence, nous avons consacré la première partie de notre travail à la sélection et la caractérisation des souches levuriennes productrices d' α -amylase thermostable, isolées à partir du sol environnant de deux sources thermales (Hammam Debagh-Guelma et Hammam Telegma-Mila, à l'Est Algérien). Ces souches levuriennes sont sélectionnées également par leur

capacité à fermenter le lactosérum (sous produit de l'industrie laitière), dont nous avons l'intention de le revaloriser.

En effet, en Algérie, la quantité globale de lactosérum, jetée quotidiennement, est de 6000 litres par unité de production (Gana et Touzi, 2001). Par sa teneur en sucres fermentescibles (lactose 40%) et en matières organiques (protéines solubles 1.1%) et minérales (Ca^{2+} , Cl^-), il serait intéressant, voire indispensable, de l'utiliser comme milieu de fermentation pour la production de divers métabolites levuriens utiles en industries ou en pharmacie.

Le second axe de notre recherche est consacré à une étude cinétique de la production de l' α -amylase et de la croissance de la souche levurienne sélectionnée. Cette étude a pour but la détermination du temps optimal de croissance et de production de l'enzyme. Enfin, nous terminons notre travail par la détermination de quelques caractéristiques physicochimiques de l' α -amylase (pH, température et thermostabilité), informations utiles pour la mise en application industrielle éventuelle de cette enzyme.

Chapitre1 : Les levures

1. Historique

Les levures sont les premiers micro-organismes utilisées par l'homme depuis des millénaires, en particulier dans la fabrication des boissons alcoolisées et de pain par fermentation (Bouix et Leveau, 1991 et Pol, 1996). Elles sont également les premiers micro-organismes à être observés au microscope par A. Van Leeuwenhoek en 1680 qui les a dessinées. Ce n'est qu'avec les travaux de Pasteur (1866-1876) que le rôle des levures dans la fermentation alcoolique a été mis en évidence. A la même époque, la levure fut à l'origine du développement de la biochimie avec notamment les travaux de Büchner. A l'heure actuelle, les levures constituent un matériel expérimental de choix en raison de leur double état de micro-organismes et d'eucaryotes (D. Pol., 1996).

2. Caractéristiques microbiologiques des levures

2.1. Définition

Le mot levure, selon Phaff et al., (1968), provient du mot latin « levare » qui se traduit par lever. Ce mot a été appliqué aux levures en raison de l'aptitude de ces micro-organismes à produire de CO₂ pendant la fermentation et à lever la surface mousseuse d'un milieu liquide de fermentation (Oteng-Gyang, 1984).

Les levures peuvent être définies comme des eucaryotes microscopiques. Elles sont des hétérotrophes faisant partie du groupe des champignons dont on les distingue par leur caractère unicellulaire et l'absence de vrai mycélium (au moins dans la plus grande partie de leur cycle biologique) (Guiraud, 1998).

2.2. Habitats

Les levures sont des espèces ubiquitaires, largement distribuées dans la nature. Elles se rencontrent sur les végétaux riches en sucre directement assimilables (Bouix et Leveau, 1991). En effet, les milieux fortement concentrés en sucre représentent un de leur environnement préférés, comme les sirops, le miel, les fleurs et de nombreux fruits (les pommes, les raisins...)(Leclerc, 1975 et Oteng-Gyang, 1984). On trouve également des levures à la surface ou à l'intérieur d'autres êtres vivants, dans les eaux, dans l'atmosphère et dans le sol (Leveau et Bouix, 1993 et Pol., 1996). Par ailleurs, le sol constitue un large réservoir assurant leur survie dans des conditions défavorables (Leclerc, 1975).

2.3. Morphologie et Structure

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

2.4. Reproduction de levures

Les levures ont un mode de multiplication bien spécial. Elles se reproduisent aussi bien par un cycle asexué (végétatif) que par un cycle sexuée (sporulation) en fonction des conditions favorables ou défavorables du milieu (Larpen et Larpen-Gourgaud, 1997). De plus, les populations des levures connaissent un cycle de vie complexe, dans lequel on trouve alternativement des cellules haploïdes et des cellules diploïdes. 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). La reproduction sexuée s'effectue par conjugaison des deux cellules qui donnent naissance à un zygote



Figure 1 : Division de cellules levuriennes par bourgeonnement
(Leclerc et al., 1995)

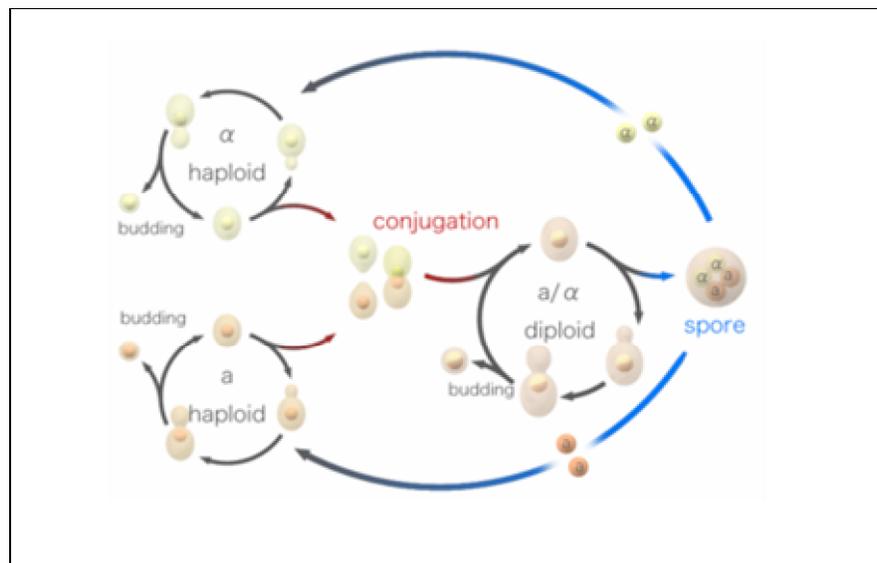


Figure 2 : Cycle de reproduction de la levure
(Leclerc et al., 1995)

Après différenciation et méiose un asque à 4 ascospores haploïdes se forme (Oteng-Gyang, 1984) (Figure2).

2.5. 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 bases de l'ADN, la structure de la paroi, le type de coenzyme Q sont pris en compte pour permettre des études plus rigoureuses. La classification actuelle répertorie 60 genres et 500 espèces (Bouix et Leveau, 1991) (tableau 1).

Selon leur mode de reproduction, les levures se divisent en trois grandes classes :

- **Les ascomycètes** : se reproduisent par un processus sexué dans une asque résultant de la transformation d'une cellule après méiose.
- **Les basidiomycètes** : réalisent une reproduction sexuée avec formation de basidiospores sur une baside.
- **Les deutéromycètes** : regroupent l'ensemble des levures ne présentant pas de mode connu de reproduction sexuée, ne se multipliant que par reproduction végétative.

3. Physiologie et Croissance des levures

3.1. Les besoins nutritifs

Pour se maintenir, croître et se reproduire, la levure doit trouver dans son milieu externe les éléments nécessaires à la synthèse cellulaire et des conditions physicochimiques favorables.

➤ *Sources de carbone*

Les sources carbonées sont d'une grande importance pour les champignons puisqu'elles fournissent le carbone exigé pour la biosynthèse de constituants cellulaires variés tels que les glucides, les lipides, les protéines, les acides nucléiques etc. (Botton, 1991). Les levures utilisent des sucres comme source principale de carbone et par conséquent d'énergie.

Tableau 1 : Classification des levures (D'après Kreger Van Rij, 1984)

Classe	Famille	Sous famille	Genre	
A S C M E T E S	Spermophthoraceae		Coccidiascus Metschnikowia Nematospora	Pachysolen Pachyticospora Pichia
	Saccharomycetaceae	Schizosaccharomycetoideae Nadsonioideae Lipomycetoideae Saccharomycetoideae	Schizosaccharomyces Hanseniaspora Nadsonia Saccharomycodes Wickerhamia Lipomyces Ambrosiozyma Arthroascus Citeromyces Clavispora Cyniclomyces Debaryomyces Dekkera Guilliermondella	Saccharomyces Saccharomycopsis Schwaniomyces Sporopachydermia Stephanoascus Torulaspora Wickerhamiella Wingea Zygosacchromyces Hansenula Isstchenkia Kluveromyces Lodderomyces
B A S I D I E S P O R E S	Filobasidiaceae		Chionosphaera Filobasidiella Filobasidium	
	Levures formants des teliospores		Leucosporidium Rhodosporidium Sporidiobolus	
	Sirobasidiaceae		Fibulobasidium Sirobasidium	
	Tremellaceae		Holtermannia Tremella	
D O S T R O M I C E S	Cryptococcaceae		Aciculoconidium Brettanomyces Candida Cryptococcus Kloeckera Malassezia Oosporidium Phaffia Bullera	Rhodotorula Sarcinosporon Schizoblastosporion Sterigmatomyces Sympodiomyces Trichosporon Trigonopsis Sporolomyces
	Sporobolomycetaceae			

Les sources les plus efficaces sont des oses (glucose, fructose et mannose) qui sont utilisables par plus de 400 espèces identifiées (Pol, 1996). D'autres levures particulières utilisent des

sources de carbone non conventionnelles ; elles sont capables d'oxyder des acides organiques et les alcools (éthanol, Glycérol) (Oteng-Gyang, 1984).

➤ *Sources d'azote*

La plupart des levures sont capables d'assimiler différentes sources d'azote organiques et inorganiques pour la biosynthèse d'acides aminés, de protéines, d'acides nucléiques et de vitamines (Larpent et Larpent-Gourgaud, 1997 et Guiraud, 1998). Les levures ne peuvent pas fixer l'azote libre. Par ailleurs, l'assimilation des ions d'ammoniums est largement répandue chez ces dernières. Cependant, d'autres espèces levuriennes se caractérisent par une capacité à utiliser les nitrates et d'autres composés comme source d'azote (les acides aminés, l'urée, la biotine et les bases puriques et pyrimidiques) (Walker et al., 1997 et Bouix et Leveau, 1999).

➤ *Oligoéléments et facteurs de croissance*

Les levures ont besoin d'éléments nutritifs pour assurer un développement adéquat. Il s'agit de sels minéraux et d'oligoéléments nécessaires à de très faibles concentrations (Larpent-Gourgaud et Sanglier, 1992). De plus, d'autres facteurs leur sont essentiels comme les vitamines (la biotine, la thiamine et l'acide pantothénique), qui interviennent lors des réactions enzymatiques, comme des coenzymes (Botton et al., 1990).

3.2. Les conditions physicochimiques de croissance

➤ *La température*

La température courante de culture des levures se situe entre 25 et 30°C, pour assurer la croissance adéquate de la plupart des levures. Toutefois, ces températures ne sont pas rigoureusement les températures optimales de croissance que les levures trouvent dans leurs habitats naturels. (Leveau et Bouix, 1993). En effet, la température maximale de croissance peut se situer entre 35°C et 45°C. D'autres levures peuvent se développer à 0°C (Oteng-Gyang, 1984) ou à plus de 50°C pour *Candida Slooffii*, *Saccharomyces telluris* et *Torulopsis bovina*. (Bourgeois et al., 1988 et Leveau et Bouix, 1993).

➤ *Le pH*

Les levures ont tendance à coloniser des environnements acides et par leurs activités métaboliques (la respiration et la sécrétion d'acide organique) acidifiant encore plus le milieu. Leur croissance optimale se fait à des pH entre 4,6 à 6,5 et beaucoup d'espèces tolèrent de grandes variations de pH. Elles peuvent s'adapter à des milieux acides (pH 2,8 à 3,0) ou alcalins (pH 8 à 8,5) (Bourgeois et al., 1988 et Larpent et Larpent Gaurgaud, 1997).

➤ *La pression osmotique et l'activité d'eau*

La pression osmotique intervient également sur le développement des levures dont l'effet varie d'une souche à une autre. La plupart des souches ne peuvent se développer à des activités de l'eau inférieure à 0,90. Certaines tolèrent des pressions osmotiques plus élevées correspondant à une activité de l'eau de l'ordre de 0,60 mais avec un métabolisme lent. Ces levures sont dites xérotolérantes (Leveau et Bouix, 1979 et Larpent et Larpent Gaurgaud, 1997), car elles sont capables de synthétiser des osmoprotecteurs (betaine, glycérol...).

➤ *L'oxygène*

Toutes les levures sont capables de se développer en présence d'oxygène, il n'y a pas de levures anaérobies strictes. Certaines levures sont aérobies strictes comme les genres : *Rhodotorula*, *Lipomyces*, *Cryptococcus* etc. Les autres sont aéro-anaérobies facultatives préférant un métabolisme soit fermentaire (comme les *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces* et *Brettanomyces*) soit respiratoire (comme les *Candida*, les *Kluyveromyces* la plupart des *Pichia* et des *Hansenula* et Quelques *Torulopsis*) (Bouix et Leveau, 1991).

3.3. Le métabolisme

Les levures présentent une diversité métabolique dans la façon de production et de consommation de l'énergie à partir de substrats dégradés. Toutes les levures sont capables de dégrader le glucose, le fructose et le mannose en présence d'oxygène, par un métabolisme oxydatif conduisant à la formation de CO₂ et H₂O (Pol, 1996). La voie de dégradation des glucides étant la glycolyse qui convertit les sucres en pyruvate, l'entrée dans cette voie varie selon le glucide tandis que la destinée du pyruvate dépend à la fois du sucre utilisé et de l'espèce de levure considérée. En se référant au catabolisme du pyruvate formé à partir du glucose, on peut distinguer deux types de métabolisme (Botton, 1991) :

➤ Métabolisme oxydatif : les levures utilisant le glucose en présence d'oxygène, par

conséquent, leur métabolisme est exclusivement respiratoire et le pyruvate est oxydé par le cycle de Krebs. Cette voie métabolique est très énergétique et permet aux levures une importante multiplication. En plus des sucres simples, certaines levures utilisent d'autres glucides (mono, di ou tri saccharides et des polysaccharides comme l'amidon), mais aussi des alcools, des acides et des alcanes (Larpen, 1991).

➤ Métabolisme fermentaire : en plus du métabolisme oxydatif, certaines levures peuvent privilégier une dégradation des glucides par un métabolisme fermentatif qui conduit à la formation d'éthanol et de CO₂. En plus de ces composés majoritaires, des alcools, des aldéhydes, des esters, des acides...sont formés en plus petites quantités. Ce métabolisme est moins énergétique que le métabolisme oxydatif (Guiraud et Rosec, 2004).

4. Technique d'étude des levures

4.1. Isolement des levures

Avant d'identifier un champignon-levure, il faut d'abord l'isoler de son substrat dans son milieu naturel et l'obtenir en culture pure (Cahagnier, 1998). Les levures sont parmi les micro-organismes les plus faciles à isoler et à cultiver comme le montrent la diversité de leurs applications agro-alimentaires (Pol, 1996). L'isolement des levures, en vue de leur identification ou de leur numération, demande l'emploi de milieux sélectifs dotés de propriétés antibactériennes et si possible antimoisissures (Guiraud, 1998). Les milieux de culture favorables aux levures sont des milieux à base d'extrait de levures ou de malt, en combinaison avec le glucose (YM, YPG ou YG) et aussi le milieu de Sabouraud (Guiraud et Rosec, 2004).

4.2. Critères et méthodes d'identification

Les critères couramment utilisés pour l'identification des levures peuvent être repartis en deux grandes catégories (Cahagnier, 1998) :

4.2.1. Tests morphologiques

➤ Caractères culturels

L'étude des caractères morphologiques est réalisée en milieu liquide et solide. Elle consiste à examiner l'aspect, la forme, la couleur et la consistance des cultures (Callon, 1997).

Les caractéristiques macroscopiques des cultures ainsi étudiées sont:

- La forme des colonies ;
- La couleur ;
- La coupe des colonies ;
- L'aspect de la culture sur gélose inclinée ;
- L'aspect de la culture en milieu liquide ;
- La taille de colonies

➤ ***Caractéristiques de la reproduction végétative***

● *Morphologie cellulaire et mode de multiplication végétative* : Ces caractères sont étudiés d'après des préparations microscopiques effectuées à l'état frais sur des cultures en milieu liquide et sur milieu solide. L'observation microscopique permet de définir la forme, l'arrangement, le mode de division cellulaire et de mesurer la taille à l'aide d'un oculaire micrométrique (Bouix et Leveau, 1991).

● *Aptitude à la filamentation* : Certaines espèces peuvent former des filaments de type mycélien comme *Candida*, *Pichia*, *Tricosporon* (Rose et Harrison, 1987 et Leveau et Bouix, 1993). Ces filaments sont parfois mis en évidence par un examen microscopique. La recherche systématique de l'aptitude à la filamentation d'une souche, doit cependant s'effectuer après culture sur un milieu spécifique, comme le Potatoes Dextrose Agar (PDA) ou bien le Corn meal Agar (CMA) (Cahaghier, 1998).

● *Morphologies particulières* : Les chlamydospores et les ballistospores apparaissent dans des milieux pauvres sous tension d'oxygène réduite. Leur recherche s'effectue à partir des milieux spécifiques. Le milieu classique pour la production de chlamydospores chez *Candida albicans* est le riz agar (Cahaghier, 1998).

➤ ***Caractéristiques sexuelles***

Les levures ascomycètes présentent des phénomènes de reproduction sexuée par formation d'une asque renfermant des ascospores issues de la méiose. La mise en évidence des asques et des ascospores (la forme, la couleur et le nombre de spores par asque) permet d'identifier une levure, par sa reproduction sexuée (Bourgeois et Leveau, 1991).

4.2.2. Tests physiologiques et biochimiques

➤ *Fermentation des sucres*

La description standard des levures se base sur la capacité à fermenter certains sucres, examinés dans des tubes de Durham pendant une période fixe. La caractérisation de la fermentation qu'elle soit vigoureuse, bonne, lente ou faible, dépend de la quantité de gaz dégagé dans le tube d'insertion (Kreger-van Rij, 1984).

➤ *Assimilation des substrats carbonés*

L'importance de l'assimilation des substrats carbonés comme critère pour l'identification est soulignée par Wikerham, (1951). Ces composés sont choisis pour leur intérêt distinctif (Ostergaard et al., 2000). Pour plus de détails, se référer au paragraphe 3.3.

➤ *Assimilation des composés azotés*

Les levures assimilent généralement l'ammonium, les peptones, les acides aminés et parfois l'urée. D'autres espèces levuriennes se caractérisent par une capacité à utiliser les nitrates et d'autres composés azotés (comme les nitrites, l'éthylamine, cadavérine...); propriété spécifique pour leur identification (Guiraud, 1998).

5. Les levures en biotechnologie

Par un métabolisme diversifié, les levures occupent une place essentielle dans l'industrie alimentaire. Elles participent à l'élaboration de nombreux produits alimentaires (panification, fromagerie, brasserie,...) et dans la production des enzymes (l'invertase, lactase, lipase et les amylases...) (tableau 2) (Simon et Meunier, 1970), du glycérol ainsi que certaines vitamines et solvants, mais aussi à la revalorisation de déchets agricoles, industriels et à la production des protéines (Scriban, 1984 et Lecterc et al., 1995). Les biotechnologies et la recherche biomédicale exploitent ainsi largement ces microorganismes, pour la production de molécules d'intérêt médical (ex : production de protéines hétérologues, comme le vaccin de l'hépatite B) (Mercier, 1997 et Blin, 2002).

5.1. Boissons alcoolisées

Le rôle, le plus ancien des levures est la fabrication de boissons alcoolisées. Cette fabrication repose sur la fermentation alcoolique, qui consiste à transformer les sucres simples en alcool. Ainsi, elles interviennent au cours de la vinification et de l'élaboration de la bière. L'espèce la plus utilisée par l'homme est *Saccharomyces cerevisiae*, appelée aussi levure de bière pour son innocuité (Leveau et Bouix, 1993).

5.2. Panification

Une autre utilisation, connue depuis l'antiquité, est la fabrication du pain : Le dégagement de gaz carbonique, qui accompagne la fermentation, permet de faire lever la pâte en lui conférant une texture légère. On utilise également *Saccharomyces cerevisiae* (levure de boulangerie) (Simon et Meunier, 1970 et COFALEC, 2006).

5.3. Affinage des fromages

Les levures sont aussi capables d'utiliser les acides organiques comme source d'énergie et de carbone (Larpent, 1991). Elles participent à l'affinage des fromages ; en consommant l'acide lactique produit par les bactéries lactiques à partir des composants du lait. Elles contribuent aussi à réduire l'acidité du caillé (Leveau et Bouix, 1993). De nombreuses espèces se rencontrent en fromagerie, les plus fréquentes appartenant aux genres

Kluyveromyces, *Debaryomyces*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Torulopsis*, *Candida* et *Rhodotorula* (Larpent, 1991).

5.4. Production de protéines

Les levures constituent une source précieuse de protéines car elles sont le siège d'une biosynthèse protéique très active. Elles sont utilisées à la production de protéines d'organismes unicellulaires (POU) ou "single cell protéins" (SCP), qui sont souvent incorporées à l'alimentation animale et humaine. Cette production peut s'effectuer sur des substrats considérés comme des déchets tels que le lactosérum et les résidus de pâte à papier. (Pol, 1996).

5.5. Production d'alcools industriels

Depuis quelques temps, une nouvelle utilisation des levures est apparue. Les levures, essentiellement des souches du genre *Saccharomyces*, grâce à leur haute capacité fermentaire, peuvent assurer la bioconversion de nombreux substrats saccharosés (jus de betteraves, sirop, mélasse de sucrerie) en bioéthanol (Leveau et Bouix, 1993).

5.6. Autres utilisations

Aujourd'hui, les levures constituent une des importantes sources d'enzymes produites commercialement en raison de leurs capacités polyvalentes et de la frugalité de leurs exigences permettant d'obtenir une biomasse importante à bas prix (Pol, 1996). En effet, l'invertase ou saccharase sécrétée par diverses levures est utilisée industriellement pour produire du glucose et du fructose à partir de mélasses de betterave ou de cannes à sucre (tableau 2) (Simon et Meunier, 1970).

Tableau 2 : Production et utilisation de certaines enzymes levuriennes.

(Simon et Meunier, 1970 et Sicard, 1982)

Types d'enzymes	Levures utilisées	Utilisations
Amylases	<i>Lipomyces starkey</i> <i>Schwanniomyces castellii</i>	Saccharification de l'amidon, Boulangerie, Textile, Papeterie.
Invertases	<i>Saccharomyces carlbergensie</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Confiserie
Lipases	<i>Candida lipolytica</i>	Fromagerie, Laiterie.
Lactases	<i>Candida pseudotropicalis</i> <i>Kluyveromyces fragilis</i> <i>Kluyveromyces lactis</i>	Crèmes glacées.

5.7. Avantage des levures en industrie

Par rapport aux bactéries, les levures présentent des éléments favorables quant à leur utilisation en biotechnologie. Elles offrent donc une meilleure résistance que les bactéries à ces conditions de stress, en particulier la possibilité à des pH acides.

En plus, l'état unicellulaire, la capacité à se multiplier rapidement et la rusticité des exigences nutritionnelles à ces eucaryotes permettent de les cultiver, de les étudier et de les utiliser aussi facilement que des micro-organismes procaryotes. Comme l'écrit joliment James D. Watson, ce sont les « *Escherichia coli* » des eucaryotes (Pol, 1996). Elles produisent des protéines glycolyses qui vont servir à des fins industriels et pharmaceutiques : insuline par *Saccharomyces cerevisiae* (Mercier, 1997) et le vaccin de l'hépatite B (Blin, 2002).

