

**République Algérienne Démocratique et Populaire**  
**Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique**



Université des Frères Mentouri Constantine,  
Algérie



Université de Technologie Compiègne,  
France

N° série : . . . . .  
N° ordre : . . . . .

**THESE DE DOCTORAT EN SCIENCES**  
**Co-tutelle**  
**Laboratoire de transformations intégrées de la matière renouvelable**  
**Département de Biochimie et Biologie Moléculaire et Cellulaire / Laboratoire de GMA**

présentée par  
**DAKHMUCHE-DJEKRIF Scheherazed**

en

Spécialité : **Biochimie et Microbiologie Appliquées**

**Production et caractérisation de l'amylopullulanase de la  
levure *Clavispora lusitaniae* ABS7 isolée de blé cultivé et  
stocké en zones arides**

**Soutenue le 04 Janvier 2016**

Devant le jury :

Président Mr KHELIFI Douadi : Professeur Université Frères Mentouri Constantine. Algérie.  
Directrice de Thèse Mme MERAIHI Zahia: Professeur, Université Frères Mentouri Constantine, Algérie  
Co-directeur de Thèse Mr PAUSS André : Professeur, Université de Technologie, Compiègne, France.  
Rapporteur Mr BOUSSEBOUA Hacène : Professeur, Directeur de l'E.N.B. Constantine, Algérie.  
Rapporteur Mr HADJ SASSI Abdessattar: Maître de Conférences Bordeaux (INP), (ENSCBP), France.  
Examinatrice Mme COCHET Nelly : Professeur, Université de Technologie de Compiègne, France.  
Examinatrice Mme GILLMAN Louisa : Maître de Conférences, Université d'Angers, France.  
Examineur NECIB Youcef : Professeur Université Frères Mentouri Constantine, Algérie.

*Année Universitaire 2015/2016*

**République Algérienne Démocratique et Populaire**  
**Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique**



Université des Frères Mentouri Constantine,  
Algérie



Université de Technologie Compiègne,  
France

N° série : . . . . .  
N° ordre : . . . . .

**THESE DE DOCTORAT EN SCIENCES**  
**Co-tutelle**  
**Laboratoire de transformations intégrées de la matière renouvelable**  
**Département de Biochimie et Biologie Moléculaire et Cellulaire / Laboratoire de GMA**

présentée par  
**DAKHMUCHE-DJEKRIF Scheherazed**

en

Spécialité : **Biochimie et Microbiologie Appliquées**

**Production et caractérisation de l'amylopullulanase de la  
levure *Clavispora lusitaniae* ABS7 isolée de blé cultivé et  
stocké en zones arides**

**Soutenue le 04 Janvier 2016**

Devant le jury :

Président Mr KHELIFI Douadi : Professeur Université Frères Mentouri Constantine. Algérie.  
Directrice de Thèse Mme MERAIHI Zahia: Professeur, Université Frères Mentouri Constantine, Algérie  
Co-directeur de Thèse Mr PAUSS André : Professeur, Université de Technologie, Compiègne, France.  
Rapporteur Mr BOUSSEBOUA Hacène : Professeur, Directeur de l'E.N.B. Constantine, Algérie.  
Rapporteur Mr HADJ SASSI Abdessattar: Maître de Conférences Bordeaux (INP), (ENSCBP), France.  
Examinatrice Mme COCHET Nelly : Professeur, Université de Technologie de Compiègne, France.  
Examinatrice Mme GILLMAN Louisa : Maître de Conférences, Université d'Angers, France.  
Examinateur NECIB Youcef : Professeur Université Frères Mentouri Constantine, Algérie.

*Année Universitaire 2015/2016*

## *Remerciements*

Je tiens à remercier en premier lieu Dieu, le tout Puissant de m'avoir donné volonté et patience pour achever ce travail.

Ce travail a été réalisé en co-tutelle entre la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie de l'Université Frères Mentouri Constantine et l'Université de Technologie de Compiègne, France.

Je tiens à adresser mes remerciements les plus sincères à Madame le Professeur Meraihi Zahia, mon promoteur, pour toute son aide, sa patience, son soutien et merci aussi pour ses critiques constructives et avisées qui m'ont permis de mener à bien mon travail.

Il m'est très agréable d'adresser mes sincères remerciements au Professeur André Pauss pour avoir accepté d'être mon Directeur à l'UTC Compiègne et d'avoir corrigé le manuscrit.

Mes vifs remerciements vont à Mme Gillmann Louisa, Maître de Conférences et Directrice de Laboratoire LASBA à l'université d'Angers et co-Directrice de cette thèse pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire. Merci pour son encadrement, ses encouragements, son soutien dans les moments difficiles et ses précieux conseils qui m'ont permis de réaliser ce travail.

Je remercie également Monsieur Khelifi Douadi, Professeur à la faculté des Sciences de la Vie et de la Nature, d'avoir bien voulu présider le jury de soutenance de cette thèse.

Je tiens à exprimer toute ma gratitude à Madame Nelly Cochet, Professeur à l'Université de Technologie de Compiègne. Je la remercie surtout pour son soutien et son aide précieuse dans mon inscription à l'UTC et de m'avoir honoré d'être membre de mon jury. Je ne saurais vous remercier.

Mes remerciements s'adressent à Mr Hadj Sassi Abdessattar, Maître de Conférences d'avoir accepter cette lourde charge en examinant ce travail et de nous honorer par sa présence

Je remercie très sincèrement Professeur Hacène Bousseboua, Directeur de l'Ecole de Biotechnologie de Constantine pour son aide afin d'achever cette thèse et de participer à mon jury de thèse et d'avoir accepté d'évaluer mon travail.

Mes remerciements s'adressent à Madame Saunier Monique, Maître de Conférences à l'Université d'Angers pour sa collaboration scientifique et amicale et sa gentillesse. Merci Monique pour tous ces moments que j'ai passé chez toi. Tu étais toujours là quand j'avais besoin de toi, merci encore une fois.

Je souhaite aussi remercier vivement le Professeur Bouchara Jean Philippe, Professeur au Laboratoire de Parasitologie et Mycologie à l'hôpital d'Angers et Directeur de Laboratoire GEIHP (Groupe d'Etude des Interactions Hôte Pathogène) d'avoir accepté de m'accueillir au sein de son unité pour la partie d'identification des moisissures et des levures. Il a mis à ma disposition le matériel et les produits chimiques nécessaires pour la réalisation de mon travail. Je le remercie pour son aide, ses conseils, sa gentillesse et de m'avoir soutenue dans les moments difficiles. Je remercie aussi toute son équipe, particulièrement Julia et Danielle.

Mes remerciements s'adressent aussi à Monsieur Arnaud Dudoit, Responsable du Service Micropolluants du Laboratoire d'Hydrologie et d'Hygiène d'Angers pour m'avoir aidé dans la partie statistique et pour la lyophilisation du jus de fermentation,

Mes remerciements vont à Madame Noémie Jacques, Responsable de qualité CIRM Levures au Laboratoire de Microbiologie et Génétique Moléculaire à l'INRA - CNRS de Grignon - pour l'identification par la biologie moléculaire des levures et pour l'identification de la levure sélectionnée par les tests classiques de fermentation et d'assimilation ainsi que pour la réalisation des photographies de spores. Je remercie Monsieur Benoit Colonna Ceccaldi et Monsieur Laurent Attard du Centre de Recherche Pernod-Ricard au Laboratoire de Technologie du Vivant pour m'avoir fourni le protocole d'identification classique des levures et tous les produits chimiques dont j'avais besoin.

Je remercie également Monsieur Kerkoud Mohamed de la Plate Forme d'ADN Angers, pour la formation en biologie moléculaire et pour l'identification par la biologie moléculaire des levures.

Je remercie Monsieur El Hourch Mohamed pour m'avoir permis d'effectuer dans son unité les analyses sur la composition chimique du lactosérum.

Je remercie très sincèrement tout le personnel de l'IUT (assistants et techniciens) pour leur aide et leur gentillesse surtout Pascal.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude pour tous les enseignants de la Faculté des Science de la Nature et de la Vie de l'Université Frères Mentouri qui ont contribué de près ou de loin à ma formation.

Je remercie particulièrement mon amie Madame Bennammoun Leila pour tout ce qu'on a partagé ensemble durant toutes ces années. Tu as su m'écouter et me reconforter dans les moments difficiles. Merci surtout pour les moments agréables qu'on a passés ensemble.

Je remercie notre ex-ingénieur du Laboratoire Mr Ziada Abderazak pour avoir été toujours là quand j'avais besoin de lui.

Je remercie, aussi toute notre équipe du laboratoire pour leur aide : Monsieur Nouadri Tahar, Madame Meziani Zohra, Madame Ait Kaki Amel, Madame Labbani Fatima-Zohra Kenza et Monsieur Merouane Fateh.

Je remercie également Monsieur Haddef El Okki Mohamed, Enseignant à l'Institut National de Nutrition, d'Alimentation et de Technologies Agro-alimentaires pour son aide pour la partie statistique et aussi pour les graphes et les figures.

Je remercie tous mes collègues de l'Ecole Normale Supérieure de Constantine, en particulier mes collègues du Département des Sciences de la nature et de la vie.

Je remercie, aussi, tous mes collègues de la promotion de magister de 1997.

J'adresse, spécialement, mes remerciements à ma petite famille : mon époux Mohamed et mes trois chers enfants, Abdelhak, Adel Amir et Iyes qui ont beaucoup pris sur eux pendant mon absence, merci pour m'avoir supportée durant les moments difficiles.

*Le présent travail, fruit de longues années d'efforts et de persévérances est dédié*

*A tous ceux que j'aime*

*Quiconque, assis au fond d'un puits, verra le ciel petit*

*(Philosophe chinois)*

## Production et caractérisation de l' $\alpha$ -amylase et de la pullulanase de la levure *Clavispora lusitaniae* ABS7 isolé de blé cultivé et stocké en zones arides

**Résumé :** Cette étude vise à produire deux enzymes amylolytiques ( $\alpha$ -amylase et pullulanase) thermostables par des levures contaminant le blé récolté dans des zones semi arides et arides (Biskra - Sahara, Sud Algérien) et capables d'hydrolyser à la fois les liaisons  $\alpha$ -1-4 et  $\alpha$ -1-6 de polysaccharides comme l'amidon et le pullulane, molécules d'intérêt industriel. Après isolement et caractérisation de colonies levuriennes, la méthode de plate-test-agar permet d'isoler des souches amylolytiques et de montrer que la souche L7 est la plus performante dans la production enzymatique parmi une douzaine de souches de levures productrices d' $\alpha$ -amylase et de pullulanase thermostables. L'identification des souches, basée sur les caractères morphologiques, les tests biochimiques et la biologie moléculaire a permis de répartir la population comme suit : 50% *Clavispora lusitaniae* (forme anamorph *Candida lusitaniae*), 25%, *Pichia guilliermondii*, 8% *Pichia carribbica*, 8% *Meyerozyma guilliermondii* et 8% *Rhodotorula rubra*. Par sa richesse en amidon, le biotope du blé est favorable à la survie des levures amylolytiques. La majorité de ces souches dont la souche L7 est productrice de pseudo ou vrai mycélium et est tolérante à certains paramètres comme la température, la salinité, les stress osmotique et éthanolique. La souche de levure L7, *Clavispora lusitaniae* ABS7, semble être la plus performante dans la production d'enzymes thermostables. Son identification moléculaire a montré deux bandes avec l'endonucléase HAE III alors que les autres souches de la même espèce de *Clavispora lusitaniae* (L5, L9, L10, L11 et L12) présentent une seule bande.

En conditions optimales (agitation 136,56 rpm, température 54,14°C, amidon 2,66g/l, extrait de levure 0,365g/l, sels 8,75ml/l et oligo-éléments 4,3ml/l en erlenmeyers de 250 ml), la production maximale atteint les valeurs suivantes : 13456,36 $\pm$ 300 UI pour l' $\alpha$ -amylase et 12611,6 $\pm$ 154 UI pour la pullulanase. Ces performances sont en accord étroit avec la prédiction du modèle statistique évaluée à 13231 UI pour l' $\alpha$ -amylase et 12825,5 UI pour la pullulanase. La production optimisée a pratiquement doublé par rapport à la production avant l'optimisation (6639,16 UI pour l' $\alpha$ -amylase et 6308,5 UI pour la pullulanase). En conditions optimales et en fermenteur de 2 L, la production maximale pour les deux enzymes de la levure *Clavispora lusitaniae* ABS7 est obtenue au bout de 28 h avec un optimum de croissance obtenu à 40 heures. La production des deux enzymes n'est donc pas associée à la croissance. La production maximale des deux enzymes s'effectue à pH 8. La cinétique est caractérisée par l'augmentation des glucides et une substance nappant la paroi du fermenteur, probablement un exo-polysaccharide. Le profil chromatographique sur Séphacryl S200 révèle deux activités  $\alpha$ -amylasique et pullulanasiq ue éluees en même temps que le pic protéique. L'élution sur DEAE-cellulose confirme la présence des deux activités dans la même fraction. Les deux enzymes sont donc présentes sur la même molécule. L' $\alpha$ -amylase et la pullulanase sont purifiées avec un taux de purification de 50,5 et 44,6 respectivement et des rendements respectifs de 23,9% et 21,1%. L'extrait purifié montre une seule bande sur le gel de SDS-PAGE avec un poids moléculaire estimé à 75KDa et une activité amylolytique contenant à la fois les activités  $\alpha$ -amylasique (indépendante de Ca<sup>2+</sup>) et pullulanasiq ue (une métalloenzyme à calcium). La souche de la levure *Clavispora lusitaniae* ABS7 possède donc une enzyme amylolytique avec deux sites actifs. La CCM révèle une enzyme qui hydrolyse l'amidon en maltose et glucose et le pullulane en maltotriose, maltose et glucose, ce qui montre que l'enzyme est saccharifiante et correspond à une pullulanase de type II (amylopullulase). L'optimisation de l'immobilisation de l'enzyme a permis l'amélioration de l'activité:  $\alpha$ -amylasique à 4907,75 UI (rendement 72,3 %) et celle de la pullulanase à 4491,83 UI (rendement 70,1%) avec un pH optimum de 8,5.

Il ressort de notre étude que l'amylopullulanase type II libre de *Clavispora lusitaniae* ABS7 est thermostable puisqu'elle résiste à un traitement thermique de 75°C pendant 3 heures d'incubation et conserve 88% de son activité initiale. L'immobilisation a amélioré la thermostabilité des deux activités. Une incubation de 180 min à 85°C a permis de conserver sensiblement la même activité résiduelle pour les deux enzymes: 94,33% pour l' $\alpha$ -amylase et 94,2 pour la pullulanase. Les performances des enzymes amylolytiques de cette souche de levure (isolée d'un environnement saharien aride) la qualifient de souche d'utilité industrielle en particulier dans les industries de l'amidon, du textile et des détergents puisque les enzymes alcalothermostables de *Clavispora lusitaniae* ABS7 ont démontré une excellente stabilité et une compatibilité avec les détergents à lessive commerciales.

**Mots Clé:**  $\alpha$ -amylase, pullulanase, levure, *Clavispora lusitaniae* optimisation, purification et immobilisation.

## Production and Characterization of the $\alpha$ -amylase and pullulanase of yeast *Clavispora lusitaniae* ABS7 isolated of wheat cultivated and stored in arid zone

**Abstract :** This study aims to produce two amylolytic enzymes ( $\alpha$ -amylase and pullulanase) by thermostable wheat contaminant yeast harvested in semi arid and arid zones (Biskra, Sahara, Algeria SUD) and capable of hydrolyzing both the  $\alpha$  links 1-4 and 1-6 of polysaccharides such as starch and pullulan, molecules of industrial interest. After isolation and characterization of levuriennes colonies, the test method of agar-plate allows to isolate amylolytic strains and show, that the L7 strain is the most effective, in the enzymatic production of the 12 yeast strains producing  $\alpha$ -amylase and pullulanase the thermostable. The identification of strains, based on morphological, biochemical tests and molecular biology has helped spread the population as follows: 50% *Clavispora lusitaniae* (anamorph form *Candida lusitaniae*), 25%, *Pichia guilliermondii*, 8% *carribbica Pichia*, 8% *Meyerozyma guilliermondii* and 8% *Rhodotorula rubra*. By its high starch, the wheat biotope is favorable to the survival of amylolytic yeasts. Most of these strains, including the strain L7, is producer, pseudo or true mycelium and is tolerant to certain parameters such as temperature, salinity, osmotic stress and ethanolic stress. The yeast strain *Clavispora lusitaniae* ABS7 (L7) seems to be the most efficient in the production of thermostable enzymes. Its molecular identification showed two bands with the endonuclease HAE III while other strains of the same species *Clavispora lusitaniae* (L5, L9, L10, L11 and L12) have a single band. In optimal conditions (agitation 136.56 rpm, temperature 54.14 ° C, starch 2,66g / l, yeast extract 0,365g / l, salts 8 75ml / l and trace elements 4,3ml / liter Erlenmeyer flasks into 250 ml), the maximum production reached: 13456.36  $\pm$  300 IU for the  $\alpha$ -amylase and 12611, 6  $\pm$  154 IU for pullulanase. This performance is in close agreement with the prediction of the statistical model 13231UI evaluated for  $\alpha$ -amylase and 12825.5 IU for pullulanase. The optimized production almost doubled compared to production before optimization (6639.16 IU for the  $\alpha$ -amylase and pullulanase for 6308.5 IU). In optimal conditions, and 2 L fermenter, the maximum production for the two enzymes of *Clavispora lusitaniae* ABS7 obtained after 28 hours, with an optimum of growth obtained at 40 hours. The production of both enzymes is thus not associated with growth. The maximum production of both enzymes is obtained at pH 8. The kinetics are characterized by an increase in carbohydrate and a substance spooning the wall of the fermenter, probably an exopolysaccharide. The chromatographic profile on Sephacryl S200 reveals two  $\alpha$ -amylase and pullulanase activities eluted along with the protein peak. Elution DEAE cellulose confirms the presence of both activities in the same fraction. Both enzymes are present on the same molecule. The  $\alpha$ -amylase and pullulanase were purified with a purification rate of 50.45 and 44.59 respectively and respective yields of 23.88% and 21.11%. The purified enzyme showed a single band on SDS-PAGE gel with a molecular weight estimated at 75 KDa and an amylolytic activity containing both the  $\alpha$ -amylase activities (independent of Ca<sup>2+</sup>) and pullulanase (a calcium metalloenzyme). The strain of the yeast *Clavispora lusitaniae* ABS7 therefore has an amylolytic enzyme with two active sites. TLC reveals an enzyme which hydrolyzes starch into maltose and glucose and pullulan into maltotriose, maltose and glucose, which shows that the saccharifying enzyme, and corresponds to a pullulanase type II (amylopullulase). The optimization of the immobilization of the enzyme enabled the improvement of the activity:  $\alpha$ -amylase to 4907.75 IU (yield 72.3%) and pullulanase to 4491.83 IU (yield 70, 1%) with a pH optimum of 8.5. It appears from our study that amylopullulanase type II free is thermostable to heat treatment of 75 ° C for 3 hours of incubation, and retains 88% of its original activity. The immobilization improved thermostability of the two activities. An incubation period of 180 min at 85 ° C made it possible to retain substantially the same residual activity for both enzymes: 94.33% for  $\alpha$ -amylase and 94.2% for pullulanase. The performance of the amylolytic enzymes of the yeast strain (isolated from an arid Saharan environment) qualify the strain of industrial utility particularly in starch industries, textiles and detergents since the alcalothermostables enzymes *Clavispora lusitaniae* ABS7 have demonstrated excellent stability and compatibility with the commercial laundry detergents.

**Keywords:**  $\alpha$ -amylase, pullulanase, yeast, *Clavispora lusitaniae*, optimization, purification and immobilization.

## نتائج ودراسة خصائص $\alpha$ الاملز و pullulanase من لغيرة *Clavispora lusitaniae* ABS7 مع صولة منقح

### أل رأي لجملة

**لهيخص:** رذف زلفناسخ إنزابج كج ي الانز ببدان سه متشوبء وان قايوخنفساسح و الألفائي الحص و pullulanase ي لخنش حان تفخنق ران س ص د وان خض ك ان بطقش لخنق بز معق س طخ و اوان ج اق (ولوبكخنش كشنش س شرنهطل ايش). ررض ز الانز تبسفنسروبك هوسه م الروكظان دهك بس دخ  $\alpha$ -1,4 و  $\alpha$ -6,1 ان خدحك انكش تبدي م اشبء و pullulanase. نو ككض ل زوكش ف ك ه 12 عي ريغيش دودن س ح ك زابج طري ألب ايل ص و pullulanase ان قايوخنفساسح ري رخص سل الانخ L7 لآنكك شك لبعك إلبج الانز كلب يك ذ لشرل ببدان بس كن خخ وانج. نخب بن لضرخ ي زوكش ف ك ه ان اللات وارث كلب ني ص ككخ للوب ن: 50% *Clavispora lusitaniae* انصر س حان كخن ائ اي *Candida anamorph lusitaniae* (%25), *Pichia guilliermondii* (%8), *Pichia carribbica* (%8), و *Meyerozyma guilliermondii* (%8). *Rhodotorula rubra* طشان - نبدار ق ريغيش بء, ككجش وس ظي لعض من ككجيش ان سه متشوبء. كلبت ذان زويح ا لئ هت ريغيش ش ررح يس ه كلب رة أوق ق, ورظي قوب وي خ كض ان كبي مي م ناس اسح, ان بزخ انض ظ الاس ص و لولاب ل و نج كونك ان س لالخ L7 و *Clavispora lusitaniae* ABS7 لككش لخنق كرابج الانز ببدان قايوخنفساسح. اظش زوكش فن لعض نئ هس النخ L7 شش ظ ي غ endonuclease HAE III ك ز اظش دان اللات اخ ش ي لس ان ع (L5) *Clavispora lusitaniae*, L9, L10, L11, و L12 (لش ظ واذ. ك ان ظروفان ك ه) لشن كخنش ج 136.56 دورة ك ان قوق. ناس اسح 54,14 و اشبء 2,66 ئ/ لي س رخص لخنش ح 0,365 ئ/ل, أ ال ذ 8,75 ئ/م ل و ككصش انصرش 4,3 ئ/م ل (شئ) ان س ذالق ص لوابج  $\alpha$  - الئي لخص  $300 \pm 13456,36$  وحدة دولخ و pullulanase  $154 \pm 12611,6$  وحدة دولخ. و كق ز ا لوابج انق ي انز س ص م كه تب ي ان شرلخ الإصبيئ خ و  $13231$  وحدة دولخ ل  $\alpha$  - الئي لخص و 5, 12825 وحدة دولخ ل pullulanase. ز نشوبكق إل ربحق شوي قيب س خ تب لإبحق ح م سواسخ الظروفان ك ه)  $6639.16$  وحدة دولخ ل  $\alpha$  - الئي لخص و 6308.5 وحدة دولخ ل pullulanase. لخب ص انق ش نوز ذى 2ل و رس ذ الظروف لك لغب لإبج ألق صن ل انز لئ شل طخ *Clavispora lusitaniae* ABS7 ك ي كذ 8 هب كذ pH 8 ي بان الئي كعزى ن س ص لك ه ك 40 ب ك و ر ا تل ك ه لا بخ ذاسه ب ط ان و زابج كم ي الانز لئ و ررض ان ذ اسخ لشنش ك ص تب بدح يس ظخ كالكش نئ س ادي غ ش ك م بيدض انض بء ر طان دل س ل ذاخ ق بدص انز خش, س تب رك ككش تبد ك ت دج بس خخ. وكش ق ان لخص م ان كويوب ريغيش ك ك ه س Ephacryl S200 و ك ه DEAE ن س ه فص و جود 3 برور بء راش با ط لب اليغض نك برور وازنلقظ طش تب بطلا ب كخ ان اشب ب  $\alpha$  - الئي لخص (شب طاض ي ل الص ع pullulanase. وي كئ ك م ي الانز لئ ي خد ك ه لس اندض ان برور زرى خ اليغض و pullulanase ك ي كذ 50,5 و 44,6 ك هان زان ي ش دود 23,9% و 21,1%. و اظش دان دش ك ه ال و SDS-PAGE و جوشش ظ وازذ ذو وزخض ئ قيس ه 75 ك ه ل ن ز و مكش ب ط  $\alpha$  - الئي لخص يبرق م ك  $Ca^{2+}$ ) (ش ب ط pullulanase) ا طري ز طمت لئ لئ س شون زب ركئ لشنش ل سل بل ثوبء ان النخ لخنش ح *Clavispora lusitaniae* ABS7 س م ك كئ ي ان اقغان شطخ (وازلفن لب الئي لخص وان تب ن م pullulanase) وكش ق ان لخص م ان كويوب و شراك ك ه ان طقش لخنق قخ TLC أ ك ان سه م اشبء ان ان لخص وان لطيص و pullulanase ان ي ز ر ش ص وان لطيص, ي ب تل ك ه ا طري ي ان ع saccharifiant, وراك ق ي غ ع pullulanase II (amylopullulase). ررتم لاسب دح ان ك ه ي رنج ذ انش لئ س س ي قايوخنفساسح:  $\alpha$  اليغض ان 4907.75 IU ي ش دود 72.3% (و pullulanase ل 4491.83 IU ان ش دود 70%) (ي غ دس خن س ج خ ان ك ه 8.5. وبدو ي سواسن ب amylopullulanase ع الئ س ش ل *Clavispora lusitaniae* ABS7 أ بي قايوخنفساسح ك كبي بن و بمت س خ ز ش اس 75 و ن ذ ح 3 سي ك ب د ز ت ازل ظ ه 88% ي اشب ب الأو ن ق ذرس ذ ك ه خنج ذ انش لئ الاقشر اس انش اس س ش ب ط. ويك ذوضب خ انش لئ ن ذ ح 180 دوق خ ك 85 و ي الاهب طكش ك م خ ش ك ه لس اشب ب طان ر ج ق ز ك م ي الانز لئ 94.33% م  $\alpha$  - اليغض و 94.2% pullulanase. ل ص لبد انش ي ان سه م اشب ب ان بوح ي النخ لخنش ح ان معزولخ ك ان جئ خاض س راوخنق بزخ (و تبك النخ رادي ك ي كخنش ب ك خ بصر ك انص ي ك ب د اشب ب وان س خ بد وان طيب هب أ لئ وان بوح ي *Clavispora lusitaniae* ABS7 ان ررض قوب وي ك كن خنوش لاسه و لئن ككش خخ ز ج خ ك بن خق ذ اظش لئ لئ س ش اس ر ي ص وراك ق ي غ ي طيب دان س افر دب س.

كه ببدان لوبذ:  $\alpha$ -amylase, pullulanase, لخنش ح *Clavispora lusitaniae* رقية و رنج ذ الانزى

# Sommaire

Abréviations.....	17
Liste des figures.....	18
Liste des tableaux.....	21
Introduction générale.....	23

## Chapitre1: Etude bibliographique

<b>1. Levures.....</b>	<b>25</b>
1.1. Généralités.....	25
1.2. Taxonomie du modèle biologique.....	25
1.3. Caractéristiques des levures.....	25
1.3.1. Caractéristiques écologiques.....	25
1.3.2. Caractéristiques biologiques.....	26
1.3.3. Caractéristiques nutritionnelles.....	27
1.3.3.1. Nutrition carbonée.....	27
1.3.3.2. Nutrition azotée.....	28
1.3.3.3. Effet des facteurs de croissance et des oligo-éléments.....	28
1.3.4. Caractéristiques physiologiques.....	28
1.3.4.1. Effet de la température sur la croissance des levures.....	28
1.3.4.2. Effet du pH et de l'oxygène.....	29
1.3.4.3. Influence de l'activité de l'eau et de la pression osmotique.....	29
1.4. Utilisation industrielle des levures ou de leurs enzymes.....	30
1.5. Levures amylolytiques.....	31
1.5.1. Levures productrices d'amylases extracellulaires.....	31
1.5.2. Système amylolytique chez les levures.....	33
<b>2. Enzymes amylolytiques et la thermostabilité.....</b>	<b>33</b>
2.1. Classification des glycosides hydrolases (ou amylases).....	33
2.2. Structure des enzymes de la famille des amylases.....	34
2.3. $\alpha$ amylase.....	35
2.3.1. Sources de l' $\alpha$ -amylase.....	36
2.3.2. Caractéristiques de l' $\alpha$ -amylase .....	36

2.3.2.1. Masse moléculaire.....	36
2.3.2.2. pH .....	37
2.3.2.3. Température.....	37
2.3.2.4. Métaux.....	37
2.4. Pullulanase.....	38
2.4.1. Définition et nomenclature.....	38
2.4.2. Sources de la pullulanase.....	38
2.4.2.1. Source bactérienne.....	38
2.4.2.2. Source fongique.....	38
2.4.3. Types de pullulanase et leur substrat.....	39
2.4.4. Régulation de la production de la pullulanase : Induction/ répression.....	41
2.4.5. Effet de la composition du milieu sur la production de la pullulanase.....	41
2.4.5.1. Source de carbone.....	41
2.4.5.2. Source azotée.....	41
2.4.6. Caractéristiques des pulluanases.....	41
2.4.6.1. Masse moléculaire.....	41
2.4.6.2. pH .....	42
2.4.6.3. Température.....	42
2.4.6.4. Minéraux et certains oligo-éléments.....	42
2.5. Aspect économique des enzymes.....	43
2.5. Application industrielle de la pullulanase et de l'α-amylase.....	43
2.6.1. En glucoserie.....	43
2.6.2. En industrie de la transformation de l'amidon.....	43
2.6.3. En panification.....	44
2.6.4. En brasserie.....	44
2.6.5. En industrie des détergents.....	44
2.6.6. En industrie du textile.....	45
2.6.7. En industrie des cyclodextrines (CD).....	45

2.6.8. Dans le diagnostique et en industrie pharmaceutiques.....	45
2.6.9. Dans la production des gommés alimentaires.....	46
2.6.10. En bioraffinerie.....	46
2.6.11. En papeterie.....	47
2.6.12. Dans la production du bioéthanol.....	47
2.6.13. En industrie des boissons.....	47

## **Chapitre 2 : Matériel et méthodes**

<b>1. Isolement des levures.....</b>	<b>48</b>
1.1. Echantillonnage.....	48
1.2. Caractéristiques des régions des prélèvements.....	48
1.3. Traitement des grains.....	49
1.4. Isolements.....	49
1.4.1. Traitement du sable.....	49
1.5. Repiquage des souches.....	50
1.6. Purification des souches.....	50
1.7. Conservation des souches.....	51
<b>2. Sélection des levures amylolytiques.....</b>	<b>51</b>
<b>3. Identification des levures.....</b>	<b>51</b>
3.1. Identification phénotypique des souches.....	51
3.1.1. Caractérisations morphologiques.....	51
3.1.1.1. Etude de caractères macroscopiques.....	51
3.1.1.2. Etude de caractères microscopique.....	52
3.1.2. Caractéristiques physiologiques.....	53
3.1.2.1. Fermentation des sucres.....	53
3.1.2.2. Assimilation des composés carbonés.....	53
3.1.2.3. Assimilation des composés azotés.....	54
3.1.2.4. Croissance à différentes température (thermorésistance).....	54
3.1.2.5. Résistance aux antibiotiques.....	54
3.1.2.6. Résistance au NaCl.....	54
3.1.2.7. Influence de l'éthanol.....	55