Leur utilisation dans l'alimentation a fait de sorte que les levures soient globalement plus connues pour leur efficacité en fermentation industrielle que d'autres micro-organismes. Elles ne sont pas attaquées par des virus (phages), elles sont facilement récupérables grâce à leur grosseur. La stabilité génétique des levures permet aussi une très bonne fidélité du procédé et la connaissance de leur physiologie cellulaire facilite leur utilisation (Labrecque, 2003).

Les seuls éléments défavorables, quant à leur utilisation, dans le domaine de la dépollution sont leur croissance relativement lente (120 minutes) par rapport aux bactéries (20 minutes) et le choix limité d'espèces, nous constatons que les nombreux avantages des levures l'emportent sur leurs quelques inconvénients (Labrecque, 2003).

Tableau 3 : Classification et nomenclature des Amylases

(D'après Melansniemi, 1990)

Liaison entre résidus	Nom recommandé	Nom systématique	Nom codifié
(1→4)	α -amylase	α -1,4-D-glucane-4-glucanohydrolase	3.2.1.1.
	β -amylase	α -1,4-D-glucane maltohydrolase	3.2.1.2.
	α -glucosidase	α -D-glucoside glucanohydrolase	3.2.1.20
	Exo-(1→4) α -glucanase	-----	-----
	Cyclo-malto- dextrine glucanotransférase	1,4- α -D-glucan-4- α -D-(1,4- α -D-glucano) transférase	2.4.1.19.
(1→6)	Pullulanase	Pullulane-6-glucanohydrolase	3.2.1.41.
	Isoamylase	Glycogène-6-glucanohydrolase	3.2.68

Chapitre 2 : L' α -amylase

1. Introduction

L' α -amylase est une enzyme ubiquitaire, synthétisée par tous les genres de la vie (Janecek, 1994). Elle appartient à la classe des protéines globulaires, dont le rôle biologique est de catalyser l'hydrolyse de l'amidon et du glycogène (Wang et al., 1989 et Scriban, 1999).

2. Définition

L' α -amylase [α -(1,4)-D-glucane glucanohydrolase (E.C.3.2.1.1)] est une endoamylase qui hydrolyse au hasard les liaisons osidiques α (1,4), de l'amylose, de l'amylopectine, de l'amidon et du glycogène à l'exclusion des liaisons terminales de ces chaînes (Mercier, 1985 et Keating et al., 1998). Elle provoque la libération du glucose, du maltose et surtout d' α -dextrines (Kelly et al., 1997).

3. Nomenclature de l' α -amylase

→Nom codifié : E.C.3.2.1.1.

→Nom commun : α -amylase

→Nom systématique : 1,4- α -D-glucane-4-glucano hydrolase.

→synonymes : glycogénase, endoamylase, taka-amylase, maxilase...

(Schamburg et Slzmann, 1991 et Dauter et al., 1999)

(Tableau 3)

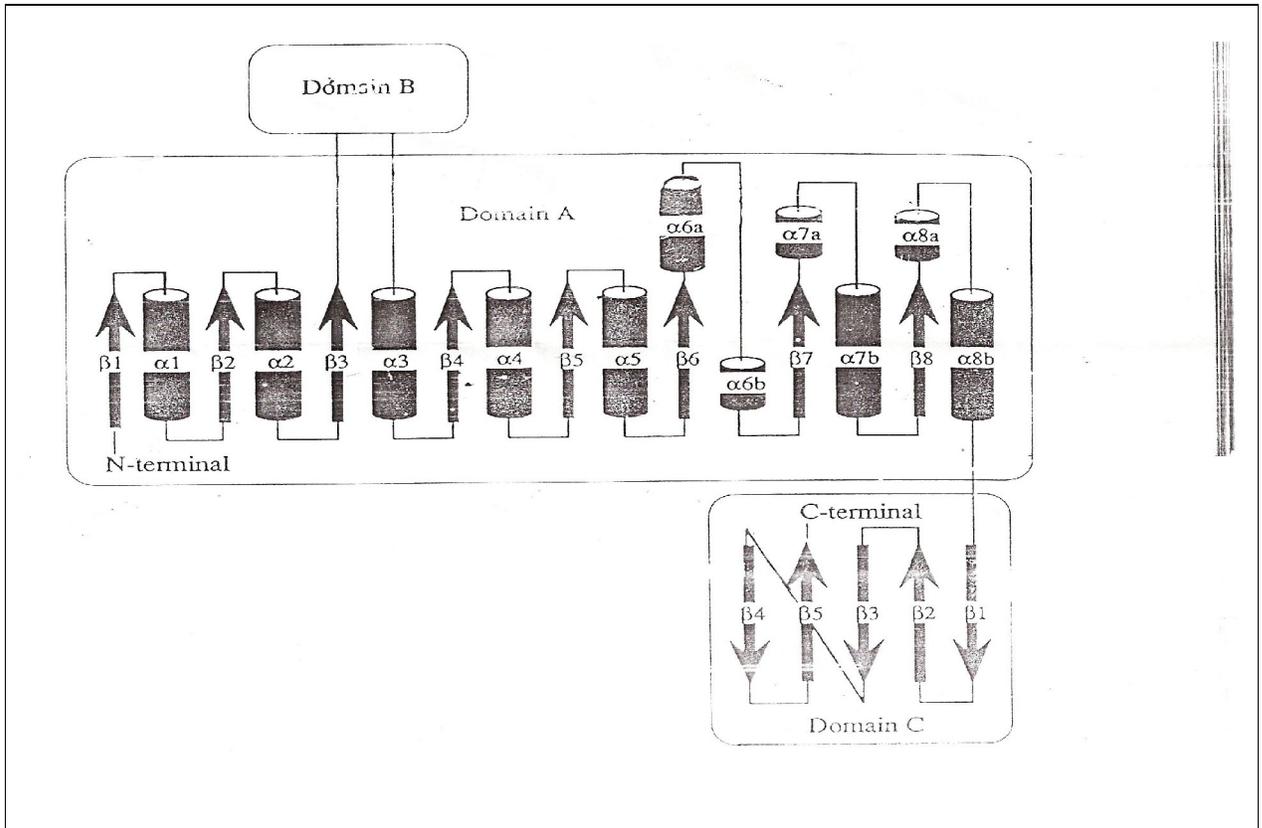


Figure 4 : La représentation des domaines et des éléments de la structure secondaire de l' α -amylase. (Kadziola et al, 1994).

4. Structure

L' α -amylase fongique est une glycoprotéine, comportant trois domaines globulaires (A, B et C) (Farber et Petsko, 1990). Elle renferme une partie glucidique, qui est formée principalement, de D-mannose, D-glucose, D-galactose, D-xylose et D- glucosamine (Stefanova et Emanuilova ,1992) associés chimiquement à la chaîne polypeptidique constituée de 471 à 483 résidus d'acides aminés, avec 4 ou 5 ponts disulfures (Heslot, 1996).

Le domaine central A, forme un tonneau (β/α)₈ qui contient 8 feuillet β plissés et qui se disposent de façon parallèle et de 8 hélice α , il porte le site actif à la partie C- terminale des feuillet β . Le domaine B est formé d'une boucle de 64 résidus d'acide aminé reliant A- $\beta 3$ avec A- $\alpha 3$ et constitue une sorte de « couvercle » au-dessus du site actif. Alors le domaine C est constitué d'un tonneau de 8 feuillet β antiparallèles (Kadziola et al, 1994).

La figure 3, présente un diagramme topologique montrant l'arrangement des éléments de la structure secondaire. Cette dernière est évoluée en une structure tridimensionnelle de la protéine enzymatique (figure 4) (Priestle, 1988).

Par ailleurs, certaines α -amylases, telles que l' α -amylase de *Streptomyces limosus*, ont un domaine supplémentaire (domaine E) à leur extrémité C-terminale, jouant un rôle dans l'adsorption d'amidon (Bodri et al., 1997).

En outre, l' α -amylase est une metallo-enzyme à calcium (Comi et al., 2000 et Savcheko et al., 2002) . Elle comporte au moins un ion de calcium par molécule. Cet ion joue un grand rôle dans le maintien et la stabilité de la structure tertiaire de l'enzyme ainsi que dans son activité catalytique (Boel et al., 1990). Pour certaines α -amylases, la présence d'un site de fixation du Cl^- est également signalée (Hwang et al., 1997) et pour d'autres, l'ion Zn^{2+} (Comi et al., 2000).

5. Les différentes origines

Les α -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 Rao et al., 2004).

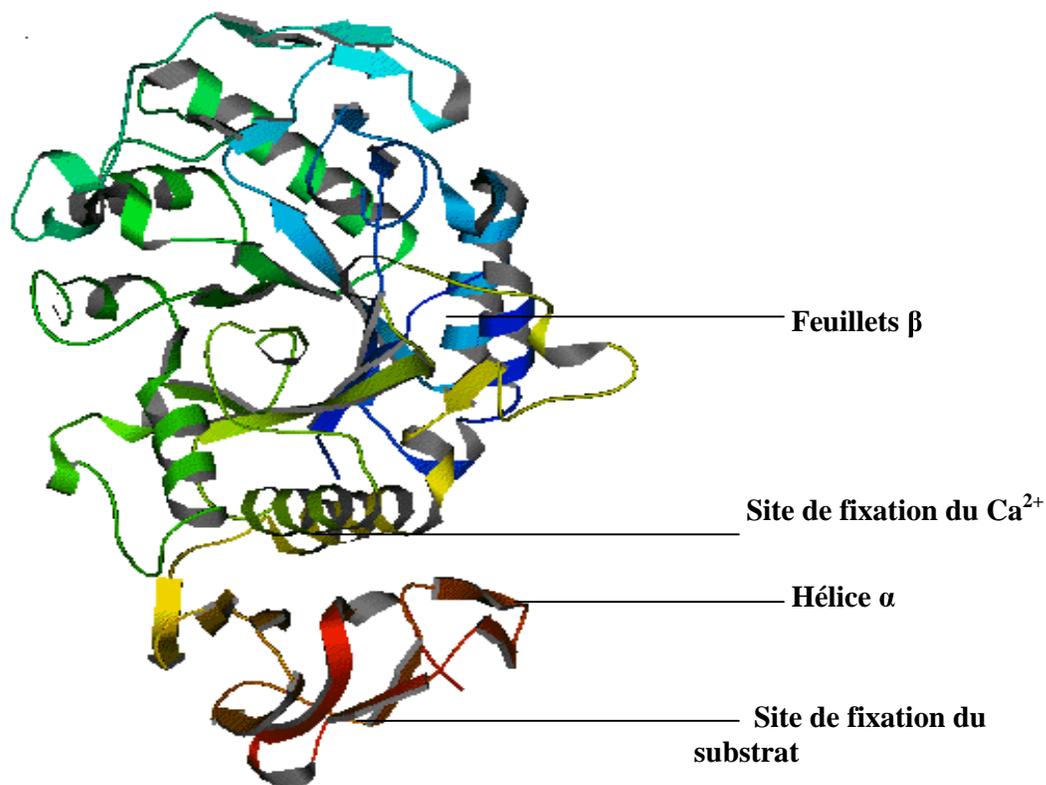


Figure 3 : Structure tridimensionnelle de l' α -amylase fongique (Priestle, 1988).

- **Origine animale** : l' α -amylase animale est généralement extraite de la salive humaine et du pancréas des mammifères tels que les porcs et les veaux (Bertheau et al., 1985 et Chatterton et al., 1996).
- **Origine végétale** : les α -amylases jouent chez les plantes un rôle important dans le métabolisme glucidique, où elles participent à l'hydrolyse de l'amidon en produisant des sucres réducteurs (glucose et maltose) directement assimilables (Badot et Merlin, 1984). Ces enzymes végétales sont généralement obtenues par extraction à partir des céréales notamment le blé, l'orge, le son ou le riz (Srinivasa Rao et al., 2004). Elles sont souvent formées au cours de la germination des grains (Charles et al., 2003).
- **Origine microbienne** : on distingue les α -amylases fongiques et bactériennes, les α -amylases fongiques diffèrent des amylases bactériennes par une inactivation par la température, un pouvoir élevé de saccharification et un pH optimal faible (4-5) (Costes, 1982).

Les α -amylases des espèces fongiques *A .niger* et *A .oryzae* sont saccharifiantes et formant une grande quantité de maltose et maltohexose, alors que celles des bactéries (*B.licheniformis* et *B.stearothermophilus*) sont liquéfiantes, produisant un mélange de sucres du glucose jusqu'au maltohexose (Sicard, 1982)

Par ailleurs, les levures participent également à la production de l' α -amylase (Bouix et Leveau, 1999). Leur capacité à assimiler une grande variété de substrat (les hexoses, les pentoses et les polysaccharides), est à l'origine de plusieurs investigations menées sur elles, dans le but de produire des acides organiques, des enzymes et en particulier les α -amylases.

6. Mode d'action

Les modalités d'action des α -amylases dépendent de l'origine de l'enzyme. Elles hydrolysent les liaisons glucosidiques α -(1→ 4) des chaînes latérales du glycogène, de l'amylopectine, de l'amylose et de l'amidon à l'exclusion des liaisons terminales de ces chaînes (Christian, 1982). Elles entraînent la libération du glucose et d'oligosides de 2 à 7 unités (Mouranche et Costes, 1985 et Rown, 1990). Les produits de la réaction dépendant du substrat. Dans le cas de l'amylose, les produits finaux sont essentiellement du maltose et du maltotriose, ce dernier sera hydrolysé par la suite en maltose et glucose (Mercier, 1986), alors que pour le cas de l'amylopectine, en plus du glucose, du maltose et du maltotriose, il persiste

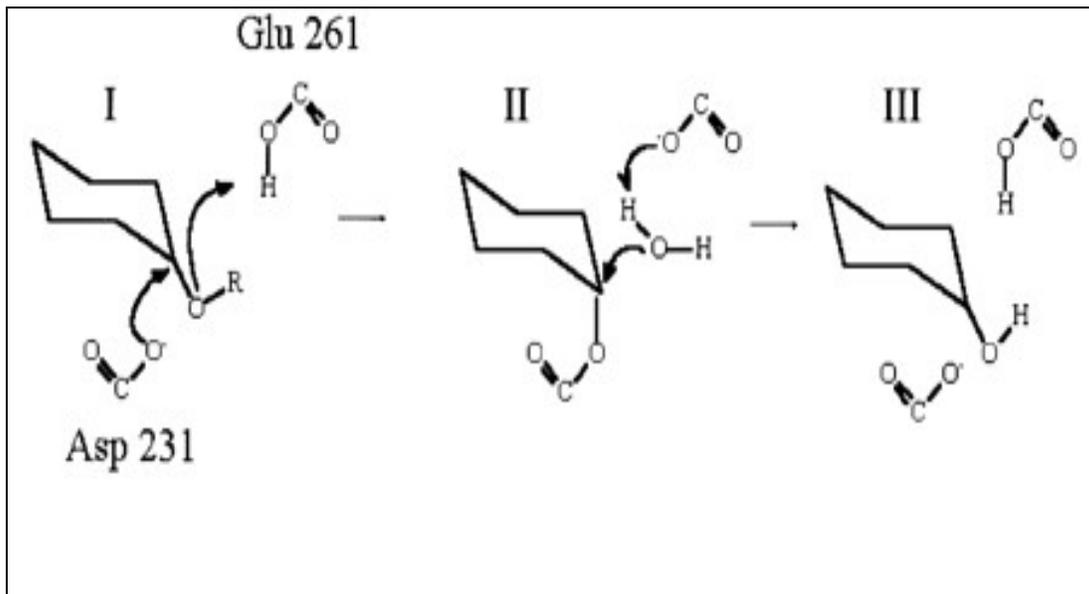


Figure 5: Mécanisme catalytique

des hydrolases glycosyliques (Nielsen et al., 2001) :

I : Protonation de l'oxygène glucosidique par le donneur d'hydrogène (Glu 261) et attaque sur le glucose (C₁) par le nucléophile (Asp 231). Départ de la fin réductrice du substrat.

II : L'activation d'une molécule d'eau, clivage de la liaison covalente C₁ Asp 231.

III : Régénération des états initiaux de protonation.

des dextrines dites α -dextrines limitées contenant des ramifications en α -(1→6) (Mouranche et Costes, 1985 et Mac Gregor, 1993).

En générale, les α -amylases peuvent agir par différents modes d'action. Selon les conditions (température, pH, taille et structure du substrat), l'enzyme peut utiliser l'un ou l'autre mécanisme et même une combinaison entre plusieurs mécanismes (Mazur et Nakatani, 1993 et Nielson et al., 2001).

- **Attaque aléatoire ou au hasard** : n'importe quelle liaison α -(1→4) peut être hydrolysée à partir de l'extrémité réductrice. Elle provoque la formation de glucose, maltose et surtout d' α -dextrines (Scriban, 1999).
- **Attaque préférée** : l' α -amylase montre une préférence pour certaines liaisons glucosidiques dans le substrat (Berry et Paterson, 1990).

- **Attaque multiple ou répétitive** : elle implique le déplacement de l'enzyme tout au long de la chaîne du substrat et l'enzyme hydrolyse les liaisons glucosidiques sans se dissocier du substrat (Kandra et al., 1997).
- **Mécanisme uni-chaîne** : où l'enzyme dégrade une chaîne avant de passer à l'autre. Une fois que l'enzyme forme le complexe actif avec le premier substrat, elle catalyse la réaction et ne forme pas un autre complexe actif avec d'autre substrat jusqu'à l'achèvement de la dégradation de la première chaîne (Berry et Paterson, 1990).
- **Mécanisme multi-chaîne** : où toutes les chaînes sont dégradées parallèlement (Pazur et Marchetti, 1992).

7. 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 5) :

1-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 (Davies et al., 1999).

2-Activation d'une molécule d'eau, vraisemblablement par le maintien du Glu 261 déprotonné (Nielson et al., 2001)

Tableau 4 : Quelques propriétés des α -amylases (E.C.3.2.1.1)

(Fogarty et Kelly,1980 et Panchal, 1990)

Enzyme d'origine	PM (KD)	pH optimum	T° optimale(C°)
Animale			
Salive humaine	50	6.9	40
Pancréas de porc	50	6.9	37
Végétale			
Malt d'orge	59.5	4.7-5.4	50-55
Blé	-	4.6	60-66
Seigle	-	5.2-5.4	-
Riz	48	-	-
Microbienne			
Bactéries			
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	49	5.9	65
<i>Bacillus licheniformis</i>	22.5	5.0-9.0	76
<i>Thermoactinomyces vulgaris</i>	40	4.6-5.3	40
<i>Thermomonospora viridis</i>	62	5.5-6.0	65
Moisissurs			
<i>Aspergillus niger</i>	-	6.5	55
<i>Aspergillus oryzae</i>	52.6	5.5-6.9	40
Levures			
<i>Lipomyces starkey</i>	76	4	70
<i>Lipomyces kononenkoa</i>	38	5.5	40
<i>Pichia polymorpha</i>	-	4	40
<i>Saccharomyces alluvius</i>	62	6.3	40
<i>Saccharomyces castelli</i>	40	6	60
<i>Aureobasidium pullulans</i>	98	4.5	60
<i>Schanniomyces alluvius</i>	-	6.3	40

3-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 C₁de résidu du sucre en position 1 (Nielson et al., 2001).

8. Caractéristiques de l' α -amylase

➤ *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 et 90 KDa (Schomburg et Salzmann, 1991). Celui des α -amylases levuriennes, varie entre 40 et 70 KDa (Panchal, 1990) (Tableau 4).

➤ *pH optimum*

Les α -amylases sont généralement stables dans une gamme de pH de 5 à 8, avec un optimum se situant entre 4 à 5 pour les α -amylases fongiques et un optimum supérieur à la neutralité 6 à 8.5 pour les amylases bactériennes (Larpen-Gourgau et Sanglier, 1992). Pour les levures, l'enzyme requiert, selon les espèces, des pH entre 4 à 6 (Panchal, 1990) (Tableau 4).

➤ *Température optimale*

La température optimale varie avec l'espèce et l'origine de l'enzyme, généralement les α -amylases ont une température optimale comprise entre 40 et 70°C. En effet, Les α -amylases bactériennes ont une plus grande stabilité thermique par rapport aux amylases fongiques (Larpen-gourgau et Sanglier, 1992). La température optimale des α -amylases bactériennes varie entre 50 à 95°C alors que celle des α -amylases fongiques varie entre 40 à 60°C. L' α -amylase levurienne a des températures maximales, allant de 40 à 60°C et parfois même 70°C pour certaines espèces comme *Lypomyces starkeyi* (Panchal, 1990) (Tableau 4).

➤ *Effecteurs*

Toutes les α -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' α -amylases vis-à-vis de la dénaturation thermique (Egas et al., 1998). Cependant les ions Cl^- , Zn^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} et Fe^{2+} sont également des activateurs de l' α -amylases (Schomburg et Salzmann, 1991).

Par ailleurs, l' α -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' α -amylase d'origine levurienne de *Cryptococcus sp*, que les métaux lourds comme Hg^{2+} (25%), Ag^+ (51%), Cu^{2+} (52%) et Zn^{2+} (87%) inhibe l'activité, enzymatique. Par contre, les ions Na^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} et l'EDTA n'ont aucune influence sur l'enzyme à une concentration de 1Mm (Lefuji et al., 1996).

Les α -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 α -amylase (Ali et Abdelmoneim, 1989).

9. Intérêt et utilisation industrielle

Le secteur industriel présente une très grande diversité de techniques et de produits. Il offre aux enzymes hydrolytiques un large champ d'utilisation (Cosetes, 1982 et Mercier, 1986).

Actuellement, les α -amylases microbiennes sont parmi les enzymes les plus utilisés dans les procédés industriels : industrie alimentaire, pharmaceutique, textile, papeterie, et détergent, en raison de leur productivité et thermostabilité (Behal et al., 2006). Avec l'arrivée de nouvelles frontières en biotechnologie, le spectre de l'application de l' α -amylase s'est élargi vers d'autres domaines, comme la chimie clinique, médicale et analytique (Pandey et al., 2000).

➤ *En boulangerie*

L'addition d'une petite quantité d' α -amylase, dans la farine, augmente la production de gaz carbonique après fermentation et conduit à l'obtention d'un pain aéré et donc léger (Pandey et al., 2000)

➤ *En sucrerie*

Parfois, les sirops de canne peuvent se trouver perturbés par la présence de contaminations amylacées augmentant aussi leur viscosité et de nuire ensuite au processus de cristallisation. Cet inconvénient est éliminé par l'introduction d'une petite quantité de l' α -amylase bactérienne immobilisée à une température égale ou supérieure à 80 °C (Sicard, 1982 et Roa et Satyanarayana, 2003).

➤ *En textile*

A cause de leurs stabilités à la chaleur, les α -amylases bactériennes conviennent très bien à l'industrie de textile, en dégradant l'apprêt amylacé lors du désencollage (Sicard, 1982 et Ito et al., 1998).

➤ *Détergents*

Actuellement, environ 25% des détergents en poudre contiennent maintenant des enzymes (protéase, α -amylase, pectinase,...) pour aider à la décomposition des taches. En effet, l' α -amylase dégrade les taches à base d'amidon à de plus petits segments, les oligosaccharides et les dextrans libérés de l'action hydrolytique des enzymes sont solubles, par conséquent, la tache est physiquement découpée (Igarashi et al., 1998).

➤ *Domaine médical et pharmaceutique*

Dans le domaine pharmaceutique, les α -amylases sont utilisées comme agent anti-inflammatoire et aussi comme aide digestif pour éviter les dyspepsies et les fermentations intestinales (Rivière, 1975 et Sanofi, 1996).

Dans le domaine médical, le taux de l' α -amylase dans les liquides biologiques peut être utilisé pour détecter certaines maladies : insuffisance cardiaque, oreillons, cancer du pancréas... (Rown, 1990 et Pandey et al., 2000).

Chapitre 3 : Lactosérum

1. Généralités sur le lactosérum

Malgré la situation nutritionnelle et économique actuelle, en particulier dans le domaine du lait, nous assistons à des rejets énormes du lactosérum par les industries fromagères. Elles génèrent plus de 145 millions de tonnes de lactosérum liquide par année (Audic et al., 2003). Ces rejets constituent une menace réelle sur l'environnement, car le lactosérum est riche en matière organique, en particulier, le lactose 40% (Alais, 1984). La pollution causée par 1000 m³/ jour d'eaux usées rejetées par une industrie laitière serait équivalente à celle d'une ville de 800 000 habitants (Kosikowski, 1977). Dans ces conditions, il est devenu indispensable de le recycler pour éviter la menace polluante. Encore faut il que son traitement soit économiquement acceptable.

Le lactosérum est le liquide jaune pâle qui reste après la coagulation de lait lors de la fabrication du fromagère ou de la caséine ; où l'on retrouve la majeure partie de l'eau avec toutes les substances du lait (Kosikowski, 1979).

Sa principale caractéristique est qu'il contient beaucoup de lactose, ce sucre représente une principale source de carbone pour les microorganismes qui intéressent l'industrie agroalimentaire. Le lactosérum contient également des protéines solubles ou protéines sériques qui restent en solution quand on précipite le lait, avec en plus des substances azotées non protéiques résultant de l'action des enzymes coagulantes ou du métabolisme des bactéries qui se développent dans le lait ou dans le coagulant. Aussi il contient des sels minéraux tels que : Ca²⁺, P, Na⁺, Cl⁻, K⁺... (Tableau 5) (Veissyere, 1975). Ces trois composants constituent un milieu favorable pour le développement des microorganismes ; d'où son effet polluant.

2. Sources industrielles du lactosérum

Les deux principales voies industrielles de transformation du lait nature aboutissant au lactosérum, sont la beurrerie et la fromagerie.

- **La beurrerie** : c'est l'ensemble des procédés qui conduisent à la fabrication du beurre à partir du lait nature. Après écrémage de ce dernier suivi d'une extraction de la caséine par précipitation on obtient du « lactosérum écrémé ».

- **La fromagerie** : c'est l'ensemble des procédés qui conduisent à la fabrication des fromages à partir du lait nature, ce dernier subit les processus de coagulation et de synérèse, aboutissant d'une part à une phase solide le « fromage », d'une part à une phase liquide « le lactosérum ».

3. Différents types de lactosérum

Selon l'acidité Dornic ($1^{\circ}\text{D} = 0,1 \text{ g d'acide lactique par litre de produit}$) inférieure ou supérieure à $1,8 \text{ g d'acide lactique par litre}$ on peut distinguer deux types de sérum, (Veisseyere, 1975) :

- **Le lactosérum doux** : pH environ de 6,5 à 6,7 (l'acidité est inférieure à 18°D), issu de la fabrication de fromage à pâte pressée ou à pâte cuite.
- **Le lactosérum acide** : pH environ de 4,5 à 5 (l'acidité est supérieure à 18°D), provient des caséineries ou des fromageries fabriquant des pâtes fraîches ou des pâtes molles.

4. Composition chimique du lactosérum

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

Tableau 5 : Composition chimique du lactosérum en (g/l)
(Fevrier et Collet, 1975 et Alais, 1981)

Composant chimique	Lactosérum doux	Lactosérum acide
Matière sèche (MS)	55 à 75	55 à 65
lactose	40 à 57	40 à 50
Lipides (MG)	0 à 5	0 à 2
Matières azotées totales (MAT)	7 à 11	4.8 à 10.5
Cendres (MM)	4 à 6	6 à 8
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 à 8

5. Intérêt industriel du lactosérum

Le lactosérum a été depuis longtemps considéré comme un sous produit encombrant, sans intérêt, dont il fallait se débarrasser aux moindres frais, en particulier en rejetant dans les eaux résiduaires des usines laitières.

Or, depuis quelques années, les recherches effectuées par la plupart des pays laitiers ont mis en évidence sa valeur nutritionnelle, ainsi que les possibilités de son utilisation en l'alimentation de bétail, comme engrais, comme milieu de fermentation pour la production par voie microbienne de l'acide lactique, des vitamines (B₂, B₁₂), d'enzymes (protéase, amylase, pectinases, β -galactosidase et cellulase) et de matière grasse. (Luquet et Boudier, 1984).

- **Intérêt alimentaire:** Une quantité considérable de lactosérum est utilisé dans l'alimentation animale. De plus, il est utilisé pour enrichir les aliments ou les régimes pauvres en protéines. En pathologie, il est utilisé pour l'alimentation des diabétiques, des malades diabétiques ou des sujets souffrant de mal nutrition, et en alimentation de soutien, pour les sportifs, les personnes âgées (Dryer, 2001).
- **Intérêt médical :** Actuellement, les scientifiques évaluent les effets bénéfiques des fractions de protéines de lactosérum. L'utilisation de ces fractions est efficaces contre les maladies du cœur (réduction du cholestérol et de la tension artérielle), les ulcères, les cancers, etc. (Berry, 2000).
- **Intérêt biotechnologique :** En biotechnologie, le lactosérum par sa composition biochimique possède d'intéressantes propriétés comme milieu de fermentation pour plusieurs microorganismes assimilants le lactose comme source de carbone et d'énergie. Il s'agit des levures telles que *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida kefyr* et *Kluyveromyces fragilis*, cette dernière est cultivée sur le lactosérum doux déprotéiné et enrichi par des facteurs de croissance de la biomasse (Gana et Touzi, 2001). Le lactosérum déprotéiné a servi comme milieu de base pour la production de la cellulase par la moisissure *Aspergillus niger* (Leghlimi, 2004) et pour la production aussi de l' α -amylase par la moisissure *Rhizopus oryzae* (Aït Kaki, 2004).

1. Isolement de souches levuriennes productrices d' α -amylase

1.1. Echantillonnage

Le travail porte sur la production d'une α -amylase thermostable secrétée par des levures isolées à partir du sol. En effet, les échantillons du sol utilisés pour cet objectif sont prélevés des différents sites de deux régions de sources thermales (Hammam Debagh-Guelma et Hammam Téléghma-Mila) situées dans l'Est Algérien et considérés comme des écosystèmes extrêmes (Température élevée) (Tableau 6).

Pour chaque prélèvement (100 à 200 g du sol avoisinant la source), la couche supérieure (de 3 cm) est écartée. Les prélèvements sont faits à trois niveaux de profondeurs différents (10, 20, 40) (Tableau 6) et déposés sur une feuille d'aluminium stérile envelopper dans des sacs en papier; ensuite transporté au laboratoire dans une glacière pour être analysés dans les 24 heures (Rodríguez-Zaragoza et al., 2005).

Région	Mois de prélèvement	Caractéristiques des sites	Distance	Profondeur
Guelma	Janvier	Climat : humide /sub-humide Pluviosité : 450 à 600 mm/an Température de l'eau : 97°C. (Anonyme, 2007)	3m	20 cm 40 cm
			13 m	10 cm
Téléghma	Février	Climat : sec Pluviosité : 350 à 700 mm/an Température de l'eau : 86°C. (Anonyme, 2007)	10 m	40 cm
			14 m	10 cm 20 cm

Tableau 6 : Caractéristiques des sites d'échantillonnages

1.2. Détermination du pH des échantillons

Cette mesure est réalisée dès l'arrivée des prélèvements au laboratoire, la technique consiste à déterminer la valeur du pH d'une suspension de sol en eau distillée (10g de sol pour 90 ml d'eau distillée) à l'aide d'un pH mètre (Davet et Rouxel, 1997). Par ailleurs, l'analyse physico-chimique des échantillons de sol est élaborée par le laboratoire de chimie des sols, Agence National des Ressources hydrauliques (Zone Industrielle Palma Constantine).

1.3. Isolement des levures

Un gramme de sol est suspendu dans 9 ml d'eau physiologique stérile et homogénéisé pendant 10min, cette suspension constitue la dilution 10^1 . Une série de dilution sont préparées jusqu'à 10^6 (Ulacio et al., 1997). Chaque dilution est étalée à la surface des milieux gélosés (Sabouraud et YMA) (Tsuyoshi et al., 2004)(Annexe 1 a) avec l'addition de Gentamicine (0.04 g/L) afin d'inhiber la croissance de bactéries Gram⁺ et Gram⁻. L'ensemencement est fait en surface, par étalement de 0.1 ml de culture en strie transversale (Hammer et al, 1998 et Tsuyoshi et al., 2004). Les boîtes de Pétri sont incubées à 30°C, pendant 24 à 72 h (Harrigon et Mc lace, 1976).

Les colonies bien isolées, ont subi une coloration au bleu de méthylène, puis observées au microscope (l'objectif 40), pour vérifier la morphologie et l'homogénéité des cellules.

1.4. Conservation

La méthode de conservation des souches la plus utilisée et la plus simple consiste à repiquer les souches en tube sur gélose inclinée PDA ou MA (Annexe 1 b), les cultures sont incubées pendant 3 à 5 jours, pour permettre une croissance maximale, puis elles sont stockées à 4°C pour favoriser leur viabilité et limiter les possibilités de variations (UI-Haq et al., 2002).

1.5. Sélection des souches amylolytiques

La sélection est effectuée sur un milieu PDA à pH 5, additionné d'amidon soluble à 1% (Annexe 1 c). Les boîtes sont ensuite incubées à 30°C pendant 24 à 72 h. Après incubation, une solution de lugol est versée sur la surface de la boîte, afin de mettre en évidence l'activité amylasique. Les souches, à halo clair sur le pourtour, sont considérées comme productrices d'amylases (Tatsinkou et al., 2005).

2. Etude de la composition chimique de lactosérum

Le lactosérum a été recueilli à l'unité de production STELLINA de la région HARIA-Constantine. Ce produit provient de la fabrication de fromage « Camembert ». Les échantillons ont été prélevés dans des bouteilles en plastique, puis conservés par congélation à -20°C.

2.1. Détermination de la matière sèche

La matière sèche est déterminée sur un échantillon de 10 ml de lactosérum par dessiccation à l'étuve à une température de 105°C jusqu'à l'obtention d'un poids constant (Audigie et al., 1984).

2.2. Détermination des cendres

Les cendres sont déterminées par incinération. La prise d'essai ayant servi à la détermination de la matière sèche (à 105°C pendant 24 heures) est suivi par une calcination au four à moufle à 550°C pendant 5 heures (Audigie et al., 1984).

2.3. Détermination de l'acidité (Dornic)

La méthode de dosage a lieu par titrimétrie de l'acide lactique à l'aide de NaOH N / 9 en présence de phénol phtaléine comme indicateur coloré de pH (Lecoq, 1965) (Annexe 2).

2.4. Détermination du pH

La détermination du pH du lactosérum brut s'effectue par une lecture directe à l'aide d'un pH mètre préalablement étalonné.

2.5. Dosage de l'azote total

La teneur en azote totale est déterminée par la méthode de Kjeldhal. Elle consiste à détruire toute trace de matières organiques par l'acide sulfurique concentré à l'ébullition en présence d'un catalyseur avec formation de sulfate d'ammonium puis de l'ammoniaque. Ce dernier déplacé par une base fixe (la lessive de soude), est entraîné par la vapeur d'eau dans une solution d'acide fort. (Hamon et al., 1990) (Annexe 3)

2.6. Dosage des sucres totaux

Les sucres totaux sont déterminés selon la méthode de Dubois et al., (1956) dont le principe repose sur la réaction suivante : l'acide sulfurique concentré provoque, à chaud, le départ de plusieurs molécules d'eau à partir des oses. Cette déshydratation s'accompagne par la formation d'un hydroxy-méthylfurfural (HMF) dans le cas d'hexose et d'un furfural dans le cas d'un pentose. Ces composés se condensent avec le phénol pour donner des complexes colorés (jaune-orangé). L'intensité de la coloration est proportionnelle à la concentration des oses. La densité optique est mesurée à 488 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (Annexe 4).

2.7. Dosage de la matière grasse

La méthode utilisée dans ce travail est celle de Wiseman. L'acide chlorhydrique libère à chaud la matière grasse des protéines et d'autres substances, qui est séparée ensuite par filtration. Après séchage, elle est extraite à l'éther de pétrole dans un appareil de Soxhlet, les extraits lipidiques étherés sont séchés puis pesés (Lecoq, 1965) (Annexe 5).

2.8. Dosage des sels minéraux

➤ Calcium

Après minéralisation de l'échantillon, le calcium est précipité sous forme d'oxalate de calcium. Après séparation et lavage du précipité, l'acide oxalique formé est dosé, en milieu sulfurique, au moyen d'une liqueur titrée de permanganate de potassium N/2 (Lecoq, 1965) (Annexe 6 a).

➤ Chlore ou chlorures

Les chlorures d'un aliment sont exprimés soit en chlore, soit conventionnellement en chlorures, titrés par la méthode de Charpentier et Volhard (Lecoq, 1965) (Annexe 6 b).

3. production de l'enzyme

3.1. Milieu de base

Le milieu choisi pour la culture des levures sélectionnées est à base de lactosérum déprotéiné dans le but de revaloriser ce déchet de l'industrie fromagère. Le lactosérum est déprotéiné par la technique de précipitation des protéines après ajustement du pH à 4.60 puis chauffé à 100°C pendant 2 h dans un bain-marie. Le filtrat est centrifugé à 4180 g pendant 10 min. Le surnageant obtenu est stocké à 4 °C dans des flacons fermés hermétiquement.

3.2. Préparation du milieu de base

Le milieu de base est préparé à différentes concentrations en lactosérum déprotéiné, afin de déterminer la concentration optimale pour la production de l' α -amylase. Par ailleurs, le milieu de base est additionné de substrat inducteur (l'amidon à 1%) puis ajusté à pH 5 (UI-haq et al., 2002).

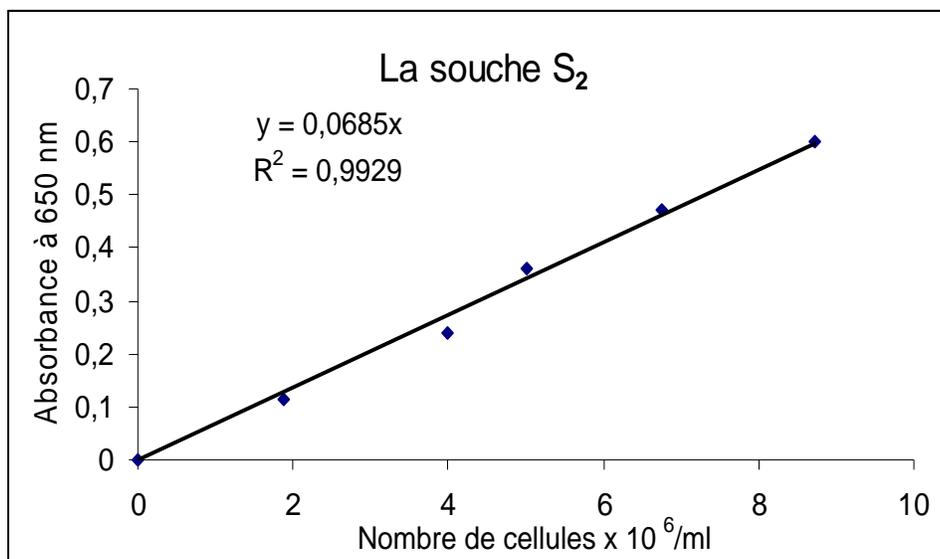
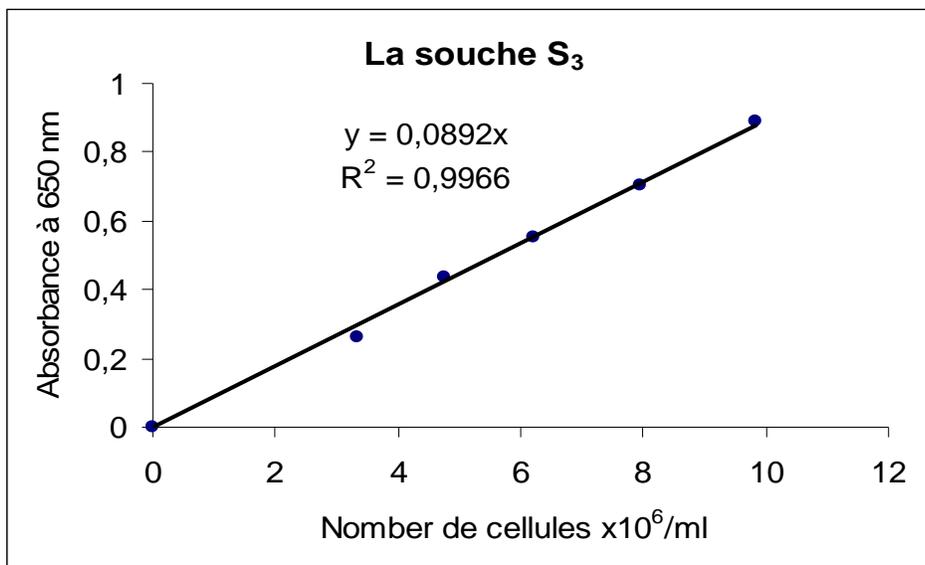


Figure 6 : Les Courbe d'étalons des cellules levuriennes (S₂ et S₃)

3.3. Inoculum

Les 2 souches sélectionnées, sont repiquées, puis mises à incuber à 30°C pendant 72 heures. Une suspension de la souche (dans l'eau physiologique stérile), est ensuite préparée à partir de la courbe étalon des cellules de chaque souche (Figure 6).

3.4. Conduite de la fermentation

Les cultures sont réalisées dans des erlens-myers de 250 ml à raison de 50 ml par erlen, puis stérilisées à 110°C pendant 20 min. Les milieux sont ensemencés par une suspension de cellules, à raison de $2,6 \times 10^6$ cellule/ ml. Les erlens sont incubées à 30°C dans un bain marie agitateur (180 t /min) pendant 72 h (UI-haq et al., 2002). Les expérimentations sont réalisées en trois essais.

4. Etude de thermostabilité de l' α -amylase des souches sélectionnées

Cette étude a pour but de sélectionner la souche la plus thermostable pour la suite du travail. Cette sélection est basée sur l'étude de la stabilité thermique de l' α -amylase, à 70 et 80°C pour un intervalle de temps allant jusqu'à 150 min, avec des prélèvements toutes les 15 min. Après refroidissement dans un bain de glace, l'activité amyliques résiduelle est mesurée selon la méthode de Somogyi et Nelson, (1952).

5. Identification de la souche productrice de l' α -amylase

La souche sélectionnée est repiquée à partir de culture pure, conservée à 4°C sur un milieu solide PDA et incubée à 30°C pendant 24 à 48 h. Tous les procédés d'identification sont menés selon les techniques décrites par Lodder, (1971) et Kreger-Van, (1984).

5.1. Tests morphologiques

➤ Les caractéristiques culturales

Leur étude est fait en milieu liquide (milieux YG, YPG et YM) et sur milieu solide incliné. Les cultures sont incubées pendant 3 jours à 25 à 28°C, puis examinées quotidiennement pendant 4 semaines. Les caractéristiques des cultures sont notées (l'aspect des cultures, la couleur, la forme des colonies...) (Annexe 1 d).

➤ Les caractéristiques de la reproduction végétative

Ces caractéristiques sont observées sur des préparations microscopiques à l'état frais (objectifs x40 puis x100) des cultures en milieu liquide et sur milieu solide (après coloration avec le bleue de méthylène).

- *Morphologie cellulaire et mode de multiplication végétative* : l'observation microscopique permet de définir la forme, la taille, l'arrangement et le mode de division des cellules.

- *Aptitude à la filamentation* : La recherche systématique de l'aptitude à la filamentation, est observée à partir d'une culture sur lame microscopique (objectifs x40 puis x100). Pour cela, du milieu PDA fondu (Annexe1 d) est déposé à la pipette sur une lame microscopique préalablement stérile dans une boîte de Pétri. Quand le milieu est solidifié, la levure à examiner est ensemencée en une strie longitudinale. La lame est incubée dans la boîte de Pétri contenant un peu d'eau stérile pour éviter la dessiccation du milieu. L'observation microscopique se fait après 3 à 5 jours d'incubation (au grossissement x 40 ou x100). La bordure de la culture est examinée, si la levure filamentise, la nature de mycélium (pseudomycélium ou vrai mycélium), son abondance, sa ramification sont notées.

➤ Caractéristiques sexuelles

Toutes les levures n'ont pas les mêmes exigences nutritionnelles. Pour cela, plusieurs milieux de sporulation doivent être utilisés simultanément, afin de mettre en évidence la sporulation si la levure est ascosporegène. Les milieux les plus couramment utilisés sont : Mac clary, Fowelle et Gordkowa (Annexe 1 d). Les milieux conditionnés en tubes inclinés, sont ensemencés en surface à partir d'une culture en phase exponentielle de 24 à 36 heures en milieu liquide (ME) (Annexe 1 d), puis incubés pendant 8 jours à un mois à 20°C. Des préparations

microscopiques sont régulièrement effectuées entre lame et lamelle. Dans le cas des levures ascosporogènes, on note la présence d'asque et sa forme, le nombre et la forme des ascospores.

5.2. Tests physiologiques et biochimiques

Les caractéristiques biochimiques et physiologiques effectuées, sont la fermentation des sucres et l'assimilation d'azote.

➤ Fermentation des sucres

Les sucres testés sont : le D-glucose, le maltose, le D-fructose, le saccharose, le lactose, le D-xylose, le D-galactose et l'amidon. La solution de base utilisée pour la fermentation des sucres, est le milieu eau de levure (extrait de levure à 0,5% dans l'eau), conditionné avec une cloche de Durham. Chaque source de carbone est préparée de 2 %. Les tubes sont ensemencés avec 3 gouttes d'une suspension de levure. Les cultures sont incubées à 25 à 28°C, pendant 48 h à 3 semaines. Le test est positif, s'il y a dégagement de CO₂ dans la clochette, perçu par la bulle d'air et négatif s'il n'y a pas dégagement de gaz (Wickerham, 1951).

➤ Assimilation des composés azotés

La source d'azote testée est le nitrate de potassium. Ce test est pratiqué selon la méthode auxanographique, avec un milieu synthétique sans azote. Une fois les cellules sont réparties en boîte de Pétri, la source d'azote est déposée à la surface du milieu solidifié, sous forme de quelques cristaux. Un témoin, est effectué avec du sulfate d'ammonium. L'incubation s'effectue pendant 3 jours à 25°C.

6. Cinétique de production de l' α -amylase de la souche sélectionnée

L'étude de la cinétique de production de l' α -amylase, est réalisée en erlens-myers de 250 ml à raison de 50 ml de milieu de base par erlen. Après stérilisation et ensemencement ($2,6 \times 10^6$) (Figure 6), les erlens sont incubés à 30°C pendant 96 heures, sous agitation de 180 tours/min. Des prélèvements sont effectués régulièrement chaque 4 heures à partir des 3 essais expérimentaux réalisés. Après récupération de la biomasse par centrifugation, les paramètres suivants sont mesurés :

6.1. Mesure du pH

Le pH de l'extrait enzymatique est mesuré à l'aide d'un pH- mètre.