3.1.2.8. Croissance sur 50 ou 60% de glucose.....	55
3.1.2.9. Lecture et analyse des résultats.....	55
3.2. Identification génotypique des souches.....	55
3.2.1. Extraction de l'ADN.....	55
3.2.2. Amplification par la PCR (Polymerase Chain Reaction).....	56
3.2.3. Purification du produit de la PCR.....	57
3.2.4. Visualisation des produits de PCR par électrophorèse.....	57
3.2.5. Polymorphisme RFLP et PCR-RFLP.....	57
3.2.6. Séquençage de gène de l'ARNr 26S de la levure sélectionnée.....	58
3.2.7. Analyse des données.....	58
<b>4. Sélection de la souche la plus performante.....</b>	<b>58</b>
4.1. Présélection de souches selon la croissance à 40°C.....	58
4.2. Sélection de la souche selon la production et la thermostabilité des enzymes amylolytiques.....	59
4.2.1. Etude de la production enzymatique et de biomasse.....	59
4.2.2. Détermination des activités $\alpha$ -amylasique et pullulanasiq.....	59
4.2.3. Etude de la thermostabilité enzymatique.....	59
<b>5. Etude de l'inoculum .....</b>	<b>60</b>
5.1. Préparation de l'inoculum .....	60
5.2. Dénombrement.....	60
5.3. Densité de l'inoculum de cellules.....	60
<b>6. Milieux de culture.....</b>	<b>60</b>
6.1. Milieu de base.....	60
6.1.1. Traitement du lactosérum.....	60
6.1.2. Composition physico-chimique du lactosérum.....	61
6.1.2.1. Dosage des protéines (Lowry et al., 1951).....	61
6.1.2.2. Dosage des sucres (Dubois et al, 1956).....	61
6.1.2.3. Mesure du pH.....	61
6.1.2.4. Détermination de la matière sèche (AFNOR 1980).....	61
6.1.2.5. Dosage des cendres (AFNOR 1980).....	61
6.1.2.6. Détermination de l'azote total (AFNOR 1980).....	61

6.1.2.7. Dosage de la matière grasse par la méthode de Wisman (Le Coq R., 1965).....	61
<b>7. Détermination des conditions optimales de culture</b> .....	62
7.1. Sélection des composants du milieu.....	62
7.2. Optimisation des composants sélectionnés.....	64
7.3. Analyse statistique et modélisation.....	65
<b>8. Fermentation</b> .....	65
8.1. Milieu de Culture.....	66
8.2. Fermentation en erlenmeyer et en fermenteur.....	66
<b>9. Purification des amylases</b> .....	66
9.1. Préparation de l'extrait enzymatique.....	66
9.2. Précipitation des protéines par l'acétone.....	66
9.3. Concentration par le PEG 20000.....	66
9.4. Chromatographie.....	66
9.4.1. Chromatographie d'exclusion.....	67
9.4.2. Chromatographie échangeuse d'ions.....	67
9.4.3. Ultrafiltration.....	67
<b>10. Chromatographie sur couche mince (CCM)</b> .....	67
<b>11. Électrophorèse SDS PAGE</b> .....	67
<b>12. Immobilisation des enzymes</b> .....	68
12.1. Optimisation de l'immobilisation.....	68
12.2. Différentes étapes de l'immobilisation.....	69
12.2.1. Préparation du gel.....	69
12.2.2. Inclusion de l'enzyme.....	69
12.2.3. Polymérisation.....	69
12.3. Détermination du rendement d'immobilisation de l'enzyme.....	71
12.4. Réutilisation des amylases immobilisées.....	71
<b>13. Détermination des propriétés physico-chimiques et cinétiques des enzymes partiellement purifiées</b> .....	71
13.1. Détermination du pH optimum.....	71
13.2. Détermination de la température optimale.....	71

13.3. Détermination de la thermostabilité des enzymes .....	71
13.4. Détermination des caractéristiques cinétiques (Km et Vmax) des enzymes.....	71
<b>14. Effet de différents métaux et réactifs chimiques sur les activités enzymatiques .....</b>	<b>71</b>
<b>15. Test de la compatibilité de l'amylopullulanase de <i>Clavispora lusitaniae</i> ABS7 avec divers détergents à lessive commerciaux.....</b>	<b>72</b>
<b>16. Analyse de la performance de lavage.....</b>	<b>72</b>

### **Chapitre 3 : Résultats et discussion**

<b>1. Isolement et identification des souches.....</b>	<b>73</b>
1.1. Isolement et purification des levures.....	73
1.2. Présélection des levures amylolytiques.....	73
1.3. Production d'amylases par le genre <i>Candida</i> .....	75
1.4. Production de pullulanase par les levures.....	75
1.5. Identification des levures.....	75
1.5.1. Identification phénotypiques.....	75
1.5.2. Assimilation des substrats carbonés (Galerie API 32C).....	78
1.5.3. Identification génotypique des isolats.....	79
1.5.3.1. Caractérisation des souches levuriennes par PCR.....	79
1.5.3.2. Identification des levures par RFLP .....	81
1.6. Production d' $\alpha$ -amylase et de pullulanase thermostables.....	85
1.7. Comparaison de la thermostabilité des enzymes des souches sélectionnées.....	87
1.8. Caractéristiques et propriétés de <i>Candida lusitaniae</i> ABS7.....	89
1.8.1. Caractères macroscopiques.....	89
1.8.2. Caractères microscopiques .....	90
1.8.3. Reproduction.....	90
1.8.3.1. Reproduction asexuée.....	90
1.8.3.2. Reproduction sexuée.....	91
1.8.4. Filamentation.....	91
1.8.5. Confirmation de l'identification de <i>Clavispora lusitaniae</i> par l'amplification de la région D1/D2.....	92
1.8.6. Séquençage de 26S rDNA de <i>Clavispora lusitaniae</i> ABS7.....	93
1.8.7. Positionnement phylogénétique de <i>Clavispora lusitaniae</i> ABS7.....	93

1.8.8. Tests classiques de fermentation et assimilation des substrats.....	94
1.8.9. <i>Clavispora lusitaniae</i> ABS7 productrice d'enzymes amylolytiques.....	95
1.8.10. Densité de l'inoculum de la levure.....	96
1.8.11. Conclusion partielle.....	97
<b>2. Production d'enzymes.....</b>	<b>97</b>
2.1. Influence de la composition du milieu au lactosérum.....	97
2.1.1. Milieu au lactosérum brut et milieu au lactosérum décaséiné.....	97
2.1.2. Etude physico-chimique du lactosérum décaséiné.....	97
2.1.3. Détermination de la meilleure concentration du lactosérum décaséiné.....	98
2.1.4. Conclusion partielle.....	99
2.2. Recherche des conditions optimales de la production enzymatique.....	99
2.2.1. Screening des facteurs.....	99
2.2.1.1. Effet de la source de carbone.....	100
2.2.1.2. Effet de la source d'azote.....	101
2.2.1.3. Effet de sels et des oligo-éléments.....	102
2.2.1.4. Effet de la température.....	103
2.2.1.5. Effet de l'agitation.....	103
2.2.2. Optimisation des facteurs sélectionnés.....	104
2.2.2.1. Analyse statistique.....	104
2.2.2.2. Graphique des effets directs.....	109
2.2.2.3. Graphiques de Pareto.....	110
2.2.2.4. Tracés des surfaces de réponse.....	111
2.3. Validation du modèle.....	113
2.4. Propriétés de la souche de <i>Clavispora lusitaniae</i> ABS7.....	114
<b>3. Etude de la cinétique de croissance de <i>Clavispora lusitaniae</i> ABS7 et de la production de l'<math>\alpha</math>-amylase et de la pullulanase.....</b>	<b>115</b>
3.1. Etude de cinétique de croissance.....	115
3.2. Etude de la production enzymatique.....	115
3.3. Etude de l'évolution du pH, de la concentration en protéines et des sucres.....	116
3.4. Conclusion partielle.....	118
<b>4. Purification des enzymes.....</b>	<b>118</b>

<b>5. Mise en évidence de la pureté des enzymes par SDS PAGE</b> .....	120
<b>6. Chromatographie sur Couche Mince (CCM)</b> .....	121
<b>7. Immobilisation des enzymes</b> .....	123
7.1. Résultat de l'optimisation .....	123
7.2. Efficacité de la réutilisation des enzymes immobilisées.....	130
<b>8. Etude des paramètres physicochimiques des enzymes libres et immobilisées</b> .....	131
8.1. Effet de la température sur l'amylopullulanase libres et immobilisée.....	131
8.2. Effet du pH sur les activités de l' $\alpha$ -amylase et de la pullulanase libres et immobilisées	132
8.3. Etude de thermostabilité de l' $\alpha$ -amylase et la pullulanase libres et immobilisées.....	133
8.4. Etude des paramètres cinétiques des enzymes libres et immobilisées.....	135
<b>9. Effet de différents sels et réactifs chimiques sur les activités <math>\alpha</math>-amylasique et pullulanasiq</b> <b>ue de <i>Clavispora lusitaniae</i> ABS7</b> .....	136
9.1. Effet des sels.....	136
9.2. Influence de différents réactifs chimiques.....	138
9.3. Test de la compatibilité de l'amylopullulanase de <i>Clavispora lusitaniae</i> ABS7 avec divers détergents à lessive commerciaux.....	139
9.4. Analyse de la performance du Lavage.....	140
Conclusion générale.....	141
Références Bibliographiques.....	145
Annexes.....	171
Liste des publications et des communications.....	196

## ABREVIATIONS

ADN: Acide deoxyribonucléique.  
ANOVA: Analyse of Variance.  
*A<sub>w</sub>*: Activité de l'eau.  
BET : Bromure d'éthidium  
C : Celcius  
CCM : Chromatographie sur couche mince.  
CD: Cyclodextrine.  
CGT: Cyclodextrine glycosyltransférase.  
CIRM : Centre international de ressources microbiennes.  
Cl.: Clavispora.  
DEAE: Diéthylaminoéthyle.  
DNSA: 3,5 dinitrosalicylique acide.  
EDTA: Ethylène diamine tétraacétique acide.  
*F*: Statistique test Fisher.  
h: Heure  
IAA: Industrie Agro-Alimentaire.  
ITS: Internal Transcribed Spacer.  
L: Levure.  
Min: minute  
MM: Matière minérale  
MS: Matière sèche  
NCBI: National Center for Biotechnology Information.  
P: Probabilité  
PCR: Polymerase Chain Reaction.  
PDA: Pomme de terre-Dextrose-Agar.  
PEG: Polyéthylèneglycol.  
RAT: Rice-Agar-Tween.  
RFLP: Restriction fragment length polymorphism.  
Rpm: revolutions per minute (tours par minute).  
S: Substrat.  
SCP: Single Cell Protein.  
SDS: Sodium dodécylsulfate.  
TAE: Tris Acétate EDTA.  
UI: Unité interationale.  
USD: United States Dollar.  
UV: Ultra-violet.  
V: Volte  
V<sub>max</sub>: Vitesse maximale.  
YCB: Yeast Carbone Base.  
YNB: Yeast Nitrogen Base.  
YPG: Yeast extract-Peptone-Glucose.  
YPGA: Yeast extract-Peptone-Glucose-Agar.  
YPPA: Yeast extract-Peptone-Pullulan-Agar.  
YPSA: Yeast extract-Peptone-Starch-Agar.

## LISTE DES FIGURES

<b>Figure 1:</b> Pseudomycélium chez <i>Candida lusitaniae</i> .	27
<b>Figure 2:</b> Modes d'action des enzymes amylolytiques.	34
<b>Figure 3:</b> Structure des amylases.	34
<b>Figure 4:</b> Structure de l'amidon.	36
<b>Figure 5:</b> Structure du pullulane.	39
<b>Figure 6:</b> Modes d'action possibles de la pullulanase.	40
<b>Figure 7:</b> Exemples d'innovation pour de nouvelles bio raffineries.	47
<b>Figure 8:</b> Climatogramme de l'est algérien.	48
<b>Figure 9:</b> Isolements des souches microbiennes.	50
<b>Figure 10:</b> Formation des billes contenant l'enzyme immobilisée dans la solution de CaCl <sub>2</sub>	70
<b>Figure 11:</b> Fermenteur AirLift pour la réutilisation des billes de l'amylopullulanase immobilisée de <i>Clavispora lusitaniae</i> ABS7.	70
<b>Figure 12:</b> Zones de lyse de l'amidon et du pullulan sous l'action des enzymes amylolytiques libérées par la levure.	73
<b>Figure 13:</b> Résultats du test PCR avec ITS1/ITS4.	80
<b>Figure 14:</b> Fréquences des levures dans les grains de blé.	81
<b>Figure 15:</b> Profils RFLP des produits de la PCR obtenus avec les enzymes de restriction Dde I, Sau3AI, MSP I et Hae III.	82
<b>Figure 16:</b> Etude de la production des enzymes amylolytiques par des levures sélectionnées sur différents milieux.	85
<b>Figure 17:</b> Etude de la thermostabilité des enzymes des levures sélectionnées.	87
<b>Figure 18:</b> Caractères morphologiques de <i>Clavispora lusitaniae</i> ABS7.	89
<b>Figure 19:</b> Caractères microscopiques de <i>Clavispora lusitaniae</i> ABS7.	90
<b>Figure 20:</b> Reproduction asexuée chez <i>Clavispora lusitaniae</i> ABS7 par bourgeonnement Culture sur milieu YPG.	90
<b>Figure 21:</b> Reproduction sexuelle chez <i>Clavispora lusitaniae</i> ABS7 : Asques contenant 2 et 4 spores.	91
<b>Figure 22:</b> Formation de pseudomycélium chez <i>Clavispora lusitaniae</i> ABS7 cultivé sur milieu RAT.	91
<b>Figure 23:</b> Place de la souche ABS7 dans l'arbre phylogénétique du genre <i>Candida</i> .	93
<b>Figure 24 :</b> Zones de lyse chez la souche <i>Clavispora lusitaniae</i> ABS7.	95

<b><u>Figure 25</u></b> : Effet du taux d'ensemencement sur la production enzymatique	96
<b><u>Figure 26</u></b> : Comparaison de l'effet du lactosérum traité ou non traité sur la production de l' $\alpha$ -amylase et la pullulanase.	97
<b><u>Figure 27</u></b> : Effet de la concentration en lactosérum sur la production enzymatique.	98
<b><u>Figure 28</u></b> : Graphique des effets directs pour l' $\alpha$ -amylase (A) et la pullulanase (B).	109
<b><u>Figure 29</u></b> : Représentation de Pareto des effets de facteurs sur la production de l' $\alpha$ -amylase (A) et la production de la pullulanase (B) pour un niveau de test $\alpha=5\%$ .	110
<b><u>Figure 30</u></b> : Courbes d'iso-réponses pour la production d' $\alpha$ - amylase thermostable par <i>Clavispora lusitaniae</i> ABS7.	111
<b><u>Figure 31</u></b> : Courbes d'iso-réponses de la production de la pullulanase thermostable par <i>Clavispora lusitaniae</i> ABS7.	112
<b><u>Figure 32</u></b> : Etude cinétique de la croissance et de la production amylolytique ( $\alpha$ -amylase et pullulanase) chez <i>Clavispora lusitaniae</i> ABS7 cultivé sur milieu optimisé à base de lactosérum.	117
<b><u>Figure 33</u></b> : Profil chromatographique de l' $\alpha$ -amylase et de la pullulanase sur Séphacryl-S200.	119
<b><u>Figure 34</u></b> : Profil chromatographique de l' $\alpha$ -amylase et de la pullulanase sur DEAE cellulose	120
<b><u>Figure 35</u></b> : Profil électrophorétique SDS-PAGE de l'enzyme purifiée.	121
<b><u>Figure 36</u></b> : Chromatogramme par CCM et Analyse des produits à partir de l'amidon et du pullulan.	122
<b><u>Figure 37</u></b> : Graphique de Pareto standardisé pour un niveau de test $\alpha= 5\%$ .	125
<b><u>Figure 38</u></b> : Effets directs pour l'activité $\alpha$ -amylasique (A) et l'activité pullulanasiq (B).	126
<b><u>Figure 39</u></b> : Iso-réponses A et surface de réponse B de l'activité alpha amylosique,	127
<b><u>Figure 40</u></b> : Iso-réponses A et surface de réponse B de l'activité pullulanasiq.	128
<b><u>Figure 41</u></b> : Réutilisation de l' $\alpha$ -amylase et de la pullulanase immobilisées	130
<b><u>Figure 42</u></b> : Effet de la température sur les activités de l' $\alpha$ -amylase et la pullulanase libres (A) et immobilisées (B).	131
<b><u>Figure 43</u></b> : Effet du pH sur les activités de l' $\alpha$ -amylase et la pullulanase libres (A) et immobilisées (B).	132
<b><u>Figure 44</u></b> : Etude de la thermostabilité de l' $\alpha$ -amylase et la pullulanase libres (A) et immobilisée (B).	133
<b><u>Figure 45</u></b> : Représentation de lineweaver et Burk des deux formes d'enzymes.	135
<b><u>Figure 46</u></b> : Effet de différents sels sur les activités $\alpha$ -amylasique et pullulanasiq de l'amylopullulanase alcalothermostable.	137
<b><u>Figure 47</u></b> : Effet de différents réactifs chimiques sur les activités $\alpha$ -amylasique et pullulanasiq de	138

l'amylopullulanase alcaline.

**Figure 48:** Stabilité et compatibilité des activités  $\alpha$ -amylasique et pullulanasiqne de *Clavispora lusitaniae* ABS7. 139

**Figures 49 :** Test d'analyse des performances du lavage de la tâche chocolat-confiture sur les morceaux de tissu lavés. 140

## LISTE DES TABLEAUX

<b><u>Tableau 1</u></b> : Habitat de <i>Clavispora lusitaniae</i> .	26
<b><u>Tableau 2</u></b> : Activité de l'eau (Aw) minimale pour la croissance de quelques microorganismes.	29
<b><u>Tableau 3</u></b> : Enzymes industrielles produites par les levures.	30
<b><u>Tableau 4</u></b> : Production d'enzymes amylolytiques par les levures.	32
<b><u>Tableau 5</u></b> : Caractéristiques physico-chimiques de quelques $\alpha$ -amylases levuriennes.	37
<b><u>Tableau 6</u></b> : Spécificités d'action des pullulanases.	40
<b><u>Tableau 7</u></b> : Quelques propriétés des pullulanases.	42
<b><u>Tableau 8</u></b> : Générateurs des matrices pour N= 8, 12, 16, et 20 essais Plackett et Burman	62
<b><u>Tableau 9</u></b> : Matrice de Plackett et Burman pour l'étude de 11 variables avec 12 expériences.	63
<b><u>Tableau 10</u></b> : Relation entre les niveaux codés et les niveaux réels des facteurs utilisés dans les matrices de Plackett et Burman.	63
<b><u>Tableau 11</u></b> : Relation entre les niveaux codés et les niveaux réels des facteurs utilisés dans le plan composite centré.	64
<b><u>Tableau 12</u></b> : Relation entre les niveaux codés et les niveaux réels des facteurs utilisés dans le plan pour améliorer l'immobilisation de l' $\alpha$ - amylase et la pullulanase	68
<b><u>Tableau 13</u></b> : Plan expérimental de Box-Behnken pour l'étude de trois facteurs	69
<b><u>Tableau 14</u></b> : Screening primaire pour l'isolement des souches levuriennes amylases positives.	74
<b><u>Tableau 15</u></b> : Caractères macroscopiques et microscopiques des 12 souches de levures sélectionnées, cultivées sur milieu YPGA et YPG et incubées à 30°C.	76
<b><u>Tableau 16</u></b> : Identification à partir de caractères biochimiques (ID 32C) et microscopiques	78
<b><u>Tableau 17</u></b> : Résultats des tests complémentaires.	79
<b><u>Tableau 18</u></b> : Taille des fragments (produits de la PCR).	80
<b><u>Tableau 19</u></b> : Tailles des produits de la PCR ITS1-ITS2 de tous les isolats étudiés et des souches témoins avant et après la digestion par les enzymes de restriction Dde I, Sau3AI, MSP I et Hae	83
<b><u>Tableau 20</u></b> : Récapitulation de l'identification des souches de levures.	84
<b><u>Tableau 21</u></b> : Identification taxonomique moléculaire réalisée par PCR de la région D1/D2 de l'ADN ribosomique 26S.	92
<b><u>Tableau 22</u></b> : Tests de fermentation des glucides de la levure <i>Clavispora lusitaniae</i> ABS7.	94
<b><u>Tableau 23</u></b> : Tests d'assimilation de sources azotées de <i>Clavispora lusitaniae</i> ABS7.	94
<b><u>Tableau 24</u></b> : Tests d'assimilation de sources azotées de <i>Clavispora lusitaniae</i> ABS7.	94
<b><u>Tableau 25</u></b> : Thermotolérance de <i>Clavispora lusitaniae</i> ABS7.	94
<b><u>Tableau 26</u></b> : Autres tests.	94
<b><u>Tableau 27</u></b> : Caractéristiques de <i>Clavispora lusitaniae</i> ABS7.	96

<b><u>Tableau 28</u></b> : Etude physico-chimique du lactosérum.	98
<b><u>Tableau 29</u></b> : Matrice expérimentale de Plackett-Burman (12 essais) et production enzymatique.	99
<b><u>Tableau 30</u></b> : Analyse statistique des résultats du plan de Plackett-Burman pour la production de l' $\alpha$ -amylase et de pullulanase.	100
<b><u>Tableau 31</u></b> : Production de l' $\alpha$ -amylase et la pullulanase selon le Plan Composite Centré.	105
<b><u>Tableau 32</u></b> : Coefficient de régression de l'équation de la production de l' $\alpha$ -amylase.	107
<b><u>Tableau 33</u></b> : Coefficient de régression de l'équation de la production de la pullulanase.	108
<b><u>Tableau 34</u></b> : Production de l' $\alpha$ -amylase et de la pullulanase avant et après l'optimisation.	114
<b><u>Tableau 35</u></b> : Résultats récapitulatifs de la purification des enzymes amylolytiques produites par <i>Clavispora lusitaniae</i> ABS7.	119
<b><u>Tableau 36</u></b> : Effet des trois facteurs étudiés sur l'immobilisation de l' $\alpha$ -amylase et de la pullulanase.	124
<b><u>Tableau 37</u></b> : Réponse optimisée pour maximiser l' $\alpha$ -amylase et la pullulanase.	129
<b><u>Tableau 38</u></b> : Activités de l' $\alpha$ -amylase et la pullulanase thermostable dans les différentes fractions durant le processus de l'immobilisation.	129
<b><u>Tableau 39</u></b> : Paramètres cinétiques de l' $\alpha$ -amylase et de la pullulanase libres et immobilisées.	136

# **Introduction générale**

## Introduction générale

Les coproduits organiques des industries agroalimentaires (IAA) menacent l'environnement par leur richesse en glucides fermentescibles (lactosérum, marcs de raisin, vinasses, déchets de légumes ou de fruits, ...). Leur valorisation énergétique recommandée par la REME (Réseau des entreprises Maghrébine pour l'environnement) répond aux différents arguments : 1- La biomasse produite peut être utile à l'alimentation humaine et animale ; 2- Leur méthanisation, sous l'action de bactéries appropriées et en l'absence d'oxygène, produit des biogaz, source de chaleur ou d'électricité ou de carburant pour certains véhicules ; 3- Le recyclage des co-produits des IAA permet la préservation de l'environnement.

Les pays en développement, à l'instar de l'Algérie, rejettent la plupart des déchets dans une décharge à ciel ouvert. Il devient donc urgent de mettre en place de nouvelles technologies permettant leur valorisation. Dans le cas particulier de l'industrie fromagère, le lactosérum représente 90% du volume original du lait utilisé ; il en est ainsi le principal coproduit (Moletta, 2002). Par sa richesse en protéines et en lactose, il devient un polluant, en particulier pour les écosystèmes aquatiques (Linden et Lorient, 1994) d'où la nécessité d'essayer de le valoriser.

Par ailleurs, l'emploi d'enzymes est très souvent nécessaire dans le domaine des biotechnologies et offre de multiples possibilités de valorisation des co-produits. Dans l'industrie de l'amidon, la transformation des produits amylicés par des enzymes amylolytiques et des processus industriels spécifiques, permet, suivant les cas, la production de dextrans, de maltose, de glucose et la fabrication de boissons alcoolisées ainsi que des détergents, des biocapteurs, des biocarburants et des kits de diagnostic et de gestion de polluants de l'environnement (Khady, 2013). Afin de permettre une optimisation des processus ainsi qu'une réduction des coûts énergétiques et une amélioration de la sécurité alimentaire et de la qualité des aliments (Minussi et al. 2002), l'utilisation d'enzymes est très recommandée.

D'après les estimations de Reiss (2007) le marché mondial des enzymes devait croître de 6,5 % par an ; les ventes mondiales en 2015 s'élèvent à 7,4 milliard USD. En 2015 les lipases constituent 38,5 % du marché mondial, suivies par les amylases à 30,5 % [Marché européen des enzymes dans les applications alimentaires (Morvan, 2010)]. Les enzymes d'applications industrielles sont caractérisées par une forte thermostabilité et une reproductibilité dans le temps. Les amylases sont utilisées dans différents secteurs industriels (IAA, textiles, papeterie, détergents.....) ainsi que dans le domaine de la santé (aides digestifs). Les amylases industrielles sont d'origine microbienne, en particulier issues des levures caractérisées par une thermorésistance avérée.

La demande des enzymes amylolytiques a augmenté suite aux crises énergétiques pétrolières. En effet, pour faire face à la raréfaction du pétrole, une troisième révolution industrielle est défendue par J. Rifkin depuis 2006 (Rifkin, 2012). Il s'agit de la bioraffinerie (ou raffinerie du végétal) dont le concept se base sur l'hydrolyse enzymatique totale des polysaccharides en glucose (comme la cellulose et l'amidon). Le glucose est transformé à son tour et utilisé pour la fabrication des films agricoles et coating ou de plastifiants et de matériaux de performances (Octave et Thomas, 2009).

Pour permettre l'essor des bioraffineries, des efforts de recherche sont encore indispensables. Il s'agit d'augmenter la productivité des enzymes commerciales, notamment les enzymes amylolytiques thermostables, et de réduire les coûts de production en utilisant notamment des matières premières bon marché et en production continue.

L'objectif principal du présent travail est d'étudier et de caractériser la production de deux enzymes amylolytiques : l' $\alpha$ -amylase et la pullulanase issues de levures prélevées en milieu extrême (Biskra- Sahara- Sud Algérien). L'optimisation de leur production sur un milieu à base de lactosérum, est réalisée par des plans statistiques. Par ailleurs, les caractéristiques cinétiques et physico-chimiques des enzymes amylolytiques (pullulanase et  $\alpha$ -amylase) sous forme libre ou immobilisée ont été déterminées.

Ce manuscrit comprend une première partie relatant l'état des connaissances sur les levures et les enzymes glycolytiques (l' $\alpha$ -amylase et la pullulanase).

La deuxième partie expérimentale renferme les techniques et les méthodes ainsi que les résultats et leur discussion.

## **Chapitre 1**

# **Etude bibliographique**

# Etude bibliographique

---

## 1. Levures

### 1.1. Généralités

Les levures sont des organismes qui se distinguent des autres champignons par une taxonomie basée à la fois sur des caractères morphologiques et physiologiques. Ce sont des microorganismes eucaryotes avec un ADN double brin (Kurtzman et al., 2011b).

Les levures forment un groupe de champignons eucaryotes avec une paroi cellulaire bien définie dont la croissance est soit entièrement unicellulaire, soit offrant une combinaison des hyphes et reproduction unicellulaire. Les 1500 espèces de levures connues appartiennent à deux phyla fongiques distinctes : Ascomycota et Basidiomycota. Dans chacun de ces phyla, les levures se différencient selon plusieurs lignées, reflétant ainsi la grande diversité de leurs origines évolutives et leurs propriétés biochimiques (Lachance, 2011a).

Dans la nature, les levures se trouvent principalement en association avec des plantes ou des animaux, dans le sol et dans les milieux aquatiques. Leurs faibles exigences en nutriments permettent un développement rapide. Ainsi, elles sont utilisées comme systèmes modèles en Biochimie, en Génétique et en Biologie Moléculaire. Les levures sont les premiers microorganismes à être domestiqué pour la production de la bière, du pain ou du vin et continuent d'être utilisées pour le bénéfice de l'humanité dans la production de protéines recombinantes et d'autres substances (Lachance, 2011a). Cependant, certaines espèces sont pathogènes comme *Candida albicans* (Kurtzman, 2011a).

### 1.2. Taxonomie du modèle biologique : *Clavispora lusitaniae*

Les *Clavispora sp.* sont des organismes eucaryotes appartenant au règne des champignons. Kurtzman (2011a) décrit la classification de *Clavispora lusitaniae* suivante :

**Règne** : Champignon

**Phylum** : Ascomycota

**Subphylum** : Saccharomycotina

**Classe** : Saccharomycetes

**Ordre**: Saccharomycétales

**Famille**: Metschnikowiaceae

**Genre**: *Clavispora*

**Espèce** : *lusitaniae*

Synonyme : *Candida lusitaniae* (forme anamorphe)

Autres noms : *Clavispora imtechensis*, *Saccharomyces carmosousae*, *Candida parapsilosis* et *Candida obtusa*

### 1.3. Caractéristiques des levures

#### 1.3.1. Caractéristiques écologiques

Les levures sont thallophytes, absorbotrophes hétérotrophes capables de provoquer la fermentation de matières animales ou végétales. Dans la nature, elles se trouvent principalement dans le sol (Thanh, 2006), dans l'air (Iefuji et al., 1994) et sur les végétaux

## Etude bibliographique

riches en sucres facilement assimilables tels que les fruits (pommes, raisins (Oteng-Gyang, 1984), les jus de fruits, les légumes, les fruits secs, les sirops, les confiture, etc.... Les levures des produits alimentaires ne sont pas pathogènes (pas de production de toxines) mais peuvent produire, par leur développement, des altérations de la qualité des produits commercialisés par la formation de troubles, d'odeurs ou de goûts anormaux (éthanol, variation de pH).

La levure *Candida lusitanae* est une espèce cosmopolite ubiquiste dont la niche écologique est mal connue (Lachance, 2011b). C'est un organisme saprophyte du tube digestif de l'homme et de nombreux animaux (mammifères, oiseaux) (<http://coproweb.free.fr/mycoweb/texte/153.htm>) : 06/03/2009. Dans l'environnement, *Clavispora lusitanae* est isolée à partir d'une large gamme de substrats (Tableau 1): végétaux, animaux, déchets industriels et spécimens cliniques.

**Tableau 1:** Habitat de *Clavispora lusitanae*

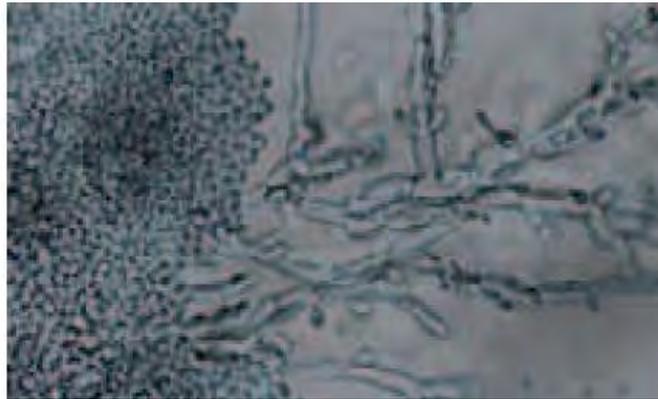
Habitats	Références
<b>Cornichons</b>	Rezki et al., 2013
<b>Dattes</b>	Rezki et al., 2013
<b>Ecorces d'arbres</b>	Rao R. S. et al., 2008
<b>Déchets de la pomme de terre</b>	Ouédraogo et al., 2012
<b>Fromage</b>	Prillinger et al., 1999 ; Jacques et Caseregola, 2008 et Binetti et al., 2013
<b>Lactosérum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

Cette espèce est isolée dans plusieurs sites dans le monde : l'Europe, la Nouvelle Zélande, l'Inde, le Mexique, les États-Unis, le Venezuela, les Îles de Caïmans, le Canada, les Bahamas (Lachance, 2011b) et l'Algérie (Rezki et al., 2013 et Djekrif et al., 2014).