6.2. Mesure de la biomasse

Le poids sec de la biomasse est déterminé à la fin des fermentations, après centrifugation et rinçage avec l'eau distillée. La biomasse est séchée dans une étuve réglée à 105°C jusqu'à poids constant. (Pedersen et Nielsen, 2000).

6.3. Dosage de l'activité α -amylasique

L'activité des α -amylases est mesurée selon la méthode de Bernfeld (1955). Le principe de cette méthode est basé sur la mesure du pouvoir réducteur du maltose libéré lors de l'hydrolyse enzymatique de l'amidon. La réaction est colorimétrique et l'intensité de la coloration est proportionnelle à la quantité du maltose libérée (Bernfeld, 1955). L'activité enzymatique est exprimée par l'unité internationale, correspondant à une μ mole de maltose libéré par minute et par ml de milieu à 40°C et à pH 5.

***Réactifs :**

DNSA : Dissoudre 1g d'acide 3,5-dinitrosalicylique, dans 20 ml de NaOH 2N et 50ml d'eau distillée. Ajouter 30g de tartrate double de sodium et de potassium. Compléter à 100 ml avec l'eau distillée. Filtrer et conserver à l'abri de la lumière.

Substrat : Dissoudre 1g d'amidon soluble dans 100ml de tampon phosphate 0,1 M, pH 5.

***Protocole :**

Ajouter à 0,5 ml de l'extrait enzymatique 0,5 ml du substrat, agiter et incuber à 40°C pendant 30 min. Le blanc est constitué d'extrait enzymatique dénaturé à 100°C pendant 15 min. La réaction est arrêtée par l'addition de 1 ml de DNSA, suivie d'un chauffage à 100°C pendant 5 min. Après refroidissement dans un bain de glace, 10 ml d'eau distillée sont ajoutés. L'absorbance est déterminé à 540 nm. La concentration des sucres réducteurs correspondants est déterminée à partir d'une courbe étalon établie avec des concentrations de maltose variant de 0 à 2 mg/ml (Annexe 7 c).

6.4. Dosage des protéines

Les protéines sont dosées par la méthode de Lowry et al., (1951). Le sulfate de cuivre en milieu alcalin et le réactif de Folin-ciocalteu (acide phosphomolybdo-tungstique) en présence d'une protéine donne une coloration bleue, qu'est le résultat de deux réactions :

-Réaction de Biuret : qui en présence de sulfate de cuivre en milieu alcalin, permet le dosage des liaisons peptidiques des protéines.

-Réaction du réactif de Folin sur la tyrosine et le tryptophane, qui sont réduits en un complexe bleu.

***Réactifs :**

- Solution A : Na_2CO_3 2 % dans NaOH 0,1 N
- Solution B : Tartrate double de Na et K 2 % dans l'eau distillée.
- Solution C : $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1 % dans l'eau distillée.
- Solution M : 0,5 ml de la solution C
0,5 ml de la solution B
0,5 ml de la solution A
Réactif de Folin-ciocalteu dilué au 1/3^{eme}

***Protocole :**

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

N.B : La courbe étalon est établie avec une solution de sérum albumine bovine (BSA) dont les concentrations varient de 0-500 µg/ml (Annexe 7 b).

6.5. Dosage des sucres

(La méthode est décrite précédemment) (Annexe 4).

7. Etude de quelques propriétés physico-chimiques de l' α -amylase

7.1. Effet du pH

Le pH optimum est déterminé par l'emploi d'une gamme de tampons variant de 2,5 à 8,5 (avec des variations de 0,5 unités).

-Pour l'intervalle [2,5 - 4,5] : citrate (0,1 M) / phosphate monopotassique(0.1M).

-Pour l'intervalle [5 - 7] : phosphate monopotassique(0.1M) / phosphate dipotassique(0.1M)

-Pour l'intervalle [7 – 8.5] : phosphate dipotassique(0.1M) / NaOH (1N).

7.2. Effet de la température

L'effet de la température est déterminé par mesure de l'activité amylasique de l'extrait brut incubé pendant 30 min à des températures variant de 20°C à 90°C avec un pas de 5°C, afin de déterminer la température optimale.

7.3. Etude de la thermostabilité

L'étude de la stabilité thermique est déterminée par mesure de l'activité enzymatique résiduelle, après incubation de l'extrait enzymatique à différentes températures (60°C, 70°C, 80°C, 90°C et 100°C), sur une période de temps de 0 à 180 min, avec des prélèvements toutes les 15 minutes (Somogyi et Nelson., 1952).

1. Isolement des souches levuriennes

La culture des échantillons de sol sur deux milieux (Sabouraud et YMA) a permis l'isolement de cinq souches levuriennes (**S₁**, **S₂**, **S₃**, **S₄** et **S₅**). Les résultats sont récapitulés dans le tableau 7.

Tableau 7 : Isolement des levures à partir des différents échantillons de sol

La région	Distance et profondeur	Milieu d'isolement	La dilution	La souche levurienne
Hamмам Téleghma Mila	Echantillon 1 : (14m de distance et 10 cm de profondeur)	Sabouraud	SM	S₁
		YMA	SM	S₂
		YMA	SM	S₃
Hamмам Debagh Guelma	Echantillon 2 : (13m de distance et 10 cm de profondeur)	YMA	10 ⁻³	S₄
		YMA	10 ⁻²	S₅

L'analyse des résultats montre que la profondeur 10 cm est la plus peuplée. Les profondeurs (20 et 40cm) n'en contiennent pas. Ces résultats montrent que les souches levuriennes sont autochtones au site (Phaff et Starmer, 1987).

Par rapport à l'estimation du nombre total des levures dans le sol (10⁵ à 10⁶/g de sol), le nombre 05 souches levuriennes paraît faible, comparé à celui des bactéries et des moisissures de l'ordre de 4x10⁶ à 7x10⁷/g de sol, (Phaff et Starmer, 1987). Ce taux faible de population levurienne peut être justifié par le pH du sol, relativement basique 7,8 favorisant plutôt la croissance des populations bactériennes (Allen et Ahearn, 1987). En effet, pour une croissance optimale, les levures préfèrent des pH acides (Larpen et larpen-Gaugaud, 1997).

L'analyse chimique des sols (tableau 8) révèle que les sols de Hamмам Debagh et Hamмам Téleghma contiennent un taux faible de matières organiques (inférieur à 3%) et par conséquent en carbone et en azote ; mais avec une nette différence entre eux : le sol de Téleghma est plus riche en matières organiques (2,08 %) que celui de Guelma (1,41%). Cependant, cette matière organique des deux sols s'avère riche en carbone (12 ‰ et 8 ‰ respectivement) et pauvre en azote (0.65 ‰ et 0.47 ‰ respectivement). Le sol de Téleghma

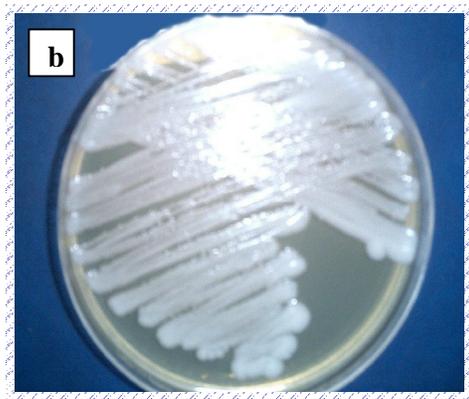


Figure 7: Aspect macroscopique des cinq souches levuriennes isolées (après 72 h d'incubation à 30 °C et à pH 5)

[**a:** souche S₁; **b:** souche S₂; **c:** souche S₃; **d:** souche S₄; **e:** souche S₅.]

présente un rapport C/N= 18.6, alors celui de Debagh est de 17.4. Ces deux rapports se rapprochent de ceux cités par la littérature (Botton, 1991) et favorables à un développement microbien.

La conductivité électrique (C.E), facteur indiquant le degré de salinité du sol, est inférieure à 10, révélant une faible salinité des sols environnant les sources thermales étudiées. Le taux de Mg^{2+} est relativement semblable pour les deux échantillons de sol (2.5 – 3%), par contre la différence est de taille pour le sodium : 8.4% pour Hammam Debagh contre 2.3% pour Hammam Téléghma.

Tableau 8 : Analyse chimique des sols prélevés des sources thermales
(Hammam Téléghma et Hammam Debagh)

Site	Source thermale Téléghma (Mila)	Source thermale Debagh (Guelma)
Profondeur (cm)	10 cm	10 cm
Matière organique (%)	2.081	1.41
Carbone (‰)	12.1	8.2
Azote (‰)	0.65	0.47
Saturation (%)	6.4	5.8
C.E (Salinité)	1.3	1.1
CO₃H (meq/l)	0.5	0.7
SO₄ (meq/l)	9.8	12.5
Ca²⁺ (meq/l)	6.9	10.8
Mg²⁺ (meq/l)	2.5	3.4
Na⁺ (meq/l)	2.3	8.4
K⁺ (meq/l)	0.4	0.2

Le peuplement faible des sols étudiés (5 souches levuriennes) est lié à une teneur insuffisante en matière organique (inférieure à 3%) présente dans le site et également à la structure du sol, qui exerce un effet sur leur distribution (Phaff et Starmer, 1987).

Pour ces raisons, le sol de la source thermale de Téléghma (2.08% de matière organique) paraît relativement plus peuplée que celui de Hammam Debagh (1.41% de matière organique). Vu autre facteur, expliquant cette différence de peuplement, est la température élevée de la source thermale de Debagh 97°C contre 86°C pour Hammam Téléghma. En effet, certaines souches (par leur forme sporulée) peuvent résister à des températures élevées.

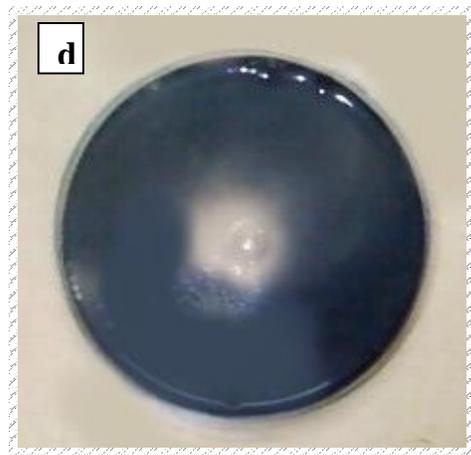


Figure 8 : Test de sélection de souches amylolytiques sur PDA à 1% d'amidon (après 48 h d'incubation à 30 °C et à pH 5)

[**a**: souche S₁; **b**: souche S₂; **c**: souche S₃; **d**: souche S₄; **e**: souche S₅.]

2. Mise en évidence de l'activité amylasique

Pour la mise en évidence de l'activité amylasique chez les 5 isolats, nous avons utilisé un milieu PDA à 1 % d'amidon (milieu sélectif). Après l'incubation (à 30°C pendant 48 h), nous observons des zones de lyse de différentes dimensions. Les 3 souches (**S₁**, **S₄** et **S₅**) ont des zones de lyse faible (leur diamètre est inférieur à 2 cm) alors que les deux autres souches (**S₃** et **S₂**) ont des zones de lyse plus développée (diamètre de 25 mm à 27 mm respectivement) (Figure 8 et 9).

Par leur forte capacité à hydrolyser l'amidon, les souches **S₂** et **S₃**, seront sélectionnées pour la suite de travail.

3. Production de l' α -amylase levurienne

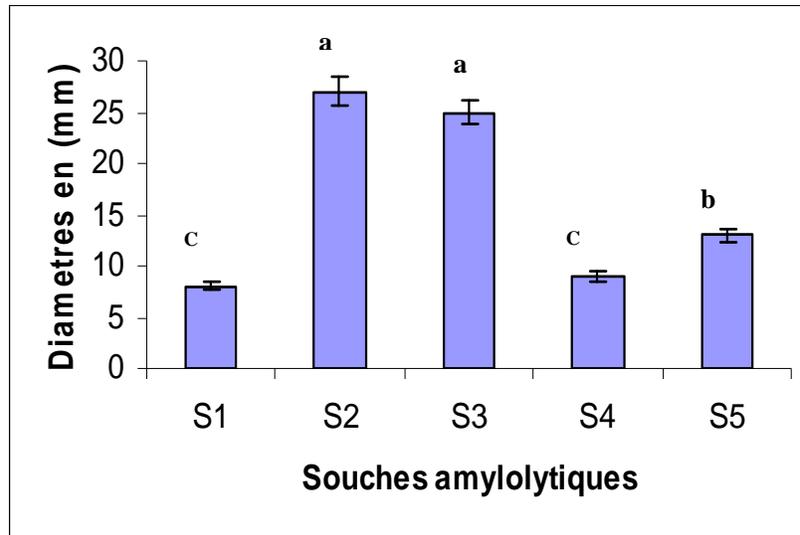
3.1. Composition chimique du lactosérum

Avant de tester l'activité amylasique des souches sélectionnées, il est nécessaire de déterminer d'abord, la composition chimique du milieu de fermentation, le lactosérum, (enregistrée dans le tableau 9).

L'analyse des résultats fait apparaître que le lactosérum doux est riche en sucres totaux 64g/L, en particulier en lactose (42.68g/L). Sa richesse en lactose constitue une source importante de carbone et d'énergie pour la croissance de nombreux microorganismes possédant le système β - galactosidase (Trystram et al 1991 et Lejeune et Baron, 1995). Cette teneur élevée en lactose se rapproche des valeurs de 40 – 57g/L décrites par Alais, (1981), qui justifie que le lactosérum doux contient une teneur plus élevée en lactose par rapport au lactosérum acide (38-55 g/L).

La teneur protéique de 5.90g/L, est une valeur légèrement inférieure à celle rapportée par la bibliographie (environ de 7 à 11g/L) (Alais, 1981). Cette différence en teneur protéique est certainement due au processus de fabrication du fromage (Adrian, 1973).

La matière azotée totale 0.923g/L, est inférieure à celle annoncée par Luquet et Boudier, (1984) et Alais, (1981), de 1.2-1.8g/L. Cependant, cette teneur azotée donne un rapport de C/N=28 (le rapport C/N indispensable à un développement adéquat des levures, doit être supérieure ou égal à 18) (Botton, 1991).



[a, b et c désignent des variations statistiques hautement significatives (différences)]

(seuil de signification 0.05)

Figure 9 : Diamètre des zones de lyse des souches levuriennes amylolytiques
(après 48 h d’incubation à 30 °C et à pH 5)

Tableau 9 : Composition chimique de lactosérum.

Paramètres mesurés	Valeur obtenue en (g/L)
pH	5.89
Matière sèche	57
Matière azotée totale	0.923
Sucres totaux	64
Lactose	42.68
Matière grasse	0.72
Matière minérale (Cendres)	12.2
Calcium	0.23
Chlore	3.10
Acidité (Acide lactique)	2.6

La teneur en acide lactique de 2.6 g/L se rapproche de celle annoncée dans la littérature 0 – 3.0 g/L (Luquet et Boudier, 1984). Une teneur élevée en acide lactique, surtout dans le lait,

traduit une infection microbienne qui a décomposé le lactose en acide lactique (Casalis, 1975). Par ailleurs, la matière grasse affiche une valeur de 0.72 g/L, similaire à celle de Alais, (1981) et Assenat et al, (1985) qui rapportent une valeur de 0 – 5.0g/L.

La matière sèche de 57g/L, est une teneur comprise dans l'intervalle annoncée par Alais, (1981) de 55 - 75 g/L. Cependant, la valeur du pH de 5.89 est légèrement inférieure à celle annoncée par la bibliographie (pH de 6.5 – 6.7). Cette différence peut être due aux conditions de transport et de stockage du lactosérum.

La concentration en matières minérales (12.2 g/L) du lactosérum est plus élevée que celle décrite par Alais, (1981), (4- 6 g/L). La matière minérale s'avère riche en chlore (3.1g/L) et calcium (0.23 g/L), facteurs activateurs de α -amylase (Hwang et al., 1997 et Egas et al.,1998).

La composition chimique, de ce lactosérum révèle un milieu d'une grande valeur alimentaire (sucres totaux, lactose, protéines, sels minéraux). Ce sous produit laitier peut donc être employé comme un milieu de fermentation pour la production de l' α -amylase. Ce recyclage évite la pollution de la nature par la prolifération microbienne.

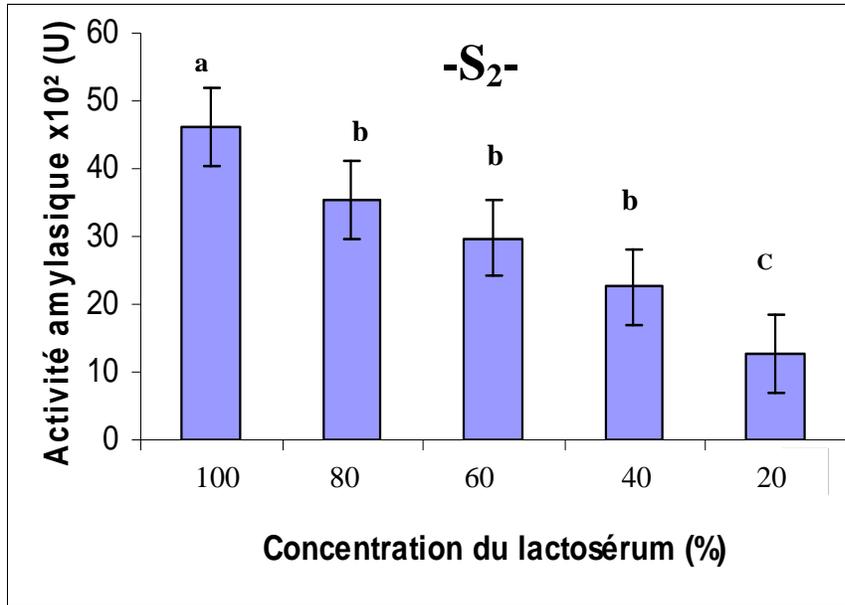
Par ailleurs, Gana et Touzi, (2001) préconisent la revalorisation du lactosérum après sa déprotéinisation pour la production de biomasse par des levures lactiques. Nous avons donc suivi ce procédé.

3.2. Détermination de la concentration optimale en lactosérum

Dans le but de déterminer la concentration optimale de production de l'enzyme par les levures cultivées sur lactosérum, nous avons réalisé des tests sur une gamme de dilution (20%, 40%, 60%, 80%,100%) (Figure 10). Cette figure, indique que la production de l' α -amylase est proportionnelle à la concentration du lactosérum. A une concentration de 100% l'activité amylasique de souches levuriennes S2 et S3 est maximale et évaluée, respectivement de 4611.8 (U) et 4526.9 (U).

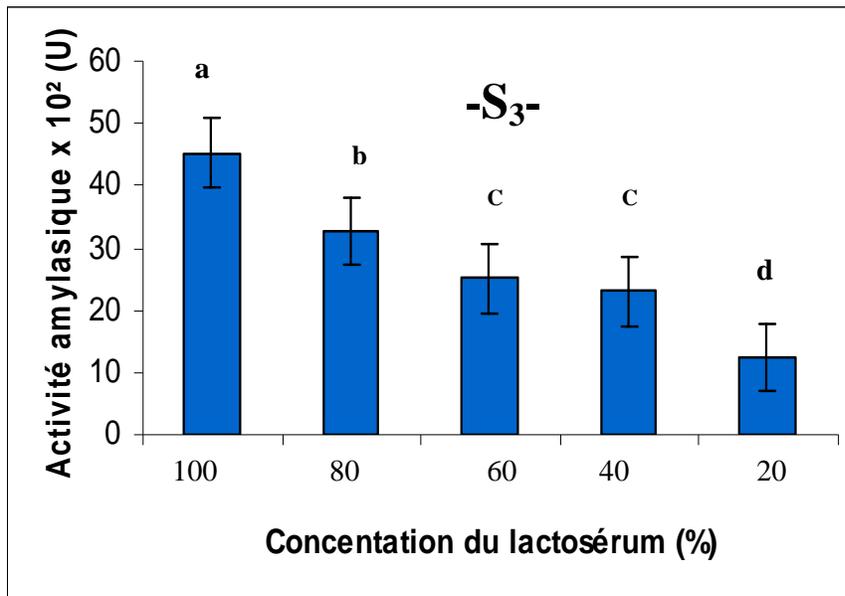
Conclusion

Les deux souches levuriennes **S₂** et **S₃** productrice d'une α -amylase, nécessitent un milieu de fermentation constitué de 100% en lactosérum déprotéiné et supplémenté par 1% d'amidon.



[a, b et c désignent des variations statistiques hautement significatives(différences)]

(seuil de signification 0.05)



[a, b, c et d désignent des variations statistiques hautement significatives(différences)]

(seuil de signification 0.05)

Figure 10 : Effet de la dilution du lactosérum sur la production de l' α -amylase par les souches sélectionnées.

3.3. Sélection de la souche productrice d' α -amylase thermostable

Le test de thermostabilité est réalisé sur l' α -amylase produite par les deux souches performantes (**S₂** et **S₃**), après un traitement thermique à 70 et 80°C (Figure 11).

Cette figure, montre que l' α -amylase des souches **S₂** et **S₃** conserve respectivement 76 % et 84 % de leur activité initiale, après un traitement à 70°C pendant 60 min. Après 90min d'incubation à 70°C, l'enzyme de la souche **S₂** conserve 72% de son activité initiale, alors que celui de la souche **S₃** en garde 82%. A 80°C, la souche **S₃** est plus thermostable avec une demie vie de 150min contre une demie vie de 135 min pour la souche **S₂** (Figure 11).

De cette étude, nous sélectionons la souche **S₃** pour la suite du travail, car elle est productrice d'une α -amylase plus thermostable que celle de **S₂**.

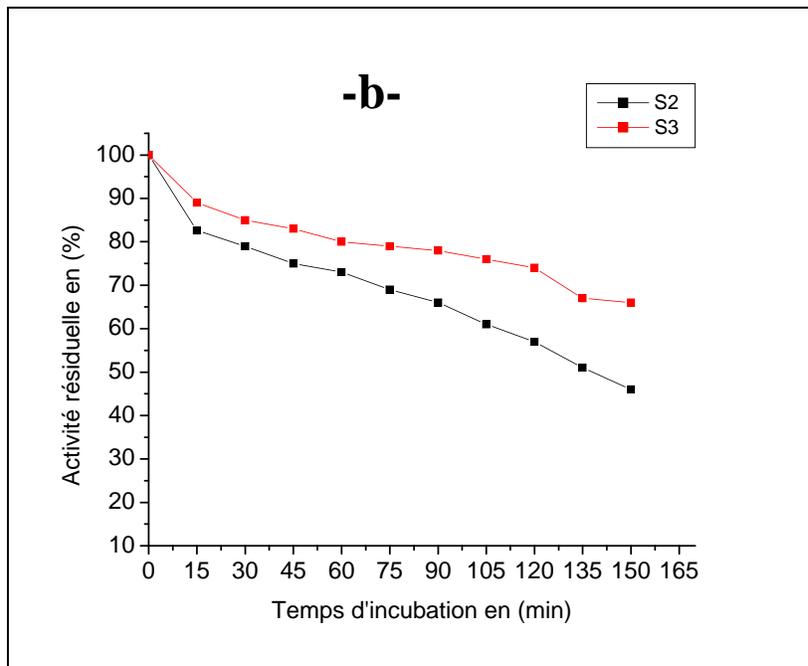
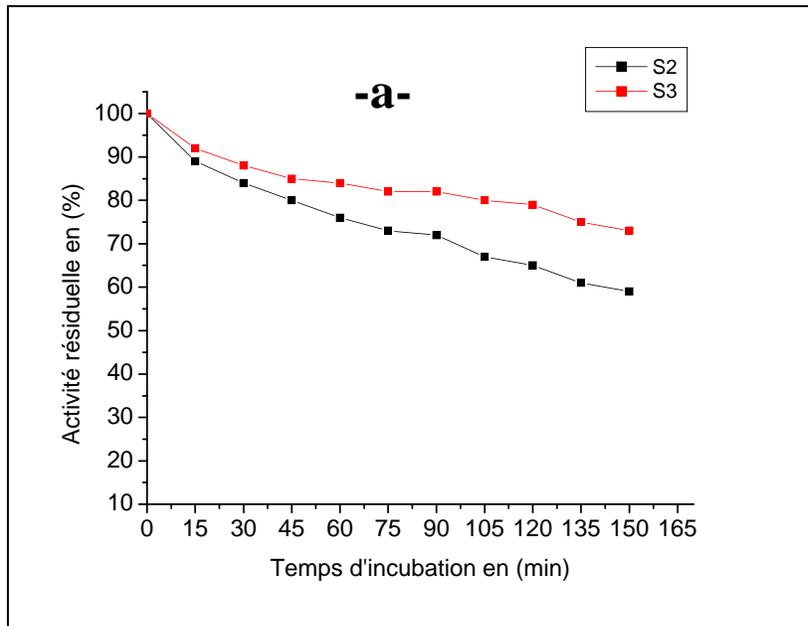


Figure 11: Thermostabilité de l' α -amylase des deux souches **S₂** et **S₃**
a (à 70°C) ; **b** (à 80°C)

4. Identification du genre de la souche levurienne

L'identification du genre de la souche sélectionnée S₃, est de faite selon les clefs de détermination de Lodder (1971) et Kreger Van, (1984).

4.1. Tests morphologiques

❖ *Caractères cultureux*

L'observation macroscopique des cultures en milieu liquide et sur milieu solide (YG, YPG et YM), a pu révéler les caractères suivants :

- Colonies arrondies, crémeuse, de couleur blanche (Figure 12)
- Culture abondante sur gélose inclinée.
- La culture en milieu liquide présente un culot au fond du tube, absence de voile et d'anneau.
- Surface lisse et brillante.
- La taille des colonies est moyenne

❖ *Caractéristiques de la reproduction végétative et sexuelle*

L'étude des ces caractères, réalisée à l'aide des préparations microscopiques, révèle ceci :

- Une morphologie cellulaire : la forme de cellules est ovale à ronde, la taille des cellules est environ de 4 µm (figure 13).
- Un mode de reproduction : bourgeonnement unipolaire à multipolaire
- Une filamentation : de type pseudomycélienne.
- Une sporulation : présence d'ascospores, contenant 1 à 2 spores, avec une ascospore de forme ronde et rebord équatorial. Les spores sont toujours emprisonnées dans l'ascospore.



Figure12 : Aspect macroscopique et cultural de la souche S₃
(sur milieu YPG, après 48 h d'incubation à 30°C et à pH 5)

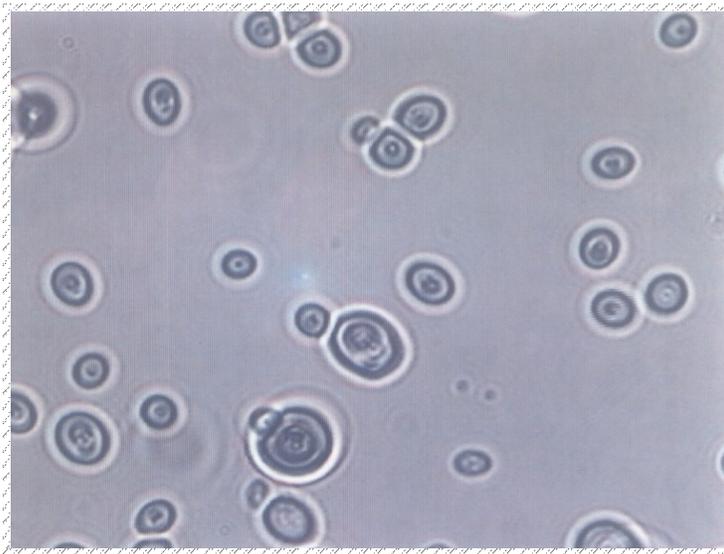


Figure13 : Aspect des cellules de la souche S₃, Grossissement x 1000.
(sur milieu YPG, après 48h d'incubation à 30°C et à pH 5)

4.2. Tests physiologiques et biochimiques

❖ Fermentation des sucres

La souche S₃ présente une aptitude à fermenter certains sucres comme le Glucose, le Fructose, le Saccharose, le Maltose, l'Amidon, mais ne fermente pas le lactose, le Xylose et le Galactose.

Ces fermentations positives des sucres sont caractérisées par production des gaz dans la cloche de Durham, traduisant ainsi, l'aptitude de cette souche à fermenter les substrats glucidiques testés.

❖ Assimilation des substrats azotés

La souche S₃ présente une assimilation positive pour le sulfate d'ammonium, mais elle n'assimile pas le nitrate de potassium. Il n'y a pas eu de croissance cellulaire, donc les nitrates ne seront pas utilisés comme sources d'azote.

Conclusion :

L'analyse des résultats montre que la souche levurienne correspond probablement au genre : *Schwanniomyces*, selon les clefs de détermination de Lodder (1971) et de Kreger Van, (1984).

De plus, le métabolisme fermentaire observé (en particulier l'hydrolyse de l'amidon et la non assimilation des nitrates) et le processus caractéristique de formation des asques, correspondent bien à ceux cités par Oteng-Gyang, (1984), Rose et Harrison, (1987) Larpent et Larpent-Gourgaud, (1997) pour ce genre de levure.

Kloecker, 1909 et Rose et Harrison, 1987 ont rapporté que le sol est l'habitat typique pour ce genre. Par ailleurs, trois espèces supplémentaires sont décrites : *Schw.castellii* de sol de champ de vigne en Espagne, *Schw.alluvius* de plusieurs sols dans le milieu Ouest des U.S.A. et *Schw. personii* des sols de l'Afrique du sud (Phaff et Starmer, 1987).

5. Etude Cinétique

5.1. Cinétique de croissance de la levure *Schwanniomyces sp*

L'évolution cinétique de la biomasse est présentée par la figure 14, où la levure *Schwanniomyces sp*, montre une cinétique de croissance microbienne avec ces 4 phases classiques :

- **La phase de latence** : qui dure environ 12 heures, correspondant à la période d'adaptation de la levure. Au cours de cette période, la levure synthétise les enzymes qui lui sont nécessaires pour métaboliser les substrats présents dans le milieu. Lorsque la phase d'adaptation est terminée, on assiste au démarrage de la croissance à partir de la 16^{ème} heure, où la biomasse passe de 1.86 à 3.58 g/L.
- **La phase exponentielle** : Elle s'étend de 12 à 56 heures, cette phase est caractérisée par un rythme de croissance rapide et progressif, où la biomasse atteint une valeur maximale de 07g/L après 56 heures de fermentation. Ce taux de biomasse semble faible mais relativement satisfaisant tant que le milieu n'est pas encore optimisé
- **La phase stationnaire** : de 60 à 72 heures, où la croissance exponentielle s'arrête. On assiste à une légère baisse de la biomasse de 6.89 à 6.56 g/L. En effet, les cellules conservent une activité métabolique, mais leur structure biochimique subit des modifications (Leclerc et al., 1995 et Bouix et Leveau, 1999).
- **La phase de décroissance** : dès les 74 heures, la concentration cellulaire viable diminue du fait de la lyse cellulaire causée par les conditions devenues défavorables dans le milieu (épuisement en source d'énergie, accumulation de produits d'excrétions métaboliques et autolyse par des protéases intracellulaires). Cette phase est caractérisée par une diminution du poids sec qui passe de 6.56 à 2.23 g/L.

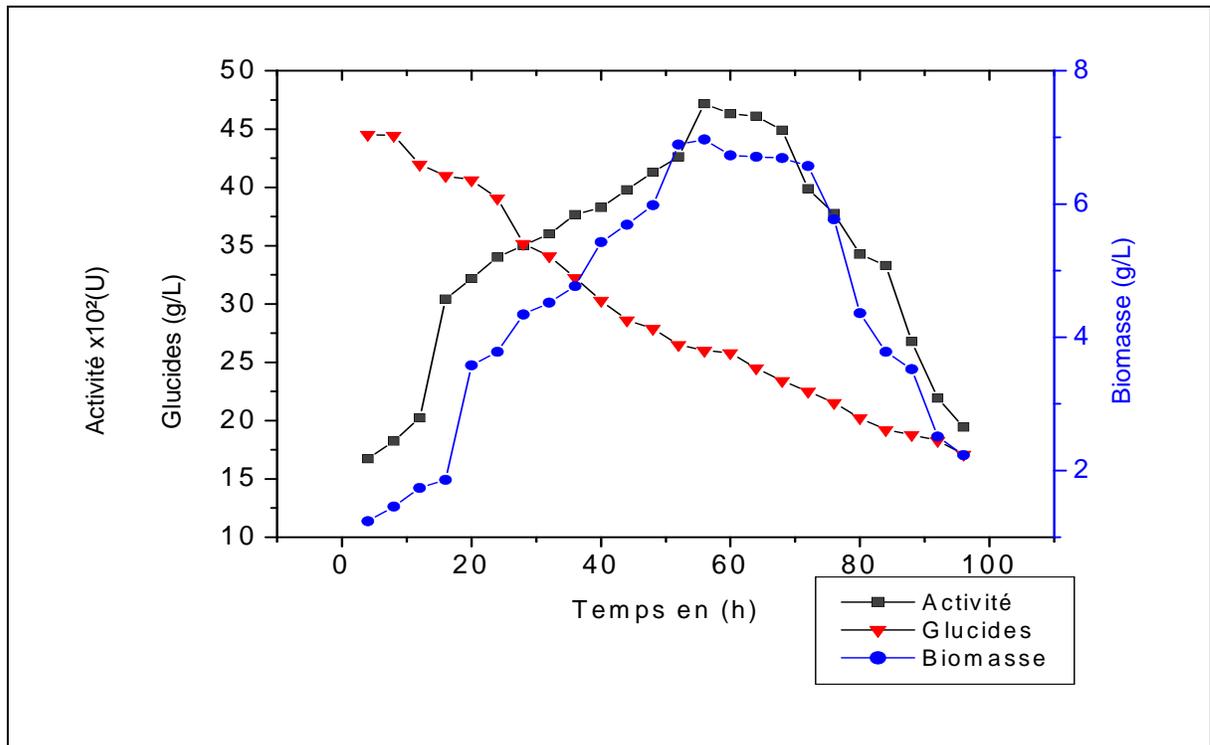


Figure 14 : Evolution cinétique de la croissance, la production de l' α -amylase et la consommation des glucides au cours de la fermentation de *Schwanniomyces sp* (milieu de lactosérum 100%, Température 30°C, pH 5, agitation 180 rpm)

5.2. Cinétique de la production de l' α -amylase par *Schwanniomyces sp*

La figure 14 décrit la cinétique de production de l' α -amylase par *Schwanniomyces sp*. La synthèse de l'enzyme commence dès le début de la fermentation, mais en faible quantité (1673 $\mu\text{mols}/\text{min}/\text{ml}$). La production de l' α -amylase augmente avec la croissance cellulaire. Ce type de profil, a été rapporté par Kocher et Katyal (2003) et par Tatsinkou et ses collaborateurs (2005) pour des levures ascomycètes cultivées respectivement sur des milieux à base de pomme de terre et de blé. La juxtaposition des profils de biomasse et d'activité amylasique traduit une synthèse associée à la croissance.

En effet, l'activité amylasique augmente de façon importante durant la phase exponentielle, où elle passe de 2023 à 4717 U, après 56 heures de fermentation. Ce mécanisme d'activité s'explique probablement par les changements morphologiques et physiologiques de la souche levurienne influençant la production de l' α -amylase.

Cependant, le temps de fermentation nécessaire pour arriver à l'activité amylasique optimale varie d'une souche à une autre et d'un milieu de fermentation à un autre. Comparativement à d'autres études, le maximum d'activité amylasique est observé au cours de la phase d'accélération de la croissance ; 78 heures pour la souche *Lipomyces sp* cultivée sur un milieu à base de déchets de dattes (Merabti, 2006) avec une activité maximale de 6582U.

Par ailleurs, la diminution de l'activité amylasique commence dès la 60^{ème} heure de fermentation et elle se poursuit pour atteindre la valeur de 1944 U au bout de 96 heures (à la fin de fermentation). Cette diminution est due certainement à l'épuisement du milieu en nutriments nécessaires à la croissance d'une part et à l'autolyse des cellules d'autre part (Leclerc et al, 1995).

5.3. Evolution de la concentration des glucides

Au cours de la fermentation, la teneur du milieu en sucres diminue pendant la phase de latence. La consommation des glucides devient importante dans la phase exponentielle et elle poursuit dans les deux autres phases (phase stationnaire et de déclin). Nous notons une variation brusque de 44.53g/L à 17.09g/L (figure 14), due à l'assimilation des glucides totaux présents dans le lactosérum par la levure *Schwanniomyces sp* pour ses activités métaboliques.

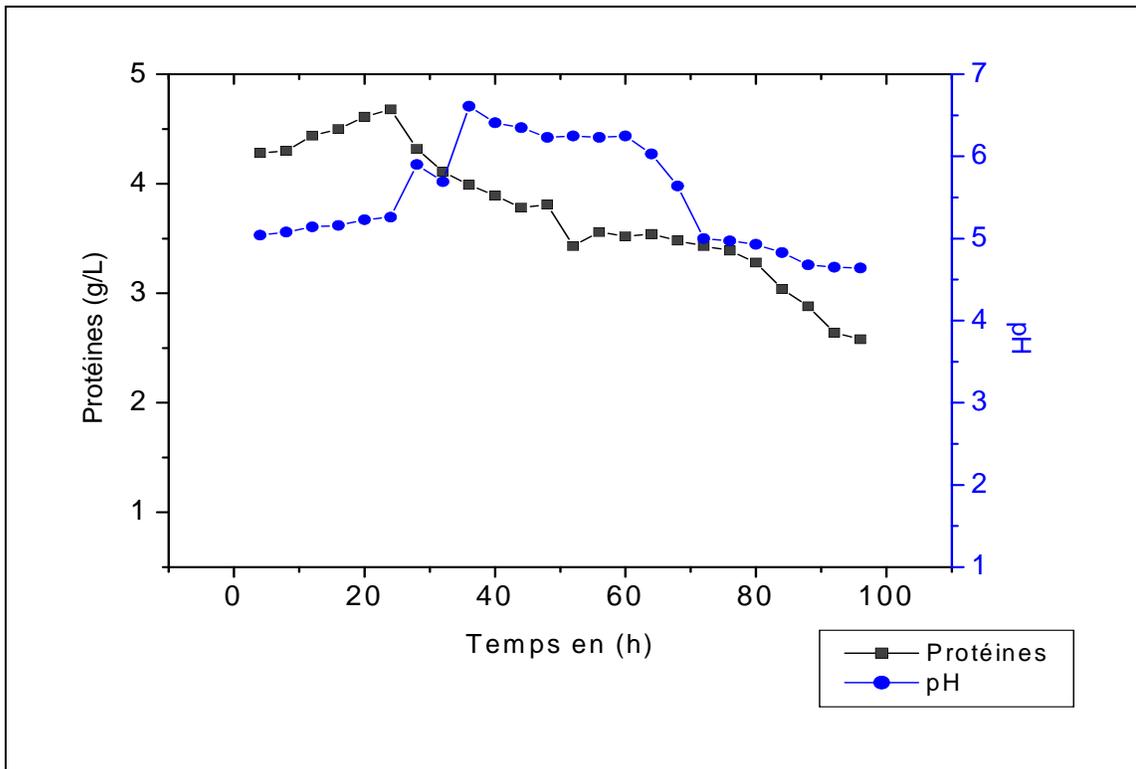


Figure 15 : Evolution cinétique des protéines et de pH au cours de la fermentation par *Schwanniomyces sp*

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

Le pH du milieu de production est initialement ajusté à 5. La figure 15 montre l'évolution du pH au cours de la fermentation. Il demeure constant pendant les premières heures de la fermentation de 4 heures à 24 heures. On assiste à une augmentation progressive, jusqu'à atteindre une valeur maximale de 6.61 après 32 heures. Cette augmentation du pH est due certainement à la dégradation des protéines qui libèrent progressivement des acides aminés hydrolysés ensuite en ammoniacque par désamination (Leclerc et al, 1995). L'augmentation du pH s'explique également par la métabolisation des glucides qui libère du CO₂. Cependant, le pH reprend sa diminution à partir de 60 heures, suite à la formation d'acides organiques (acides succinique, acétique, formique...) à partir des glucides (Gancedo et Senano, 1989). Enfin le pH maintient une valeur stable de 4.64 jusqu'à la fin de fermentation.

Quant à l'évolution des protéines au cours de la fermentation (figure 15), nous observons une légère hausse pendant la phase de croissance (4 heures à 24 heures), expliquée par la synthèse d'enzyme et en particulier des hydrolases (Arnaud et Guiraud, 1999). Cette progression est en parfaite synergie avec les cinétiques de croissance et de production de l' α -amylase. Les protéines diminuent légèrement pendant la phase exponentielle et d'une manière plus importante au cours des phases stationnaire et de déclin, où elles atteignent une valeur de 2.58g/L. Cette baisse des protéines s'explique par l'attaque des protéase libérées lors de la lyse cellulaire (Leclerc et al, 1995 et Bouix et Leveau, 1999).

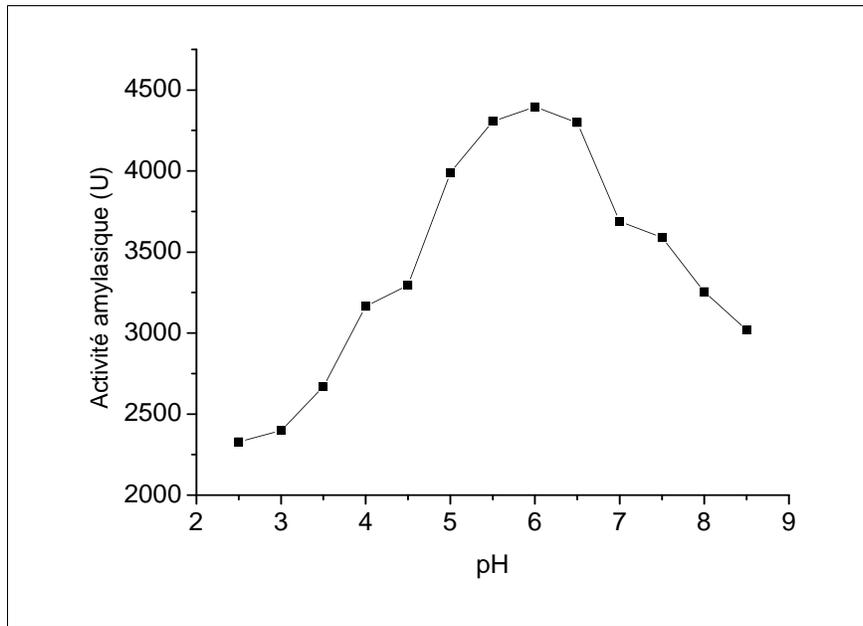


Figure 16 : Effet du pH sur l'activité de l' α -amylase de *Schwanniomyces sp.*

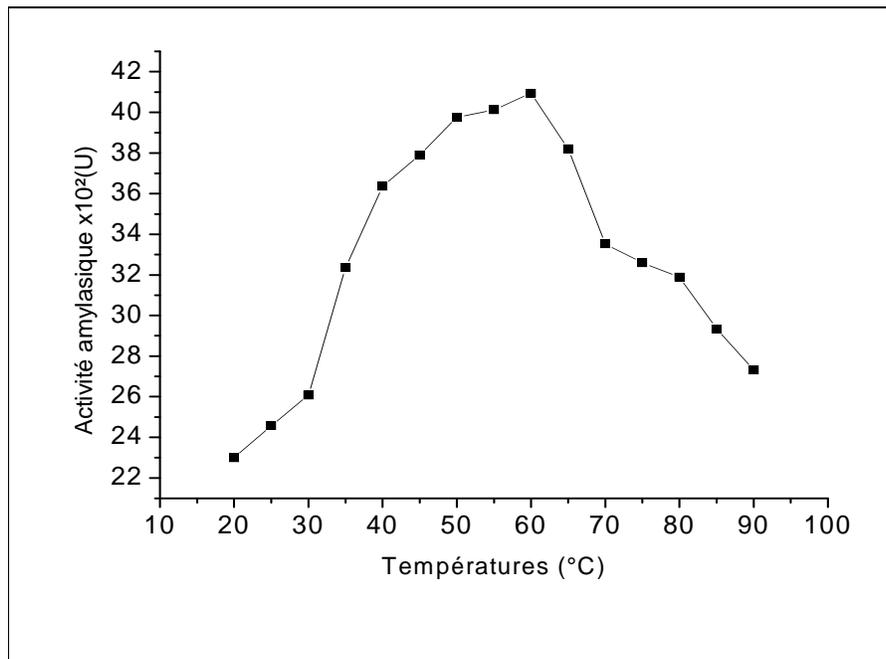


Figure 17 : Effet de la température sur l'activité de l' α -amylase de *Schwanniomyces sp.*

6. Etude de quelques caractéristiques de l' α -amylase de *Schwanniomyces sp*

6.1. Effet de la variation du pH sur l'activité amylasique

La courbe de l'activité amylasique de la souche *Schwanniomyces sp* en fonction du pH à l'allure d'une cloche, indiquant une valeur maximale de 4396 U à pH 6 (figure 16). Dans l'intervalle de pH 2,5 à 6, l'activité progresse proportionnellement à cette variation du pH. L'analyse statistique (ANOVA, annexe 9), révèle une corrélation positive entre l'activité enzymatique de l' α -amylase de *Schwanniomyces sp* et le pH (jusqu'au pH 6). Au delà de cette valeur, elle commence sa diminution et à pH 8,5, elle perd 76% de son activité. Cette perte de l'activité de l' α -amylase de *Schwanniomyces sp* 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.

Le pH optimum de 6 pour l' α -amylase de *Schwanniomyces sp* est proche de 6,3 pour la levure *Schwanniomyces alluvius* (Wilson et Ingledew, 1982) et de 5,6 pour la levure *Filobasidium capsuligenum* (De Mot et Verachlert, 1985) et identique pour la levure *Lipomyces sp* (Merabti, 2006). Cependant, il est différent pour d'autres genres levuriens : 5,5 pour la levure *Schwanniomyces occidentalis* (Wang et al., 1989) et 4,5-5 pour *Lipomyces kononenkoae* (Prieto et al., 1995). Ces différences sont probablement dues à la variation de la composition en acides aminés, où chaque α -amylase, développe un état de protonation spécifique et à la composition du milieu de culture.

En conclusion, l' α -amylase de *Schwanniomyces sp* a un pH optimum de 6, semblable à celui des α -amylases fongiques, mais différent de celui des α -amylases bactériennes, qui ont parfois des pH optimum plus alcalins (pH 8) (De Souza et Martins, 2000 et Cordeiro et al., 2002).

6.2. Effet de la température sur l'activité amylasique

L'influence de la température sur l'activité de l' α -amylase de *Schwanniomyces sp* est testée sur une gamme de températures de 20 à 90 °C (figure 17).