### 1.3.2. Caractéristiques biologiques

Une levure est un mycète unicellulaire avec un cycle biologique comportant une phase unicellulaire prépondérante. Généralement, les cellules des levures sont plus grandes que celles des bactéries (de taille de quelques microns à 30  $\mu$ ) avec une forme sphérique ou ovoïde. A certains stades de leur vie, elles peuvent parfois former des filaments et constituer un pseudo-mycélium (Figure 1) ou un vrai mycélium (Barnett et al., 2000).

Les souches de *C. lusitanae* produisent les pseudohyphes avec des chaînes de blastoconidies développées (Lachance, 2011b).



**Figure 1:** Pseudomycélium chez *Candida lusitanae*  
(Pastor-Pascual et al., 2007)

La reproduction se fait selon deux modes :

- Certaines levures adoptent une reproduction asexuée, par bourgeonnement multilatéral et division transversale, qui aboutit à la forme anamorphe ou forme imparfaite (hétérothallique téléomorphe). Les cellules sont ovoïdes, allongées ou ellipsoïdales : *Clavispora lusitanae* est le représentant de ce groupe.

- D'autres se reproduisent de façon sexuée : certaines arrivent à faire la méiose comme *Candida lusitanae*. Après la méiose, les asques s'ouvrent par déliquescence pour libérer 1 à 4 ascospores de forme conique (François et al., 2001).

### 1.3.3. Caractéristiques nutritionnelles

#### 1.3.3.1. Nutrition carbonée

Les levures sont des chimiohétérotrophes et ont besoin de composés organiques carbonés, servant à la fois comme de source de carbone et de source d'énergie pour leur développement. Toutes les levures sont capables de métaboliser le glucose, le fructose, le mannose (Walker, 2009). Les levures *Candida sp.* et *Clavispora lusitanae* sont capables de fermenter le D-xylose alors que pour les souches industrielles, il reste inutilisable (Nigam et al., 1985).

D'autres saccharides, des polyols, des alcools (éthanol, méthanol, glycérol), des polysaccharides (amidon soluble, pectine), l'acide lactique et l'acide citrique peuvent être utilisés par les levures grâce aux enzymes de leur capital génétique (Kutzman et Suzuki, 2010). Le glucose peut avoir un effet répressif et inhibiteur sur l'assimilation d'autres sucres par les levures (Walker, 1998).

Plusieurs *Candida sp.* (*Candida tropicalis*, *C. maltosa*, *C. guilliermondii*, *C. rugos*, *C. lusitanae* et *C. utilis*) se développent sur une diversité de substrats comme les n-alkanes, les huiles, les acides gras, le xylose et les glucides (Tanaka et Ueda, 1993; Klein et Favreau, 1995 et Wolf, 1996). Les souches de *Schwanniomyces castellii*, *S. fibuligera* produisent la biomasse à partir de l'amidon non hydrolysé (à partir des pommes de terre ou leurs pelures, l'amidon soluble) (Ouédragao et al., 2012) et les hydrolysats de plantes, le moût de pomme,... (Halász et Lásztity, 1991 ; Klein et Fauveau, 1995 et Bekatorou et al., 2006). Ces données suggèrent une capacité à disposer d'un niveau élevé d'enzymes glycolytiques et lipasiques.

## Etude bibliographique

---

### 1.3.3.2. Nutrition azotée

- Sources azotées organiques

Les levures poussent sur des milieux riches en sources azotées organiques (peptone, extrait de levure et autres). L'extrait de levure constitue le principal stimulateur de la croissance microbienne en particulier pour les levures (Deak, 2006).

- Une grande variété de composés organiques azotés (glutamine, acide aspartique, peptides, bases purines et pyrimidines, amines et urée...) peut couvrir également les besoins azotés de la levure (Walker et al., 1998 et Deak, 2006). Sources azotées inorganiques.

Toutes les levures sont pratiquement capables d'utiliser l'azote minéral comme les sels d'ammonium utilisés dans les milieux de culture (Bourgeois, 1996). Contrairement à *Hansenula* et *Citeromyces*, certains genres de levures sont incapables d'utiliser les nitrates : *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Pichia* et *Debaryomyces*. Par contre, les nitrites sont métabolisables par *Debaromyces hansenii* et *Pichia pinus* (Bourgeois, 1996).

Généralement, les nitrates et l'urée ne sont pas assimilés par *C. lusitaniae* (François et al., 2001).

### 1.3.3.3. Effet des facteurs de croissance et des oligo-éléments

Les besoins en vitamines varient selon l'espèce. La levure peut se multiplier en l'absence de vitamines ou peut en exiger une ou plusieurs dans le milieu de croissance comme la biotine, la thiamine, l'acide pantothénique (Guiraud, 1998). La souche *Candida lusitaniae* n'a pas besoin de vitamines pour sa croissance. Par contre, la levure *Sacharomyces cerevisiae* a besoin de biotine pour croître. Pour un développement adéquat les levures ont besoin d'oligo-éléments variés et en très faible concentration (Larpen-Gourgand et Sanglier, 1992). Les ions  $Ca^{2+}$  ont un effet significatif sur le métabolisme et la physiologie des microorganismes (Sarıkaya et Gurgun, 2000).

### 1.3.4. Caractéristiques physiologiques

#### 1.3.4.1. Effet de la température sur la croissance des levures

Les micro-organismes thermophiles poussent à des températures comprises entre 45-80°C (Rudiger et al., 1995 et Madigan and Martino, 2006). Leur température minimale de croissance se situe entre 20°C et 50 °C.

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

La température maximale de la croissance des levures se situe classiquement entre 35°C et 45°C. D'autres levures peuvent se développer à 0°C (Oteng-Gyang, 1984) ou à plus de 50°C: *Candida Slooffii*, *Saccharomyces telluris* et *Torulopsis bovina* (Bourgeois et al., 1988 et Leveau et Bouix, 1993). Par leur température de croissance, les levures sont classées en :

- Levures psychrophiles : la température maximale de croissance se situe entre 5°C et 20°C.
- Levures mésophiles peuvent se développer entre 0 à 50°C.

## Etude bibliographique

Dans une étude portant sur 600 souches et plus de 100 espèces des genres de *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Debaryomyces*, *Pichia*, *Candida*, 98% des levures ont une température de croissance comprise entre 24 et 48 °C (Deak, 2006). La levure *Candida thermophila*, isolée du sol en Corée, croit à 51°C (Shin et al., 2001). Contrairement aux procaryotes, la plupart des eucaryotes ne résistent pas à des températures supérieures à 60 °C (Madigan et al., 1997). Raspor et Zupan (2006) notaient une survie des eucaryotes à des températures élevées impliquant probablement la stabilité des membranes des organelles qui doivent rester assez poreuses pour permettre le passage des molécules telles que l'ATP et l'ARN.

### 1.3.4.2. Effet du pH et de l'oxygène

Les levures tolèrent une large gamme de pH allant de 2,4 à 8,6. L'optimum de pH varie de 4 à 6,5. Les levures du genre *Candida* se multiplient activement en milieu acide, de pH 2 à pH 6 mais peuvent survivre à pH 9. ([http://fr.wikipedia.org/wiki/Candida\\_genre](http://fr.wikipedia.org/wiki/Candida_genre)): 20/05/2008.

Toutes les levures sont capables de se développer en présence d'oxygène ; il n'y a pas de levures anaérobies strictes, certaines sont aérobies strictes : *Rhodotorula*, *Rhodospiridium*, *Lipomyces*, *Saccharomyces*, *Cryptococcus*, *Sporobolomyces*, *Hansenula*, *Pichia*, *Torulopsis* et *Debaryomyces* (Bouix et Leveau, 1991). D'autres sont aéro-anaérobies facultatives :

- des levures avec un métabolisme fermentaire même en présence d'oxygène : *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces* et *Brettanomyces* et quelques espèces de *Torulopsis*.

- des levures avec un métabolisme respiratoire en présence d'oxygène : *Candida*, *Kluyveromyces*, la plupart des *Pichia* et *Hansenula* et quelques espèces de *Torulopsis* (Bouix et Leveau, 1991).

### 1.3.4.3. Influence de l'activité de l'eau et de la pression osmotique

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 qu'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 (Tableau 2) 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 (glycérol et bétaïne).

**Tableau 2:** Activité de l'eau ( $A_w$ ) minimale pour la croissance de quelques micro-organismes (Beuchat, 1983 ; Chirife and Maria, 1994)

Microorganismes	$A_w$
<b>Levures</b>	
<i>S.cerevisiae</i>	0,90-0,94
<i>Rhodotorula sp.</i>	0,90
Levures osmophiles	0,62
<b>Moisissures</b>	
<i>Botrytis cinerea</i>	0,93
<i>Fusarium</i>	0,90
<i>Mucor</i>	0,80-0,90
<i>P. expansum</i>	0,85
<i>A.flavus</i>	0,70

## Etude bibliographique

### 1.4. Utilisation industrielle des levures ou de leurs enzymes

Les levures sont utilisées par l'homme depuis des millénaires avec une large application, à la fois fondamentale et industrielle, dans les disciplines scientifiques, alimentaires, médicales et agricoles. Les levures sont traditionnellement impliquées dans de nombreuses fermentations alimentaires et la fabrication de produits tels que les bières, les cidres, les vins, le saké, les produits de boulangerie, le fromage, les saucisses et autres aliments fermentés. Des procédés industriels impliquent, depuis longtemps, des levures dans la production d'éthanol-carburant, de protéines unicellulaires (SCP) pour l'alimentation animale ou d'enzymes industrielles, la production de vaccins et de caroténoïdes (Jacob, 1991 et Buzzini, 2000) (Tableau 3).

**Tableau 3:** Enzymes industrielles produites par les levures (Liese et al., 2000 ; Pandey, 2006 et Johnson et Echavari, 2011).

Enzyme	Levures	Industrie
<b>Chymosine</b>	<i>Klyveromyces sp.</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Préparation des aliments
<b>Galactosidase</b>	<i>Saccharomyces sp.</i>	Applications alimentaires
<b>Glutaminase</b>	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	Thérapeutique analyse
<b>Inulinases</b>	<i>Candida sp.</i> <i>Klyveromyces marxianus</i>	Applications alimentaires
<b>Invertase</b>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Applications alimentaires
<b>Lactase</b>	<i>Candida pseudotropicalis</i> <i>Klyveromyces sp.</i>	Préparation des aliments
<b>Lipase</b>	<i>Candida rigosa</i> <i>Pseudozyma antarctica</i> <i>Trichosporon fermentum</i>  <i>Yarrowia lipolytica</i>	Préparation des aliments Arômes dégraissage biorestauration thérapeutique Détergents
<b>Phenylalanine Ammonialyase</b>	<i>Rhodotorula sp.</i> <i>Rhodospiridium sp.</i>	pharmaceutique
<b>Phenylalanine déshydrogénase</b>	<i>Candida boidinii</i>	pharmaceutique
<b>Phytase</b>	<i>Ogataea polymorpha</i>	fouillage nutritionnelle

L'extrait de levure constitue un élément nutritionnel important (source azotée et apport en vitamines du groupe B indispensable), favorable en particulier à la croissance de la plupart des microorganismes. Les levures participent également à la valorisation des déchets agricoles et industriels pour la production des protéines, des enzymes et de « SCP » (Spencer-Martins et Van Uden, 1979).

Les enzymes de levures sont de plus en plus utilisées en industries pour faciliter les procédés et diminuer le coût énergétique du produit fini en particulier dans les IAA. La recherche de nouvelles enzymes de levures possédant un potentiel d'application industrielle continue à se développer. Des levures comme *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae* et *Hansenula*

## Etude bibliographique

---

*polymorpha* sont utilisées actuellement pour la production industrielle de protéines et d'enzymes, y compris les protéines pharmaceutiques (Johnson et Echavarri-Erasum, 2011). Les levures *Yarrowia lipolytica* et *Rhodotorula glutinis* sont utilisées grâce à leur capacité à produire des lipases, dans les industries du pétrole, en blanchisserie, en industrie des détergents et dans les IAA (Burden et Eveleigh 1990 and Gholam and Sahebeh, 2013). Dans notre étude, l'accent sera mis sur la production d'enzymes amylolytiques en particulier, l' $\alpha$ -amylase et la pullulanase chez la levure *Clavispora lusitaniae*. A ce jour, peu d'études ont été menées sur la levure *Clavispora lusitaniae*.

### 1.5. Levures amylolytiques

Par leur facilité de culture, les levures amylolytiques ont suscité l'intérêt des chercheurs pour leur application dans les bio-industries (Fossi et al., 2005). Les levures amylolytiques sont capables de produire différentes enzymes amylolytiques (Tableau 4). Pour cette raison, leur utilisation dans la production enzymatique est de plus en plus sollicitée (Fossi et al., 2005). Par ailleurs, l'excrétion des amylases dépend de la composition du milieu de culture (Oteng-Gyang et al., 1980 et Aiyer, 2005).

#### 1.5.1. Levures productrices d'amylases extracellulaires

Les amylases extracellulaires d'origine levurienne sont très peu répertoriées: *Cryptococcus heimaeyensis* HA7 (Hossam et al., 2011), *Trichosporon pullulans*, *Saccharomycopsis bispora*, *Saccharomycopsis capsularis*, *Saccharomycopsis fibuligera* (*Endomycopsis fibuligera*) (Gonzalez et al., 2008), *Lipomyces starkeyi* NCYC 1436 (Graham et al., 2000), *Candida sp.* (Hernandez-Montanez et al. 2010) et *Candida parapsilosis*, *Candida glabrata*, *Rhodotorula mucilaginosa* (De Oliveira et al., 2015) (Tableau 4). Contrairement aux amylases, peu d'études sont menées sur la production de la pullulanase par les levures. Cependant, depuis les années 80, l'activité pullulanase est mise en évidence chez *Candida*, *Cryptococcus*, *Pichia*, *Schwanniomyces*, *Torulopsis*, *Lipomyces*, *Trichosporon*, *Endomycopsis*, *Leucosporidium* et *Filobasidium* (De Mot et Varachtert 1984), *Aureobasidium pullulans* (Moubasher et al. 2013).

## Etude bibliographique

**Tableau 4:** Production d'enzymes amylolytiques par les levures

Levure	Enzymes amylolytique	Références
<i>Filobasidium capsuligenum</i>	$\alpha$ -amylase, glucoamylase	De Mot et Varachtert, 1985
<i>Schwanniomyces castelli</i>	$\alpha$ -amylase, glucoamylase	Sills et al., 1984, Clementi et Rossi, 1986
<i>Candida utilis</i> , <i>Candida guilliermondii</i> <i>Candida famata</i> <i>Trichosporon mucoides</i>	$\alpha$ -amylase	Ouédraogo et al., 2012
<i>C. famata</i> et <i>C. guilliermondii</i>	Glucoamylase	Lagzouli et al., 2007
<i>Candida edax</i>	$\alpha$ -amylase, glucoamylase	Ettalibi et Beratti, 1988
<i>Candida antarctica</i> CBS 6678	$\alpha$ -amylase, glucoamylase	De Mot et Varachtert 1987
<i>C. antarctica</i> et <i>C. rugosa</i>	Lipases	Jaegar et Reetz, 1998
<i>Wickerhamia</i> sp.	$\alpha$ -amylase	Hernandez-Montanez et al. 2012
<i>Saccharomycopsis capsularis</i>	$\alpha$ -amylase, glucoamylase	Soni et al., 1996
<i>Trichosporon pullulans</i>	$\alpha$ -amylase, glucoamylase	De Mot et Varachtert, 1986
<i>schwanniomyces alluvius</i>	$\alpha$ -amylase	Moranelli et al., 1987
<i>Schwanniomyces occidentalis</i>	$\alpha$ -amylase	Dohmen et al., 1989
	Invertase	Alvaro-Benito et al., 2010
<i>Cryptococcus flavus</i>	$\alpha$ -amylase	Wanderly et al., 2004
<i>Cryptococcus</i> sp. S-2	$\alpha$ -amylase	Iefuji et al., 1996
<i>Saccharomyces diastaticus</i> et <i>Endomycopsis capsularis</i>	Glucoamylase	Verma et al., 2010
<i>Aureobasidium pullulans</i>	Pullulanase	Moubasher et al., 2013
	Glucoamylase	Federici et al. 1990,
	$\alpha$ -glucosidase, $\alpha$ -amylase	Li Haifeng et al., 2007
	Amylase	Gaur et al., 2010
	Cellulase	Walker, 1998
<i>Lipomyces kononenkoae</i>	$\alpha$ -amylase, glucoamylase	Spencer- Martins et Van Uden, 1979
<i>Pichia burtonii</i>	$\alpha$ -amylase	Takeuchi et al., 2006
<i>Candida guilliermondii</i>	$\alpha$ -amylase	Acourene et Ammouche, 2012
	Inulinase	Gao et al., 2007
	Esterase	Basaran et Hang, 2000
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	$\alpha$ -amylase	Acourene et Ammouche, 201
<i>Saccharomycopsis fibuligera</i>	$\alpha$ -amylase, glucoamylase	Gonzalez et al., 2008
<i>Pichia burtonii</i> 15-1	$\alpha$ -amylase	Kato et al., 2007
<i>Kluyveromyces fibuligera</i>	Inulinase et Pectinase	Almeida et al., 2003 et Jain et al., 2012
<i>Yarrowia lipolytica</i>	Lipase	Fickers et al., 2004
<i>Clavispora lusitaniae</i>	$\alpha$ -amylase	Ouédraogo et al., 2012
	$\beta$ -glucosidase	Freer et Greene, 1990
	Phytase	Greppi et al., 2015
	Naringinase ( $\alpha$ -L-rhamnosidase et $\beta$ -D-glucosidase)	Sahota et Kaur, 2015

### 1.5.2. Système amylolytique chez les levures

Le système amylolytique des levures est très diversifié : les principales enzymes de ce système sont l' $\alpha$ -amylase, la glucoamylase, la pullulanase et la cyclodextrinase (Sills et al., 1984 ; De Mot et Verachtert, 1987; Horn et al., 1988 ; Ouédraogo et al., 2012 et Moubasher et al., 2013).

## 2. Enzymes amylolytiques et thermostabilité

L'application industrielle d'enzymes amylolytiques nécessite des enzymes thermostables dont la température optimale est supérieure ou égale 70°C. Aujourd'hui, le marché annuel des enzymes thermostables représente environ 250 millions de dollars et les amylases thermostables en occupent une bonne part (Prakash et Jaiswal, 2010).

Ces dernières années, beaucoup de recherches ont été faites sur la production d'amylases par les microorganismes thermophiles (Gomes et al., 2007). Leur utilisation dans les procédés industriels offre les avantages de diminuer le risque de contamination, de réduire le temps de la réaction, le coût du refroidissement de l'extérieur (Brown et Kelly 1993; Mobini et Javan, 2012 et Nisha et Tulasi, 2013) et d'augmenter la vitesse de diffusion (Lin et al., 1998). Les principales enzymes amylolytiques utilisées dans l'industrie de l'amidon sont l' $\alpha$ -amylase, la  $\beta$ -amylase, la glucoamylase, la pullulanase, la maltase et l' $\alpha$ -1,6 glucosidase.

La plupart des amylases commerciales sont d'origine bactérienne (Gomes et al, 2003 et Saxena et al, 2007) pour leur intérêt dans la saccharification de l'amidon pour la production, du glucose, du maltose, du maltotriose et des dextrans (Gomes et al, 2003 et Saxena et al, 2007).

Aussi, Il serait judicieux de trouver des levures à production mixte de l'amylase et de la pullulanase thermostables capables d'hydrolyser les liaisons  $\alpha$ -1, 4 de l'amidon et l'amylose et  $\alpha$ -1, 6 du pullulan et des polysaccharides ramifiés. Ce couple d'endo amylase est désigné sous le nom « amylo-pullulanase » (Mrudula, 2010; Zareian et al., 2010 et Mrudula et al., 2011a).

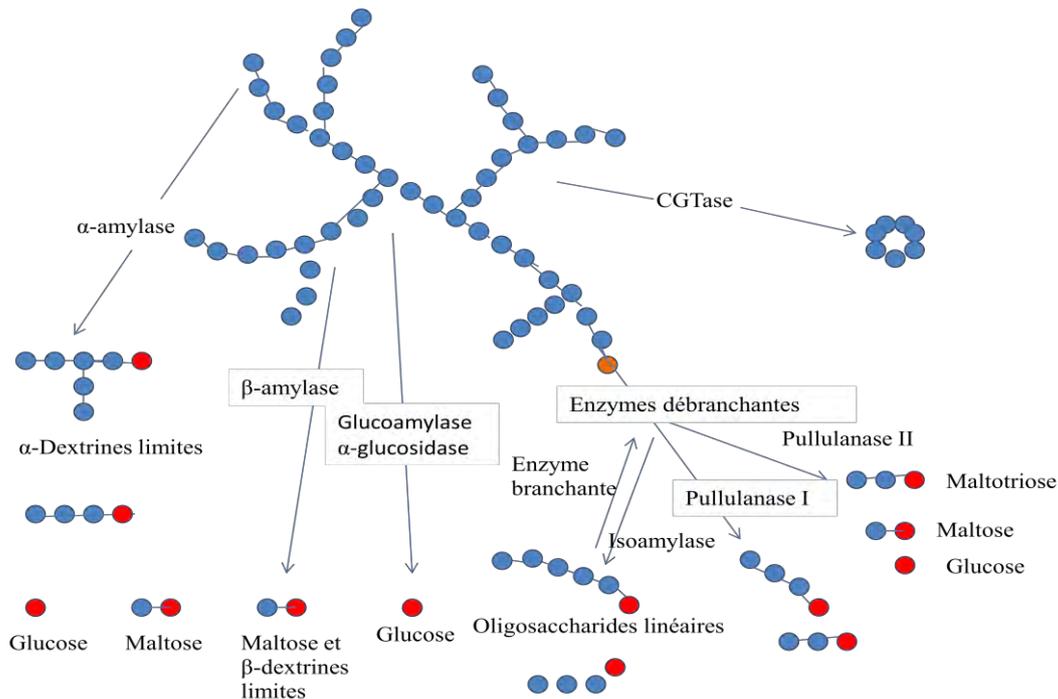
### 2.1. Classification des glycosides hydrolases (ou amylases)

Selon Gupta et al., 2003, Michelin et al., 2010 et l'Union Internationale de Biochimie et de Biologie Moléculaire (UIBMB), les glycosides hydrolases (GH) sont classées en trois grands groupes selon leur mode d'action (Figure 2) :

- Les endoamylases qui hydrolysent les liaisons  $\alpha$ -1,4 de l'amylose et de l'amylopectine (les deux constituants de l'amidon) libérant ainsi des oligosaccharides et des dextrans. Dans ce groupe, nous retrouvons principalement l' $\alpha$ -amylase (EC 3.2.1.1).
- Les exoamylases, elles regroupent la  $\beta$ -amylase (EC 3.2.1.2), l' $\alpha$ -glucosidase (EC 3.2.1.20) et la glucoamylase ou l'amyloglucosidase (EC 3.2.1.3). Leur action libère des sucres de faibles poids moléculaires comme le glucose, le maltose et des oligosaccharides.
- Les enzymes débranchantes, elles, hydrolysent les liaisons  $\alpha$ -1,6 de l'amylopectine. La pullulanase (EC 3.2.1.41) et l'isoamylase (EC 3.2.1.68) appartiennent à ce groupe.

L'action synergique trouvée dans les complexes amylolytiques est bénéfique pour l'hydrolyse totale de l'amidon, du pullulane et des polysaccharides ramifiés.

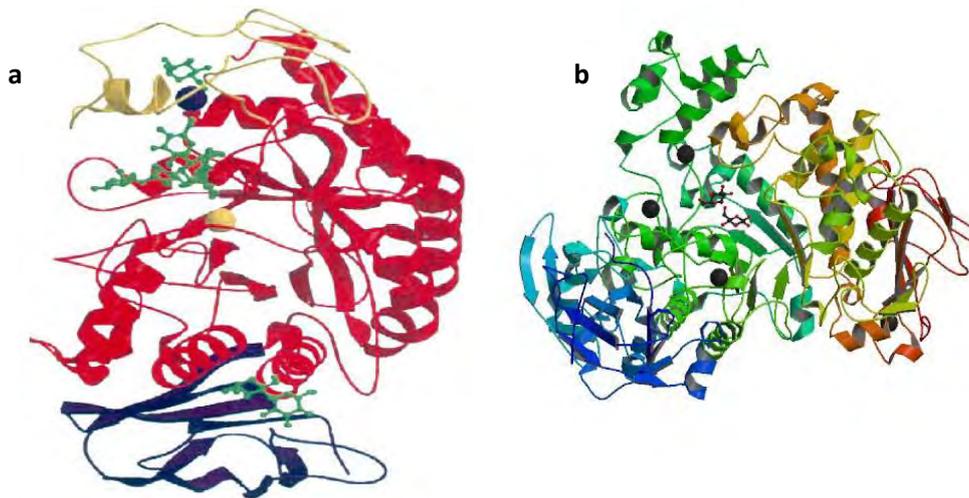
# Etude bibliographique



**Figure 2:** Modes d'action des enzymes amylolytiques (Bertoldo et Antaranikian, 2002).

## 2.2. Structure des enzymes de la famille des amylases

Les amylases appartiennent à la famille 13 des hydrolases glycosidiques (GH) (Henrissat et Davies, 1997). L' $\alpha$ -amylase et la pullulanase possèdent trois domaines A, B et C dans leur structure spatiale, (Figure 3) :



**Figure 3 :** Structure des amylases

**a :** Structure de l' $\alpha$ -amylase (De Souza and De Oliveira, 2010).

Le domaine A est indiqué en rouge, le domaine B en jaune et le domaine C en violet. Dans le centre catalytique, l'ion  $\text{Ca}^{2+}$  est représenté dans la sphère bleue et l'ion chlorure dans la sphère jaune.

Les structures vertes sont liées au site actif et aux sites de liaison de surface

**b :** Structure monomérique de la pullulanase de *Klebsiella pneumoniae*

[www.rcsb.org/pdb/images/2fh8](http://www.rcsb.org/pdb/images/2fh8))

## Etude bibliographique

---

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

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

- Le domaine C, coté C-terminal et a une structure dite en sandwich de feuillets  $\beta$  (Brayer et al., 1995 et Qian et al., 1993) qui participe au repliement post-traductionnel de l'amylase pancréatique de rat, garantissant ainsi l'activité et la sécrétion de cette enzyme (Doyon et al., 2002).

Comme toutes les enzymes, les  $\alpha$ -amylases et les pullulanases sont des glycoprotéines (Stefanova et Emanulilova, 1992, Ara et al., 1995) de structure, généralement, monomérique mais certaines peuvent être tétramériques ou dimériques (Kennedy, 1979). La partie glycosylée des enzymes protège les enzymes contre la dénaturation et la protéolyse (Mouranche et Costes, 1985).

La thermorésistance des amylases peut être expliquée en partie par leur richesse en acides aminés acides (Asp et Glu) (Larpen et Larpen-Gourgand, 1997).

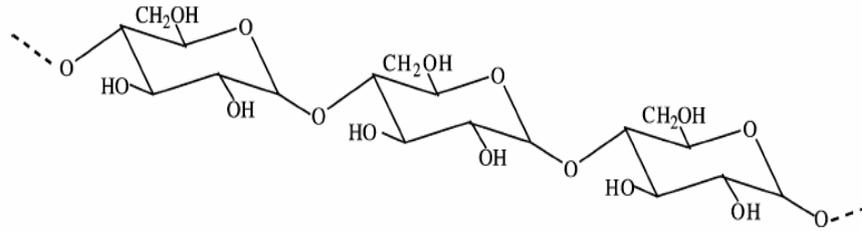
La fonction thiol des  $\alpha$ -amylases n'est pas présente dans le site actif (Kennedy, 1978) mais impliquée dans la liaison du calcium à l'enzyme (Mouranche et Costes, 1985).

### 2.3. $\alpha$ -amylase

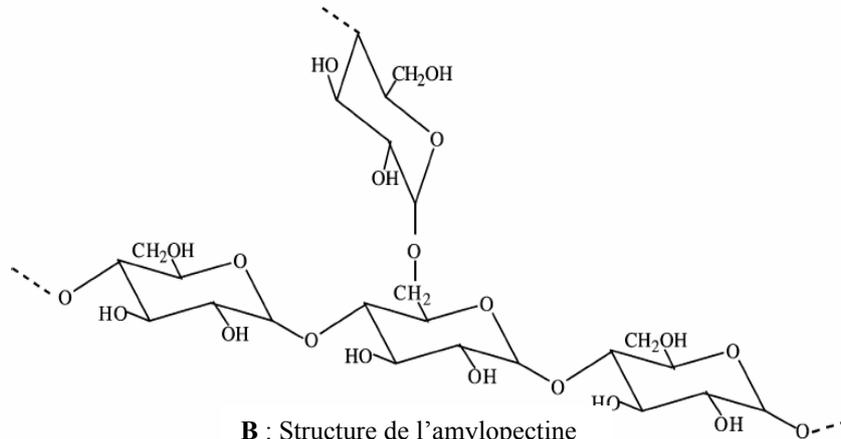
C'est une glycosidase (EC 3.2.1.1) qui rompt des liaisons osidiques  $\alpha$ -1,4 des polysaccharides (amidon et glycogène) en libérant du glucose, du maltose et des maltodextrines solubles de taille variable (Elleuche et Antranikian, 2013). Ces maltodextrines renferment des points de ramification car l'enzyme ne peut pas hydrolyser les points de branchement  $\alpha$ -1,6 (Hii et al., 2012a). Le substrat classique de l' $\alpha$ -amylase est l'amidon, constitué de l'amylose et l'amylopectine (Figure 4) :

- L'amylose est un polymère linéaire constitué d'un maximum de 6000 unités de glucose avec des liaisons glycosidiques  $\alpha$ -1,4.
- L'amylopectine est composée de courtes chaînes linéaires de 10 à 60 unités de glucose liées par  $\alpha$ -1,4 et liées par  $\alpha$ -1,6 à des chaînes latérales avec 15 à 45 unités de glucose.

## Etude bibliographique



A : Structure de l'amylose



B : Structure de l'amylopectine

**Figure 4** : Structure de l'amidon, **A** Amylose, **B** : Amylopectine

### 2.3.1. Sources de l' $\alpha$ -amylase

Les  $\alpha$ -amylases sont universellement distribuées à travers les règnes animal, végétal et microbien (Gupta et al., 2003).

Certaines levures produisent industriellement de l' $\alpha$ -amylase : *Candida tsukubaensis* CBS 6389, *Filobasidium capsuligenum*, *Lipomyces kononenkoae*, *Saccharomycopsis capsularis*, *Saccharomycopsis fibuligera*, *Schwanniomyces alluvius*, *Schwanniomyces castelli*, *Trichosporon pullulans* et *Candida isikubaensis* (Tableau 4).