L'activité enzymatique croît régulièrement dans la zone de température de 20 à 60 °C, pour atteindre son maximum à 60°C. Elle chute brutalement lorsque la température passe de 65 à 75°C. L'étude statistique [analyse de la variance (ANOVA)] des résultats, révèle un effet de la significatif ($P < 0.05$) de la température sur l'activité de l' α -amylase ($p < 0.05$) (annexe 9

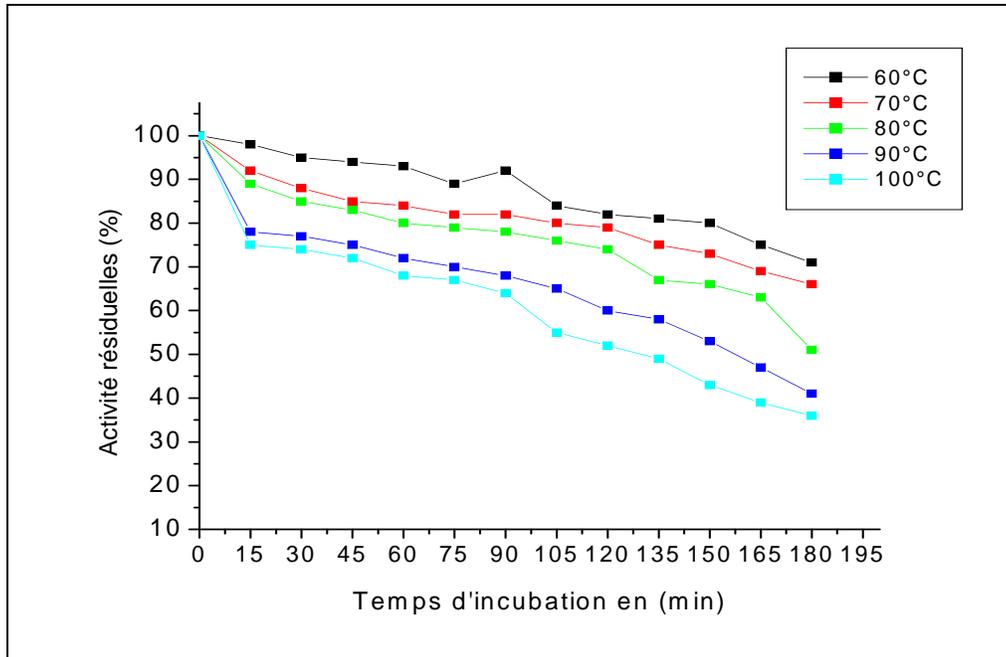


Figure 18: Effet de la thermostabilité de l' α -amylase de *Schwanniomyces sp*

b). En effet, la température optimale des amylases levuriennes varie entre 40°C à 60 °C et peut atteindre les 70°C pour certaines espèces comme *Lipomyces starkeyi* (Panchal, 1990). Comparée aux souches bactériennes, cette température est proche des bactéries thermophiles avec des températures optimales oscillant de 70 à 90°C.

Nos résultats sont proches de celui rapporté par Kelly et al., (1985) et Haifeng et al., (2006), qui signalent une température optimale de 60 °C pour la souche *Lipomyces starkeyi* et la souche *Aureobasidium pulluans*. Cependant, les études menées sur les espèces levuriennes de même genres (*Schwanniomyces alluvius* et *Schwanniomyces occidentalis*), possèdent des α -amylases avec des températures optimales moindres de 40 et 50 °C (Moranelli et al., 1987 et Wang et al, 1989). De plus, l'optimum de l'activité de l' α -amylase de *Schwanniomyces sp* est supérieure à celui d'autres levures : *Cryptococcus flavus* (Wanderley et al., 2004) et *Filobasidium capsuligenum* (De mot et Verachtert, 1985), où leur température optimale avoisine les 50°C.

Nous pouvons conclure que *Schwanniomyces sp* a un potentiel pour la production d'une α -amylase thermostable, qui l'on peut qualifier de thermophile, puisque son activité est maintenue dans un intervalle de température de 60 à 65°C, une caractéristique des enzymes thermophiles (Vieille et Zeikus, 2001).

6.3. L'étude de la thermostabilité de l' α -amylase

L'étude de la stabilité thermique de l' α -amylase produite par *Schwanniomyces sp* isolée du sol de la sources thermales, Hammam Téléghma-Mila, est testée à différentes températures : 60, 70, 80, 90 et 100°C. L'enzyme résiste à 60°C, pendant 3 heures d'incubation (Figure 18).

L'examen de cette figure montre, que l' α -amylase est également stable à 70°C puisqu'elle conserve 85% de son activité initiale pour un traitement thermique de 120 min (2 heures). La demi-vie de l'enzyme à 80°C est de 180min et à 90°C, elle est de 150min. Pour la durée d'une heure de traitement, l'enzyme conserve 70% de son activité à 90°C et 65% à 100°C. Ces pourcentages élevés de conservation de l'activité sont des indices qui qualifient l' α -amylase de *Schwanniomyces sp* de source thermale de Téléghma (Mila) parmi les enzymes thermostables ayant des aptitudes industrielles.

De plus, la thermostabilité de notre enzyme dépasse largement les valeurs rapportées par Lefuji et al, (1996), où la levure *Cryptomyces sp* conserve uniquement 20% et 10% de son activité après des traitements thermiques de 30 min à 80°C et à 90°C. Elle dépasse aussi largement celle de la levure *Aureobasidium pullulansqui*, qui se dénature complètement à 70°C pendant 30 min (Haifeng et al., 2006).

Nos résultats sont corroborés pour ceux de Moranelli et al., (1987), qui rapportent une α -amylase très thermostable pour le même genre levurienne (*Schwanniomyces alluvius*). Ces différences de comportement vis-à-vis du traitement thermique sont dues au patrimoine génétique particulier à chaque espèce et à l'adaptation physiologique du microorganisme à la niche écologique dans laquelle il vit (Hasper et al., 2002).

Cette thermostabilité est due à d'autres facteurs comme la présence de certaines liaisons dans la structure secondaire et tertiaire des protéines enzymatiques (liaisons hydrogènes, liaisons secondaires liaisons avec métaux et ponts dissulfures), permettent de consolider la structure de l'enzyme et donc sa résistance au traitement thermique (Scriban, 1999). En effet, des études ont prouvé que la richesse en résidus cystéines et en glucides (glucosylation excessive) confère à la molécule enzymatique une grande intégrité structurale résistant à des températures élevées (Vieille et Zeikus, 2001 et Xu et al, 2002).

Conclusion

L'échantillon de 1g de sol prélevé de deux régions différentes de sources thermales (Hammam Debagh-Guelma et Hammam Téleghma Mila), a permis d'isoler 5 souches (S₁, S₂, S₃, S₄ et S₅) à activité amylolytique. La sélection sur milieu PDA contenant 1% d'amidon (substrat inducteur) a révélé que la souche S₂ et S₃ sont les plus performantes dans la production de l' α -amylase.

Par ailleurs, un traitement thermique de 70°C et 80°C est réalisé pour départager les deux souches et garder la souche la plus performante dans la production d'une enzyme, la plus thermostable. L'analyse des résultats indique que la souche S₃ répond aux deux exigences fixées comme objectif dans cette étude (quantité d'enzyme et thermostabilité). Il sera retenue pour la suite de notre travail.

L'identification [basée sur les clefs de Lodder (1971), Kreger Van, (1984) et Guiraud, (1998)] a montré que cette levure amylolytique appartient (probablement) au genre *Schwanniomyces*.

Les profils de cinétique des productions de biomasse et d' α -amylase (sur un milieu à 100% de lactosérum supplémenté par 1% d'amidon) mettent en évidence que les deux maximums de biomasse (07 g/L) et de l'activité α -amylasique (5829 U) sont obtenus après 56 heures de fermentation. Cette superposition des profils indique que les deux produits sont associés (ou corrélés positivement).

L'enzyme produite par *Schwanniomyces sp* possède un pH optimum de 6.0 et une température optimal de 60°C. Cette température optimale élevée nous a poussé à pour suivre la stabilité de l'enzyme à des température encore plus élevées. En effet, le traitement de l'enzyme à différentes températures (80°C, 90°C et 100°C) pendant des intervalles de temps de 0 à 180min, avec des prélèvement toutes les 15 min, révèle des demi vies respectivement de plus de 3 heures, 180min, 150min et 120min. A 60°C et 70°C l'enzyme conserve pratiquement toute son activité durant toute la période de traitement (3 heures).

Une température optimale de 60°C et une thermorésistance à 70°C pendant un traitement thermique de 3 heures, permet donc de qualifier l' α -amylase produite par *Schwanniomyces sp* 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 identification de l'espèce de la souche isolée, par des tests d'assimilation de substrats et par les techniques de la biologie moléculaire.
- Une optimisation du milieu de production, pour un meilleur rendement.
- Une purification de l'enzyme produite, pour un usage alimentaire ou pharmaceutique
- Une analyse protéomique de l'enzyme pour connaître les raisons de cette stabilité thermique.

Référence bibliographique

- **Adrian J. (1973)**. Valeur alimentaire du lait. Maison Rustique. Paris.
- **Aït Kaki A. (2004)**. Isolement de la moisissure *Rhizopus oryzae* et optimisation d'un milieu à base de lactosérum pour la production de l' α -amylase. Thèse de magistère. Université Mentouri Constantine.
- **Alais C. (1981)**. La valorisation du lactosérum " les bases et les problèmes". Technique laitière. N° 952, p : 7-10.
- **Ali F.S. and Abdel Moneim A.A. (1989)**. Effet of chemicals on fungal α -amylase activity. *Zentralbl Microbiol.*, **114**(8), p: 623-628.
- **Allen N.H and Ahearn D.G. (1987)**. Ecology of Aquatic In : Rose A.H., Harrison J.S. (eds), The yeast, V1, Biology of yeast. 2nd edition Academic Press. London. p: 123- 174.
- **Alva S., Anupama J., Savla J., Chiu Y.Y., Vyshali P., Shruti M., Yogeetha B.S., Bhavya D., Purvi J., Ruchi K., Kumudini B.S and Varalakshmi K.N. (2007)**. Production and characterisation of fungal amylase enzyme isolated from *Aspergillus sp.* JGI12 in solid state culture. *African Journal of Biotechnology.*, **6**(5), p: 576-581.
- **Anonyme (2007)**. Etat récapitulatif des sources géothermales recensées sur le territoire national.
- **Arnaud A. et Guiraud J.P. (1999)** .Le métabolisme microbien. Ds. Scriban. R. Biotechnologie. 5^{ème} édition. Techniques et Documentation-Lavoisier (éd.). p: 91-96.
- **Assenat L., Boudier J.F., Cottier M., Goursaud J., Lejaouen J.C., Lemens P. Mahieu H. & Rotereau J.C. (1985)**. Laites et produits laitiers. Vache. Brebis. Chèvre. Lavoisier. Paris. p : 1-10.
- **Audic J.L., Chaufer B. and Daufin G. (2003)**. Non-food applications of milk components and dairy co-products : A review. INRA, EDP Sciences. p: 417-438.
- **Audigie C.L., Fagerella J., Zonszain F. (1984)**. Manipulation d'analyse biochimique. Edition Tec & Doc, Lavoisier. Paris. p : 270.
- **Badot R.M. et Merlin D. (1984)**. Métabolisme énergétique et mouvement révolutif chez le haricot (*Phaseolus vulgaris*). Ann. Sci. Uni. Franche-Comté, *Biol.Veg.*, **4**, p : 7-12.
- **Behal A., Singh J., Sharama M.K., Pur P. and Batra N. (2006)**. Characterisation of Alkaline α -Amylase from *Bacillus sp* AB 04. *International Journal of Agriculture & Biology.*, **08**(1), p : 80-83.

- **Bernfeld P. (1955).** Amylase. *In* : Clowck S.P and Kaplan N.O.(Ed): Methods in enzymology. Volume 1. Academic press. New York.p: 149-157.
- **Berry D. (2000).** Ingredients foods. *Dairy foods*. 101(4), p : 32.
- **Berry D and Paterson A. (1990).** Enzymes in food industry *In*: Sucking C.J.(ed.),Enzyme chemistry impact and application. Edition champman and hall London, 2nd edition.p: 306-351.
- **Bertheau Y., Kotoujansky A. et Colenoa A. (1985).** Sources actuelles et potentielles d'enzymes d'hymolyses et de dépolymérisation. *In* : Mouranche A. et Coste C. (Ed) : Hydrolyses et dépolymérase enzymes, d'intérêt industriel. Ed. Gautier-Villard. p : 47-108.
- **Blin C.P. (2002).** Etude comparative du catabolisme de l'acide ricinoléique chez les levures du genre *Sporidiobolus* : mise en évidence et caractérisation du système béta-oxydase impliqué. Thèse de doctorat. Ecole Nationale Supérieure de Biologie Appliquée à la Nutrition et à l'Alimentation. Université de Bourgogne, France.
- **Bodri E.A. Bower B. Berka R.M. and Dunn-Coleman N.S. (1997).** Economically important organic acid and enzyme products. *In*: Martinelli S-D and Kinghorn J-R. (Ed): *Aspergillus* = 50 years on progress in industrial microbiology. Elsevier, vol.29, p: 561-602.
- **Boel E., Brady L., Brozowski A-M., Derewanda Z., Dodson G-G., Jensen V-J., Petersen S-B., Swift H., Thim I. & Woldike H-F. (1990).** Calcium binding in α -amylase: an X-ray diffraction study at 2,1 Å resolution of two enzymes from *Aspergillus* . *Biochem.*, **29**, p: 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.
- **Botton B. (1991).** La physiologie des levures Ds : Larpent J.P., Biotechnologie des levures. Masson, Milan Barcelone Bonn. Paris. p : 97-127.
- **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 d'importance industrielle. 2^{ème} édition. Masson. Collection Biotechnologies. p : 34-381.
- **Bouix M. et Leveau J.Y. (1991).** Les levures Ds : Bourgeois C.M., Leveau J.Y., Techniques d'analyse et de contrôle dans les industries agroalimentaires, édition 2 Lavoisier-Tec &Doc, Paris. 3, p : 206-229.
- **Bouix M. et Leveau J.Y. (1999).** Production des enzymes. *In* : Scriban R. (Ed) : Biotechnologies .Ed. Lavoisier. p: 344-400.
- **Bourgeois C.M. et Leveau J.Y. (1991).** Techniques d'analyse et de contrôle dans les industries agroalimentaires, édition 2 Lavoisier-Tec & Doc, Paris. 3, p : 206-229.

- **Bourgeois C.M., Mesclé J.F. et Zucca J. (1988).** Microbiologie alimentaire, Tome 1. Aspect microbiologique de la sécurité et de la qualité alimentaires, Technique et Documentation – Lavoisier, Paris. 8, p : 161-171.
- **Burhan A., Nisa U., Gokhan C., Omer C., Ashabil A. and Osmani G. (2003).** Enzymatic properties of novel thermostable, thermophilic, alkaline and chelator resistant amylase from an alkaliphilic *Bacillus sp.* Isolate ANT-6. *Process Biochem.*, **38**, p : 1397-1403.
- **Cahagnier B. (1998).** Moisissure des aliments peu hydratés. Lavoisier-Tec & Doc, Paris. 8, p : 96-135.
- **Callon C. (1997).** Les levures. In : Larpent J.P, Microbiologie alimentaire. Technique de laboratoire. Lavoisier-Tec & Doc. Paris. p : 465-472.
- **Casalis J. (1975).** Considérations sur l'utilisation du lactosérum dans l'industrie alimentaire. Revue laitière Française N° 332., p : 403-419.
- **Charles A, Guy L et Laurent M. (2003).** Biochimie alimentaire, 5^{ème} édition de l'abrégé. Dunod, Paris.
- **Chatterton J-R, Vogelsong K-M, Lu Y, Ellman A-B et Hudgens G-A. (1996).** Salivary α -amylase as a measure of endogenous adrenergic activity. *Clin. Physiol. J.* 16(4), p: 344-348.
- **Christian M. (1982).** L'amidon et les enzymes en sucrerie industrie alimentaires et agricole. N°10, p : 21-25.
- **COFALEC. (2006).** Caractérisation des levures de boulangerie. Adopté par Comité de Fabrication de levures de panification de l'union européenne. Paris. p: 1-10
- **Comi K., Akeno T., Minitoki T., Ozeki K., Kumagai C., Okazaki N and Linura Y. (2000).** Molecular cloning and characterization of a transcriptional activator gene involved in the amyolytic gene expression in *Aspergillus oryzae*. *Basic. Biotechnol. Biochem.*, **64** (4), p: 816-827.
- **Cordeiro C.A., Leal M.L. and Luciano A.B. (2002).** Production and properties of α -amylase from thermophilic *Bacillus sp.* *Braz. J. Microbiol.*, **33**(1)
- **Costes C. (1982).** Les enzymes ; Production et utilisations industrielles. Bordas, Paris. p: 37-195.
- **Davet P. et Rouxel F. (1997).** Détection et isolement des champignons du sol. (Ed), INRA. Paris. p : 13-18
- **Davies G-J., Wilson K-S. et Henrissat B. (1999).** Nomenclature for sugar binding subsites in the glycosylhydrolases. *Biochem. J.*, **321**, p: 557-559.
- **Dauter Z. et al., (1999).** X-ray structure of the maltogenic α -amylase from *Bacillus stearothermophilus*, novamyl, maltose and acarbose complexed at 1,7 Å resolution. *Biochem.* (38), p : 8385-8392.

- **De Mot et Verachlert (1985)**. Purification and Characterization of Extracellular Amylolytic Enzymes from the Yeast *Filobasidium capsuligenum*. *Applied and Environmental Microbiology*, p: 1474-1482.
- **De Souza C.E. and Martins M.L. (2000)**. Culture conditions for the production of thermostable amylase by *Bacillus sp.* *Martins Brazilian Journal of Microbiology* C.E. de S. Teodor and M.L.L., **31**, p: 298-302.
- **Dryer J. (2001)**. La grande diversité du lactosérum. *Dairy foods*. 102(5), p: 35.
- **Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J.K., Pebers P.A and Smith F. (1956)**. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.*, **28**, p: 350-356.
- **Egas M.C., Da Cota M.S., Cowman D.A, and Pires E.M. (1998)**. Extracellular α -amylase from *Thermus filiformis* ork A₂ : purification and biochemical characterisation. *Extremophiles.*, **2**(1), p: 23-32.
- **Farber G.K and Petsko G.A. (1990)**. The evolution of α/β barrel enzyme. *Trends. biochem. SCI.*, **15**, p : 228-234.
- **Fevrier C. et Collet J. (1975)**. Considérations sur l'utilisation du lactosérum en industrie alimentaire. *Revue Laitière Français* N°332.
- **Fogarty W.M. and Kelly A. (1980)**. Amylases amyloglycosidases and related glucanases in Ecanon. microbiology. Acad press, New York and London. p: 17-24.
- **Gana S et Touzi A. (2001)**. Valorisation du lactosérum pour la production de levures lactiques avec les procédés de fermentation discontinue et continue. *CDER, Rev. Energ. Ren.*, p: 51-58.
- **Gancedo C and Senano R. (1989)**. Energy-Yielding Metabolism. *In* : Rose A.H., Harrison J.S. (eds), *The yeast, Metabolism and Physiology of Yeast*. 2nd edition Academic Press. London., **3**, p: 205- 251.
- **Graham T. (1996)**. Acid α -amylase biochemistry. 2nd Ed., Rathews & Van Holde, p: 132.
- **Guiraud J.P. (1998)**. Microbiologie alimentaire. Dunod, Paris. p : 310-321.
- **Guiraud J.P. et Rosec J.P. (2004)**. Pratique des normes en microbiologie alimentaire. AFNOR. p: 228-235.
- **Haifeng L., Zhenming C., Xiaohong W., Xiaohui D., Liyan M et Lingmei G. (2006)**. Purification and characterization of extracellular amylase from the marine yeast *Aureobasidium pullulans* N13d and its raw potato starch digestion. *Enzymatic and Microbial Technology.*, **40**, p: 1006-1012.
- **Hamilton L.M., Kelly C.T. and Forgaty W.M. (1999)**. Purification and proprieties of the row starch degrading α -amylase of *Bacillus sp.* IMD 434. *Biotechnl. Letters.*, **21**, p : 111-115.

- **Hammer E., Krowas D., Schafer A., Specht M., Franche W. and Schauer F. (1998).** Isolation and characterisation of a Dibenzofuran-Degrading Yeast : Identification of Oxidation and Ring Cleavage Products. *Appl. Environ. Microbiol.*, **64**, p: 2215-2219.
- **Hamon M., Pellerin F., Guenet M. et Maauzier G. (1990).** Abrégés chimie analytique. Méthodes spectrales et analyse organique. Tome 3. 2^{ème} édition. Masson. Paris. p: 232-233.
- **Haq I., Ahsraf H., Iabal J. and Qadeer M.A. (2003).** Production of α -amylase by *Bacillus licheniformis* using an economical medium, *In: Behal A., Singh J., Sharama M.K., Pur P and Batra N., Characterisation of Alkaline α -Amylase from *Bacillus sp* AB 04. International Journal of Agriculture & Biology.*, **08**(1), p : 80-83.
- **Harrigon W.F. and Mc lace M.E. (1976).** Laboratory methods in food and dairy microbiology. *Sci. Food Agric.* London. Academic Press. 32, p : 1145-1150.
- **Heslot H. (1996).** Lingenierie des protéines et ses applications. Lavoisier Tec et Doc, p: 424-432.
- **Hasper A.A., Dekkers E., Mil M.Y., Van Vondervoort P.J.I. and 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.
- **Hwang K-Y., Song H-K., Chang C., Lee J., Lee S-Y., Kim K-K., Choe S., Sweet R-M. & Such S-W. (1997).** Crystal structure of thermostable α -amylase from *Bacillus licheniformis* refined at 1,7 Å resolution. *Mol. Cells.*, **7**(2), p: 251-258.
- **Igarshi K., Hatada Y., Hagihara H., Saeki K., Takaiwa M., Ulmura T., Ara K., Ozaki K., Kawai S., Kobayashi T. and Ito S. (1998).** Enzymatic properties of novel liquefying α -amylase from an alkalophilic *Bacillus* isolated and entire nucleotides and aminoacids sequences. *Appl. Environ. Microbiol.*, **64**(9), p: 3282-3289.
- **Ito S.T., Kobayashi K., Ara K., Ozaki S., Kawai S and Halada Y. (1998).** Alkaline detergent enzymes from alkaliphiles: enzymatic properties, genetics and structures. *In: Behal A., Singh J., Sharama M.K., Pur P and Batra N. Characterisation of Alkaline α -Amylase from *Bacillus sp* AB 04. International Journal of Agriculture & Biology.*, **08**(1), p: 80-83.
- **Janecek S. (1994).** Sequence similarities and evolutionary relationships of microbial, plant and animal α -amylase. *Eur.J.Biochem.*, **224**, p: 519-524.
- **Kadziola A., Abe J., Svensson B. and Aser R. (1994).** Crystal and molecular structure of barley α -amylase. *J. Mol. Biol.*, **239**, p: 104-121.
- **Kandra L., Gyemant G., Farakas E. and Liptak A. (1997).** Action pattern of porcine pancreatic α -amylase on three different series of beta-maltooligosaccharide glycoside. *Carbohydr. Res.*, **289**(3), p: 237-242.

- **Keating L., Kelly C. and Forgartry W. (1998).** Mechanism of action and the substrate dependant pH maximum shift of the α -amylase of *Bacillus coagulans*. *Carbohydrate Research.*, **309**, p: 311-318.
- **Kelly C.T, Bolton DJ. and Fogarty W.M. (1997).** Bi-phasic production of α -amylase of *Bacillus flavothermus* in batch fermentation. *Biotechnology.*, **19**(7), p: 675-677.
- **Kelly C.T., Moriarty M. E. and Fogarty W. M. (1985).** Thermostable extracellular α -amylase and α -glucosidase of *Lipomyces starkeyi*. *Applied Microbiology and Biotechnology.*, **22**(5), p: 352-358.
- **Kocher G.S et Katyal P. (2003).** Use oh potato starch for extracellular amylase production by a yeast isolate. Ludhana , India.
- **Kosikowski F.V. (1977).** Cheese and fermented food. 2nd Edition Words-Brothers. U.S.A.
- **Kosikowski F.V. (1979).** Utilisation du lactosérum et produits à base de lactosérum. *Revue Laitière Français.* p: 11-21.
- **Kreger -Van Rij N.J. (1984).** The yeast, a Taxonomic Study, Elsevier Biomedical.
- **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. p : 19-24.
- **Larpent J.P. (1991).** *Biotechnologie des levures.* Masson, Milan Barcelone Bonn. Paris. p : 97-127.
- **Larpent-Gourgaud M. and Sanglier J-J. (1992).** *Biotechnologies. Principes et méthodes,* p: 574-581.
- **Larpent J.P. et Larpent-Gourgaud M. (1997).** *Mémento technique de microbiologie.* 3^e édition, Lavoisier-Tec &Doc, Paris. 8, p : 217-240.
- **Laplanche J. (2004).** Systhème d'épuration du lactosérum d'alpage par culture fixée sur lit de compost. *Revue suisse Agric.*, **36**(5), p: 220-224
- **Leclerc H. (1975).** *Microbiologie générale,* doin éditeurs, Paris. p : 28
- **Leclerc H., Meyer A. et Deiana J. (1995).** *Cours de microbiologie générale.* Nouveau programme. Biosciences et Techniques. doin éditeurs, Paris. p : 73-92.
- **Lecoq R. (1965).** *Manuel d'analyse alimentaire et d'expertises usuelles.* Tome 1. Edition Doin et Cie. p : 200-203, 569, 1604-1613.
- **Lefuji H., Chino M. and Imura Y. (1996).** Raw-starch-digesting and thermostable α -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.

- **Lejeune R. and Baron G.V. (1995).** Effet of agitation on growth and enzyme production of *Trichoderma reesei* in batch fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **43**, p: 249-258.
- **Leveau J.Y. et Bouix M. (1979).** Etude des conditions extrêmes de croissance des levures osmophiles. *Ind. Alim. Agric.*, **11**, p : 1147-1151.
- **Leveau J.Y. et Bouix M. (1993).** Microbiologie industrielle. Les micro-organismes d'intérêt industriel. Lavoisier TEC& DOC, Paris. 08, p : 2-92.
- **Lodder J. (1971).** The yeast, a taxonomic study, 2^{ème} edition. North Holland, Amsterdam, Londres. p: 1385.
- **Lowry O.H., Rosebroughi N.J., Farr A.L and Randall R.J. (1951).** Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**(1), p: 265-275.
- **Luquet F.M. et Boudier J.F. (1984).** Utilisation des lactosérums en alimentation humaine et animale. *Apria.*, **21**, p : 1-7, 66, 83-90.
- **Mac Gregor E.A. (1993).** Relation ships between structure and activity in the α -amylase family of starch-metasolising enzymes. *Star.*, **45**(7), p: 232-237.
- **Mazur A. K and Nakatani H. (1993).** Multiple attack mechanisme in the porcine pancreatic α -amylase hydrolysis of amylose and amylopectine. *Arch. Bioch. Biophysics*. Vol., **306**(1), p: 29-38.
- **Mc Carter J.D and Withers S.G. (1996).** Unequivocal identification of Asp-214 as the catalytic nucleophile of *Saccharomyces cervisiae* α -glucosidase using 5-fluoro glycosyl fluorides. *J. Biol. Chem.*, **271**, p: 6889-6894.
- **Merabti R. (2006).** Isolement et caractérisation de souches levuriennes amylolytiques à partir de sol saharien algérien. Thèse de Magistère. Université Mentouri Constantine.
- **Mercier C. (1997).** Transgènes et modification quantitative et/ou qualitative de la composition de lait à de fins nutritionnels. *In* : Frened G. (Ed), intérêts nutritionnels et diététique du lait de chèvre. Nord-France. p : 169-177.
- **Mercier C. (1985).** Les enzymes amylolytiques. *In* Mauranch A & Costes C. (Ed): Hydrolase et polymerases. Ed. Gauthier Villars. p: 109-142.
- **Mercier C. (1986).** Starch in polysaccharides. Acad. Press. Newyork, p: 209-382.
- **Melansniemi H. (1990).** The α -amylase of *Clostridium thermosulfuricum* Ph.D. Thesis. Research laboratories of the state alcool company. Alko. Helsinki. Finland.
- **Monsan P. (1982).** Les méthodes d'immobilisation des enzymes. Ed : Bordas. Paris. p : 81-118.

- **Moranelli F., Yaguchi M., Calleja G.B. and Nasim A. (1987).** Purification and characterisation of the extracellular alpha-amylase activity of the yeast *Schwanniomyces alluvius*. *Biochem Cell Biol.*, **65**(10), p: 899-908.
- **Mouranche A et Costes C. (1985).** Hydrolases et dépolymérasés. Enzymes d'intérêt industriel. Collection dirigée par Costes C. France.
- **Nielson J-E., Borchert T-V et Vriend G. (2001).** The determinant of α -amylase pH-activity profiles. *Protein Engineering*. Oxford University Press. **14**(7), p: 505-512.
- **Ostergaard S., Olsson L. and Nielsen J. (2000).** Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol.Mol.Biol.Rev.*, **64**(1), p: 34-50.
- **Oteng-Gyang K. (1984).** Introduction à la microbiologie alimentaire dans les pays chauds. Technique & Documentation Lavoisier, Paris. **8**, p : 43-51.
- **Panchal C.J. (1990).** Yeats strain selection. Marcel Dekker (ed) USA, p: 189.
- **Pandey A., Nigam P., Soccol V.T., Singh D and Mohan R. (2000).** Advances in microbial amylases. *In*: Alva S., Anupama J., Savla J., Chiu Y.Y., Vyshali P., Shruti M., Yogeetha B.S., Bhavya D., Purvi J., Ruchi K., Kumudini B.S and Varalakshmi K.N. Production and characterisation of fungal amylase enzyme isolated from *Aspergillus sp.* JGI12 in solid state culture. *African Journal of Biotechnology.*, **6**(5), p: 576-581.
- **Pazur J. H. and Marchetti N.T. (1992).** Action patterns of amylolytic enzymes as determined by the [¹⁴C]mlto-oligo-saccharides mapping method. *Carbohydr. Res.*, **227**, p: 215-225.
- **Pedersen H and Nielsen J. (2000).** The influence of the nitrogen source on the α -amylase productivity of *Aspergillus oryzae* in continuous cultures. *Appl. Microbiol. Biotechnology.*, **53**, p : 278-281.
- **Phaff H.J. and Starmer W.T. (1987).** Yeast associated with Plants, Insects and Soil *In* : Rose A.H., Harrison J.S. (eds), *The yeast*, V1, *Biology of yeast*. 2nd edition Academic Press. London. p: 123- 174.
- **Phaff H.G., Miller M.W and Mrak E.K. (1968).** The life of yeasts. *In*: Oteng-Gyang K. Introduction à la microbiologie alimentaire dans les pays chauds. Technique & Documentation Lavoisier, Paris. **8**, p :43.
- **Phaff H.G., Miller M.W and Mrak E.K. (1978).** The life of yeasts. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts.
- **Pol D. (1996).** Travaux pratiques de biologie des levures. Guide de laboratoire. ellipses édition marketing S.A, Paris. **15**, p : 20-38, 42-57, 141-151.
- **Priestle Y.P. (1988).** A sterea cartoon-drawing program for proteins. *J.Appl. Crystall.*, **21**, p: 472-576.

- **Prieto J.A., Bort B. R., Martinez J., Randez G. F., Buesa C and 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.
- **Riviere J. (1975).** Les applications industrielles de la microbiologie. Collection Sciences agronomiques. Masson et Cie (ed.), p : 31-195.
- **Rodríguez-Zaragoza Mayslish E and Steinberger Y. (2005).** Vertical distribution the free living Amoeba Population in soil under desert shrubs in the Ngev. *Applied and Environmental Microbiology.*, **71**(4), p: 2053-2060.
- **Rose A.H., Harrison J.S. (1987).** The yeast, V1, *Biology of yeast.* 2nd edition Academic Press. London. p: 23- 35.
- **Rown D. (1990).** *Traité de Biochimie.* Ed : De Beack. Paris. p :320.
- **Roa U.M and Satyanarayana T. (2003).** Statistical optimisation of a high maltose-forming, hyperthermostable and Ca²⁺ independent alpha-amylase production by an extreme thermophile *Geobacillus thermoleovorans* using response surface methodology. *In: Behal A., Singh J., Sharama M.K., Pur P and Batra N. Characterisation of Alkaline α -Amylase from Bacillus sp AB 04. International Journal of Agriculture & Biology.*, **08**(1), p : 80-83.
- **Sanofi W. (1996).** Notices du médicament (maxilase) 94258 genilly cedex france fabricant Sanofi Winthrop industrie ambares 33. France.
- **Savcheko A., Vieille C., Kang S & Zeikus J-C. (2002).** Pyrococcus α -amylase is stabilised by calcium and zinc .Department of biochemistry and molecular biology. University east Lausing. p: 111-123.
- **Schomburg D and Salzmann M. (1991).** *Enzyme Hand book 4. Classe 3: Hydrolases.* Springer-Verlag (ed). Berlin Heidelberg. Germany. p: 1-12.
- **Scriban R. (1984).** *Biotechnologies.* 2^{ème} édition. Techniques et Documentation-Lavoisier. Paris. p :531.
- **Scriban R. (1999).** *Biotechnologies.* 5^{ème} édition. Techniques et Documentation-Lavoisier. p : 149-157.
- **Sicard P.(1982).** Applications industrielles des enzymes. *In : Durand G. & Monson P. (Ed): Les enzymes production et utilisation industrielles.* Ed. Gauthier-Villars. p: 121-164.
- **Simon P. et Meunier R. (1970).** *Microbiologie industrielle et génie biochimique.* Masson ET Cie, Editeurs. Paris VI^e. p : 31-47, 385-411.
- **Somogyi M and Nelson N. (1952).** Notes on sugar determination. *J. Biol. Chem.*, **195**, p: 19-23.

- **Srinivasa Rao M. Reddy G. Venkateswara Rao G and Sambasiva Rao K. R.S. (2004).** Studies on the extraction and characterisation of thermostable α -amylase from pericarp of *Borassus indica*. *African Journal of Biotechnology*., **4**, p: 289-291.
- **Stefanova M and Emanuilova E. (1992).** Characterization of a thermostable α -Amylase from *Bacillus brevis*. *Eu. J. Biochem.*, **207**(1), p: 345-349.
- **Tatsinkou F.B., Taveai F and Ndjouenkeui R. (2005).** Production and partial characterisation of a thermostable amylase from ascomycetes yeast strain isolated from starchy soils. *African Journal of biotechnology*., **4**(1), p: 14-18.
- **Trystram G., Guenneugues P., Pigache S., Brenon M. & Bimbenet J.J. (1991).** Optimisation du procédé industrielle de fermentation continue de levures sur lactosérums. E.N.S.I.A.- BEL Industrie-Biology. p:108.
- **Tsuyoshi N., Fudou R., Yamanaka S., Kozaki M., Tamang N., Thapa S. and Tamang J.P. (2004).** Identification of yeast strains isolated from marcha in Sikkim, a microbial starter for amyolytic fermentation. *International Journal of Food Microbiology*. **99**. p: 135-146.
- **UI-Haq I., Roheena A., Ashraf H and Shah A.H. (2002).** Isolation and Screening of Fungi for the biosynthesis of Alpha Amylase. *Biothechnology*., **1** (2-4), p: 61-66.
- **Uitdehaag J-C-M., Mosi R. Kalk K-H., Vander Veen B-A. Dijkhuizen L., Withers S-G et Dijkstra B-W. (1999).** X-ray structure along the reaction pathway of cyclodextrin glycosyltransferase elucidate catalysis in the amylase family. *Nat. Struct. Biol.* **6**, p : 432-436.
- **Ulacio D., Perez C and Pineda Y.J. (1997).** Mycoflora in tobacco plant roots (*Nicotiana tabacum*) in portuguesa state, Venezuela. *Bioagro.*, **9**(1), p: 3-11.
- **Vieille C and Zeikus J.G. (2001).** Hyperthermophilic Enzymes: Sources, Uses, and Molecular Mechanisms for Thermostability. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*., **65**(1), p: 1-43
- **Veissyere R. (1975).** Technologie du lait. Edition Masson Rustique. Paris.
- **Walker G.M., Wiley J. and Chihster S. (1997).** Yeast physiology and biotechnology.
- **Wanderley K.J., Torres F.A., and Moraes L.M. (2004).** Caractérisation of alpha-amylase from the yeast *Cryptococcus flavus*. *FEMS. Microbiol Lett.*, **231**(2), p: 165-169
- **Wang T.T., Lin L.L. and Hsu W.H. (1989).** Cloning and expression of *Schwanniomyces occidentalis* α -amylase gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applid and Environmental Microbiology*., **55**(12), p: 3167-3172.
- **Watson J.D. et al., (1996).** Biologie moléculaire du gène. *In* : Pol D. Travaux pratiques de biologie des levures. Guide de laboratoire. ellipses édition marketing S.A, Paris. **15**, p : 10.
- **Wickerham L.J. (1951).** Taxonomy of yeast. Technical Bulletin No. 1029, United States. Departement of Agriculture, Washington, D.C.

- **Wilson J.J. and Ingledew W. M. (1982).** Isolation and characterisation of *Schwanniomyces alluvius* amylolytic enzymes. *Applied and Environmental Microbiology.*, **44**(2), p: 301-307.
- **Xu B., Hellman U., Ersson B. and Janson J.C. (2002).** Purification, characterization and amino-acid sequence analysis of a thermostable, low molecular mass endo- β -1,4 glucanase from blue mussel, *Mytilus edulis*. *Euro.J.Biochem.*, **267**, p: 4970-4977.

Annexes

Annexe 1 : Milieux de culture d'isolement et d'identification

a- Milieux d'isolement

* Sabouraud

Glucose.....	20g
Peptone.....	10g
Agar.....	15g
Eau distillée.....	1000ml

* Yeast Malt Agar (YMA)

Extrait de levure.....	3g
Extrait de malt.....	3g
Peptone.....	5g
Glucose.....	10g
Agar.....	20g
Eau distillée.....	1000ml

b- Milieu de repiquage et de conservation

* Potato Dextrose Agar (PDA)

Extrait de pomme de terre.....	1000ml
Glucose.....	20g
Agar.....	20g

◆ Préparation de l'extrait de pomme de terre :

200g de pomme de terre non pelées et vieille, sont lavés et coupés en petits dés, ensuite mis dans un litre d'eau distillée et portés à ébullition pendant 1 h. Ils sont enfin écrasés, filtrer. Compléter à un litre d'eau distillée.

◆ Préparation du milieu :

L'agar et Le Glucose sont dissous à chaud dans l'extrait. Compléter à un litre d'eau distillée, ajuster le pH à 5 et stériliser à 110°C, pendant 30 min.

* Malt Agar (MA)

Extrait de Malt.....	30g
Peptone.....	5g
Glucose.....	15g
Agar.....	15g
Eau distillée.....	1000ml

c- Milieu de sélection

*** PDA à 1% d'amidon**

Extrait de pomme de terre.....	1000ml
Amidon.....	10g
Agar.....	20g

◆ Préparation du milieu :

L'agar et l'amidon sont dissous à chaud dans l'extrait de pomme de terre. Compléter à un litre d'eau distillée, ajuster le pH à 5 et stériliser à 110°C, pendant 30 min.

d- Milieu d'identification

*** Yeast Glucose (YG)**

Extrait de levure.....	3g
Glucose.....	20g
Eau distillée.....	1000ml

*** Yeast Malt (YM)**

Extrait de levure.....	3g
Extrait de malt.....	3g
Peptone.....	5g
Glucose.....	10g
Eau distillée.....	1000ml

*** Yeast Peptone Glucose (YPG)**

Extrait de levure.....	5g
Peptone.....	10g
Glucose.....	20g
Eau distillée.....	1000ml

*** Malt Extract (ME)**

Extrait de malt.....	30g
Peptone.....	5g

Glucose.....15g
 Eau distillée.....1000ml

* Fowell

Acétate de sodium trihydraté.....5g
 Agar.....20g
 Eau distillée.....1000ml

* Gordkowa

Glucose.....1g
 Peptone.....10g
 NaCl.....5g
 Agar.....20g
 Eau distillée.....1000ml

* Mac Clary

Glucose.....1g
 Kcl.....1,8g
 Extrait de levure2,5g
 Acétate de sodium8,2g
 Agar.....20g
 Eau distillée.....1000ml

Annexe 2 : Détermination de l'acidité

- Verser 10 ml de lactosérum dans un bécher de 50 ml.
- Ajouter 2 gouttes de solution de phénophtaléine.
- Titrer par une solution de NaOH à N/9 placée dans une burette.

La coloration rose qui apparaît (comparée à un témoin) doit persister au moins une dizaine de secondes. L'acidité en gramme pour 100g de lactosérum est donnée par la formule suivante :

$$\frac{0,01 \times V \times 100}{E}$$

1 ml de solution de NaOH versée correspond à 0,01g d'acide lactique.

V = volume en ml de la solution de NaOH.

E = masse en gramme de la prise d'essai.

Annexe 3 : Dosage de l'azote total

- Réactifs :**
- Acide sulfurique concentré (d = 1,84)
 - Acide sulfurique 0,1 N

- Soude 0,1 N
- Lessive de soude 33%
- Sélénium en poudre pur (catalyseur)
- Indicateur rouge de méthyle
- Papier pH ou papier tournesol
- Billes de verre, ou pierre ponce

- Matériels :**
- Balance de précision
 - Matras kjeldahl de 500 ml
 - Appareil à distiller
 - Réchaud à gaz ou électrique
 - Burette de 250 ml
 - Erlen-meyer de 300 ml

Protocole :

♦ 1^{ère} étape : minéralisation sulfurique

Introduire dans un Matras kjeldahl de 500ml :

- 1g d'échantillon
- 2g de catalyseur (bien mettre en suspension l'échantillon au sein du catalyseur)
- 20 ml d'Acide sulfurique concentré.

Le liquide est chauffé jusqu' à des coloration complète (la solution devenu limpide) en maintenant une ébullition tranquille sans laisser échapper les vapeurs sulfuriques qui doivent le surmonter. Laisser refroidir.

♦ 2^{ème} étape : Alcalinisation et distillation

Dans le Matras kjeldahl contenant le sulfate d'ammonium, ajouter :

- 160 ml d'eau distillée
- 80 ml de lessive de soude à 33%
- Quelques graines de pierres ponce pour régulariser l'ébullition.

Pour le déplacement de l'ammoniaque, ajouter délicatement le lessive de soude (sans agitation par risque de perte de l'ammoniaque), une fois que l'appareil à distiller est prêt à fonctionner : Réfrigération assurée et extrémité de l'appareil plongeant dans un erlen-meyer de 30 ml contenant 20 ml d'acide sulfurique 0,1 N (extrémité de l'appareil doit être en contact avec le

liquide). Vérifier la fin de la distillation en recevant quelques gouttes de distillat, soit sur papier tournesol rouge (qui devient bleu en présence d'ammoniaque, car le milieu est basique), soit sur du papier pH.

♦ 3^{ème} étape : titrage

L'ammoniaque distillée est reçue dans erlen-meyer contenant l'acide sulfurique en excès (20 ml). Ajouter dans erlen-meyer quelques gouttes de rouge de méthyle et titrer par la soude 0.1N l'acide sulfurique restant (qui n'a pas réagit avec l'ammoniaque). Doser goutte à goutte avec la soude contenue dans la burette, jusqu'au virage jaune pâle persistant.

Calculs :

Le pourcentage d'azote est déterminé selon la formule :

$$N = \frac{0.0014 \times V \times 100}{P}$$

V : volume de l'acide sulfurique qui a réagit avec l'ammoniaque.

P : la prise d'essai (1g).

Le pourcentage d'azote par rapport à l'échantillon sec sera donc :

$$N = \frac{0.0014 \times V \times 100}{P} \times \frac{100}{(100-H)}$$

H : humidité de l'échantillon.

Pour obtenir une valeur appropriée du taux de protéines, il faut multiplier le taux d'azote par un coefficient déterminé expérimentalement.

Annexe 4 : Dosage des sucres totaux

Réactifs :

- Phénol 5 % dans l'eau distillée.
- Acide sulfurique concentré à 95% de pureté et de densité d = 1,84

Protocole :

- Ajouter à 1 ml d'échantillon, 1 ml de phénol et 5 ml d'acide sulfurique concentré. Agiter et laisser reposer 10min à température ambiante.
- Incuber au bain marie à 30°C pendant 20 min.

- Mesurer la coloration jaune orangé à 488 nm, les valeurs obtenues sont traduites en concentrations de glucose par référence à une courbe d'étalonnage préalablement établies.

Annexe 5 : Dosage de la matière grasse

- Réactifs :**
- Acide chlorhydrique 1N
 - Solution aqueuse de ferrocyanure de potassium à 10%
 - Solution aqueuse d'acétate de zinc à 20%
 - Sable purifié pour analyse
 - Ether de pétrole
 - Papier filtre

- Matériels :**
- Balance de précision
 - Appareil de soxhlet
 - Rotavapeur
 - Réfrigérant
 - Dessiccateur
 - Ballon rode de 250 ml

Protocole :

Peser 5g de l'échantillon, ajouter 50 ml d'acide chlorhydrique et faire bouillir pendant 5 min. Laisser reposer. Si le liquide n'est pas clair, ajouter 1 ml de solution d'acétate de zinc à 20% et 1 ml de solution de ferrocyanure de potassium à 10%. Filtrer sur un filtre mouillé, contenant 5g de sable purifié, puis sécher à l'étuve à 105°C. Extraire le papier filtre séché et résidu avec de l'éther de pétrole pendant 2 h dans un soxhlet, dont le ballon aura été taré. Broyer le résidu et extraire de nouveau pendant 1 h. Chasser par distillation sous vide sur un rotavapeur la totalité du solvant contenu dans le ballon, en considérant les vapeurs de solvant à l'aide d'un réfrigérant descendant. Sécher ensuite à l'étuve à 105°C jusqu'à poids constant.

Calculs :

Le poids des matières grasses totales est déterminé selon la formule suivant :

$$P = P_1 - P_2$$

P : poids de la matière grasse contenue dans l'échantillon.