### 2.3.2. Caractéristiques de l' $\alpha$ -amylase

#### 2.3.2.1. Masse moléculaire

Malgré la grande différence de caractéristiques des  $\alpha$ -amylases microbiennes, leurs masses moléculaires sont généralement dans la même gamme de 40 à 70 kDa (Gupta et al., 2003). Il a été rapporté que l' $\alpha$ -amylase de *Chloroflexus aurantiacus* possède le poids moléculaire le plus élevé des  $\alpha$ -amylases avec 210 kDa (Ratanakhanokchai et al., 1992). Gupta et al., 2003, ont signalé que l' $\alpha$ -amylase de *Bacillus caldolyticus* a un poids moléculaire de 10 kDa représentant la valeur la plus faible. Cette masse moléculaire peut être augmentée en raison de la glycosylation comme dans le cas de l'enzyme de *T. vulgaris* qui atteint 140 kDa (Omar et al., 2011). En revanche, la protéolyse diminue la masse moléculaire. L' $\alpha$ -amylase de *T. vulgaris* 94-2A (AmyTV1) est une protéine de 53 kDa (Hofemeister et al., 1994).

## Etude bibliographique

### 2.3.2.2. pH

Selon l'origine les  $\alpha$ -amylases levuriennes présentent, généralement, des pH optimum entre 4 à 6 (Panchal, 1990). Les pH optimum des amylases levuriennes sont récapitulés dans le tableau 5.

### 2.3.2.3. Température

La température optimale des  $\alpha$ -amylases varie également selon l'origine du microorganisme. Elle varie de 30 à 70°C (Tableau 5). Elle est souvent supérieure à celle de la croissance de la bactérie productrice de l'enzyme. L'enzyme la plus thermostable est celle de la bactérie *Bacillus licheniformis* CUMC 305 qui demeure stable à un traitement thermique à 100°C pendant 4 h (Krishman et Chandra, 1983).

### 2.3.2.4. Métaux

Les ions  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Ag}^{2+}$  et  $\text{Zn}^{2+}$  diminuent l'activité de l' $\alpha$ -amylase de la levure *Cryptococcus sp.* (Iefuji et al., 1996), alors que les ions  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$  et l'EDTA n'ont aucun effet sur l'activité de l'enzyme de la même levure.

**Tableau 5:** Caractéristiques physico-chimiques de quelques  $\alpha$ -amylases levuriennes

Origine de l' $\alpha$ - amylase	Masse moléculaire (Kda)	Température optimale	pH optimum	Références
<i>Candida antarctica</i> CBS 6678	50	62	4.2	De Mot et Varachtert, 1986
<i>Saccharomyces kluyveri</i> YKMS	-	30	5	Moller et al., 2004
<i>Cryptococcus flavus</i>	75	50	5,5	Wanderly et al., 2004
<i>Saccharomycopsis fibuligera</i>	54	-	-	Chi et al., 2009
<i>Lipomyces kononenkoae</i>	38	50	5,5	Spencer-Martins et Van Uden., 1979 Panchal, 1990
<i>Lipomyces kononenkoae</i>	76	70	4,5-5	Prieto et al., 1995
<i>Wickerhamia sp.</i>	54	50	5-6	Hernandez-Montanez et al., 2012
<i>Talaromyces pinophilus</i> 1-95	58	55	4-5	Liang et al., 2015

### 2.4. Pullulanase

#### 2.4.1. Définition et nomenclature

La pullulanase (pullulan  $\alpha$ -glucano hydrolase) (EC 3. 2. 1. 41) est une enzyme de déramification, capable d'hydrolyser les liaisons  $\alpha$ -1,6 contenues dans l'amidon, l'amylopectine, le pullulane et les oligosaccharides apparentés. Comme la plupart des enzymes amylolytiques, la pullulanase est une carbohydase extracellulaire employée dans les processus de saccharification de l'amidon (Ara et al., 1995). De nombreux microorganismes mésophiles, thermophiles et hyperthermophiles sont capables de sécréter ce type spécifique de glucanase (Gomes et al., 2003).

La pullulanase est également connue sous le nom de: dextrinase, amylopectin 6-glucanohydrolase, enzyme debranchante, alpha- dextrine endo-1,6-alpha-glucosidase, R-enzyme, pullulane alpha-1,6- glucanohydrolase.

#### 2.4.2. Sources de la pullulanase

Les pullulanases sont produites par les plantes (l'albumen des semences de riz ; Yamasaki, 2008) et *Sorghum bicolor* var. F-2-20 (Ba et al., 2010) et par les microorganismes comme les bactéries, les champignons et certaines levures (Nisha and Tulasi, 2013).

##### 2.4.2.1. Source bactérienne

De nombreuses bactéries et les archées (mésophiles, thermophiles et hyperthermophiles) sont productrices de pullulanases (Gomes et al., 2003). Les bactéries anaérobies thermophiles synthétisent principalement des amylopullulanases: *Clostridium thermosulfurogenes* (Spreinat et Antranikian, 1990; Antranikian et al., 1987), *C. thermohydrosulfuricum* Z 21-109 (Saha et al., 1990), *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* (Ganghofner et al., 1998) et *Thermococcus profundus* (Kwak et al., 1998).

Les bactéries aérobies et thermophiles, comme les espèces de *Bacillus* et *Geobacillus*, sont identifiées comme productrices d'amylopullulanase: *Bacillus sp.* 3183 (Shen et al., 1990), *Bacillus circulans* F-2 (Kim et Kim, 1995), *Bacillus sp.* TS-23 (Lin et al., 1998), *Bacillus sp.* KSM-1378 (Ara et al., 1995), *Bacillus sp.* DSM 405 (Brunswick et al., 1999), *Geobacterium thermoleovorans* NP33 (Noorwez et al., 2006). *Bacillus sp.* US 149 (Roy et al., 2003) et *G. stearothermophilus* L14 (Zareian et al., 2010). Les archées hyperthermophiles *Pyrococcus furiosus*, *P. woesei*, *Thermococcus litoralis* et *Thermococcus hydrothermalis* sont également capables de produire des amylopullulanases très thermostable (Koch et al., 1990; Brown et Kelly 1993; Rudiger et al., 1995; Dong et al., 1997 et Erra-Pujada et al., 1999.).

##### 2.4.2.2. Source fongique

Peu d'études sont consacrées à des pullulanases fongiques :

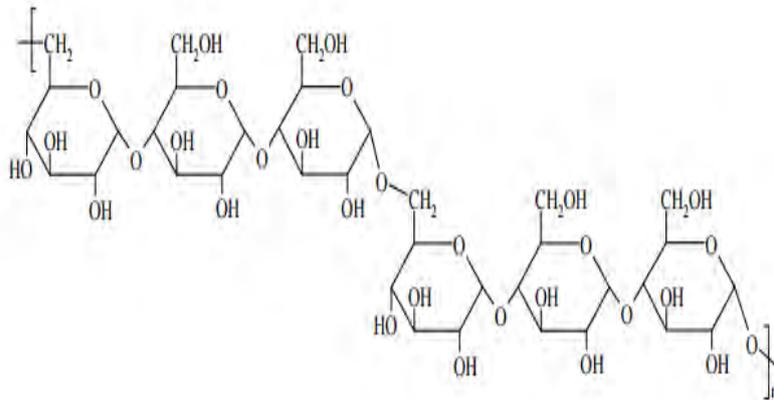
- Chez les levures, De Mot et al., 1984 ont étudié la production d'enzymes extracellulaires dégradant le pullulane par plusieurs souches de levures amylolytiques. L'activité pullulanase, la plus élevée, est obtenue avec des espèces d'*Endomycopsis*, de *Lipomyces*, de *Filobasidium*, de *Leucosporidium* et de *Trichosporan*. Moubasher et al., 2010, ont également purifié la pullulanase de type I chez la levure *Aureobasidium pullulans*.

## Etude bibliographique

- Chez les moisissures Mizuno en 2008 a mis en évidence chez *Aspergillus niger* ATCC 9642 la présence d'une isopullulanase qui hydrolyse le pullulane à 40°C et produit de l'isopanose.

### 2.4.3. Les types de pullulanase et leur substrat

Le pullulane est un glucane extracellulaire synthétisé par le champignon *Aureobasidium pullulans*, lorsqu'il est cultivé sur un milieu contenant du glucose ou du saccharose (Kim et al., 1990a). Ce polysaccharide est composé d'unités polymérisées de maltotriose (liaison  $\alpha$ -1, 6) sous forme linéaire (Figure 5) (Catley et Whelan, 1971) avec un ratio 2 : 1 de liaisons  $\alpha$ -1,4-glucano et  $\alpha$ -1,6-glucano (Kim et al., 1990a). Le plus souvent il est employé comme substrat modèle pour le dosage des enzymes déramifiantes (Plant et al., 1986).



**Figure 5** : Structure du pullulane

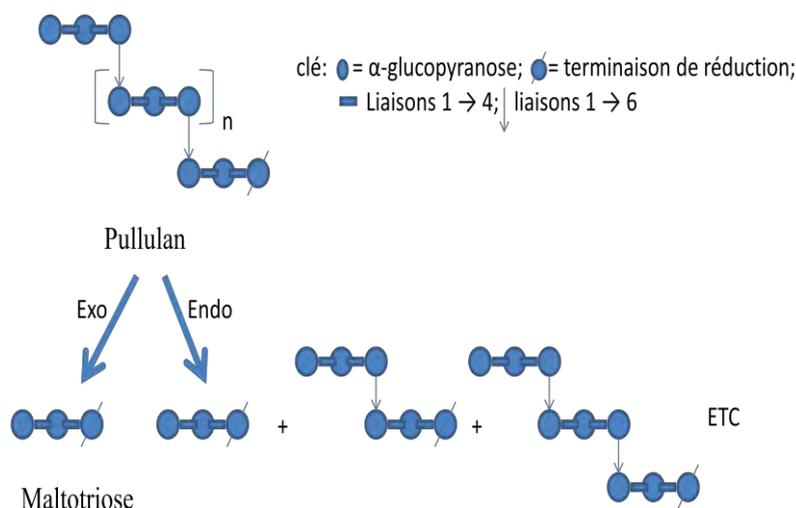
Le pullulane est uniquement soluble dans l'eau pour former une solution transparente, incolore et visqueuse (Shingel, 2004). Il a des applications potentielles dans les IAA, les produits pharmaceutiques et les industries biomédicales (Shingel, 2004 et Singh et al., 2008). La masse moléculaire du pullulane varie de 1,5 à 810 kDa.

La pullulanase attaque le pullulane par l'un des deux modes d'action (représenté sur la figure 6) :

- Une exo-action dans laquelle l'hydrolyse est limitée à la liaison glycosidique  $\alpha$ -1, 6, la plus proche de l'extrémité non réductrice, avec la libération progressive du maltotriose.

- Une endo- action où l'enzyme hydrolyse les liaisons glycosidiques  $\alpha$ -1, 6 interne et externe, avec la production mixte de l'hexa-, nona- et des oligosaccharides plus grands, en plus de maltotriose (Drummond et al., 1969).

## Etude bibliographique



**Figure 6:** Modes d'action possibles de la pullulanase

La pullulanase hydrolyse l'amidon ou le glycogène, par rupture de liaisons  $\alpha$  -1,6 glycosidiques. La pullulanase type II est également capable d'hydrolyser les liaisons  $\alpha$  -1, 4 (Tableau 6) (Malakar et al 2010).

**Tableau 6:** Spécificités d'action des pullulanases

Type de pullulanase	Nombre EC	Liaisons hydrolysée	Substrat préféré	Produits formés	Références
<b>Pullulanase type I</b>	3.2.1.41	$\alpha$ -(1,6)	Oligo- et polysaccharides	Maltotriose	Kim et al., 1996 et Bertoldo et antranikian, 2002
<b>Pullulanase type II (amylopullulanase)</b>	3.2.1.41	$\alpha$ -(1,6) $\alpha$ -(1,4)	Pullulane, Poly- et oligosaccharide (Amidon)	Malotriose, Mélange de glucose, maltose, et maltotriose	Duffner et al., 2000; Leveque al., 2000 et Roy et al., 2003 ; Zareian et al., 2010
<b>Pullulan hydrolase type I (neopullulanase)</b>	3.2.1.135	$\alpha$ -(1,4)	Pullulane	Panose	Ara et al., 1995 et Sunna et al., 1997
<b>Pullulan hydrolase type II (isopullulanase)</b>	3.2.1.57	$\alpha$ -(1,4)	Pullulane	Isopanose	Van der Maarel et al., 2002
<b>Pullulan hydrolase type III</b>	3.2.1.—	$\alpha$ -(1,4) et $\alpha$ -(1,6)	Pullulane Amidon, amylose, et amylopectin	Mélange de panose, maltose, et maltotriose Maltotriose et maltose	Niehaus et al., 2000

## Etude bibliographique

---

### 2.4.4. Régulation de la production de la pullulanase : Induction/ répression

Comme la plupart des enzymes, la régulation de la pullulanase est régie par des systèmes à induction / répression et une connaissance de ce mécanisme pourrait contribuer à la conception d'un milieu efficace d'induction rapide et économique de l'enzyme (Nair et al., 2007). L'enzyme est inductible par des polysaccharides avec des liaisons d' $\alpha$ -(1, 6), le maltose (Antranikian, 1992). Le pullulane peut améliorer la synthèse de la pullulanase chez *B. cereus* (Nair et al., 2007) ou l'inhiber (Asha et al., 2013), ce qui suggère la répression de l'enzyme par son substrat.

### 2.4.5. Effet de la composition du milieu sur la production de la pullulanase

#### 2.4.5.1. Source de carbone

La source de carbone varie selon les microorganismes. La farine de la pomme de terre à 20% est la meilleure source pour la production de la pullulanase de *C. thermosulfurogenes* SV2 (Swamy et Seenayya 1996 et Ramesh et al. 2001). L'amidon, la dextrine et le pullulane stimulent la synthèse de la pullulanase (Melasniemi 1987). Le pullulane montre un effet inhibiteur pour l'enzyme de *T. thalophilus*, *B. stearothermophilus* KP1064 (Suzuki et Chishiro 1983) et *A. aerogenes* (Ohba et Ueda, 1973) et un effet activateur pour l'enzyme d'*A. aerogenes* (Nisha et Tulasi, 2013).

#### 2.4.5.2. Source azotée

La source azotée est un facteur important pour la croissance et la production de la pullulanase. L'activité de la pullulanase semble être également induite par l'extrait de levure (Nair et al., 2006) et la limitation sévère de l'azote déprime l'induction de la pullulanase (Nair et al. 2007). La tryptone est utilisée pour la production de cette enzyme chez *P. furiosus* (Brown et Kelly, 1993), *P. woesei* (Rudiger et al., 1995), *T. ethanolicus* 39E (Mathupala et al., 1993), *T. thermosaccharolyticum* (Ganghofner et al. 1998) et *C. thermohydrosulfuricum* (Melasniemi 1987). La peptone est employée pour la production maximale d'amylopullulanase par *C. thermosulfurogenes* SVM17 (Mrudula 2010).

### 2.4.6. Caractéristiques des pullulanases

#### 2.4.6.1. Masse moléculaire

Contrairement à la masse moléculaire de l' $\alpha$ -amylase, celle de la pullulanase est plus élevée et varie de 55 à 450 kDa selon les souches (Tableau 7) : 90 à 450 kDa pour la pullulanase type II. L'amylopullulanase de *T. thalophilus* a une masse moléculaire de 79 à 210 kDa (Odibo et Obi, 1988). A travers ces valeurs nous pouvons déduire que certaines pullulanases sont monomériques et d'autres oligomériques.

## Etude bibliographique

**Tableau 7** : Quelques propriétés des pullulanases

Micro-organisme	PM (kDa)	pI	pH optimal	Température optimale (°C)	Référence
<b>Type I</b>					
<i>Bacillus flavocaldarius</i> KP 1228	55	-	7	75-80	Suzuki et al., 1991
<i>Fervidobacterium pennavorans</i> Ven 5	240	-	6	85	Bertoldo et al. , 1999
<i>Aureobasidium pullulans</i>	73	-	-	-	Moubasher et al., 2010
<b>Type II</b>					
<i>Thermoanaerobacter sp.</i> B6A	450	4.5	5	75	Saha et al., 1990
<i>Pyrococcus furiosus</i>	110	-	5.5	98	Brown et Kelly, 1993
<i>Pyrococcus woesei</i>	90	-	6	100	Rudiger et al., 1995
<i>Desulfurococcus mucosus</i>	-	-	5	100	Canganella et al., 1994
<b>Isopullulanase</b>					
<i>Aspergillus niger</i> ATCC 9642	69–71	-	3.5	40	Mizuno, 2008
<i>Bacillus sp.</i> US 149	200	-	5	60	Roy et al., 2003
<b>amylopullulanase alcaline</b>					
<i>Bacillus sp.</i> KSM-1876	120	5.2	10-10.5	50	Ara et al., 1992
<i>Bacillus sp.</i> KSM 1378	210	4.8	9.5	50	Ara et al., 1995
<b>Pullulane hydrolase type III</b>					
<i>Thermococcus aggregans</i> expressed in <i>E. coli</i>	-	-	6.5	95	Niehaus et al., 2000

### 2.4.6.2. pH

Le pH a une grande influence sur le métabolisme de l'amidon. La plupart des pullulanases ont des pH optimum acides ou neutres, mais certaines ont des pH optimum alcalin (Tableau 7).

### 2.4.6.3. Température

La température est le paramètre le plus important qui affecte, à la fois, la croissance et la sécrétion des enzymes extracellulaires. La température optimale de la pullulanase se situe entre 40°C et 50°C (Tableau 7). La température optimale des pullulanases thermoactives des archées hyperthermophiles est de 85 °C pour *Pyrococcus woesei* (Rudiger et al, 1995) et 105°C pour *Pyrococcus furiosus* (Brown et al. 1990 et Brown and Kelly, 1993). La thermostabilité de la pullulanase est maintenue, même en absence de substrat et des ions Ca<sup>2+</sup> (Bertoldo and Antranikian, 2002).

### 2.4.6.4. Minéraux et certains oligoéléments

Ces éléments sont indispensables à la croissance des microorganismes et à la production d'enzymes. Les sels minéraux comme le chlorure d'ammonium, le nitrate d'ammonium et le sulfate d'ammonium constituent une source d'azote utilisée pour la culture et la production de l'enzyme de bactéries: *Bacillus sp.* 3183 (Saha et al. 1989 b), *Bacillus sp.* DSM 405

## Etude bibliographique

---

(Brunswick et al. 1999), *Bacillus sp.* KSM-1378 (Ara et al.1995), *Bacillus sp.* TS-23 (Lin et al. 1998), *B. circulans* F-2 (Sata et al.1989) et *G. thermoleovorans* NP33 (Noorwez et al.2006). L'activité de la pullulanase est fortement inhibée par certains cations à 0,2 mM :  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ . Par contre, les cations  $\text{Ca}^{2+}$  augmentent l'activité de la pullulanase de *Bacillus cereus* HI5 de 179%. (Hii et al., 2009 b).

### 2.5. Aspect économique des enzymes

En 2015, Le marché globale pour les enzymes est d'environ de 7,4 milliard \$ et il est prévu d'avoir un taux de croissance annuel moyen de 6,5 % ( Reiss, 2007). Les amylases sont l'une des enzymes industrielles les plus importantes couvrant, en 2015, 30,5% du marché mondiale des enzymes après les lipases qui constituent 38,5 % de ce marché (Morvan, 2010).

La part des carbohydrases constituées d' $\alpha$ -amylases, d'isomérases, de pectiques et de cellulases est environ de 40 %. Les secteurs de l'alimentation et les boissons utilisent 90 % des carbohydrases produites. La vente annuelle des  $\alpha$ -amylases dans le marché est estimée d'être de 11 millions \$. Et la production mondiale des  $\alpha$ -amylases de *B.licheniformis* et d'*Aspergillus sp.* est environ de 300 tonnes d'enzymes pures par an (Swetha et al., 2006).

### 2.6. Application industrielle de la pullulanase et de l' $\alpha$ -amylase

La pullulanase est l'une des enzymes débranchantes largement utilisée avec l' $\alpha$ -amylase dans l'industrie de l'amidon pour la production de différents sirops de sucre (Parakash et al., 2012). Par les progrès biotechnologiques, l'application de la pullulanase est étendue à la chimie pharmaceutique, à l'industrie chimique (détergents pour lave-vaisselle automatique), à la panification et à la production de cyclodextrines, molécules à intérêt pharmaceutiques (Prakashe et al., 2012).

#### 2.6.1 En glucoserie

Dans les industries de sirop de sucre, l' $\alpha$ -amylase conduit à la préparation de mélanges d'oligosides linéaires et ramifiés connus commercialement sous le nom de maltodextrines ou de sirop de glucose. Quant à la pullulanase, elle achève l'hydrolyse de l'amidon initiée par l' $\alpha$ -amylase ce qui augmente la qualité des sirops de sucre. Le traitement de l'amidon simultanément avec l' $\alpha$ -amylase et la pullulanase stimule l'efficacité de la réaction de saccharification et génère des rendements plus élevés du produit final (Saha et al., 1988; Silva, 2005 et Nair et al., 2006). Les amylases ( $\alpha$ -amylase et pullulanase), ayant des pH supérieurs à 8.0, ont des applications potentielles pour la saccharification de l'amidon dans les industries de l'amidon (Kim et al., 1995). La pullulanase permet la déramification de l'amidon de maïs dans la production de certains édulcorants à base de maïs (Bertoldo et Antranikian, 2002 et Haki et Rakshit, 2003).

#### 2.6.2. En industrie de la transformation de l'amidon

La pullulanase est utilisée pour préparer les amidons à haute teneur en amylose. Ils font l'objet d'une demande énorme sur le marché (Vorwerg et al., 2002). Les amidons à haute

## Etude bibliographique

---

teneur en amylose sont d'un grand intérêt et peuvent être transformés en «amidon résistant» qui présente des avantages nutritionnels (Bird et al., 2000). Contrairement à l'amidon normal, l'amidon résistant est non digéré dans l'intestin grêle mais il est fermenté dans le gros intestin par des bactéries de l'intestin pour former des acides gras à chaîne courte (butyrate), bénéfiques pour la santé du côlon (Jobling, 2004 et Hii et al., 2012a).

### 2.6.3. En panification

L'amidon et les enzymes responsables de sa modification sont utilisés par les industries de cuisson en grande quantité dans le monde entier. L'un des problèmes majeur auquel est confronté l'industrie de cuisson est l'effet de rassissement (Zobel et Kulp, 1996). Ce dernier conduit à une augmentation de la fermeté de mie, une perte de netteté de la croûte, une réduction de la teneur en humidité de la mie et de la saveur du pain. Ceci réduit considérablement la qualité du pain et autres produits (Hug-Iten et al., 2003). Ce problème est essentiellement résolu par les traitements chimiques. Mais de nos jours, les consommateurs préfèrent le traitement enzymatique, donc biologique, avec moins d'effets néfastes sur la santé. De plus, la pullulanase supprime le brunissement enzymatique anti-rassissement (Noorwez et al., 2006), ce qui améliore la qualité organoleptique du pain. L'addition d'une petite quantité de l' $\alpha$ -amylase dans la farine augmente la production de gaz carbonique après fermentation et conduit ainsi à l'obtention d'un pain aéré et très léger (Pandey et al., 2000).

### 2.6.4. En brasserie

Pendant le brassage de la bière, l'amidon est décomposé par l' $\alpha$ -amylase en dextrans et en sucres fermentescibles pour former un moût sucré. Le houblon est bouilli avec le moût sucré pour produire le moût houblonné. Les levures agissent alors sur le moût houblonné ultimement pour produire de la bière (Prakash et al., 2012). La pullulanase est ajoutée pendant l'étape de brassage de la production de bière pour rompre les points de branchement de l'amidon  $\alpha$ -1,6, ce qui conduit à la fermentescibilité maximale du moût (Klosowski et al., 2010). En conséquence, on enregistre une augmentation du rendement en pourcentage de la production de la bière à faibles calories (Gaouar et al., 1998).

### 2.6.5. En industrie des détergents

Divers enzymes alcalines ( $\text{pH} \geq 8.0$ ) (protéases,  $\alpha$ -amylases, pullulanases, lipases cellulases) sont utilisées comme additifs dans les détergents (Kim et al., 1995 ; Hatada et al., 2001 et Schallmey et al., 2004). L'utilisation d'enzymes dans les détergents a augmenté ces dernières années. De nos jours, 90 % de tous les détergents contiennent ces enzymes (Gupta et al., 2003 et Mitidieri et al., 2006). Les amylases ( $\alpha$ -amylase et pullulanase à  $\text{pH} \geq 8.0$ ) ont des applications potentielles pour la saccharification de l'amidon et les textiles et sont également utilisées dans l'industrie des détergents pour les lave-vaisselles automatiques et les blanchisseries (Kim et al., 1995; Hatada et al., 2001; Schallmey et al., 2004 et Mukherjee et al., 2009).

## Etude bibliographique

---

L'efficacité des enzymes de déramification alcaline peut être améliorée dans l'eau de lavage quand elle est utilisée en combinaison avec l' $\alpha$ -amylase alcaline (Ara et al., 1995), car le chlore est un activateur de l'enzyme (Aghajari et al., 2002).

### 2.6.6. En industrie du textile

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

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

### 2.6.7. En industries des cyclodextrines (CD)

La production de CD est très simple et comprend un traitement de l'amidon ordinaire avec un ensemble d'enzymes de modification de l'amidon. Communément, la cyclodextrine glycosyltransférase (CGTase) est utilisée avec des  $\alpha$ -amylases, mais les liaisons osidiques  $\alpha$ -1, 6 d'amylopectine bloquent l'action de la CGTase (Szejtli, 1998 et Prakash et al., 2012). Ces liaisons sont rompues par la pullulanase et par conséquent, le rendement de la production de cyclodextrines augmente (Jacob et Rendleman, 1997). Ces produits sont utilisés dans le domaine médical et pharmaceutique comme stabilisants pour les odeurs de masquage (Prakash et al., 2012).

### 2.6.8. Dans le diagnostic et en industries pharmaceutiques

Dans le domaine de diagnostic médical le taux de l' $\alpha$ -amylase dans les liquides biologiques est un marqueur pour déceler certaines pathologies : insuffisance rénale, insuffisance cardiaque, oreillons, cancer du pancréas, etc..... (Panday et al., 2000).

Dans le domaine pharmaceutique l' $\alpha$ -amylase est un anti-inflammatoire (Pandey et al., 2000). Les  $\alpha$ -amylases fongiques (résistantes à l'acidité) en association avec des cellulases sont des médicaments aides digestifs pour éviter les dyspepsies et les fermentations intestinales (Rivière, 1975).

Les cyclodextrines (CD), produites après action des pullulanases, permettent d'augmenter la solubilité et l'absorption des médicaments. La quantité nécessaire de produit étant ainsi très réduite, elle entraîne une diminution des effets indésirables (irritations d'estomac) et des coûts financiers (Prakash et al., 2012).

### 2.6.9. Dans la production des gommages alimentaires

Des gommages alimentaires sont des polysaccharides obtenus à partir de sources naturelles. Ces substances, ajoutées même en faible concentration aux solutions, provoquent une augmentation de la viscosité. Elles sont donc utilisées comme agents épaississants, agents gélifiants, agents émulsifiants et des stabilisants dans les IAA (Prakash et al., 2012). En outre, elles sont utilisées dans d'autres industries comme agents liants des adhésifs, agents de clarification, agents d'encapsulation, agents flocculant, stabilisateurs de mousse et agents gonflants (Prakash et al., 2012). Une des gommages naturelles est la gomme de caroube (LBG: locust bean gum). Il s'agit d'un galactomannane (Springer, 1990) extrait des graines de caroubier dont l'extraction est difficile d'où son prix élevé.

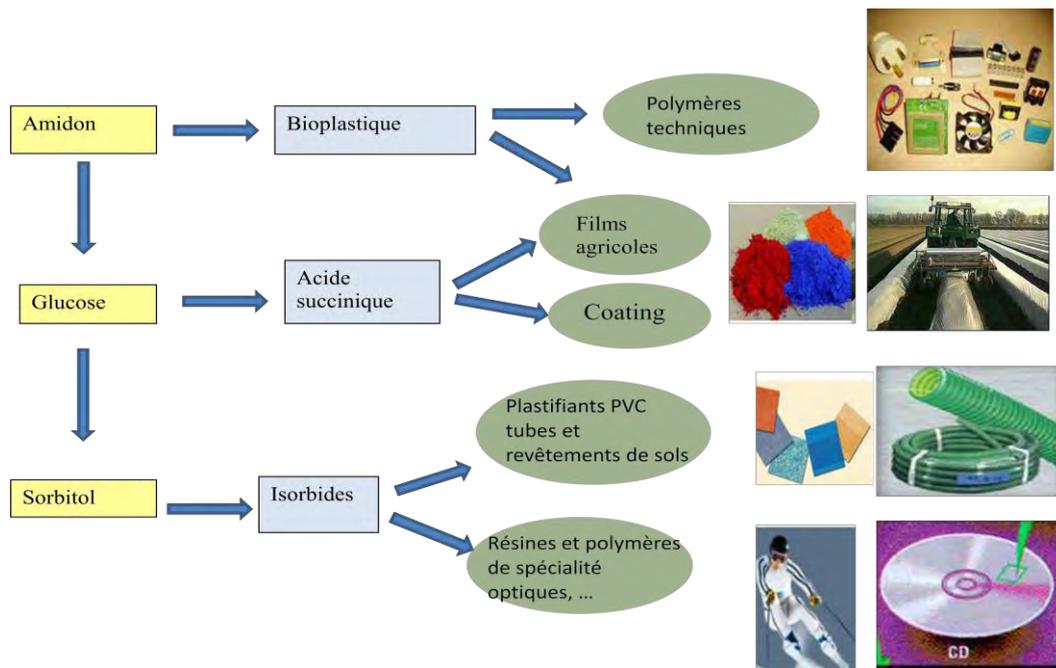
Ce problème est résolu par l'utilisation de la pullulanase sur le galactomannane de guar. La pullulanase supprime les résidus de galactose provenant de la galactomannane de guar pour produire des galactomannanes de guar modifiés (Mysore et al., 2008). Ces derniers ont les mêmes propriétés fonctionnelles que la gomme de caroube avec de meilleures propriétés rhéologiques comme la viscosité et l'élasticité (Shobha et Tharanathan, 2009). Ces galactomannanes modifiés peuvent être ainsi utilisés pour diverses applications alimentaires et non-alimentaires de la gomme de caroube.

### 2.6.10. En bioraffinerie

La demande des enzymes amylolytiques a augmenté suite aux crises énergétiques pétrolières. Pour faire face à la raréfaction du pétrole, la bioraffinerie est apparue depuis 2006 (Rifkin, 2012).

Le concept de bioraffinerie ou raffinerie du végétal se base sur l'hydrolyse enzymatique totale des polysaccharides, cellulose et amidon, en glucose. Le glucose sera ensuite transformé en acide succinique pour la fabrication des films agricoles et en coating ou en sorbitol puis en isosorbides pour la fabrication des plastifiants et les matériaux de performances (Figure 7).

Pour permettre l'essor des bioraffineries, des efforts de recherche sont encore indispensables pour augmenter la productivité des enzymes commerciales, notamment celles des enzymes amylolytiques thermostables ( $\alpha$ -amylase et pullulanase) et réduire le coût de production des enzymes, en utilisant des matières premières abondantes et bon marché (Octave et Thomas, 2009).



**Figure 7:** Exemples d'innovation pour de nouvelles bio raffineries (Rifkin, 2012)

## 2.6.11. En papeterie

Les amylases solubilisent l'amidon servant à l'encollage et au couchage du papier (Larpent et Larpent-Gourgand, 1997 et Van Der Maarel et al., 2002). Les amidons à haute teneur en amylose, obtenus grâce à l'action de la pullulanase, sont utilisés dans les produits adhésifs et dans la production de carton ondulé et de papier (Hii et al., 2012 a).

## 2.6.12. Dans la production du bioéthanol

La teneur totale des lentilles d'eau en amidon peut varier de 3 à 75% du poids sec en fonction des espèces des lentilles d'eau (Landolt et Kandeler, 1987). Certaines espèces comme *Spirodela polyrrhiza*, cultivées sur les eaux usées, peuvent contenir une teneur en amidon de près de 59% (Cui et al., 2011). La biomasse de la lentille d'eau est hydrolysée par l'action de l'enzyme pullulanase et l'amyloglucosidase pour produire des sucres réducteurs (Chen et al., 2007). Ces sucres sont ensuite convertis en bioéthanol. Le taux global de la conversion de l'amidon, par l'action de la pullulanase, est très élevé (Prakash et al., 2012).

## 2.6.13. En industrie des boissons

Dans l'industrie des boissons, l' $\alpha$ -amylase et la pullulanase hydrolysent l'amidon en sucres fermentescibles dans la fabrication d'alcool éthylique, de boissons sucrées non alcoolisées et de jus de fruits (Mamo et Gessesse, 1999 et Olsen et al., 2000).

## **Chapitre2**

# **Matériel et méthodes**

## 1. Isolement des levures

### 1.1. Echantillonnage

Les microorganismes sont isolés à partir de trois échantillons des grains de blé dur (*Triticum turgidum* var. *durum*) stockés dans trois régions distinctes climatiquement (aride et semi-aride) Constantine, Oum El Bouaghi et Biskra (Figure 8).

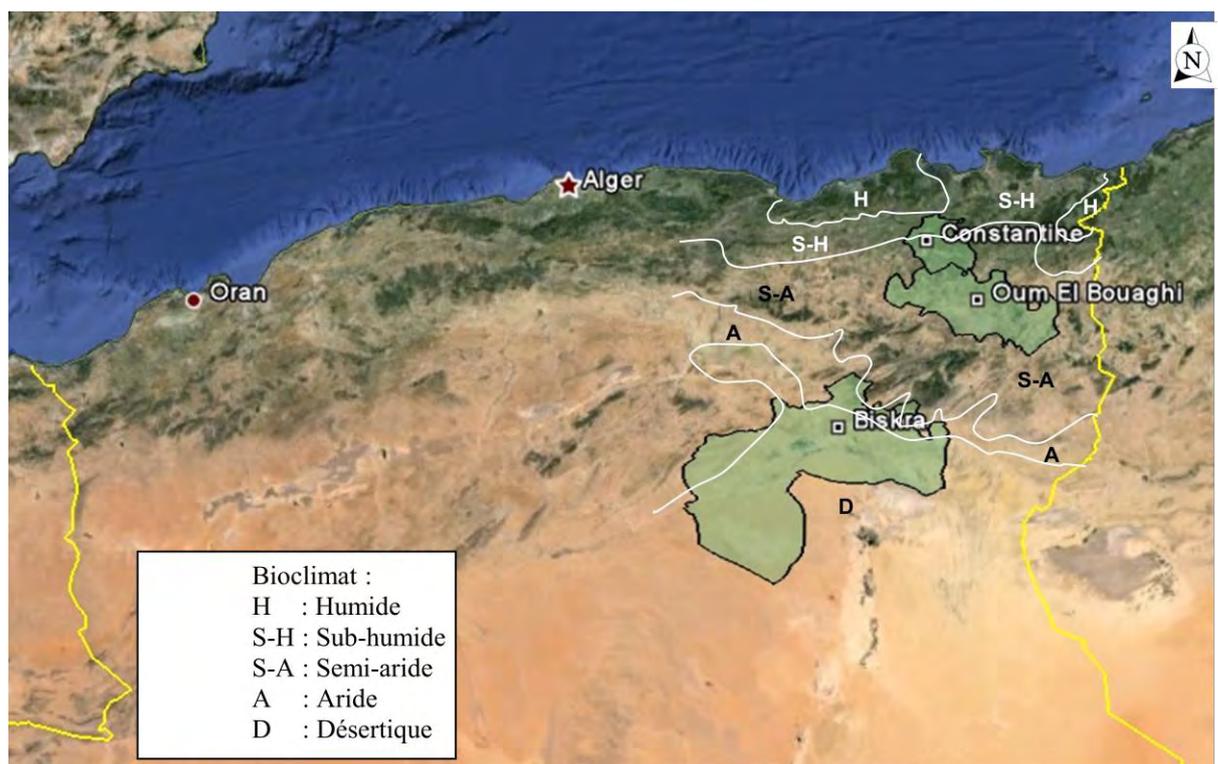
Les grains de blé sont fournis par l'Institut Technique des Grandes Cultures (I.T.G.C.) de Constantine et l'Institut Technique du Développement des Agricultures Sahariennes (I.T.D.A.S.) de Biskra (région aride) et de Oum El Bouaghi.

Pour disposer d'un lot homogène, un échantillon global est constitué par plusieurs prélèvements élémentaires que l'on mélange.

### 1.2. Caractéristiques des régions des prélèvements

- Biskra : Selon la classification de Köppen-Geiger, le climat est de type Bwh. Il s'agit d'un climat désertique ; sec et chaud appelé climat aride. Il est caractérisé par une sécheresse permanente qui dure toute l'année, un manque important d'eau liquide ; on parle plus précisément d'aridité.

La moyenne annuelle des précipitations est de 130 mm (Station météorologique de Biskra).



**Figure 8:** Climatogramme de l'Est algérien

- Constantine : d'après la classification de Köppen-Geiger, le climat est de type Cfb, tempéré et chaud. Des précipitations importantes sont enregistrées toute l'année à Constantine, y compris lors des mois les plus secs. Les précipitations annuelles moyennes sont de 940 mm. La température moyenne annuelle est de 8.6 °C à Constantine.

## Matériel et Méthodes

---

- Oum El Bouaghi : cette région est caractérisée par un climat tempéré chaud ; les précipitations sont plus importantes en hiver qu'en été. Selon la classification de Köppen-Geiger, le climat est de type Csa. Sur l'année, la température moyenne est de 13,6 °C et les précipitations sont en moyenne de 462 mm.

### 1.3. Traitement des grains

Le traitement des grains et l'isolement des souches microbiennes sont réalisés selon Moreau, 1996 et Malloch, 1997.

#### - Triage

Le changement de couleur, de taille ou d'aspect général de la graine permet de suspecter sa contamination intérieure et le triage des grains se fait en fonction de la taille, la couleur et l'aspect de la graine.

#### - Stérilisation des grains

Une désinfection superficielle des grains est réalisée afin de récupérer spécifiquement la microflore interne, installée dans les tissus profonds.

\* Les grains sont immergés dans une solution de HgCl<sub>2</sub> à 2% v/v (HCl concentré) pendant 1 à 2 minutes.

\* Trois rinçages successifs sont effectués dans l'eau distillée stérile (1<sup>er</sup> rinçage: 5 min; 2<sup>e</sup> rinçage : 10 min et 3<sup>e</sup> rinçage : 15 min).

\* Enfin, les grains sont séchés avec du papier filtre stérile.

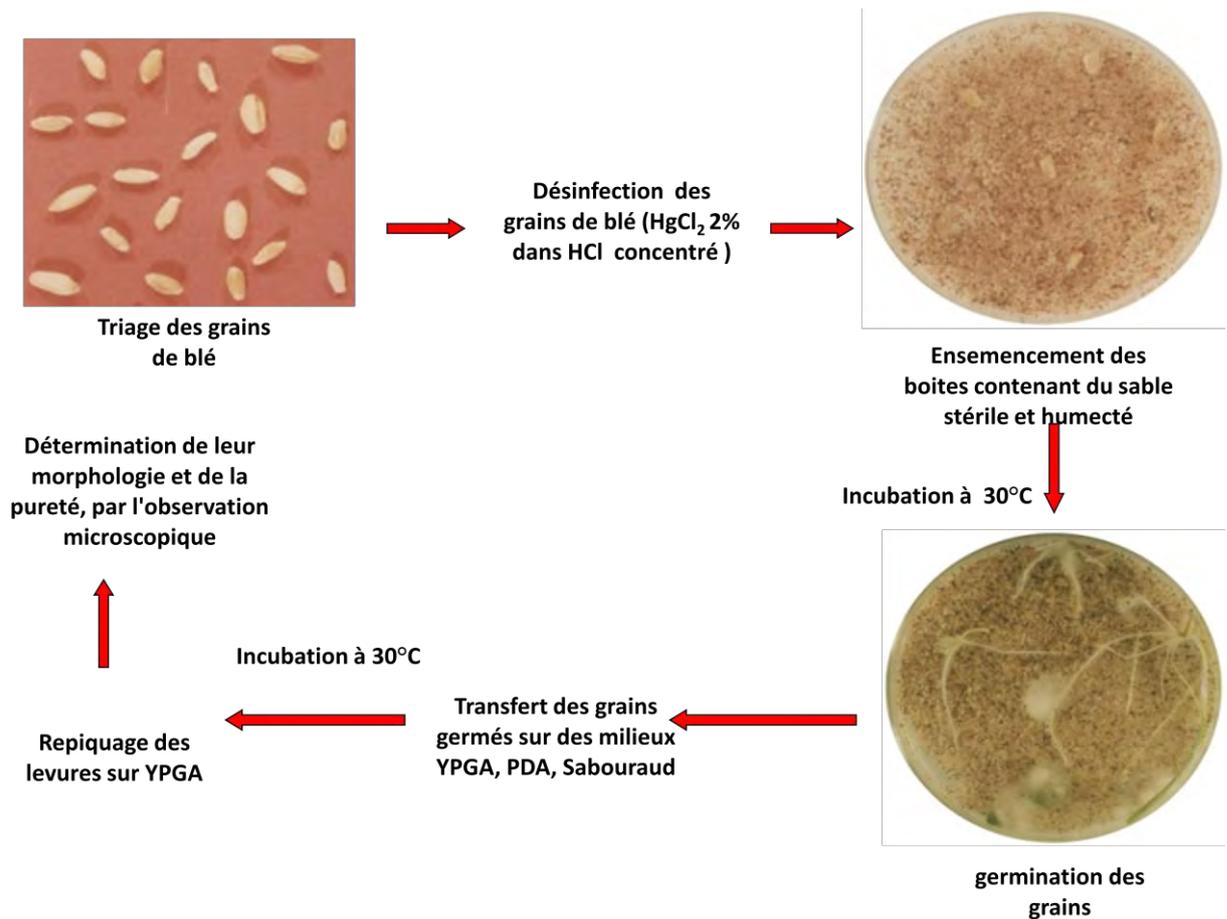
### 1.4. Isolements

Les isolements sont faits à partir des grains de blé désinfectés. Les boîtes de pétri, contenant du sable stérile humecté d'eau distillée stérile, sontensemencées avec 10 grains (Figure 9). Les boîtes sont incubées à 30 °C jusqu'à la germination et l'apparition des mycéliums.

#### 1.4.1. Traitement du sable

Le sable est préalablement traité et stérilisé par :

- Trempage dans du HCl à 3 % pendant 24 h
- Rinçage à l'eau de robinet
- Rinçage à l'eau distillée
- Séchage à l'air libre
- Stérilisation à l'autoclave à 120° C pendant 30 min.



**Figure 9:** Isolement des souches microbiennes

### 1.5. Repiquage des souches

Les grains sont transférés après germination sur des milieux nutritifs tels que le milieu Sabouraud et le milieu YPGA (annexe 1). Le chloramphénicol est ajouté aux milieux de culture afin d'inhiber la croissance bactérienne. Des observations microscopiques sont réalisées sur les petites colonies qui apparaissent sur les boîtes de pétri. Le repiquage de ces colonies est effectué sur de nouveaux milieux de Sabouraud et YPGA. Les boîtes sont incubées 2-3 jours à 30°C.

### 1.6. Purification des souches

Les colonies de levures prélevées sont repiquées en milieu riche, le Yeast Extract Peptone Glucose (YPG) liquide (annexe1).

Après incubation pendant 3 jours à 30°C, la pureté des souches est vérifiée par des :

- étalements par épuisement sur milieu YPGA (annexe1) et examen des cellules au microscope.
- culture sur milieu Chromagar *Candida* contenant des substances chromogènes et où apparaissent des colonies de couleurs différentes suivant les souches.

## 1.7. Conservation des souches

Pour leur conservation, les souches pures retenues sont ensemencées en tubes YPGA inclinés et stockées à + 4°C.

Un autre lot de souches est conservé à -20° C en milieu YPGA avec glycérol comme cryoprotecteur ou entre -20 et -70°C dans des Cryo-Billes.

## 2. Sélection des levures amylolytiques

La sélection des levures amylolytiques est réalisée par la méthode de diffusion sur gélose (plate-test-agar). Cette méthode est une méthode semi quantitative qui est décrite comme suit:

- Préparer les milieux YPSA et YPPA (annexe 1) Rajouter le chloramphénicol à 0,05% pour éviter toute contamination.
- Stériliser et répartir, ensuite, le milieu dans des boîtes de Pétri, à raison de 40 ml de milieu par boîte. Après solidification, un puits de 6 mm de diamètre est creusé dans la gélose à l'aide d'un bout revers de la pipette Pasteur.
- Mettre 60 µl de l'échantillon dans le puits.
- Incuber les boîtes à 40°C pendant 48 heures.

La révélation des zones d'hydrolyse se fait après l'addition de :

- 10 ml de lugol qui donne une zone transparente par rapport aux zones bleues. Contenant l'amidon non hydrolysé.
- 10 ml Rouge Congo 1%, laissé agir 15 min. Des rinçages successifs avec le NaCl (1N) pour

éliminer l'excès du colorant, jusqu'à l'apparition d'une zone transparente; les zones contenant le pullulane non hydrolysé apparaissant rouge (Moubasher et al., 2010).

Les diamètres des zones d'hydrolyse sont mesurés dans chaque boîte. Les boîtes qui montrent un diamètre d'hydrolyse  $\leq 0,5$  cm sont négligées.

## 3. Identification des levures

Elle comprend l'identification phénotypique (morphologiques et physiologiques) et génotypique des souches levuriennes sélectionnées (Guiraud, 1998; Barnett et al., 2000 et Kurtzman et al., 2011b).

### 3.1. Identification phénotypique des souches

L'identification phénotypique des isolats est basée sur les critères morphologiques, culturels et biochimiques.

#### 3.1.1. Caractérisations morphologiques

##### 3.1.1.1. Etude de caractères macroscopiques

- Aspects en milieu liquide

Les souches pures sont ensemencées sur milieu YPG liquide et incubées 3 jours à 30°C. Au cours de cette incubation on vérifie la présence d'un trouble ou non, d'un voile, d'un anneau, de dépôt granuleux poussiéreux et la formation de gaz.

## Matériel et Méthodes

---

### - Aspects en milieu solide

Les souches pures sont repiquées sur YPG gélosé par la méthode des stries par épuisement. Les boîtes sont incubées 3 jours à 30°C puis laissées à la lumière et à la température ambiante pour favoriser l'apparition éventuelle de pigment.

L'observation des colonies se fait par une loupe binoculaire, leur forme (contour régulier ou irrégulier, convexes ou concaves), leur aspect (brillant ou mat) et l'observation de la chromogénèse sur milieu Chromagar.

### 3.1.1.2. Etude de caractères microscopique

#### - Forme et taille des cellules

L'examen microscopique à l'état frais (grossissement x40 et/ou grossissement x100) a permis l'étude de la forme des cellules et leur taille, ainsi que les différentes organisations des levures. Cette étude est réalisée sur des cultures jeunes en milieu YPG liquide et YPGA.

#### - Mode de reproduction

- Reproduction asexuée (végétative)

Le mode de reproduction végétative est observé sur une lame à l'état frais ou fixée par coloration au bleu de méthylène.

- Reproduction sexuée

Les tubes de milieu de sporulation MacClary's acétate gélosé incliné (annexe1) sont ensemencés par la levure *Clavispora lusitaniae* ABS7. Ils sont incubés de 1 semaine à 1 mois, à 30°C. Un étalement sur lame a été effectué à partir de ces tubes de gélose de sporulation inclinée. Ces lames sont ensuite observées au microscope à l'état frais ou colorées au bleu de méthylène.

#### - Test de filamentation

Deux méthodes sont utilisées pour déterminer le type de filamentation:

- Culture sur lame : La levure est inoculée sur un petit carré (1 cm x 1 cm) de milieu PDA ou CMA (annexe1) déposé sur une lame, par strie. La lame est déposée en boîte de pétri stérile sur un support (une baguette de verre en U) et recouverte d'une lamelle stérile. Les boîtes de Pétri sont incubées à 30° C pendant 3 jours (Guiraud 1998 et Zaitlin et al. 2003).L'observation microscopique se fait aux grossissements x 40 et x100. La bordure de la culture est examinée.

- Milieu R.A.T.: Le test de filamentation est aussi effectué sur milieu R.A.T. (Rice Agar Tween) (annexe1). Cette manipulation s'est déroulée au sein du laboratoire GEIHP (Groupe d'Etude des Interaction Hôte Pathogène) du professeur J. P. Bouchara, de la manière suivante :

- \* - Couler le milieu R.A.T. dans de petites boîtes de Pétri,
- \* - Une fois solidifié, faire des stries à l'aide d'un bistouri,
- \* - Préparer une suspension de cellules McFarland 2,
- \* - Ensemencer le milieu au niveau des stries,
- \* - Incuber à 30°C pendant 48h à 72h.
- \* - Faire les observations microscopiques.

### 3.1.2. Caractéristiques physiologiques

#### 3.1.2.1. Fermentation des sucres

L'étude du métabolisme des glucides par la voie de la fermentation est réalisée en tubes de milieu liquide renfermant chacun une cloche de Durham.

L'utilisation de dix sucres à fermenter est expérimentée. Il s'agit du : D-glucose, D-galactose, D-maltose, D-saccharose, D-lactose, D-raffinose, Tréhalose, Mélibiose, Cellobiose et Mélézitose à une concentration finale en sucre de 2% et du raffinose à 4 %. Les solutions de sucres sont stérilisées par filtration sur membrane (Guiraud, 1998).

Les tubes contenant le milieu de Wickerham (annexe 1) sont ensemencés avec une goutte d'une suspension de la levure à tester. Les cultures sont incubées à 40°C pendant 48 heures à 3 semaines (à raison d'une lecture tous les deux jours). La présence de gaz dans la cloche, et éventuellement le virage au jaune de l'indicateur coloré, témoignent d'une fermentation du sucre incriminé.

#### 3.1.2.2. Assimilation des composés carbonés

##### - Galerie API ID32C

La galerie ID 32C est un système standardisé pour l'identification des levures, contenant 32 tests d'assimilation miniaturisés. Cette manipulation a été effectuée au sein du Laboratoire de Parasitologie et de Mycologie de l'hôpital d'Angers.

##### - Principe de la galerie API

La galerie 32C comporte 32 cupules contenant chacune un substrat carboné sous forme déshydraté, remplies d'un milieu semi-solide (API C Medium) préalablement inoculé.

Quelques colonies sont transférées dans de l'eau distillée stérile jusqu'à une opacité Mac Farland 2. 250 µl de cette suspension sont transférés dans une ampoule de milieu semi-solide API C fournie par le fabricant. Après homogénéisation, chaque cupule de la galerie est inoculée par 135µl de milieu ensemencé. La galerie recouverte d'un couvercle est mise à incuber à 30°C pendant 48h.

Des lectures visuelles sont réalisées après 24 h et 48 h d'incubation. La présence éventuelle d'un trouble est notée après comparaison au contrôle (O) (position 1.F sur la galerie). Une cupule plus trouble que le témoin indique une réaction positive et la fermentation du composé. La composition de la galerie et le mode opératoire sont présentés en annexe. Les résultats obtenus de l'API 32C ont été interprétés en utilisant le téléchargement d'APIWEB fourni par le fabricant.

##### - Méthode classique

Les tests d'assimilation s'effectuent en milieu solide et supposent l'étude de 27 sources de

- \* - Préparer le milieu YNB gélosé
- \* - Mélanger 1ml de suspension dense et 50 ml de milieu à 50°C
- \* - Couler le milieu dans des boîtes de pétri de 140 mm
- \* - Déposer, après la prise en masse, les disques imprégnés des solutions carbonées suivantes à 4g/ 50ml : Cellobiose, 2-céto-D-Gluconate, D-Gluconate, D-Glucosamine, D-Glucuronate, Mannitol, D-Ribose, Sorbitol, D-Xylose, D-Galactose, D-Glucose, Glycérol, L-

## Matériel et Méthodes

---

Arabinose, L-Rhamnose, L-Sorbose, Erythrytol, Tréhalose, Lactose, Maltose, Myo-inositol, Mélibiose, Mélézitose, Méthyl-Glucoside, Raffinose, Saccharose, Esculine et DL-Lactate (2ml/50ml). L'incubation s'effectue à 28° C. Après quelques jours, l'apparition des colonies révèle une assimilation positive du composé carboné.

Le glucose est toujours assimilé par les levures et sert de témoin de vitalité des souches.

### 3.1.2.3. Assimilation des composés azotés

L'assimilation des composés azotés s'étudie par la méthode de l'auxanogramme.

L'assimilation des nitrates comme seule source d'azote est un critère taxonomique très important; beaucoup de microorganismes ne peuvent pas l'assimiler (Barnett et al., 2000).

Différentes sources azotées sont testées à savoir: le nitrate de sodium (3,2 %), le nitrite de sodium (1,6%), le chlorhydrate d'éthylamine (1,2%), la lysine (2%), la cadavérine (2%), la créatine (6%, suspension dans de l'éthanol), la créatinine (6%) et le sulfate d'ammonium (6%) comme témoin.

Une suspension de 3 ml de la levure à tester est introduite en masse dans une boîte de pétri avec le milieu de base YCB (annexe 1).

Lorsque le milieu a pris en masse, les disques imprégnés des solutions azotées susmentionnées sont déposés. Après 3 jours d'incubation à 28°C, on observe la croissance de la levure autour du composé azoté. La peptone est utilisée comme témoin positif.

### 3.1.2. Croissance à différentes températures (thermorésistante)

Elle s'effectue sur milieu YPGA coulé en boîte de Pétri, chaque souche étant ensemencée par strie. Les boîtes sont incubées 3 jours à 25°C, 30°C, 35°C, 37°C, 40°C, 42°C, 45°C, 47°C et 50°C. Une culture positive se traduit par la présence de colonies.

### 3.1.2.5. Résistance aux antibiotiques

La croissance des souches sur les concentrations de 0,01 % et 0,1 % de cycloheximide (ou actidione) ont été évaluées. Ceci dans le but de détecter la résistance des souches aux antibiotiques selon le protocole suivant :

- Préparer en boîte de Pétri, des milieux YNBA-glucose (annexe 1)
- Ajouter le cycloheximide 0,1% pour un milieu et pour un autre milieu YNBA, ajouter le cycloheximide à 0,01%.
- Préparer, à partir d'une culture de 48h maximum, une suspension dense dans de l'eau stérile.
- Ensemencer les boîtes avec une goutte de la suspension et incubé à 30°C.
- Lire après 3 jours puis une semaine.

### 3.1.2.6. Résistance au NaCl

- Préparer des milieux YNBA-glucose, contenant respectivement 5, 10 et 16% de NaCl en concentration finale.
- Inoculer à l'aide d'une goutte d'une suspension dense.
- Incuber de 3 à 7 jours à 30°C.

### 3.1.2.7. Influence de l'éthanol

Le protocole d'étude est le suivant :

- Préparer le milieu YNBA (annexe1), ajouter l'éthanol ou de méthanol à 7,5%.
- Préparer à partir d'une culture de 48h maximum, une suspension dense dans l'eau stérile.
- Ensemencer les boîtes avec une goutte de la suspension et incubé à 30°C.
- Lire après trois jours et une semaine.

### 3.1.2.8. Croissance sur 50 ou 60% de glucose

- Préparer le milieu YNBA (annexe1), ajouter le glucose 50% ou 60%.
- Préparer à partir d'une culture de 48h maximum, une suspension dense dans de l'eau stérile.
- Ensemencer les boîtes avec une goutte de la suspension et incubé à 30°C.
- Lire après trois jours, puis une semaine.

### 3.1.2.9. Lecture et analyse des résultats

La croissance des levures sur les milieux d'étude est considérée comme un résultat positif. Les résultats de l'ensemble des tests physiologiques et morphologiques sont ensuite analysés à l'aide des clés dichotomiques du livre « Yeast » (Barnett et al. 2000).

## 3.2. Identification génotypique des souches

L'identification génotypique est réalisée au Laboratoire de GEIHP d'Angers et à la Plateforme de l'ADN d'Angers.

L'identification nécessite l'extraction de l'ADN à partir d'une culture pure. Elle repose sur l'amplification de régions spécifiques des unités de répétition de l'ADNr, tel que le gène imbriqué codant pour l'ARNr 18S. Cette région comporte des séquences fortement conservées et des séquences qui présentent un fort degré de variabilité génétique entre des souches d'espèces différentes (Las Heras-Vasquez et al., 2003).

Les douze souches pures ont été utilisées pour la caractérisation moléculaire. Il est à signaler que des souches de référence ont été aussi utilisées: *Debaryomyces hansenii*, *Candida glabrata* et *Saccharomyces cerevisiae* fournies généreusement par le laboratoire GEIHP d'Angers).

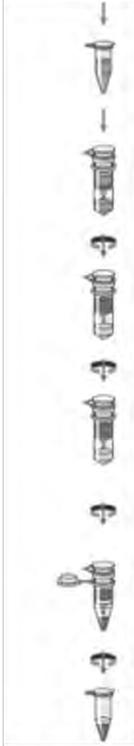
### 3.2.1. Extraction de l'ADN

L'ADN génomique des 12 souches levuriennes sélectionnées et celui des 03 souches de référence est extrait à partir d'une culture liquide de chaque levure.

Les cultures levuriennes sont incubées 24h sur milieu YPG (annexe 1) avant l'extraction de l'ADN. Le Kit utilisé pour l'extraction de l'ADN est le kit QIAGEN.

L'extraction de l'ADN est réalisée selon les étapes suivantes:

## Matériel et Méthodes

<p><b>Lyse des cellules</b>          Les cultures levuriennes sont centrifugées à 13000 g pendant 3 min. Après l'élimination du surnageant, le culot récupéré et resuspendu de façon énergique dans 400 µL de AP1 (solution de lyse contenant de l'EDTA le SDS). Ajouter 4µl RNase (pour détruire l'ARN), agiter et incubé à 65°C pendant 15-20 min (afin de créer une pression pour faire éclater les cellules).</p>	<div style="text-align: left; margin-bottom: 5px;">Echantillon</div> 
<p><b>La fixation de l'ADN génomique du lysat cellulaire à la membrane d'une colonne de centrifugation</b>          Ajouter à un volume de surnageant, 1,5 volume de tampon AP3 (400µl de surnageant+ 600µl de AP3); le tampon AP3 contient de l'isopropanol, pour précipiter l'ADN. Laisser reposer 5 min puis, transférer vers une colonne DNASY (blanche): l'ADN se fixe sur la membrane de la colonne. Centrifuger à 6000 g pendant 1 min et éliminer le surnageant</p>	
<p><b>Le lavage de la membrane</b>          Ajouter 300µl de Aw (tampon de lavage : l'éthanol) pour laver la colonne, centrifuger à 6000g pendant 1 min, éliminer le surnageant et conserver la colonne. Répéter le lavage avec 400 µl de Aw.</p>	
<p><b>L'éluion de l'ADN génomique à partir de la membrane</b>          Eluer l'ADN avec 60µl de tampon AE (tampon d'éluion) à 65°C pour l'activer. Laisser réagir 5 min. Centrifuger 1 à 2 min à 8000g. Répéter l'opération avec 60µl de tampon AE. Centrifuger et récupérer 120µl de filtrat contenant l'ADN. Conserver au réfrigérateur pendant 24 h avant la manipulation ou au congélateur -20°C.</p>	
Etapes d'extraction de l'ADN	

### 3.2.2. Amplification par la PCR (Polymerase Chain Reaction)

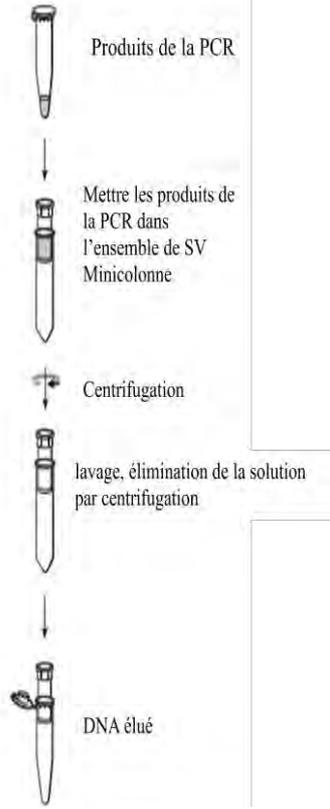
La PCR est une réaction biochimique pour la synthèse de l'ADN (annexe 2).

Le produit de l'amplification est purifié puis il subit une électrophorèse sur agarose à 1,5%.

## Matériel et Méthodes

### 3.2.3. Purification du produit de la PCR

Le produit de la PCR est purifié pour le séquençage selon les étapes suivantes :

<p>Ajouter à un volume de Membrane Binding Solution (Promega) même volume du produit de la réaction de la PCR.</p> <p><b>Fixation de l'ADN sur le gel (Binding of ADN)</b></p> <ul style="list-style-type: none"><li>- Insérer la SV Minicolonne dans le tube de la collection</li><li>- transférer le produit de la PCR dans la minicolonne et incuber à température ambiante une minute</li><li>- Centrifuger à 16000 x g pendant une minute, Réinsérer les micro- colonnes dans de nouveaux tubes de collection.</li></ul>	 <p>Produits de la PCR</p> <p>Mettre les produits de la PCR dans l'ensemble de SV Minicolonne</p> <p>Centrifugation</p> <p>lavage, élimination de la solution par centrifugation</p> <p>DNA élué</p> <p>Purification du produit de la PCR pour le séquençage</p>
<p><b>Lavage</b></p> <ul style="list-style-type: none"><li>- Ajouter 700µl de Membrane Wash Solution</li><li>- Centrifuger à 16000 x g pendant une minute, Réinsérer les micros colonnes dans de nouveaux tubes de collection</li><li>- Répéter l'étape précédente avec 500µl de Membrane Wash Solution. Centrifuger à 16000 x g pendant 5min</li><li>- Enlever le tube de collection et recentrifuger la colonne pendant 1 minute</li></ul>	
<p><b>Elution</b></p> <ul style="list-style-type: none"><li>- Transférer délicatement la mini colonne au tube micro centrifuge de 1,5 ml</li><li>- Ajouter 50 µl de Nuclease- free water à la mini colonne. Incuber à température ambiante pendant 1 minute.</li><li>- Se débarrasser de la minicolonne et conserver l'ADN à 4°C ou - 20°C</li></ul>	

### 3.2.4. Visualisation des produits de PCR par électrophorèse

L'électrophorèse est réalisée sur le gel d'agarose à 1,5% dans le tampon TAE à 0,5X V. Une fois solidifié, les puits sont remplis par 6µl de l'échantillon. La migration s'effectue à 135 v pendant 23 min. La révélation se fait par le bromure d'éthydiu (10 à 15 min) suivie par une illumination par UV.

### 3.2.5. Polymorphisme RFLP et PCR-RFLP

Après l'extraction, l'ADN est soumis à des enzymes de restriction qui coupent la molécule à des endroits précis, définis par une séquence de bases appelée sites de restriction.

L'ADN purifié est digéré par les enzymes de restriction : Hae III, Dde I, SAV3AI et MSP I [des endonucléases de restriction (Promega, Madison, WI)] à savoir 10 U.

Après une incubation à 37°C durant toute une nuit, les fragments résultant de la restriction sont analysés par électrophorèse gel Agarose (2%). Le polymorphisme de la position et du nombre de bande est visualisé par une réaction colorée (Bromure d'éthydiu, BET).

## Matériel et Méthodes

---

Les séquences de reconnaissance des enzymes de restriction sont :



### 3.2.6. Séquençage de gène de l'ARNr 26S de la levure sélectionnée

La confirmation de l'identification de la levure sélectionnée est réalisée par le Centre International de Ressources Microbiennes (CIRM, Thiverval Grignon, Paris). L'amplification et le séquençage du domaine D1/D2 de la région 26S de l'ADN ribosomique sont réalisés en utilisant la procédure mise au point par Kurtzman et Robnett (1998). Les amorces utilisées sont NL1 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3') et NL4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3').

### 3.2.7. Analyse des données

Les séquences obtenues sont comparées aux séquences des bases de données du NCBI. Les comparaisons de séquences sont effectuées en utilisant l'outil de recherche d'alignement local de base de programmation (BLAST) dans la base de données GenBank. Un isolât est attribué à l'espèce présentant une identité de séquence la plus haute identifiée.

L'analyse phylogénétique a été exécutée sur la plate-forme phylogeny.fr (Dereeper et al., 2008). Elle a été réalisée par la méthode Neighbor-joining (Nj) (Saitou et Nei 1987).

## 4. Sélection de la souche la plus performante

### 4.1. Présélection de souches selon la croissance à 40°C

La première sélection est basée sur la croissance des souches à 40°C sur les milieux YPSA et YPPA (annexe 1) contenant l'amidon comme source carbonée.

## Matériel et Méthodes

---

### 4.2. Sélection de la souche selon la production et la thermostabilité des enzymes amylolytiques

L'étude de la quantité de production et de la thermostabilité des enzymes ( $\alpha$ -amylase et pullulanase) est effectuées sur les 12 souches de levures présélectionnées afin de sélectionner la plus performante.

#### 4.2.1. Etude de la production enzymatique et de biomasse

Afin de réaliser cette sélection les différents isolats ont été cultivés sur trois milieux liquides différents. Les fermentations ont été réalisées dans des erlenmeyers de 250 ml contenant 50 ml de milieu. La composition des milieux utilisés est la suivante :

- Milieu 1 : lactosérum 100% (traité)
- Milieu 2 : lactosérum 100% (traité) + amidon (1%)
- Milieu 3 : YNB (0,67% dans le tampon phosphate) + Amidon (1%).

Après l'ajustement du pH à 6,5, les milieux sont stérilisés à 110°C pendant 15min. Ils sont ensemencés avec  $2,5 \times 10^5$  cellules /ml. Les cultures sont incubées à 40°C pendant 40h et sous une agitation de 100 rpm.

A la fin de la fermentation, la culture est centrifugée à 8000 rpm pendant 15 min.

La biomasse levurienne est mise à l'étuve à 105°C une nuit afin de déterminer son poids sec. Le surnageant est utilisé pour la détermination des activités enzymatiques et l'étude de la thermostabilité. Il constitue l'extrait enzymatique brut.

#### 4.2.2. Détermination des activités $\alpha$ -amylasique et pullulanasiq

L'activité des amylases est évaluée par la capacité de l'extrait enzymatique brut à hydrolyser l'amidon et le pullulane (annexe 2).

Le dosage de l'activité amylasique est déterminé comme suit:

- Ajouter 0,5 ml de l'extrait enzymatique brut respectivement à 0,5ml d'amidon ou de pullulane à 1% dans du tampon (phosphate pH 6,5 et Tris HCl pH 8 selon l'étude).
- Incuber le mélange réactionnel à 40°C pendant 30 min et refroidir immédiatement.
- Stopper la réaction par addition de 1 ml de solution DNSA et incuber à 100°C pendant 10 minutes.
- Lire l'absorbance des échantillons à 540 nm.

La réaction est colorimétrique et l'intensité de la coloration est proportionnelle à la quantité de sucre réducteur libéré par la réaction d'hydrolyse. Les activités  $\alpha$ -amylasique et pullulanasiq sont définies comme la quantité d'extrait enzymatique nécessaire pour produire 1  $\mu$ mole de sucre réducteur (équivalent au maltose) par min (Bernfeld, 1955).

#### 4.2.3. Etude de la thermostabilité enzymatique

Seules les souches levuriennes dont l'extrait enzymatique brut présente des activités enzymatiques élevées, sont retenues pour l'étude de la thermostabilité enzymatique et ceci dans le but de sélectionner les souches productrices d' $\alpha$ - amylase et de pullulanase thermostables.

La thermostabilité des enzymes est étudiée à 90°C. La mesure de l'activité enzymatique résiduelle est effectuée après incubation de l'extrait enzymatique brut pendant une durée variable, allant de 0 à 120 min.

## Matériel et Méthodes

---

L'extrait enzymatique est réparti en volumes égaux dans des tubes placés au bain marie 90°C (Pelmont, 2000). Les différents échantillons sont retirés les uns après les autres, à des temps déterminés et refroidis instantanément dans un bain de glace. Le protocole de dosage de l'activité amylasique est appliqué à chaque échantillon.

### 5. Etude de l'inoculum

#### 5.1. Préparation de l'inoculum

Elle s'effectue comme suit: 40 ml du milieu YPGA sont coulés en erlens meyers de 250 ml etensemencés ensuite avec une souche pure. Après une incubation de 48h à 40°C, 50ml d'eau distillée stérile sont ajoutées et les cellules sont homogénéisées par agitation manuelle.

#### 5.2. Dénombrement

Le dénombrement des cellules s'effectue par comptage direct à l'aide d'une cellule de Thoma (0.1mm, 1/400mm<sup>2</sup>).

#### 5.3. Densité de l'inoculum de cellules

Pour déterminer la quantité adéquate de cellules à apporter, la production enzymatique ( $\alpha$ -amylasique et pullulanase) est dosée dans des échantillons ayant reçu, à partir d'une culture de 48h, des doses de  $2,5 \times 10^4$  à  $2,5 \times 10^7$  cellules /ml

### 6. Milieux de culture

#### 6.1. Milieu de base

Le milieu de culture utilisé est à base lactosérum à pH 4,46, issu de la fabrication des fromages. Le lactosérum renferme les composants solubles du lait : lactose, protéines, sels minéraux et des traces de matière grasse (Larpen-Gourgand et Sanglier, 1992).

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

##### 6.1.1. Traitement du lactosérum

Le lactosérum est filtré à travers la gaze afin d'éliminer les impuretés. Avant son utilisation, le lactosérum subit un traitement de thermocoagulation sous l'action combinée du pH (ajusté à 4,6) et de la température à 100°C pendant 30 min afin de précipiter les caséines qui seront ensuite éliminées par centrifugation à 4000 g pendant 15 min (ou par filtration). Le surnageant ou le filtrat constitue le milieu de base et sert à préparer le milieu de culture (Lorient et al., 1991).

Différentes concentrations de lactosérum traité (décaféiné) à 20%, 40%, 60%, 80% et 100% (non dilué) sont testées afin de déterminer la concentration permettant d'obtenir une meilleure production de l' $\alpha$ -amylase et de la pullulanase.

## Matériel et Méthodes

---

### 6.1.2. Composition physico-chimique du lactosérum

#### 6.1.2.1. Dosage des protéines (Lowry et al., 1951)

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

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

La lecture de la coloration s'effectue à 650 nm et la valeur rapportée à une gamme étalon de Sérum Albumine Bovine (BSA) (annexe 2).

#### 6.1.2.2. Dosage des sucres (Dubois et al., 1956)

L'acide sulfurique concentré provoque à chaud la déshydratation des oses avec la formation d'hydroxy-méthyl furfural (cas d'un hexose) et d'un furfural (cas d'un pentose). Ces composés se condensent avec le phénol pour donner des composés colorés ; l'intensité de la coloration est proportionnelle à la concentration en oses (annexe2).

#### 6.1.2.3. Mesure du pH

Après filtration et traitement, le pH du lactosérum est mesuré à l'aide d'un pH mètre.

#### 6.1.2.4. Détermination de la matière sèche (AFNOR 1980)

La détermination de la matière sèche consiste à sécher à 105°C dans une étuve isotherme jusqu'à poids constant environ 10 ml d'échantillon (annexe 2).

#### 6.1.2.5. Dosage des cendres (AFNOR 1980)

Les cendres totales représentent la partie minérale d'un produit et permettent d'avoir une idée sur son apport en sels minéraux. Elles sont quantifiées par la méthode décrite dans Afnor (1980). Les échantillons de 10 ml sont incinérés complètement jusqu'à obtention des cendres blanches dans un four à moufle réglé à 550°C (annexe 2).

#### 6.1.2.6. Détermination de l'azote total (AFNOR 1980)

L'échantillon est minéralisé par l'acide sulfurique concentré à chaud, en présence d'un catalyseur. L'azote organique est transformé en azote ammoniacal. L'alcalinisation et la distillation du minéralisât libèrent de l'ammoniac. Enfin l'ammoniac est titré dans une solution d'acide borique (annexe 2)

#### 6.1.2.7. Dosage de la matière grasse par la méthode de Wisman (Le Coq R., 1965)

Après une hydrolyse acide, la matière grasse est extraite à l'éther de pétrole dans un Soxhlet. Le solvant est ensuite évaporé et les extraits lipidiques sont séchés puis pesés (annexe 2).

\*Dosage des sels (calcium, phosphore, sodium, potassium, magnésium et chlore) a été réalisé par le Laboratoire Départemental d'Analyse d'Ille et Vilaine, France.

### 7. Détermination des conditions optimales de culture

La conception optimale du milieu de culture est un aspect très important dans le développement de procédés de fermentation. La méthode classique d'optimisation un milieu de production consiste à changer un paramètre à chaque fois, tout en gardant constant tous les autres. Cette méthode peut être extrêmement longue et coûteuse à cause du nombre élevé de variables. En outre, elle ne parvient pas à déterminer l'effet combiné de différents facteurs (Khairu et al., 2015 et Mohagir et al., 2015). Les méthodes statistiques fournissent une autre méthode pour résoudre ces problèmes et optimiser un processus particulier.

Dans la présente étude effectuée en erlen meyers, une conception Plackett-Burman (1946) est utilisée pour le screening des variables importantes qui affectent la production de l' $\alpha$ -amylase et de la pullulanase ainsi que la détermination de leurs niveaux de signification. L'étude des effets de l'interaction entre les facteurs est réalisée par le plan composite centré (CCD) de Box et Wilson (1951) couplé à la méthodologie de surface de réponse (RSM). Le CCD et le RSM sont des outils efficaces et ont été largement utilisés dans l'optimisation du processus de fermentation où de nombreux facteurs et leurs interactions affectent la réponse souhaitée telle que la production de l'enzyme (Bennamoun et al, 2004; Djekrif et al, 2006; Zhang et al, 2013; Djekrif et al., 2014 et Vimal et al., 2015), la production des exopolysaccharides (Kwon et al, 2009) et la production de l'acide citrique (Bari et al, 2009).

#### 7.1. Sélection des composants du milieu

Les matrices de Plackett et Burman fournissent une méthode efficace pour sélectionner un grand nombre de variables et identifier les plus importantes. Ces plans ont été déjà utilisés dans d'autres travaux pour la sélection des facteurs influençant la production des enzymes coagulantes du lait chez *Bacillus amyloliquefaciens* (Zhang et al., 2013), la  $\beta$ -galactosidase chez *Talaromyces pinophilus* (El Nagar et al., 2015) et l' $\alpha$ -amylase de *Bacillus amyloliquefaciens* KCP2 (Vimal et al., 2015).

Ces plans permettent de mettre en évidence l'effet de k facteurs à deux niveaux (Tableau 9) sur la production enzymatique étudiée avec un nombre d'expériences minimales N tel que  $N = k + 1$  (Zhang et al., 2013). Ce sont des matrices carrées établies à partir d'un générateur de base (Tableau 8), la dernière ligne du plan d'expérience étant toujours au niveau inférieur (Tableau 9). Chaque ligne représente une expérience et chaque colonne représente une variable.

**Tableau 8:** Générateurs des matrices pour N= 8, 12, 16, et 20 essais de Plackett et Burman

N = 8	+	+	+	-	+	-	-													
N = 12	+	+	-	+	+	-	-	-	+	-										
N = 16	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+	-	-						
N = 20	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-

*Niveau supérieur +, niveau inférieur -*

## Matériel et Méthodes

Pour la constitution d'une matrice quelconque, on procède de la manière suivante : la 1<sup>ère</sup> ligne correspond à celle du générateur choisi selon le nombre de facteurs étudiés (par exemple, pour 7 facteurs on utilise la matrice N = 8), pour la seconde ligne, le 1<sup>er</sup> signe doit être obligatoirement le dernier signe de la 1<sup>ère</sup> ligne et les signes suivants sont ceux de la 1<sup>ère</sup> ligne et ainsi de suite (Tableau 9).

**Tableau 9** : Matrice de Plackett et Burman pour l'étude de 11 variables avec 12 expériences.

Expériences	Variables										
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
1	+1	+1	-1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1
2	-1	+1	+1	-1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1
3	+1	-1	+1	+1	-1	+1	+1	+1	-1	-1	-1
4	-1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	+1	+1	-1	-1
5	-1	-1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	+1	+1	-1
6	-1	-1	-1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	+1	+1
7	+1	-1	-1	-1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	+1
8	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	+1	+1	-1	+1
9	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	+1	+1	-1
10	-1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	+1	+1
11	+1	-1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	+1
12	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1

*D, H et K sont les variables erreurs : +, niveau supérieur ; -, niveau inférieur*

Dans notre cas, la matrice est composée de 11 facteurs (soit 12 combinaisons) dont 3 sont désignées comme variables erreurs afin de garder une réserve statistique pour l'évaluation de l'erreur expérimentale.

Le nombre de variables réelles est donc réduit à N-3, soit l'étude de 8 facteurs qui sont l'amidon, l'extrait de levure, le NH<sub>4</sub>SO<sub>2</sub>, les sels (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 850 mg/l, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 150 mg/l, MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O 500 mg/l et CaCl<sub>2</sub> 6H<sub>2</sub>O 100 mg/l), la solution d'oligo-éléments (CuSO<sub>4</sub> 5H<sub>2</sub>O 40 µg/l, KI 100 µg/l, FeCl<sub>3</sub> 6H<sub>2</sub>O 200 µg/l et MnSO<sub>4</sub> 4H<sub>2</sub>O 400µg/l) et les paramètres de culture (l'agitation, le pH et la température). Les différents niveaux de chaque variable sont consignés dans le tableau 10.

**Tableau 10** : Relation entre les niveaux codés et les niveaux réels des facteurs utilisés dans les matrices de Plackett et Burman.

Code	Variables	Unité	Niveaux	
			Inférieure (-1)	Supérieure (+1)
A	Agitation	rpm	50	200
B	pH	-	3	6
C	Température	°C	30	50
D	Erreur	-	-	-
E	Amidon	g/l	0	10
F	Extrait de levure	g/l	0	1
G	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	g/l	0	1
H	Erreur	-	-	-
I	Sels	ml/l	0	10
J	Oligo-éléments	ml/l	0	10
K	Erreur	-	-	-

## Matériel et Méthodes

Le traitement de la matrice est réalisé par Minitab 17; l'analyse statistique consiste à identifier les variables qui ont un effet significatif positif ou négatif sur la production de l' $\alpha$ -amylase et de la pullulanase.

a / l'effet de chaque variable est déterminé comme une différence entre la moyenne de réponses au niveau supérieur (+) et la moyenne des valeurs de réponses au niveau inférieur (-) (Vimal et al., 2015):

$$EA = R (+)/r - R (-)/r$$

**EA** est l'effet de la variable **A**, **R (+)** est la valeur de réponse observée au niveau **R (+)** et **R (-)** est la valeur de réponse au niveau (-).

**r** est le nombre d'apparition du facteur au niveau (+) ou (-), dans notre étude  $r = 6$ .

L'erreur expérimentale est définie comme la moyenne des effets des erreurs (**Ed**) :

$$VE = \sum(E_d)/n$$

**VE** est la variance des effets et **n** est le nombre des variables erreurs.

L'erreur standard **SE** est déterminée comme la racine carrée de la variance

$$SE\ eff = \sqrt{VE}$$

b / la signification de chaque facteurs est déterminée par le test de Student :

$$T = E / SE\ eff$$

**E** est l'effet et **SE eff** est l'erreur standard.

Si le test t est significatif, l'effet est vraiment dû au changement du niveau de la variable et non pas au hasard ni aux erreurs expérimentales. Autrement dit, le changement de la variable du niveau (-) au niveau (+) entraîne un effet positif ou négatif sur la réponse.

La probabilité minimale de signification est de 70%. Toutes les variables ayant une probabilité inférieure à 70% sont rejetées et considérées sans effet sur la réponse.

### 7.2. Optimisation des composants sélectionnés

Les niveaux de six variables indépendantes : l'agitation (A), la température (C), la quantité d'amidon (E) et d'extrait de levure (F), le volume des solutions standard de sels (I) et d'oligo-éléments (J), sélectionnées par le plan de Plackett et Burman, sont optimisés par le plan composite centré (CCD) en combinaison avec la méthodologie de surface de réponse (RSM). Chaque facteur dans le plan est étudié à cinq niveaux (Tableau 11).

**Tableau 11** : Relation entre les niveaux codés et les niveaux réels des facteurs utilisés dans le plan composite centré.

Facteurs	Niveaux				
	$-\alpha$ (-2,828)	-1	0	+1	$+\alpha$ (+2,828)
A : Agitation	23,44	60	80	100	136,56
C : Température	25,86	35	40	45	54,14
E : Amidon	1,172	3	4	5	6,828
F : Extrait de levure	0,117	0,3	0,4	0,5	0,682
I : Sels	4,344	8	10	12	15,65
J : Oligo-éléments	1,172	3	4	5	6,828

Agitation :	$x_1 = (\text{Agitation} - 80)/20$
Température :	$x_2 = (\text{Température} - 40)/5$
Amidon :	$x_3 = ([\text{Amidon}] - 4)/1$
Extrait de levure :	$x_4 = ([\text{Extrait de levure}] - 0.4)/0.1$
Sels :	$x_5 = (\text{Sels} - 10)/2$
Oligo-élément :	$x_6 = (\text{Oligo-éléments} - 4)/1$

$x_1, x_2, x_3, x_4, x_5$  sont les solutions des dérivés des équations obtenues après le traitement de la matrice du plan composite centré : ils nous permettent de déterminer les positions des extremums de ces fonctions.

$$x = ([\text{Concentration ou la valeur du facteur étudié}] - y)/z$$

$y$  est la valeur au niveau 0 du facteur étudié

$z$  est le pas choisi par le manipulateur.

Ce plan de 82 expériences (Tableau 1 annexe 3) permet d'étudier chaque facteur à cinq niveaux. Il est composé de trois parties :

- 64 points de coordonnées (-1, +1) qui forment un plan factoriel complet  $2^k$  (k dans notre étude égal à 5) soit 32 combinaisons.

- 12 points en étoile avec deux niveaux  $+\alpha$  et  $-\alpha$  correspondant au plan factoriel  $2^5$  : -2.378 et +2.378.

- 6 répétitions du point central (niveau 0).

Un tel plan permet d'obtenir l'équation du deuxième degré et les dérivés par rapport à 0, permettant de déterminer les coordonnées codées des extremums qui seront ensuite transformées en valeurs réelles.

### 7. 3. Analyse statistique et modélisation

Les données obtenues à partir de CCD sur la production  $\alpha$ -amylase sont soumises à l'analyse de variance (ANOVA). Les résultats du CCD ont été utilisés pour s'adapter à un polynôme du second ordre de l'équation (1) qui représente le comportement d'un tel système de manière plus appropriée:

$$Y = \beta_0 + \sum \beta_i X_i + \sum \beta_{ii} X_i^2 + \sum \beta_{ij} X_i X_j$$

Où  $Y$  représente la réponse,  $\beta_0$  est la réponse moyenne (constante),  $\beta_i$  est le coefficient linéaire,  $\beta_{ii}$  est le coefficient des carrés,  $\beta_{ij}$  est le coefficient d'interaction, et  $X_i X_j$  sont des variables indépendantes qui influencent la réponse.

Le traitement statistique de la matrice est réalisé par le logiciel Minitab 17 pour le calcul des coefficients de régression, l'analyse de la variance (ANOVA), déterminer les valeurs de la probabilité de signification (p), le test de Fisher ainsi que les graphiques des isoréponses.

## 8. Fermentation

La fermentation est effectuée dans des erlenmeyers de 250 ml contenant 50 ml du milieu de production. Après stérilisation à 110°C pendant 15 min les milieux sontensemencés avec de  $2,5 \times 10^6$  cellules/ml de *Clavispora lusitaniae* ABS7. Les cultures sont incubées sous agitation et à la température correspondante (selon le plan statistique) pendant 40 h.

### 8.1. Milieu de Culture

Pour la production enzymatique, *C. lusitaniae* ABS7 est cultivée sur un milieu optimisé à base de lactosérum. Différentes substances sont ajoutées au milieu de base à savoir l'amidon (substrat et inducteur de l'enzyme) à raison de 3,34 g/l, l'extrait de levure (0,429 g/l), 9,5ml/l de la solution de sels (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 850 mg/l, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 150 mg/l, MgSO<sub>4</sub>, 7H<sub>2</sub>O 500 mg/l and CaCl<sub>2</sub> 6H<sub>2</sub>O 100 mg/l), 4,65 ml/l de la solution d'oligo-éléments (CuSO<sub>4</sub>, 5H<sub>2</sub>O 40 µg/l, KI 100 µg/l, FeCl<sub>3</sub>, 6H<sub>2</sub>O 200 µg/l et MnSO<sub>4</sub>, 4H<sub>2</sub>O 400µg/l).

### 8.2. Fermentation en erlenmeyer et en fermenteur

La fermentation est réalisée, dans un premier temps, en erlen meyers de 250 ml afin de vérifier le résultat de l'étude statistique et, dans un deuxième temps, en fermenteur New Brunswick Scientific de 2 L. L'incubation s'effectue à 54°C avec une agitation de 135 rpm afin d'étudier la cinétique de la production d'enzymes et de la biomasse ainsi que l'évolution de la quantité de protéines et de glucides et la variation du pH pour une durée de 72h. Dans le cas de la biomasse, la fermentation est poursuivie jusqu'à 96h du fait de l'absence de la phase de déclin à 72h.

## 9. Purification des amylases

La purification de l'enzyme est réalisée selon les étapes suivantes :

### 9.1. Préparation de l'extrait enzymatique

A la fin de la fermentation en batch, le jus de la fermentation est centrifugé à 8000 g pendant 20 min. Le surnageant constitue l'extrait enzymatique brut. Ce dernier est lyophilisé. La lyophilisation de l'extrait enzymatique a été réalisée au Laboratoire d'Hydrologie et d'Hygiène d'Angers. Le lyophilisat est hydrolysé dans le tampon Tris HCl 0,2M pH8 et constitue l'extrait brut utilisé en vue de la purification.

### 9.2. Précipitation des protéines par l'acétone

Le protocole consiste à mettre sous agitation un volume de lyophilisat hydrolysé et quatre volumes d'acétone. Le mélange est mis à 4°C pendant 1h avant d'être centrifugé à 12000 g pendant 20 min (Singh et al., 2012 et Asha et al., 2013).

### 9.3. Concentration par le PEG 20000

La solution enzymatique est placée dans un boudin de dialyse. Ce dernier doit être couvert pendant quelques minutes de cristaux de PEG 20000, en vérifiant l'humidité des cristaux. Une fois que les cristaux sont humides et que le volume de l'échantillon dans le boudin a diminué, on récupère l'échantillon pour poursuivre la purification.

### 9.4. Chromatographie

Afin de purifier l' $\alpha$ -amylase et la pullulanase, l'échantillon est soumis à une chromatographie d'exclusion et à une chromatographie échangeuse d'ions.

### 9.4.1. Chromatographie d'exclusion

Un échantillon de 2,7 ml de l'échantillon concentré est chargé sur un gel de séphacryl S200 dans une colonne de 1m x 1.6 cm, équilibré avec un tampon Tris HCl 0,2M à pH 8. Le débit d'élution est réglé à 0.5 ml/mn. L'éluat est collecté par fraction de 2 ml. Sur chaque fraction collectée, la densité optique à 280 nm et les activités  $\alpha$ -amylasique et pullulanase sont mesurées. Les fractions ayant des activités enzymatiques élevées sont rassemblées.

### 9.4.2. Chromatographie échangeuse d'ions

Les fractions ayant l'activité  $\alpha$ -amylasique et pullulanase élevées sont rassemblées, puis concentrées contre le PEG 20000. Un ml de l'échantillon concentré est appliqué à la colonne de DEAE Cellulose (10 x 1 cm) équilibrée auparavant avec le tampon Tris HCl 0,2M à pH 8.

L'élution est réalisée par un gradient de NaCl 1,5M dans le tampon Tris HCl 0,2M à pH 8. Des fractions de 2 ml sont collectées avec un débit de 0.5 ml/mn. Les fractions actives sont ensuite réunies et concentrées par le tube filtrant (Asha et al., 2013).

### 9.4.3. Ultrafiltration

Des tubes d'ultrafiltration AMICON 10 KD, permettant une concentration des protéines dont le poids moléculaire varie entre 30 et 90 KD, de 15 ml sont utilisés. Ce sont des dispositifs de filtre qui fournissent une ultrafiltration rapide, avec une concentration élevée et une récupération facile du concentré à partir d'un échantillon dilué. Le concentrat est obtenu après une centrifugation à 7000 g pendant 30 min.

## 10. Chromatographie sur couche mince (CCM)

La chromatographie sur couche mince (CCM, en anglais TLC *Thin layer chromatography*) est une technique analytique qui a pour but la séparation des différents constituants d'un mélange contenus dans une phase homogène liquide (chromatographie en phase liquide). Après séparation des différents solutés, la chromatographie permettra l'identification et la quantification de chacun des solutés initialement présents dans la solution à analyser (annexe 2).

## 11. Electrophorèse SDS PAGE

La technique du gel d'électrophorèse en conditions dénaturantes (Sodium Dodecyl Sulfate polyacrylamide gel electrophoresis ou SDS page) est utilisée pour déterminer le nombre de sous unités des protéines et leur masse molaire (Laemmli, 1970).

L'échantillon protéique est traité avec un agent réducteur ( $\beta$ -marcaptoéthanol) qui rompt les ponts disulfures et un détergent anionique (SDS) qui dénature les protéines et leur confère une enveloppe de charges négatives (Hames et al., 2000).

L'échantillon est fractionné par une électrophorèse sur gel de polyacrylamide à 10%.

Tous les fragments protéiques sont séparés selon leur poids moléculaire, déterminé grâce à des marqueurs. Cette technique permet de déterminer le poids moléculaire des sous-unités formant une protéine.

Le mode opératoire ainsi que la composition des différentes solutions et gels d'électrophorèse sont détaillés en annexe 2.

### 12. Immobilisation des enzymes

#### 12.1. Optimisation de l'immobilisation

Les effets des conditions de l'immobilisation comme la concentration du gel d'alginate de sodium, de la quantité de l'enzyme et du pH sur l'activité enzymatique ainsi que leurs interactions ont été étudiés. Pour cela, le plan de Box-Behnken (BBD) combiné à la méthode de surface de la réponse (RSM) est employé. L'analyse statistique du plan expérimental est faite par le logiciel Statgraphics plus V5.1 (Statsoft, USA) au laboratoire d'hydrologie et d'hygiène d'Angers.

Trois facteurs [concentration du gel d'alginate de sodium (A), quantité d'enzyme (B) et pH (C)] sont utilisés pour l'optimisation statistique. Ces variables sont étudiées à trois différents niveaux : niveau faible (-1), niveau moyen (0) et niveau élevé (+1) (Tableau 12).

**Tableau 12** : Relation entre les niveaux codés et les niveaux réels des facteurs utilisés dans le plan pour améliorer l'immobilisation de l' $\alpha$ - amylase et la pullulanase

Facteurs	Niveaux		
	-1	0	+1
[Gel d'alginate] (%)	20	30	40
Quantité d'enzyme (g)	3	6	9
pH	3	7	9

Pour cela, un plan de 15 expériences est utilisé (Tableau 13) et les activités  $\alpha$ -amylasique et pullulanasiqne sont déterminées comme réponses. Un modèle polynomial explique la relation entre les variables indépendantes et les activités enzymatiques dans l'équation suivante (1) :

$$Y = \beta_0 + \sum \beta_i X_i + \sum \beta_{ii} X_i^2 + \sum \beta_{ij} X_i X_j$$

La significativité statistique des coefficients de régression est déterminée par le test de *Fisher* alors que la qualité du modèle est fixée par le coefficient de détermination  $R^2$ .

## Matériel et Méthodes

**Tableau 13:** Plan expérimental de Box- Behnken pour l'étude de trois facteurs.

N° essai	[Alginate] %	Quantité d'enzyme (g)	pH
1	0	0	0
2	1	0	1
3	-1	-1	0
4	0	-1	-1
5	-1	0	-1
6	0	-1	+1
7	+1	0	-1
8	0	0	0
9	-1	1	0
10	0	1	-1
11	0	1	+1
12	+1	1	0
13	-1	0	+1
14	0	0	0
15	+1	-1	0

### 12.2. Différentes étapes de l'immobilisation

#### 12.2.1. Préparation du gel

Trois g d'alginate de sodium (pour le plan statistique, cette valeur varie de 2 à 4%) sont dissous dans 100 ml dans le tampon pH 7 à 50-60°C. La solution est dégazée toute une nuit à 4°C (ou 20 min en cuve à ultrasons).

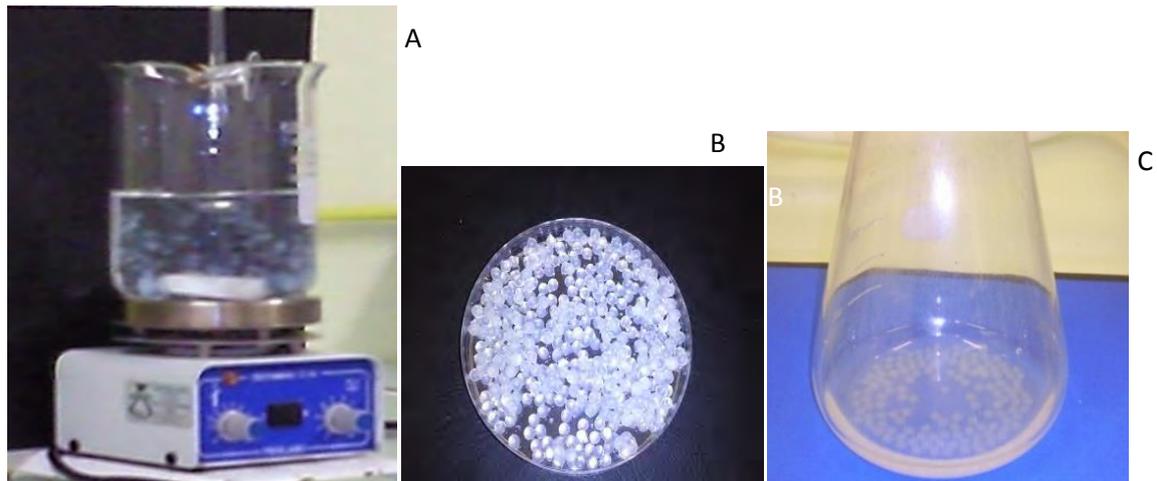
#### 12.2.2. Inclusion de l'enzyme

Dix ml de l'enzyme purifiée sont mélangés, sous agitation, avec 90 ml de la solution d'alginate de sodium.

#### 12.2.3. Polymérisation

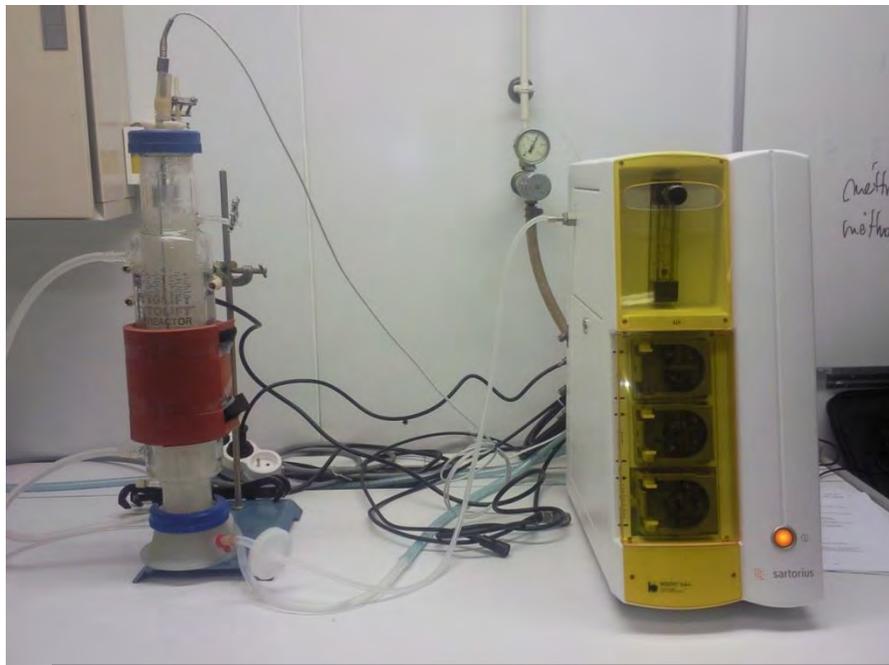
Le mélange homogène (gel d'alginate-enzyme) est introduit dans une burette à ouverture assez large (Figure 10). Les billes sont obtenues par goutte à goutte dans une solution de CaCl<sub>2</sub> 1,5 M en agitation modérée à 4°C.

## Matériel et Méthodes



**Figure 10** : montre A : Formation des billes contenant l'enzyme immobilisée dans la solution de  $\text{CaCl}_2$   
B : Billes d'alginate de calcium solidifiées  
C : Préparation de l'enzyme immobilisée pour l'étude du plan

Les billes sont conservées dans cette solution, pendant 2h, pour poursuivre la gélification. Les billes formées sont récupérées par filtration et lavées à fond avec le tampon à pH correspondant pour être séchées sur papier filtre (Whatman n°1) avant d'être utilisées dans un réacteur Air-lift (Figure 11). La solution de chlorure de calcium filtrée et l'eau de lavage sont recueillies pour la détermination de l'activité enzymatique (Talekar et al., 2012).



**Figure 11**: Fermenteur Air Lift pour la réutilisation des billes de l'amylopullulanase immobilisée de *Clavispora lusitaniae* ABS7

### 12.3. Détermination du rendement d'immobilisation de l'enzyme

Le rendement d'immobilisation est défini comme la rentabilité de l'enzyme immobilisée dans les billes d'alginate de calcium et exprimé par l'équation suivante :

$$\text{Rendement d'immobilisation (en\%)} = (\text{Activité de l'enzyme immobilisée} / \text{AB}) \times 100$$

Où **A** est l'activité de l'enzyme libre ajouté et **B** est l'activité de l'enzyme restant dans l'eau de lavage et la solution de chlorure de calcium filtrée.

### 12.4. Réutilisation des amylases immobilisées

L'avantage de l'utilisation de biocatalyseurs immobilisés est la possibilité de les utiliser à plusieurs reprises sans perte sensible d'activité. Chaque cycle dure 30 min à 60°C. Les perles obtenues sont lavées avec de l'eau distillée pour l'utilisation suivante et le processus est répété pour plusieurs cycles jusqu'à ce que l'activité enzymatique diminue. L'activité résiduelle est calculée en prenant compte de l'activité enzymatique du premier cycle à 100%.

## 13. Détermination des propriétés physico-chimiques et cinétiques des enzymes partiellement purifiées

### 13.1. Détermination du pH optimum

L'influence du pH sur les activités enzymatiques est déterminée par la mesure de l'activité à différents pH, variant de 5 à 12. Le tampon citrate phosphate 0,5 M est utilisé pour le pH 5, le tampon phosphate 0,02 M est utilisé pour la zone de pH 6 à pH8 et le tampon glycine-NaOH 0,1M pour les pH de 8,5 à 12 (Kamoun, 1997 et Hii et al, 2009 b).

### 13.2. Détermination de la température optimale

L'effet de la température a été étudié par la mesure des activités enzymatiques à différentes températures variant de 20°C à 100°C avec un incrément de 5°C (Arikan, 2007).

### 13.3. Détermination de la thermostabilité des enzymes

L'étude de la stabilité à la température de l'activité  $\alpha$ -amylasique libre est étudiée à 75°C et à 100°C et celle de la pullulanase libre à 80°C et à 100°C à différents temps, variant de 0 à 180 min. Tandis que la thermostabilité des deux enzymes immobilisées est testée à 85°C et à 100°C.

La solution enzymatique est répartie en volumes identiques dans des tubes séparés qui sont chauffés ensemble dans un bain marie, à une température soigneusement réglée. Les différents échantillons sont retirés les uns après les autres à des temps déterminés et refroidis instantanément dans un bain de glace. Après chaque traitement thermique, les activités  $\alpha$ -amylasique et pullulanase sont mesurées (Pelmont, 2000, Arikan, 2007).

### 13.4. Détermination des caractéristiques cinétiques ( $K_m$ et $V_{max}$ ) des enzymes

Différentes concentrations du substrat variant de 1 à 5 % d'amidon soluble et de pullulane sont testées afin de déterminer respectivement les paramètres cinétiques de l' $\alpha$ -amylase et la pullulanase.

## 14. Effet de différents métaux et réactifs chimiques sur les activités enzymatiques

Pour l'étude de l'effet des ions sur l'activité  $\alpha$ -amylasique et l'activité pullulanase, on utilise des sels tels que le  $FeCl_3$ , le  $ZnSO_4$ , le  $HgCl_2$ , le  $CuSO_4$ , le  $MgCl_2$ , le  $CaCl_2$ , le  $NaCl$  et

## Matériel et Méthodes

---

le  $\text{MnCl}_2$ . Les échantillons d'amylopullulanase alcaline sont incubés avec chaque ion métallique (5mM) séparément, à 60°C pendant 30 min dans le tampon Tris HCl 0,2M, pH 8 puis les activités  $\alpha$ -amylasique et pullulanase sont mesurées.

D'autres substances chimiques sont testées comme l'EDTA (2mM), l'urée (2M), le SDS (1%, w/v), le  $\beta$ -marcaptoéthanol (1%) et le tween 80 (1%) sur les deux activités enzymatiques. Les activités enzymatiques sont déterminées après le traitement de l'enzyme : une pré-incubation de l'enzyme avec chaque réactif à 40°C à pH 8.

### **15. Test de la compatibilité de l'amylopullulanase de *Clavispora lusitaniae* ABS7 avec divers détergents à lessive commerciaux**

Le potentiel de l'amylopullulanase de *Clavispora lusitaniae* ABS7 comme additif détergent dans les lessives, sa compatibilité et sa stabilité envers certains détergents commerciaux disponibles sur le marché local (Ariel, le Chat, Test, Omo et Isis) sont testés. Pour stimuler l'état de lavage, les solutions aqueuses de détergents (7 mg/ml) sont chauffées à 100 °C pendant 60-90 minutes pour dénaturer l'activité enzymatique endogène. Ensuite, le détergent et l'enzyme sont mélangés dans un rapport de 1:1 (v / v) et incubés à 45 °C pendant 1 h, suivi par la mesure de l'activité de l' $\alpha$ -amylase résiduelle par la méthode standard et par rapport au témoin (enzyme dilué à 1: 1 dans l'eau du robinet sans détergent). L'activité relative de l' $\alpha$ -amylase en présence d'un détergent est exprimée en pourcentage d'activité par rapport à l'activité de contrôle prise à 100 %.

### **16. Analyse de la performance de lavage**

Dans le but de déterminer l'efficacité de l'amylopullulanase alcaline purifiée pour une utilisation comme additif bio-détergent, une performance de lavage a été évaluée par la détermination de la capacité de l'enzyme d'éliminer la tache de chocolat sur des tissus de coton (Hmidet et al., 2009). Le chocolat est chauffé à 70 °C et est utilisé avec de la confiture pour application sur des tissus de coton propres (7 cm  $\times$  7 cm) séchés pendant une nuit dans un four à air chaud (Hmidet et al., 2009).

Pour tester la performance de lavage, chaque morceau de tissu sale est plongé dans des erlens contenant :

- (a) 25 ml d'eau du robinet (témoin),
- (b) 20 ml d'eau du robinet et 5,0 ml de l'amylopullulanase alcaline purifiée (500 U/ml),
- (c) 20 ml d'eau du robinet et 5 ml de détergent chauffé (7 mg/ml),
- (d) 20 ml d'eau du robinet et 5 ml de détergent chauffé (7 mg/ml) contenant 500 U/ml

de l'enzyme alcaline purifiée.

Tous les erlens sont incubés à 37°C pendant 60 min sous agitation 200 rpm. Après incubation, les morceaux de tissu sont retirés et rincés à l'eau puis séchés (Hmidet et al., 2009 et Rameshkumar et Sivasudha, 2011).

## **Chapitre 3**

# **Résultats et discussion**

## Résultats et discussion

Ce travail s'inscrit dans la production combinée de l' $\alpha$ -amylase et la pullulanase levuriennes à application variée dans des différents secteurs industriels. Nous allons présenter, dans un premier temps, les résultats de l'isolement, l'identification des levures amylolytiques provenant de grains de blé des zones semi aride (Constantine et Oum El Bouaghi) et arides (Biskra) et la sélection de la souche levurienne la plus performante pour la production d' $\alpha$ -amylase et de la pullulanase thermostables. Dans un deuxième temps, nous exposons les résultats de la production enzymatique, son optimisation et son étude cinétique. Aussi, nous montrons les résultats de la purification des enzymes étudiées, de leur immobilisation, de l'étude des caractéristiques biochimiques et les paramètres cinétiques des enzymes libres et immobilisées.

### 1. Isolement et identification des souches

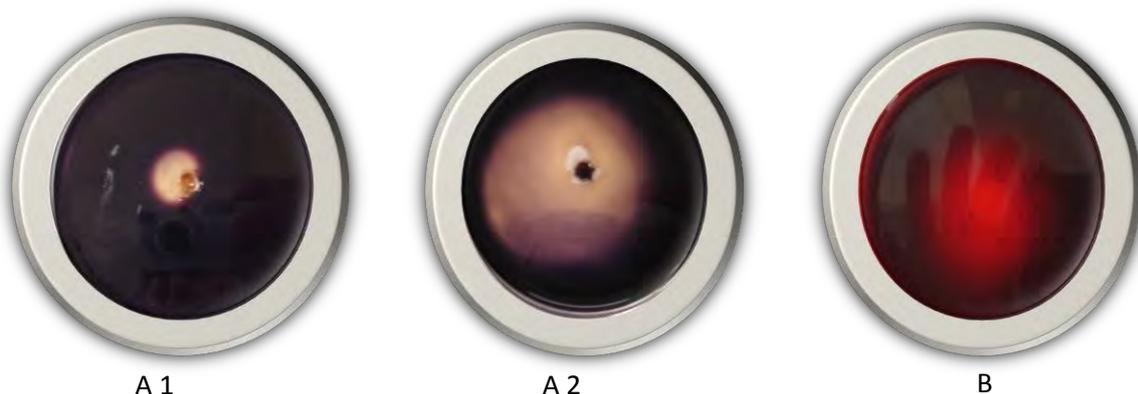
#### 1.1. Isolement et purification des levures

L'isolement des levures à partir des grains de blé a permis l'obtention d'une trentaine de souches levuriennes. Ces souches ont donné une bonne croissance sur les milieux YPGA et Sabouraud (supplémenté par 1 % de chloramphénicol), incubés à 30°C pendant 48 heures.

Par sa composition riche en amidon, en matière azotée et en matière minérale (Feillet P., 2000), on peut en déduire que le grain de blé constitue une bonne source d'isolement de levures amylolytiques.

#### 1.2. Présélection des levures amylolytiques

Une présélection sur la vitesse de croissance a été faite dans un premier temps. Tous les isolats à croissance lente ont été éliminés, soit au total une dizaine de souches. Dans un deuxième temps, une nouvelle présélection a été effectuée sur la capacité des levures à produire des enzymes amylolytiques ( $\alpha$ -amylase et pullulanase). Après culture des souches sur milieux YPSA et YPPA incubés à 40 °C pendant 72 heures, des colorations à l'iode (Figure 12A1 et 12A2) et au rouge de Congo (Figure 12 B) ont été réalisées.



**Figure 12** : Zones de lyse de l'amidon et du pullulane sous l'action des enzymes amylolytiques libérées par la levure. A1 : Zone de lyse de l'amidon moins importante. A2 : Zone de lyse de l'amidon très importante. B : Zone de lyse du pullulane importante

## Résultats et discussion

Les souches sélectionnées et productrices d'activités  $\alpha$ -amylasique et pullulanasiqne sont celles ayant provoqué une zone d'hydrolyse de diamètre  $\geq 0,5$  cm.

Une vingtaine de souches de levures sont ainsi répertoriées et dites amylase positive (Tableau14). Douze souches se sont montrées plus compétitives : SOS12, SOS8, ABS7, ABS6, SCS3, ABS5, ABS4, SCS1, SOS9, SOS11, SCS2 et SOS9. On remarque que la levure n°7 (L7), ayant le code ABS7, présente la meilleure zone de lyse pour les deux enzymes.

**Tableau 14** : Screening primaire pour l'isolement des souches levuriennes amylases positives.

N°	Souche	Location	Diamètre des zones claires (cm)	
			YPSA	YPPA
3	<b>SOS12</b>	<b>Oum el Bouaghi</b>	<b>2,25</b>	<b>1,5</b>
5	<b>SOS8</b>	<b>Oum el Bouaghi</b>	<b>2,2</b>	<b>1,8</b>
7	<b>ABS7</b>	<b>Biskra</b>	<b>4,5</b>	<b>3,5</b>
8	<b>ABS6</b>	<b>Biskra</b>	<b>3,4</b>	<b>3,1</b>
11	<b>SCS3</b>	<b>Constantine</b>	<b>3,8</b>	<b>2,8</b>
12	SOS20	Oum el Bouaghi	0,2	-
14	<b>ABS5</b>	<b>Biskra</b>	<b>2,5</b>	<b>1,8</b>
16	ABS19	Biskra	0,3	0,28
18	SCS18	Constantine	-	-
19	<b>ABS4</b>	<b>Biskra</b>	<b>4</b>	<b>3,5</b>
20	ABS17	Biskra	0,4	0,45
21	<b>SCS1</b>	<b>Constantine</b>	<b>2,8</b>	<b>2,5</b>
22	SCS15	Constantine	0,15	0,11
23	ABS15	Biskra	0,09	0,08
25	<b>SOS9</b>	<b>Oum el Bouaghi</b>	<b>1,4</b>	<b>1,2</b>
26	<b>SOS11</b>	<b>Oum el Bouaghi</b>	<b>1,3</b>	<b>0,8</b>
27	SOS14	Oum el Bouaghi	0,46	0,3
28	<b>SCS2</b>	<b>Constantine</b>	<b>3,45</b>	<b>2,6</b>
29	SCS13	Constantine	0,34	-
30	<b>SOS10</b>	<b>Oum el Bouaghi</b>	<b>1,45</b>	<b>1,40</b>

L'amidon constitue l'inducteur de l'activité  $\alpha$ -amylasique (milieu YPSA) et le pullulane celui de la pullulanase (milieu YPPA). En leur présence les levures amylolytiques secrètent l' $\alpha$ -amylase et la pullulanase qui vont diffuser et hydrolyser l'amidon (milieu YPSA) et le pullulane (milieu YPPA) pour former un halo clair autour des colonies (Moubasher et al., 2010).

Ramachandran et al., 2005, ont répertorié 150 levures qui assimilent l'amidon dans la nature, avec quelques souches seulement capables de couper à la fois les liaisons  $\alpha$ -1,4 et  $\alpha$ -1,6 des polymères glucidiques.

Les amylases extracellulaires sont relativement rares chez les levures contrairement aux bactéries. Ces enzymes sont mis en évidence chez certaines souches de levures : *Cryptococcus heimaeyensis* HA7 (Hossam et al., 2011), *Filobasidium capsuligenum* (De Mot et Verachtert, 1987), *Lipomyces kononenkoae* (Wanderly et al., 2004), *Lipomyces starkeyi* (Kang et al., 2004) *Trichosporon pullulans*, *Saccharomycopsis bispora*, *Saccharomycopsis capsularis*, *Saccharomycopsis fibuligera* (*Endomycopsis fibuligera*) (Nigam et Singh, 1995 et Gonzalez et al., 2008), *Candida tsukubaensis* CBS 6389 (De Mot et Verachtert, 1985). Le système amylolytique des espèces du genre *Schwanniomyces* (*S. Castellii*, *S. Alluvius* et *S.*

## Résultats et discussion

---

*Occidentalis*) a été bien étudié (Oteng Gyang et al., 1981 ; Sills et Steward, 1982 ; Wilson et Ingledew, 1983 ; Clementi et Rossi, 1986 et Nigam et Singh, 1995).

### 1.3. Production d'amylases par le genre *Candida*

Plusieurs espèces de *Candida* ont fait l'objet d'études quant à la production de différentes amylases.

Ouédraogo et al., 2012, ont isolé plusieurs souches levuriennes du genre *Candida*, productrices de l' $\alpha$ -amylase, *Candida utilis*, *Candida guilliermondii*, *Candida lusitaniae* et *Candida famata* à partir de déchets des pommes de terre. Cette enzyme a été également étudiée chez d'autres *Candida* tels que *Candida ontarionensis* (Hernandez-Montanez Z. et al., 2010) et *Candida guilliermondii* (Acourene et Ammouche, 2012).

Comme l'amidon est très répandu dans les produits végétaux, il serait intéressant de rechercher de nouvelles souches levuriennes pour la caractérisation du complexe d'amylases extracellulaires (Ouédraogo et al., 2012 et Moubasher et al., 2013).

Les espèces *Candida famata* et *Candida guilliermondii* sont des levures productrices de la glucoamylase (Lagzouli et al., 2007).

Par contre, certains espèces de *Candida* ont une production mixte de l' $\alpha$ -amylase et de la glucoamylase comme *Candida edax* (Ettalibi et Beratti, 1988), *Candida antartica* CBS 6678 (De Mot et Varachtert, 1987), *Candida fennica* et *Candida famata* (Linardi et al., 1993).

### 1.4. Production de pullulanase par les levures

Par rapport aux bactéries, peu d'études ont été consacrées aux pullulanases chez les levures. Cependant, nous pouvons citer les travaux de De Mot et Verachtert (1984) portant sur la production de pullulanase extracellulaire chez plusieurs espèces de *Candida*, *Cryptococcus*, *Pichia*, *Schwanniomyces*, *Torulopsis*, *Lipomyces*, *Trichosporon*, *Endomycopsis*, *Leucosporidium* et *Filobasidium*. Parmi ces souches, les genres *Endomycopsis*, *Filobasidium*, *Lipomyces*, *Trichosporon* et *Leucosporidium* sont plus performantes pour la production de cette enzyme amylolytique.

D'autres études (Gaur et al., 2010 et Moubasher et al. 2013) ont été faites sur la production de la pullulanase chez *Hypocrea jacobina* QM9414, forme imparfaite de *Trichoderma reesei* (Nurdagul et al. 2014) et aussi chez la levure *Aureobasidium pullulans* qui s'est révélée également productrice d' $\alpha$ -amylase. Linardi et al., 1993 ont découvert chez *Candida fennica* et *Candida famata*, la présence d'une enzyme débranchante, active sur le pullulane, qui pourrait être une pullulanase.

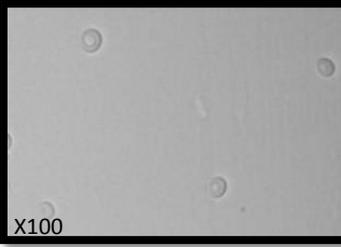
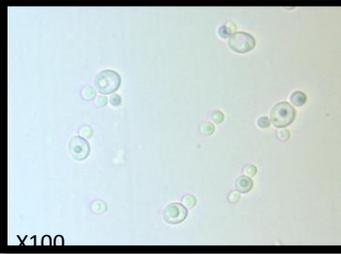
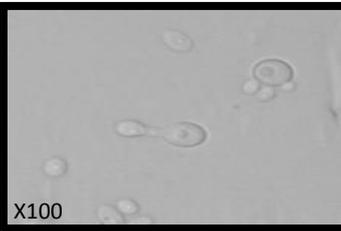
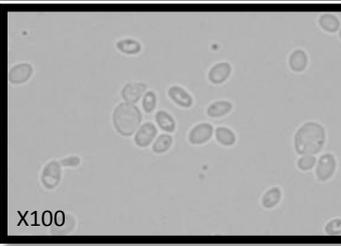
### 1.5. Identification des levures

#### 1.5.1. Identification phénotypiques

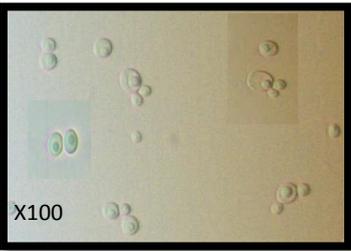
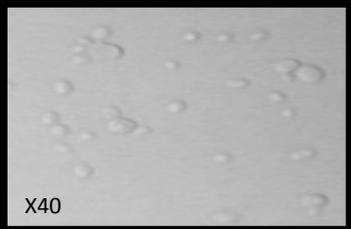
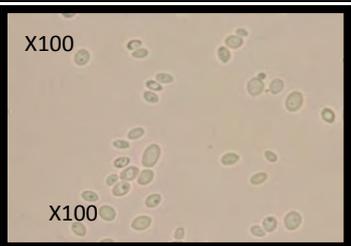
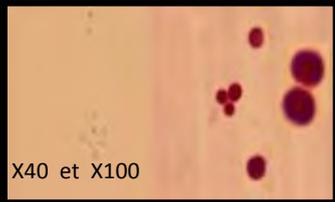
Les résultats des caractéristiques macroscopiques et microscopiques sont récapitulés dans le tableau 15. L'observation microscopique révèle une structure apparentée à celle des levures dont certaines sont en mode de reproduction par scissiparité : SCS2, SCS3, ABS4 et ABS7.

## Résultats et discussion

**Tableau 15** : Caractères macroscopiques et microscopiques des 12 souches de levures sélectionnées, cultivées sur milieu YPGA et YPG et incubées à 30°C pendant 48-72h.

Origine	Code	Aspect macroscopique sur YPGA	Aspect microscopique
Constantine (Zone semi-aride)	SCS1 (L8)	Colonie rondes, plates, humides, lisses et de couleur crème.	Cellules sphérique ou subsphériques, 2,0-4,0 x 3,0 à 6 µm en taille.  X40
	SCS2 (L9)	Colonies blanches, crémeuses, lisses, bombées d'aspect brillant.	Cellules ovoïdes, leur taille est de 4-10 x 3-6µm en taille  X100
	SCS3 (L10)	Colonies blanches, crémeuses, lisses, bombées d'aspect brillant.	Cellules globuleuses à sub-globuleuses 2-6X 2-3 en taille  X100
Biskra (Zone aride)	ABS4 (L11)	Colonies blanches, crémeuses, lisses, bombées d'aspect brillant.	Cellules subglobuleuses, 2-5,5 x 2-9 en taille Bourgeoisement mono, bi et multilatéral  X100
	ABS5 (L6)	Colonies plates, humides, lisses et de couleur crème.	Cellules sphériques ou subsphériques, 2,0-4,0 x 3,0 à 6 µm en taille. Cellules séparées ou en paires. Bourgeoisement monolatéral ou multilatéral  X100
	ABS6 (L12)	Colonies plates, humides, lisses et de couleur crème.	Cellules sont ellipsoïdales, ovoïdes, 2,0-4,0 x 3,0 à 6 µm en taille. Reproduction végétative par bourgeoisement  X100

## Résultats et discussion

ABS7 (L7)	Colonies blanches, crémeuses, lisses, bombée d'aspect brillant.	Cellules rondes à allongées. Cellules séparées ou en paires  Bourgeonnement multilatérale	 X100
SOS8 (L5)	Colonies blanches, crémeuses, lisses, bombées d'aspect brillant.	Cellules ovoïdes Production végétative par bourgeonnement	 X40
SOS9 (L4)	Colonies plates, humides, lisses et de couleur crème.	Cellules sont ovoïdes, 2,0-4,0 x 3,0 à 6 µm en taille. Production végétative par bourgeonnement	 X100 X100
SOS10 (L1)	Colonies plates, humides, lisses et de couleur crème.	Cellules sphériques ou subsphériques, 2,0-4,0 x 3,0 à 6 µm en taille. Production végétative par bourgeonnement	
<b>Oum ElBouaghi (Zone semi-aride)</b>	SOS11 (L2)	Colonies plates, humides, lisses et de couleur crème.	Cellules sphériques ou subsphériques, 2,0-4,0 x 3,0 à 6 µm en taille.  X100
	SOS12 (L3)	Colonies de couleur rose-orange, lisses, brillantes Contour entier (régulier),	Cellules ovoïdes à sphériques, 3-6x2-10 µm en taille Bourgeonnement multilatéral et scissiparité Isolées ou en paires
			 X40 et X100 

## Résultats et discussion

### 1.5.2. Assimilation des substrats carbonés (Galerie API 32C)

Les composés carbonés sont les substrats le plus fréquemment utilisés par les levures. Certaines levures ont la capacité d'utiliser une large gamme des composés carbonés contrairement à d'autres qui en assimilent moins. Vue l'importance de ce critère dans la physiologie des levures nous avons utilisé la galerie API 32C pour l'identification des 12 souches sélectionnées. Les résultats sont interprétés en utilisant le téléchargement d'APIWEB fourni par le fabricant (récapitulés dans le tableau 16).

Parmi les 12 souches isolées et sélectionnées, une souche appartient au genre *Rhodotorula*, six appartiennent à *Candida guilliermondii* et cinq à *Candida lusitaniae* (Tableau 16). Ces espèces ont pu s'adapter aux conditions extrêmes qui dépassent les 50°C au mois de Juillet à Biskra (400 Km au Sud Est d'Alger, Sahara Algérien).

**Tableau 16** : Identification à partir de caractères biochimiques (ID 32C) et microscopiques

Origine	Levure	Code	Caractères biochimiques (ID 32C) et	Filamentation sur R.A.T.	Sporulation	Identification
Constantine	L8	SCS1	7177 3521 17 lac- et ESC+	Pseudohyphes courts et des filaments assez longs avec des verticilles de blastospores au niveau des septa	+	<i>Candida guilliermondii</i> .
	L9	SCS2	5157 3701 17 lac- et ESC+ (GNT-)	Petits pseudohyphes	+	<i>Candida lusitaniae</i>
	L10	SCS3	5157 3701 17 lac- et ESC+ (GNT-)	Petits pseudohyphes	+	<i>Candida lusitaniae</i>
Biskra	L12	ABS4	5177 3521, ESC+	Vrai mycélium	+	<i>Candida guilliermondii</i> ou <i>famata</i>
	L11	ABS5	5157 3703 17 lac- et ESC+ (GNT +)	Vrai mycélium	+	<i>Candida lusitaniae</i>
	L6	ABS6	7177 3521 15 lac- et ESC+.	Pseudohyphes assez courts et Vrai mycélium	+	<i>Candida guilliermondii</i>
	L7	ABS7	5157 3703 17 lac- et ESC+ (GNT+)	Vrai mycélium	+	<i>Candida lusitaniae</i> .
Oum El Bouaghi	L5	SOS8	5157 3701 1 lac- et ESC+ (GNT-)	Vrais filaments	+	<i>Candida lusitaniae</i> .
	L4	SOS9	7177 3521 15 lac- et ESC+.	Pseudohyphes et vrais filaments	-	<i>Candida guilliermondii</i>
	L1	SOS10	7577 3501 17 lac -, ESC+ : (ARA+, MEL-)	Pseudomycélium	+	<i>Candida guilliermondii</i>
	L2	SOS11	7177 3521 17 Lac- et ESC + (ARA-, MEL+)	Pseudohyphes courts	-	<i>Candida guilliermondii</i>
	L3	SOS12	5461 7401 17 lac- et ESC+ (GNT-)	Pas de filaments	-	<i>Rhodotorula rubra</i> ou <i>glutinis</i> .

## Résultats et discussion

D'autres résultats complémentaires selon Barnett 2000 indiquent que la majorité des souches (L1, L2, L3, L4, L5, L6, L8, L9, L10) poussent sur le méthanol et l'éthanol tandis que L7 poussent uniquement sur le méthanol (Tableau 17).

Sur un milieu contenant 0,1% de cycloheximide, seules les souches L4 et L6 présentent un bon développement (Tableau 17).

Sur un milieu contenant 15% de NaCl, aucune croissance n'a été observée pour toutes les souches testées (Tableau 17). A 10% de NaCl, les souches L1, L2, L4, L6, L8 et L9 tolèrent cette concentration.

Par contre, toutes les souches poussent sur le milieu contenant 50% ou 60% de glucose. La résistance des levures aux changements de la pression osmotique du milieu extérieur peut être due à l'accumulation dans la cellule de polyols (Rose, 1987).

Après une incubation pendant 48 heures à différentes températures allant de 30°C à 47 °C, la majorité des souches a bien poussé sauf la souche L3 qui n'a pu résister à 47°C. Ces caractéristiques de croissance permettent de classer ces levures parmi les microorganismes thermophiles osmophiles modérés. Selon Rudiger et al. (1995) et Madigan et Martino (2006), les micro-organismes qui poussent entre 45°C et 80°C sont appelés micro-organismes thermophiles.

**Tableau 17** : Résultats des tests complémentaires.

Souches	Ethanol	Méthanol	Cycloheximide 0,01%	Cycloheximide 0,1%	Glucose 50%	Glucose 60%	NaCl 5%	NaCl 10%	NaCl 15 %	30°C	37°C	42°C	45°C	47°C
L1	+	+	+	+	+	±	+	+	-	+	+	+	+	+
L2	+	+	+	±	+	±	+	+	-	+	+	+	+	+
L3	+	+	+	+	+	±	+	-	-	+	+	+	+	-
L4	+	+	+	++	+	±	+	+	-	+	+	+	+	+
L5	+	±	+	+	+	±	+	-	-	+	+	+	+	+
L6	+	+	+	++	+	±	+	+	-	+	+	+	+	+
L7	-	+	+	±	+	±	+	-	-	+	+	+	+	+
L8	+	+	+	+	+	±	+	+	-	+	+	+	+	+
L9	+	+	+	+	+	±	+	+	-	+	+	+	±	±
L10	+	+	+	+	+	±	+	-	-	+	+	+	±	±
L11	+	+	+	±	+	±	+	-	-	+	+	+	+	+
L12	+	+	+	±	+	±	+	-	-	+	++	+	+	+

### 1.5.3. Identification génotypique des isolats

#### 1.5.3.1. Caractérisation des souches levuriennes par PCR.

L'amplification de l'ADN des levures isolées avec des amorces ITS1/ITS4 a donné des bandes (une pour chaque ADN) de taille entre 400-800pb (Figure 17). Nous avons comparé

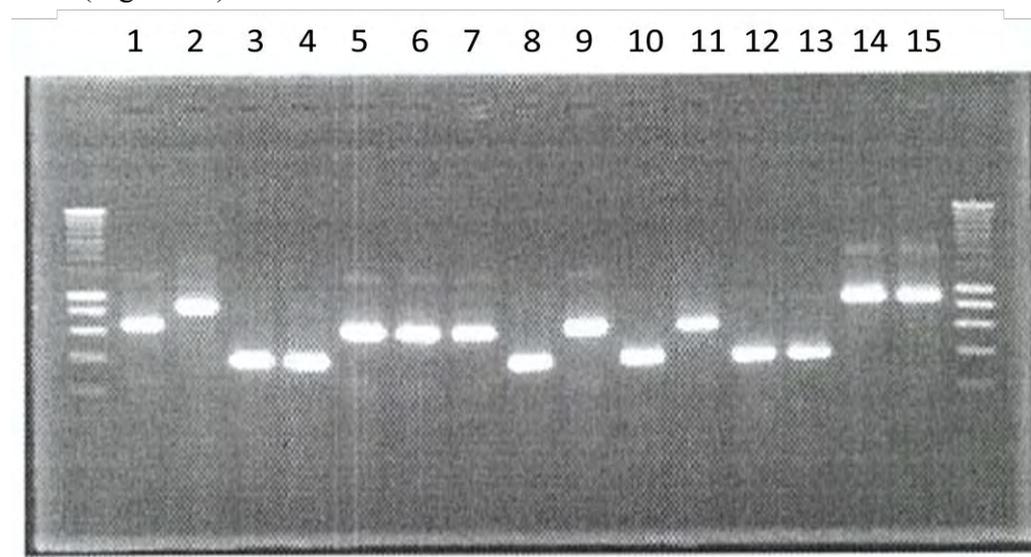
## Résultats et discussion

nos souches à trois souches de référence (*S. cerevisiae*, *C. glabrata* et *K. lactis*). Les amorces ITS1 et ITS4 sont utilisées pour amplifier la région entre 18S et 28S d'ARNr. Les isolats ont montré des produits de la PCR de différentes tailles, allant de 400 pb à 800 pb (Tableau 18).

**Tableau 18 :** Taille des fragments (produits de la PCR).

N° de piste	Référence des souches	Taille de fragment (pb)
1	<i>Klyveromyces lactis</i> (témoin)	600
2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (témoin)	800
3	L12	400
4	L11	400
5	L1	600
6	L2	600
7	L4	600
8	L5	400
9	L6	600
10	L7	400
11	L8	600
12	L9	400
13	L10	400
14	<i>Candida glabrata</i> (témoin)	800
15	L3	800

La taille et la pureté des produits de PCR sont confirmées par l'électrophorèse d'agarose. L'ADN est visualisé après coloration au bromure d'éthidium par illumination avec de la lumière UV (Figure 13).



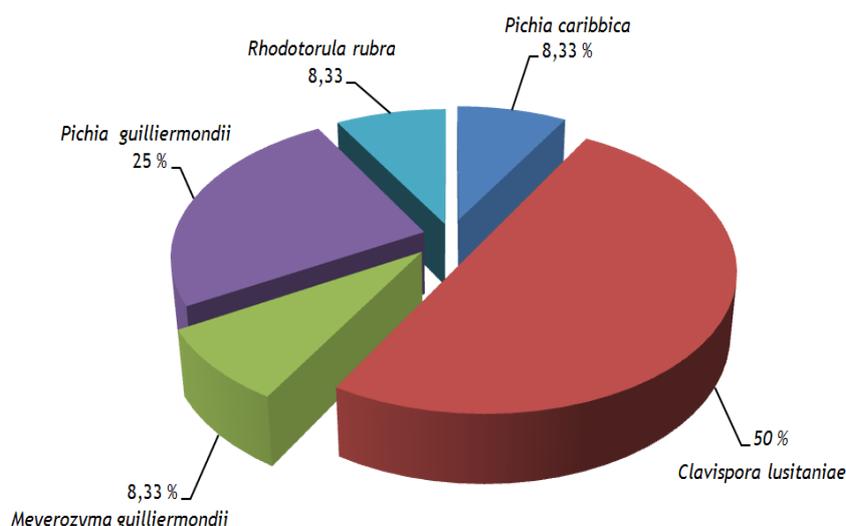
**Figure 13 :** Résultats du test PCR avec ITS1/ITS4

La comparaison de séquences avec la base de données NCBI aboutit à :  
- 11 souches appartiennent à la classe d'Ascomycètes et sont identifiées ainsi :

## Résultats et discussion

- La souche (L1) a un ADN de taille de 600 pb correspondant à *Pichia caribbica*
- Les souches (L5, L7, L9, L10, L11, L12) ont un ADN de taille de 400 pb correspondant à *Clavispora lusitaniae*
- Une souche a un ADN de taille de 600 pb et est identifiée à *Meyerozyma guilliermondii*
- Les souches (L2, L4, L8) ont un ADN de taille de 600 pb et correspondent à *Pichia guilliermondii*.
- La souche (L3) a un ADN de 800 pb appartenant à la classe des Basidiomycètes et identifiée comme *Rhodotorula rubra*.

La fréquence des isolats obtenus à partir des grains de blé est présentée dans la figure 14.



**Figure 14** : Fréquences des levures dans les grains de blé

Il ressort de la figure 14 que l'espèce *Clavispora lusitaniae* est l'espèce dominante dans nos échantillons puisqu'elle présente 50% du biotope des grains de blé prélevés pour notre étude.

Les groupes de souches sont classés en fonction de la taille du fragment générée par PCR :

- Groupe A (L7, L11, L5, L12, L9, L10).
- Groupe B (*K. lactis*, L1, L2, L4, L6, L8).
- Groupe C (*S. cerevisiae*, *C. glabrata*, L3).

Les souches ayant la même taille du fragment ITS seront comparées pour déterminer leur degré de ressemblance en se basant sur les profils de restriction et sur l'alignement des séquences du fragment encadré par ITS1/ITS4.

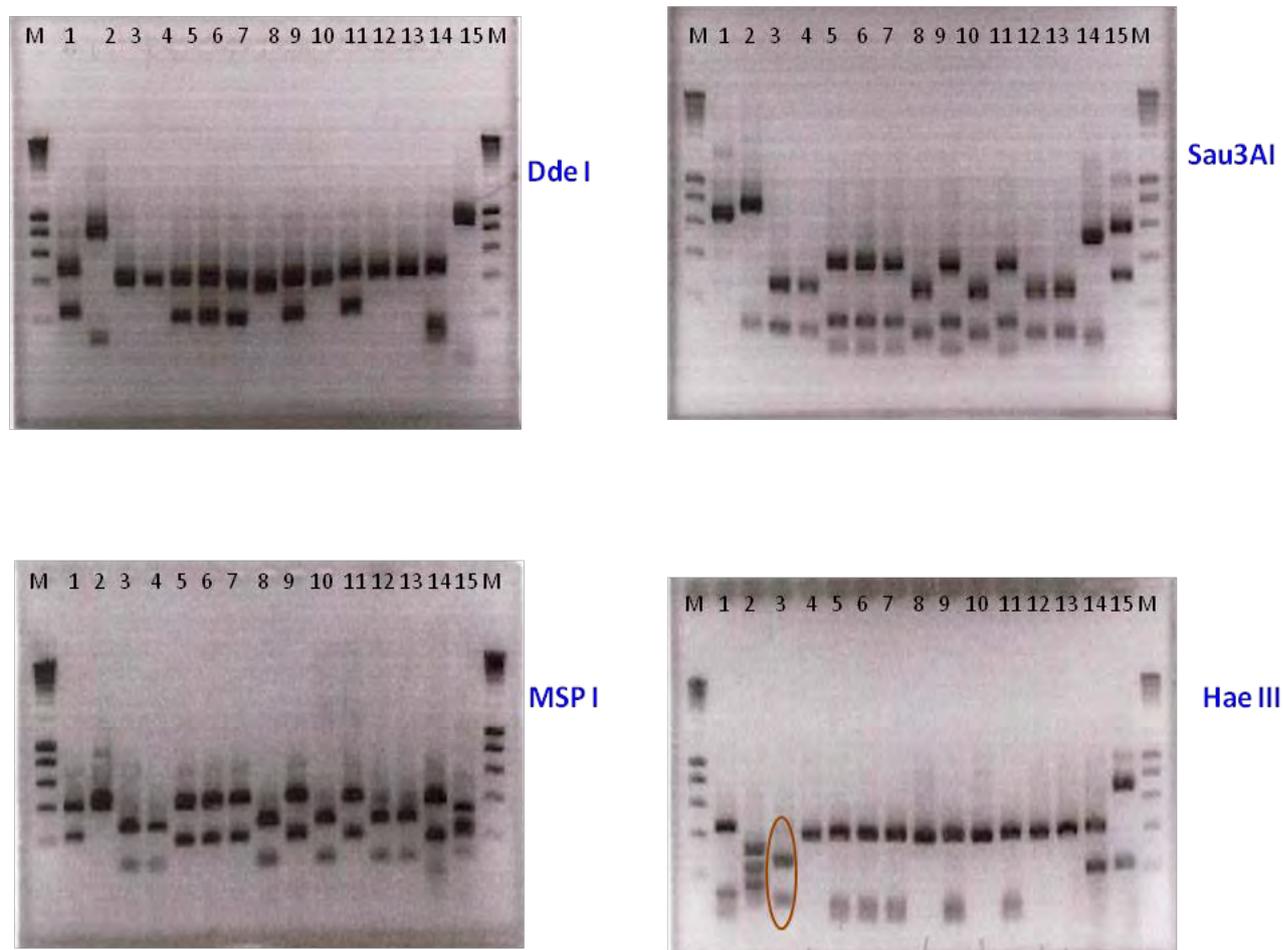
A ce stade, nous ne pouvons pas affirmer que les souches ayant la même séquence sont identiques. Il faudrait faire l'analyse d'autres séquences ou réaliser des tests physiologiques supplémentaires.

### 1.5.3.2. Identification des levures par RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)

Les isolats ont subi une étude complémentaire qui a consisté en la digestion des produits de la PCR par les enzymes de restriction Dde I, Sau3AI, MSPI et Hae III. Les fragments de restriction obtenus sont analysés par électrophorèse sur gel d'agarose.

## Résultats et discussion

Les résultats de la digestion par les enzymes de restriction sont présentés par les profils la figure suivante (Figure 15)



**Figure 15** : Profils RFLP des produits de la PCR obtenus avec les enzymes de restriction Dde I, Sau3AI, MSP I et Hae III.

La figure 15 montre les gels typiques d'électrophorèse de produits de la PCR obtenus à partir de 11 souches de *Candida* et une souche de *Rhodotorula* digérés avec les quatre enzymes de restriction.

Les profils de restriction obtenus avec chaque enzyme pour chaque isolat sont résumés dans le tableau 19. Les résultats montrent que la souche L7 *Clavispora lusitaniae* ABS7 a donné deux bandes avec l'endonucléase HAE III alors que les autres souches de *Clavispora lusitaniae* (L5, L9, L10, L11 et L12) ont donné une seule bande.

## Résultats et discussion

**Tableau 19:** Tailles des produits de la PCR ITS1-ITS2 de tous les isolats étudiés et des souches témoins avant et après la digestion par les enzymes de restriction Dde I, Sau3AI, MSP I et Hae III

Souche	Identification	Taille d'ITS1-ITS4 (pb)	Taille de produits de la restriction (paire de bases pb)			
			Dde I	Sau3AI	MSP I	Hae III
Témoin	<i>Klyveromyces lactis</i>	600	400+200	600	400+200	600
Témoin	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	800	700+100	700+100	800	800
L7	<i>Clavispora lusitaniae</i>	400	400	300+100	320+80	<b>250+150</b>
L11	<i>Clavispora lusitaniae</i>	400	400	300+100	320+80	400
L1	<i>Pichia caribbica</i>	600	400+200	400+120+80	400+200	480+120
L2	<i>Pichia guilliermondii</i>	600	400+200	400+120+80	400+200	480+120
L4	<i>Pichia guilliermondii</i>	600	400+200	400+120+80	400+200	480+120
L5	<i>Clavispora lusitaniae</i>	400	400	300+100	320+80	400
L6	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	600	400+200	400+120+80	400+200	480+120
L12	<i>Clavispora lusitaniae</i>	400	400	300+100	320+80	400
L8	<i>Pichia guilliermondii</i>	600	400+200	400+120+80	320+80	450+150
L9	<i>Clavispora lusitaniae</i>	400	400	300+100	320+80	400
L10	<i>Clavispora lusitaniae</i>	400	400	300+100	320+80	400
Témoin	<i>Candida glabrata</i>	800	800	500+250+50	380+250+170	480+320
L3	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	800	600+200	400+300+100	400+300+100	650+150

Pour l'identification moléculaire, une comparaison de séquences est établie avec les séquences de la base de données NCBI. Les résultats de l'identification sont récapitulés dans le tableau 20.

La confirmation de la répartition de la population levurienne se fait ainsi :

- Six souches appartenant au genre *Clavispora lusitaniae* (*Candida lusitaniae*) avec sporulation et pseudomycélium.
- Trois souches de *Pichia guilliermondii* sans sporulation et un vrai mycélium.
- Une souche de *Pichia caribbica*, sporulation+.
- Une souche de *Rhodotorula mucilaginosa*, sporulation –.
- Une souche de *Meyerozyma guilliermondii*, sporulation +.

Le biotope prélevé contient des levures de différents genres avec une prédominance nette pour l'espèce *Clavispora lusitaniae* ou *Candida lusitaniae*.

## Résultats et discussion

**Tableau 20 :** Récapitulation de l'identification des souches de levures.

Code Souche	API 32C	Identification galerie 32C	Numéro Accession	Similarité %	Identification PCR-RFLP	Mycélium	Sporulation
L1	7577 3501	<i>Candida guilliermondii</i>	FN42831.1	99%	<i>Pichia caribbica</i>	Vrai mycélium	+
L2	7177 3521	<i>Candida guilliermondii</i>	FJ969194.1	99%	<i>Pichia guilliermondii</i>	Vrai mycélium	-
L3	5461 7401	<i>Rhodotorula rubra</i>	CRUB0138	99%	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	-	-
L4	7177 3521	<i>Candida guilliermondii</i>	EF197814.1	99%	<i>Pichia guilliermondii</i>	Vrai mycélium	-
L5	5157 3701	<i>Candida lusitaniae</i>	G0376072.1	99%	<i>Clavispora lusitaniae</i>	Pseudo mycélium	+
L6	7177 3521	<i>Candida guilliermondii</i>	EF197816.1	100%	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	Vrai mycélium	+
L7	5157 3701	<i>Candida lusitaniae</i>	GO376072.1	99%	<i>Clavispora lusitaniae</i>	Pseudo mycélium	+
L8	7177 3521	<i>Candida guilliermondii</i>	FJ96991941	99%	<i>Pichia guilliermondii</i>	Vrai mycélium	-
L9	5157 3701	<i>Candida lusitaniae</i>	GO376072.1	99%	<i>Clavispora lusitaniae</i>	Pseudo mycélium	+
L10	5157 3701	<i>Candida lusitaniae</i>	GO376072.1	99%	<i>Clavispora lusitaniae</i>	Pseudo mycélium	+
L11	5157 3701	<i>Candida lusitaniae</i>	GO376072.1	99%	<i>Clavispora lusitaniae</i>	Pseudo mycélium	+
L12	5157 3701	<i>Candida lusitaniae</i>	GO376072.1	99%	<i>Clavispora lusitaniae</i>	Pseudo mycélium	+

Les levures contaminant les céréales appartiennent aux micromycètes et renferment les genres *Saccharomyces*, *Candida*, *Hansenula*, *Pichia* (Bourgeois et Larpent, 1996, Laitila et al., 2006). Dans l'orge, les levures sont le deuxième groupe de microorganismes le plus abondant (Flannigan, 2003). Dans l'écosystème de l'orge se trouvent les genres *Candida*, *Clavispora*, *Galactomyces*, *Hanseniaspora*, *Issatchenkia*, *Pichia*, *Saccharomyces* et *Williopsis* et les genres de levures basidiomycètes telles que *Bulleromyces*, *Filobasidium*, *Cryptococcus*, *Rhodotorula*, *Sporobolomyces* et *Trichosporon*.

Le biotope étudié [blé récolté dans un climat aride (Biskra) et semi aride (Constantine et Oum El Bouaghi)] constitue une source de souches levuriennes amylolytiques. Des études antérieures ont permis l'isolement de levures amylolytiques à partir de différentes sources riches en amidon :

- Tubercules de la patate douce (Olasupo et al., 1996),
- Sols amylicés prélevés dans des plantations de manioc après la récolte ou des marchés de la farine et dans l'environnement de minoteries (Kamakshi et al., 1999 et Fossi et al., 2005),
- Orge (Petters et al., 2008), mais (Ebabhi et al., 2013).
- Déchets de la pomme de terre (Ouédraogo et al., 2012),

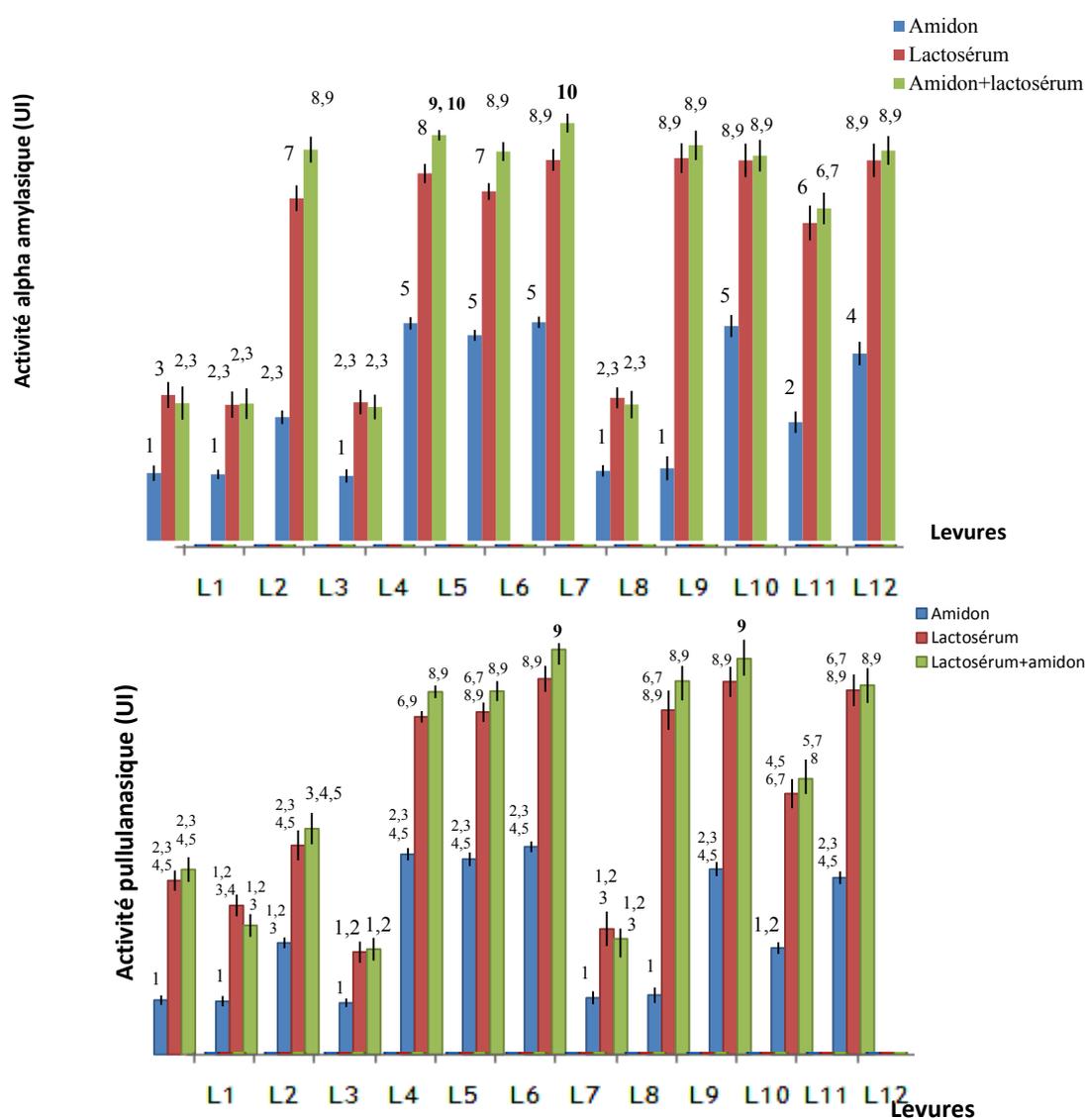
## Résultats et discussion

- Produit de fermentation du riz pour la préparation du vin traditionnel vietnamien (Dung et al. 2006),
- Marcha ou murcha (un stimulateur d'expression « start up » amylolytique traditionnel utilisé pour produire des boissons alcoolisées) (Tsuyoshi et al., 2005),
- Aliments fermentés (Hiroshi et al., 1997).
- Levains de panification traditionnels (Lagzouli et al., 2007).

A ce jour, l'isolement de levures amylolytiques à partir de grains de blé n'a fait l'objet d'aucune étude malgré leur richesse en amidon (69g/100g de grain de blé) (Feillet, 2000).

### 1.6. Production d' $\alpha$ -amylase et de pullulanase thermostables

Pour chercher une souche productrice d'enzymes thermostables, un screening sur les 12 souches levuriennes sélectionnées est entrepris en comparant leur comportement sur différents milieux (lactosérum, amidon, lactosérum + amidon) (Figures 16).



**Figure 16 :** Etude de la production des enzymes amylolytiques par des levures sélectionnées sur différents milieux, A :  $\alpha$ -amylase, B : pullulanase

## Résultats et discussion

---

Les 12 souches sont capables de produire de l' $\alpha$ -amylase et de la pullulanase mais avec une différence hautement significative.

- Les activités amyliques sont plus élevées chez les souches L<sub>3</sub>, L<sub>5</sub>, L<sub>6</sub>, L<sub>7</sub>, L<sub>9</sub>, L<sub>10</sub>, L<sub>11</sub> et L<sub>12</sub> (figure 16 A).
- L'activité de la pullulanase est performante chez les souches : L<sub>5</sub>, L<sub>6</sub>, L<sub>7</sub>, L<sub>9</sub>, L<sub>10</sub>, L<sub>11</sub> et L<sub>12</sub> (figure 16 B)

## Résultats et discussion

- Les souches L<sub>3</sub>, L<sub>5</sub>, L<sub>6</sub>, L<sub>7</sub>, L<sub>9</sub>, L<sub>10</sub>, L<sub>11</sub> et L<sub>12</sub> produisent aussi bien l' $\alpha$ -amylase que la pullulanase sur les trois milieux testés.

Les résultats de l'analyse de la variance montrent que l'activité  $\alpha$ -amylase chez *Clavispora lusitaniae* ABS7 dépend de la souche (F=847,55) et du substrat (F=3110,66).

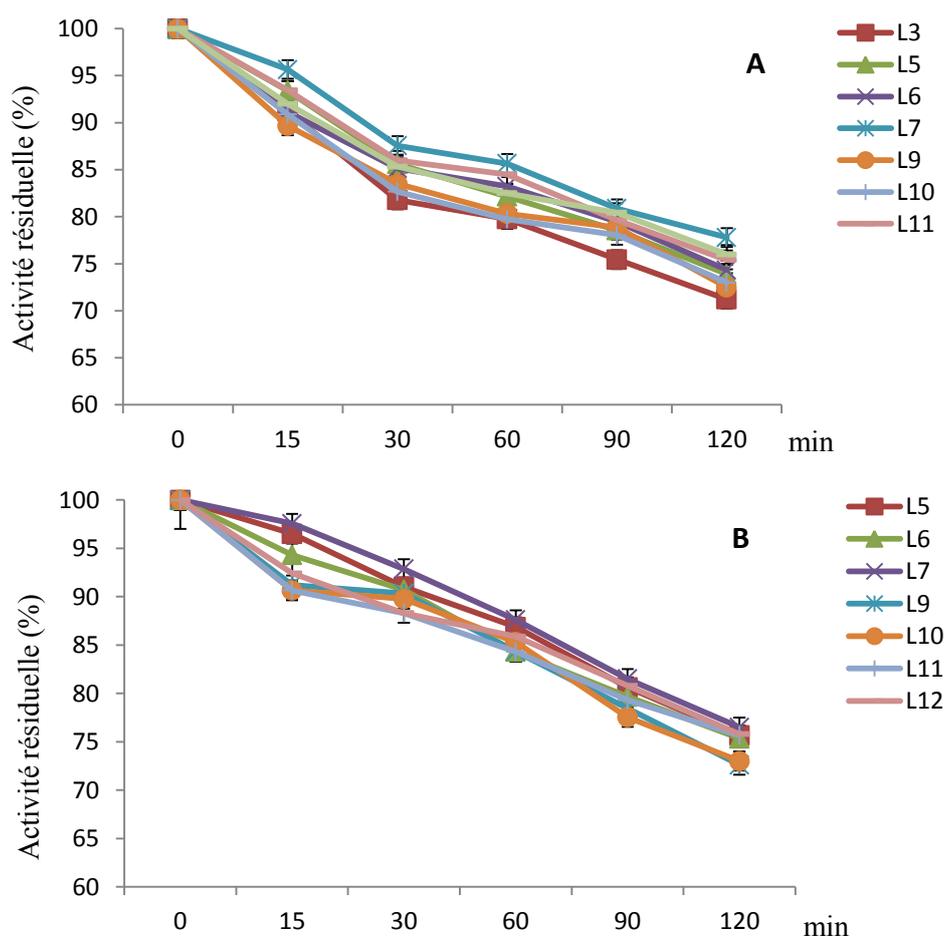
Cultivée sur le lactosérum additionné de 1% d'amidon, la souche L<sub>7</sub>, *Clavispora lusitaniae* ABS7, est la plus performante dans la production de l' $\alpha$ -amylase d'après la figure et le test de Newman-Keuls. Elle est suivie de la souche L<sub>5</sub>, cultivée sur le même milieu (annexe 3).

Quant à la production pullulanasique par les 12 souches sur les trois milieux, l'analyse de la variance indique que l'enzyme est affectée aussi bien par la souche (F= 41,114) que par le substrat (F=131,43). D'après la figure 16 et le test de Newman-Keuls, il s'est avéré que la souche L<sub>7</sub> est la plus performante lorsqu'elle est cultivée sur le milieu lactosérum plus amidon. Elle est suivie de la souche L<sub>10</sub> dans les mêmes conditions (annexe 3)

La souche la plus performante (celle qui donne la meilleure production d' $\alpha$ -amylase et de pullulanase thermostables est donc la levure L<sub>7</sub>.

### 1.7. Comparaison de la thermostabilité des enzymes des souches sélectionnées

Les meilleures souches productrices de l' $\alpha$ -amylase et de la pullulanase sont utilisées pour l'étude de la thermostabilité (Figures 17).



**Figure 17 :** Etude de la thermostabilité des enzymes des levures sélectionnées

A :  $\alpha$ -amylase, B : pullulanase

## Résultats et discussion

---

De façon générale, les souches du biotope d'étude sont compétitives pour la production amylolytique et les enzymes  $\alpha$ -amylase et pullulanase sont thermostables. A 90°C durant 120 min, toutes les enzymes ont maintenu en moyenne 75 % de leur activité initiale. Cependant, la souche L3 de l'espèce *Rhodotorula mucilaginosa* semble être plus sensible avec une perte de 30% de son activité initiale.

Les résultats obtenus montrent que les enzymes produites par les souches sont des enzymes thermostables, et dépassent largement les valeurs rapportées par la littérature.

La stabilité thermique de l' $\alpha$ -amylase et de la pullulanase sont prolongées : la durée de demi-vie n'est pas atteinte après 3h d'incubation.

Cette résistance à la température peut s'expliquer par la nature des souches, l'influence du biotope (zone aride désertique et semi-aride) et l'adaptation physiologique des microorganismes aux conditions de l'environnement, entraînant la sécrétion d'enzymes dont la structure particulière est en lien avec la thermostabilité, en particulier grâce à une glycosylation excessive (Vieille et Zeikus, 2011).

Les levures ne sont pas connues par leur résistance à la température élevée, alors que certaines bactéries sont considérées comme thermo-résistantes. Des études ont montré que la cohabitation des bactéries et des levures dans le même milieu peut avoir pour conséquence un transfert de gènes des bactéries vers les levures, justifiant ainsi le comportement thermique inhabituel des enzymes des souches levuriennes étudiées, comparables à celui des amylases bactériennes (Fossi et al., 2005). En effet, la transformation génétique se produit lorsque différents micro-organismes sont cultivés sur le même milieu (Gasson et Davies, 1984 ; Hofer, 1985; Deak et al., 1986 ; Cocconcelli et al., 1986). La composition du milieu et les conditions environnementales sont des facteurs qui régissent ce processus (Fossi et al., 2005). D'autres facteurs accentuent la thermostabilité des enzymes comme les différentes liaisons maintenant la structure tertiaire des enzymes : ponts disulfures, liaisons hydrogènes, interactions ioniques et liaisons hydrophobes (Mallick et al., 2002 ; Roovers et al., 2004 et Elleuche et Antranikian, 2013), ponts salins et cofacteurs (Vieille et al., 2001).

Tous ces facteurs augmentent la résistance de l'enzyme à des traitements thermiques élevés (Mallick et al., 2002 ; Roovers et al., 2004). Par ailleurs, les ions  $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{Zn}^{2+}$  participent à la structure des amylases (métallo-enzyme à  $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{Zn}^{2+}$ ) et augmentent considérablement leur stabilité (Saxena et Singh, 2011 et Smitha et al., 2015).

Nos résultats peuvent également être expliqués par le fait que l'enzyme n'est pas purifiée : l'extrait enzymatique contient des sources carbonées et des sels qui peuvent contribuer à la thermostabilité des enzymes (Turner et al., 2007). Cependant, on peut également penser que des éléments déterminés par des séquences particulières en acides aminés situés à des endroits stratégiques, ont participé également au maintien de la structure spatiale de l'enzyme malgré les traitements thermiques subis. Différentes études ont révélés que la thermostabilité des enzymes est énormément affectée par la richesse en paires de base CG des mRNA des protéines (Farias et Bonato, 2003 ; Hickey et Singer, 2004 ; Paz et al