P₁ : poids du ballon avant extraction

P₂ : poids du ballon après extraction

Le taux de la matière grasse par rapport au produit sec sera donc :

$$\frac{P_1 - P_2}{P_1 - P_2 - H} \times 100$$

H : humidité du produit

Annexe 6 : Dosage des sels minéraux

a- Dosage du Calcium

Réactifs :

- Solution saturée à froid d'oxalate d'ammonium
- Solution d'acide formique à 2%
- Solution d'acide acétique à 20%
- Solution d'acide sulfurique à 20%
- Solution d'acide d'ammoniaque à 20%
- Solution de rouge de méthyle
- Eau ammoniacale oxalatée (Ammoniaque 10ml + Solution saturée d'oxalate de calcium).
- Permanganate de potassium N/2

Matériels :

- Bain marie
- Pipette à eau bouillante

Protocole :

La prise d'essai de 5 g est incinérée et alcaliniser légèrement par l'ammoniaque en présence de rouge de méthyle. Dissoudre le précipité par un excès de solution à 20% d'acide formique ou d'acide acétique et porter à l'ébullition, en additionnant quelques gouttes du même acide si un trouble se manifeste à nouveau. Ajouter un excès (10 ml) de solution à froid d'oxalate d'ammonium. Porter au bain marie bouillant pendant une demi heure pour rassembler le précipité. Laisser reposer pendant 1 h et recueillir le précipité sur un filtre sans cendres. Laver à l'eau ammoniacale à 10% saturée d'oxalate de calcium pour éliminer complètement l'oxalate d'ammonium (le filtrat ne doit plus réagir avec un sel de calcium). A l'aide d'une pissette à eau bouillante, faire passé le précipité dans un bécher, on utilisons environ 50ml d'eau chaude. On peut également faire passer dans le bécher le précipité et le filtre que l'on dilacère. Dans ce cas,

un dosage témoin avec filtre seul est nécessaire. Ajouter 25 à 30 ml d'acide sulfurique à 20% pour dissoudre le précipité et porter la solution à plus 60-70 °C. Verser goutte à goutte de la solution titrée de permanganate de potassium jusqu'à coloration rose persistante ; 1 ml de la solution N/10 de permanganate de potassium correspond à 2 mg de calcium.

b- Dosage du Chlore

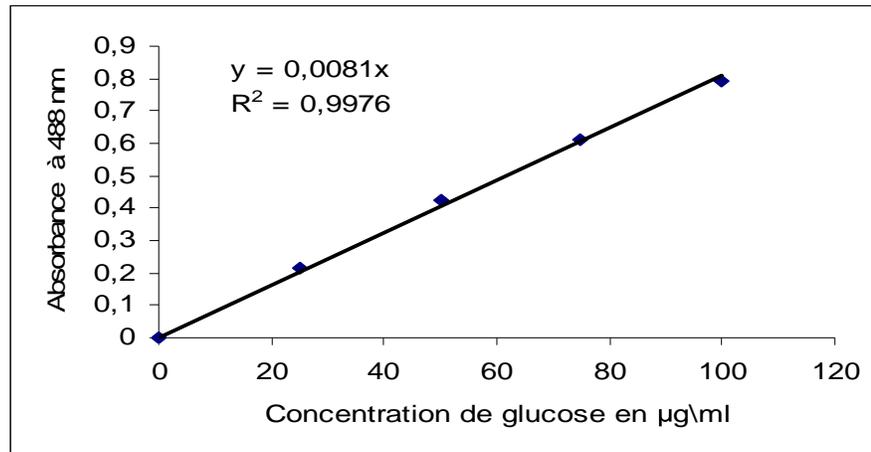
- Réactifs :**
- Acide azotique ou nitrique à 5%
 - Acide azotique à 2 %
 - Acide azotique 6 N
 - Solution de ferrocyanure de potassium :
 - Ferrocyanure de potassium.....15g
 - Eau distillée.....100ml
 - Solution d'acétate de zinc :
 - Acétate de zinc30g
 - Eau distillée.....100ml
 - Solution environ 1N de potasse
 - Solution eau oxygénée à 10 volumes
 - Solution saturée de permanganate de potassium
 - Solution d'azote (ou de nitrate d'argent N/10)
 - Solution de sulfocyanure (thiocyanate) d'ammonium (ou de potassium) N/10
 - Solution saturée d'alun de fer ammoniacale (à 40%)

Protocole :

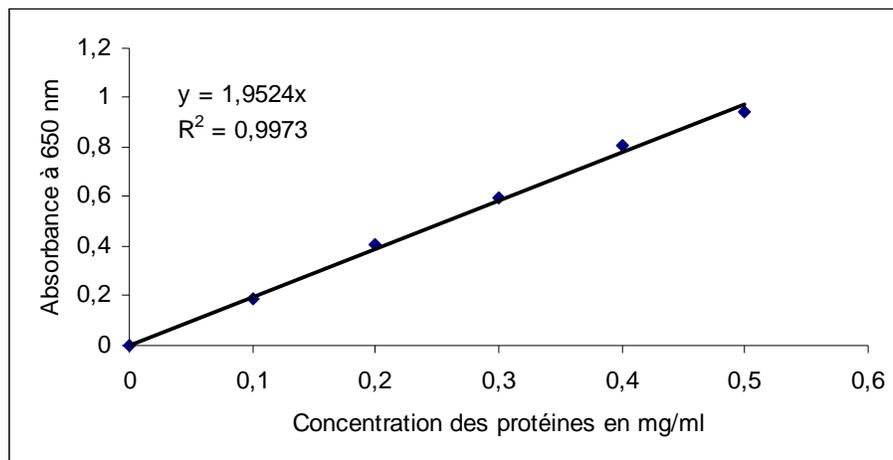
Incinérer 5 g de produit pendant 1 heure à 220°C. Epuiser les cendres à plusieurs reprises par une solution d'acide azotique à 2 % ; filtrer sur filtre sans cendres. Incinérer le filtre à plus 550°C et reprendre les cendres obtenues par la solution d'acide nitrique à 2 %. Joindre cette liqueur à la précédente et amener les solutions à un volume connu. Prélever un volume de la solution déféquée renfermant les chlorures dans un ballon jaugé de 200 ml. Ajouter 5 ml d'acide azotique et 20 ml d'azote d'argent N/10. Agiter, laisser reposer à l'obscurité pour rassembler le précipité de chlorure d'argent. Filtrer 100 ml de la solution claire. Ajouter 5 ml d'une solution d'alun de fer ammoniacal pure à 40 %, dont on fait disparaître la coloration brune par de l'acide nitrique en quantité suffisante pour amener la solution à une teinte vert claire ; titrer l'excès d'argent à l'aide d'une solution N /10 de sulfocyanure d'ammonium ou de potassium jusqu'au virage rose. Faire d'autre part, un titrage avec 100ml d'eau distillée renfermant 5 ml d'acide nitrique, 10 ml d'azotate d'argent N/10 et 5 ml d'une solution saturée d'alun de fer ammoniacal. La différence des deux lectures, exprimée en millilitres d'azotate d'argent N/10, correspond aux chlorures contenus dans la moitié du volume prélevé de la solution déféquée. 1 ml de nitrate d'argent N/10 correspond à 0.00585g de chlorures de sodium.

Annexe 7 : Les courbes d'étalonnages

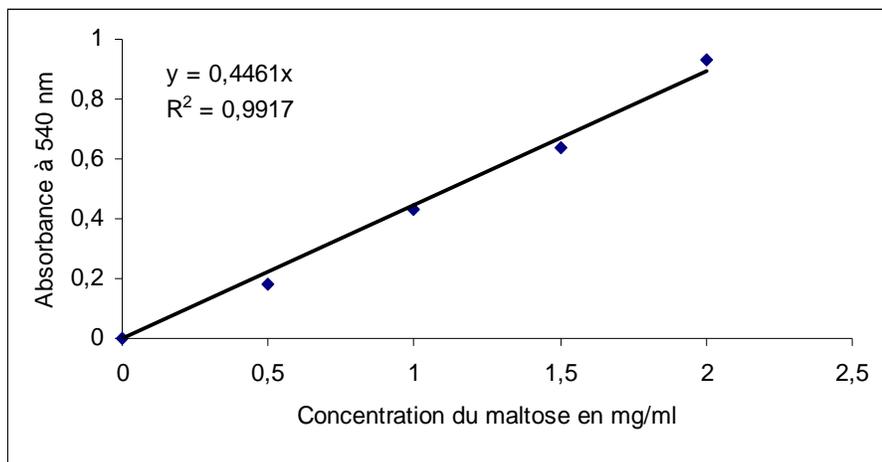
a- Courbe étalon du glucose



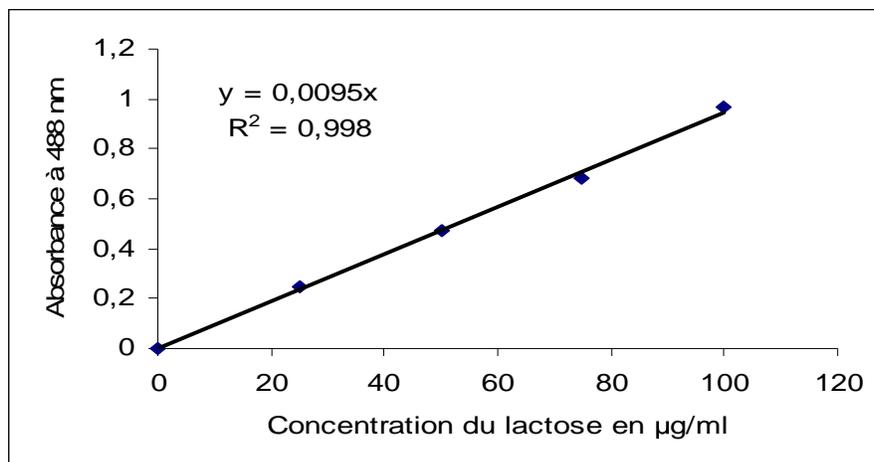
b- Courbe étalon des protéines



c- Courbe étalon du maltose



d- Courbe étalon du lactose



Annexe 8: Analyse de la variance

a- Analyse de la variance pour l'effet du pH sur l'activité amylolytique

	Degré de liberté	Somme des carrés	Somme des carrés moyens	Fisher	Pr >F
Variation factorielle	13	16840430.377	1295417.721	132958.056	<0.0001
Variation résiduelle	24	233.833	9.743		
Total	37	16840664.211			

b- Analyse de la variance pour l'effet de la température sur l'activité amylolytique

	Degré de liberté	Somme des carrés	Somme des carrés moyens	Fisher	Pr >F
Variation factorielle	14	13289056.432	949218.317	471.973	<0.0001
Variation résiduelle	29	58324.000	2011.172		
Total	43	13347380.432			

a- Analyse de la variance pour l'effet du pH sur l'activité amylolytique

	Degré de liberté	Somme des carrés	Somme des carrés moyens	Fisher
Variation factorielle	13	180454 8	1388111	39464.88
Variation résiduelle	25	879.333	35.1733	

Analyse de la variance :

Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F
Modèle	13	16840430,377	1295417,721	132958,056	< 0,0001
Erreur	24	233,833	9,743		
Total corrigé	37	16840664,211			

b- Analyse de la variance pour l'effet de la température sur l'activité amylolytique

	Degré de liberté	Somme des carrés	Somme des carrés moyens	Fisher
Variation factorielle	14	142867 2	58324.00	524.9020
Variation résiduelle	30	1020479	1944.133	

Analyse de la variance :

Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F
Modèle	14	13289056,432	949218,317	471,973	< 0,0001
Erreur	29	58324,000	2011,172		
Total corrigé	43	13347380,432			

Souches amylolytique :

S1 / Newman-Keuls (SNK) / Analyse des différences entre les modalités avec un intervalle de confiance à 95% :

Contraste	Différence	Différence standardisée	Valeur critique	Pr > Diff	Significatif
S2 vs S1	20,000	26,667	4,446	< 0,0001	Oui
S2 vs S4	18,500	30,210	4,071	< 0,0001	Oui
S2 vs S5	14,500	23,678	3,564	< 0,0001	Oui
S2 vs S3	1,500	2,449	2,776	0,070	Non
S3 vs S1	18,500	24,667	4,071	< 0,0001	Oui
S3 vs S4	17,000	27,761	3,564	< 0,0001	Oui
S3 vs S5	13,000	21,229	2,776	< 0,0001	Oui
S5 vs S1	5,500	7,333	3,564	0,004	Oui
S5 vs S4	4,000	6,532	2,776	0,003	Oui
S4 vs S1	1,500	2,000	2,776	0,116	Non

Modalité	Moyenne estimée	Groupes			
S2	27,000	A			
S3	25,500	A			
S5	12,500		B		
S4	8,500			C	
S1	7,000			C	

Analyse de la variance :

Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F
Modèle	4	629,389	157,347	419,593	< 0,0001
Erreur	4	1,500	0,375		
Total corrigé	8	630,889			

Concentration du lactosérum S3

1 / Newman-Keuls (SNK) / Analyse des différences entre les modalités avec un intervalle de confiance à 95% :

Contraste	Différence	Différence standardisée	Valeur critique	Pr > Diff	Significatif
1 vs 0,2	3284,100	42,711	4,446	< 0,0001	Oui
1 vs 0,4	2290,600	29,790	4,071	< 0,0001	Oui
1 vs 0,6	1649,150	21,448	3,564	< 0,0001	Oui
1 vs 0,8	1102,000	14,332	2,776	0,000	Oui
0,8 vs 0,2	2182,100	34,757	4,071	< 0,0001	Oui
0,8 vs 0,4	1188,600	18,933	3,564	0,000	Oui
0,8 vs 0,6	547,150	8,715	2,776	0,001	Oui
0,6 vs 0,2	1634,950	26,042	3,564	< 0,0001	Oui
0,6 vs 0,4	641,450	10,217	2,776	0,001	Oui
0,4 vs 0,2	993,500	15,825	2,776	0,000	Oui

Modalité	Moyenne estimée	Groupes			
1	4568,000	A			
0,8	3466,000		B		
0,6	2918,850			C	
0,4	2277,400				D
0,2	1283,900				E

Analyse de la variance :

Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F
Modèle	4	9123731,464	2280932,866	578,708	< 0,0001
Erreur	4	15765,685	3941,421		
Total corrigé	8	9139497,149			

Concentration du lactosérum S2

1 / Newman-Keuls (SNK) / Analyse des différences entre les modalités avec un intervalle de confiance à 95% :

Contraste	Différence	Différence standardisée	Valeur critique	Pr > Diff	Significatif
1 vs 0,2	3718,000	8,731	4,446	0,004	Oui
1 vs 0,4	2717,000	6,381	4,071	0,011	Oui
1 vs 0,6	2035,333	5,070	3,564	0,016	Oui
1 vs 0,8	1496,000	3,042	2,776	0,038	Oui
0,8 vs 0,2	2222,000	5,218	4,071	0,022	Oui
0,8 vs 0,4	1221,000	2,867	3,564	0,095	Non
0,8 vs 0,6	539,333	1,343			Non
0,6 vs 0,2	1682,667	5,302	3,564	0,013	Oui
0,6 vs 0,4	681,667	2,148	2,776	0,098	Non
0,4 vs 0,2	1001,000	2,879	2,776	0,045	Oui

Modalité	Moyenne estimée	Groupes
1	4758,000	A
0,8	3262,000	B
0,6	2722,667	B
0,4	2041,000	B
0,2	1040,000	C

Analyse de la variance :

Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F
Modèle	4	10510011,333	2627502,833	21,735	0,006
Erreur	4	483546,667	120886,667		
Total corrigé	8	10993558,000			

Résumé

5 souches (**S₁**, **S₂**, **S₃**, **S₄** et **S₅**) levuriennes ont été isolées du sol environnant les sources thermales de Hammam Debagh-Guelma et Hammam Téléghma-Mila (Est Algérien). L'étude comparative des 5 isolats pour la production des α -amylases et de sa thermostabilité, a sélectionné la souche (**S₃**), pour ces deux propriétés. L'étude des caractères morphologiques, physiologiques et biochimiques semble indiquer que la souche levurienne **S₃**, appartient au genre *Schwanniomyces*.

Schwanniomyces sp est cultivée sur un milieu à base de lactosérum doux à 100% **déprotéiné** et **supplémenté** par l'**amidon à 1%** (substrat inducteur). L'étude cinétique de la production de l' α -amylase est réalisée en batch dans des erlen-meyers de 250 ml contenant 50 ml de milieu de base (température de 30°C, pH 5 et sous agitation 180 r.p.m). Dans ces conditions, nous avons obtenu une biomasse de **07 g/L** et une activité amyliasique de **4717 (U)** après **56** heures de fermentation. Par ailleurs, les profils cinétiques de croissance et de production enzymatique ont montré que la synthèse amyliasique est de type associée à la croissance de la levure.

L'étude des effets du pH et de la température sur l'activité amyliasique montre que l'enzyme produite par cette souche est active à un **pH de 6** et possède une **température de 60°C**. Le traitement thermique de l'enzyme (testée à différentes températures 60,70, 80, 90 et 100°C) indique que l' α -amylase de *Schwanniomyces sp* est thermostable. En effet, après un traitement à **60°C** et **70°C** pendant 3 heures, l'enzyme garde pratiquement toute son activité initiale. Les demi-vies de l'enzyme à **80, 90** et **100°C** sont respectivement de : **180, 150** et **120 min**. **La thermostabilité de l' α -amylase de *Schwanniomyces sp*, après un traitement thermique à 80°C pendant 3 heures, permet à l'enzyme d'avoir des applications industrielles.**

Mots clés : Isolement – Sol des sources thermales – Levure amylolytique – Identification – Lactosérum – Thermostabilité.

Abstract

The isolation of the yeast from the soil of thermal sources (Hammam Dabegh-Guelma and Hammam Téléghma-Mila, East Algerian) revealed the presence of 5 strains (**S₁**, **S₂**, **S₃**, **S₄** and **S₅**). Comparative study of 5 strains for production of α -amylase and of its thermo stability, chose the strain (**S₃**), for this two ownership. The morphological, physiological and biochemical studies seem to indicate that the strain **S₃**, does probably belong to the *Schwanniomyces* kind.

Is *Schwanniomyces* sp cultivated on a medium to basis of soft cheese whey to **100%** deproteine and supplementy by the starch to **1%** (inductive substrate). The kinetic study of the production of α -amylase is achieved in batch in erlen-meyers of 250 ml containing 50 ml of basis meduim (temperature of 30°C, pH 5 and under agitation 180 r.p.m). In these conditions, we got a biomass of **07 g/L** and an amylase activity of **4717 (U)** after **56** hours of fermentation. Otherwise, the kinetic profiles of growth and enzymatic production showed that the amylase synthesis is of type associated to the growth of the yeast.

The study of the effects of the pH and the temperature on the amylase activity shows that the enzyme produced by this strain is active to a **pH of 6** and possessed a **temperature of 60°C**. The thermal treatment of the enzyme (tested to different temperatures 60, 70, 80, 90 and 100°C) indicates that α -amylase of *Schwanniomyces* sp is thermo stable. Indeed, after a treatment to 60°C and 70°C during 3 hours, the enzyme keeps its initial activity practically. The half-lives of the enzyme to **80, 90** and **100°C** are respectively of: **180, 150** and **120 min**. The thermo stability of α - amylase of *Schwanniomyces* sp, after a thermal treatment in 80°C during 3 hours, allows enzyme to have industrial applications.

Key words: Isolation - Soil of the thermal sources - Yeast amylolytic - Identification - cheese whey – Thermo stability

ملخص

5 سلالات (S_1, S_2, S_3, S_4, S_5) أسفرت عليها عملية عزل الخميرة من عينات أرض منابع حرارية (حمام دباغ بقالمة و حمام تلاغمة بميله). تمت مقارنة الإنتاج و التبات الحراري عند السلالات الخمسة، فسمح لنا ذلك بانتقاء السلالة S_3 ، نظرا لنتائجها الايجابية من حيث إنتاج آل α -amylase و تباتها الحراري. دراسة الخصائص المرفولوجية ، البيوكيميائية و الفيزيولوجية لهذه السلالة، بينت احتمال انتماءها إلى جنس *Schwannionyces* .

هذه السلالة تم زرعها في بيئة مصل الحليب (lactosérum) المنزوع البروتين و المزود بسكر النشاء (1%). عملية متابعة حركة انتاج α -amylase 1 تمت في des erlen-meyers ذو حجم 250 ملل ، تحتوي على 50 ملل من هذه البيئة (درجة حرارة 30°C ، pH 5 ، تحت دوران 180 دورة / دقيقة). تحصلنا في هذه الشروط على نمو يقدر بـ 07 غ مع انتاج مقدر بـ 4717 وحدة ، في مدة لا تتجاوز 56 ساعة من التخمر و قد لوحظ أن حركية انتاج هذا الإنزيم تتماشى مع حركية نمو الخميرة .

أظهرت دراسة بعض الخصائص الكيميائية و الفيزيوكيميائية لإنزيم آل α -amylase أن له PH ملائم 6 ، و درجة حرارة ملائمة مقدرة بـ 60°C . اختبار المقاومة الحرارية للإنزيم بالنسبة للأربع درجات مختلفة: 60°C ، 70°C ، 80°C ، 90°C و 100°C ، بين انه مستقر بالنسبة لـ 60°C و 70°C و أن مدة نصف حياته عند 80°C ، 90°C و 100°C قدرت على التوالي بـ 180، 150، 120 دقيقة . المقاومة الحرارية التي أباها إنزيم آل α -amylase الخاص بـ *Schwannionyces* بعد معالجته حراريا عند 80°C خلال 3 ساعات، أهلت هذا الإنزيم بان يستغل صناعيا.

كلمات مفتاحية : عزل - أرض منابع حرارية - خميرة - أنزيم آل α -amylase - مصل الحليب - مقاومة حرارية

Etude de l'alpha amylase de levures isolées d'un écosystème extrême (sol environnant des sources thermales) et cultivées sur un milieu à base de lactosérum.

Résumé

5 souches (**S₁**, **S₂**, **S₃**, **S₄** et **S₅**) levuriennes ont été isolées du sol environnant les sources thermales de Hammam Debagh-Guelma et Hammam Téléghma-Mila (Est Algérien). L'étude comparative des 5 isolats pour la production des α -amylases et de sa thermostabilité, a sélectionné la souche (**S₃**), pour ces deux propriétés. L'étude des caractères morphologiques, physiologiques et biochimiques semble indiquer que la souche levurienne **S₃**, appartient au genre *Schwanniomyces*.

Schwanniomyces sp est cultivée sur un milieu à base de lactosérum doux à 100% **déprotéiné et supplémenté par l'amidon à 1%** (substrat inducteur). L'étude cinétique de la production de l' α -amylase est réalisée en batch dans des erlen-meyers de 250 ml contenant 50 ml de milieu de base (température de 30°C, pH 5 et sous agitation 180 r.p.m). Dans ces conditions, nous avons obtenu une biomasse de **07 g/L** et une activité amylasique de **4717 (U)** après **56** heures de fermentation. Par ailleurs, les profils cinétiques de croissance et de production enzymatique ont montré que la synthèse amylasique est de type associée à la croissance de la levure.

L'étude des effets du pH et de la température sur l'activité amylasique montre que l'enzyme produite par cette souche est active à un **pH de 6** et possède une **température de 60°C**. Le traitement thermique de l'enzyme (testée à différentes températures 60,70, 80, 90 et 100°C) indique que l' α -amylase de *Schwanniomyces sp* est thermostable. En effet, après un traitement à **60°C** et **70°C** pendant 3 heures, l'enzyme garde pratiquement toute son activité initiale. Les demi-vies de l'enzyme à **80, 90 et 100°C** sont respectivement de : **180, 150 et 120 min**. **La thermostabilité de l' α -amylase de *Schwanniomyces sp*, après un traitement thermique à 80°C pendant 3 heures, permet à l'enzyme d'avoir des applications industrielles.**

Mots clés : Isolement – Sol des sources thermales – Levure amylolytique – Identification – Lactosérum – Thermostabilité.

Laboratoire de recherche : Laboratoire de Génie Microbiologie et Applications / Département des Sciences de la Nature et de la Vie / Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie.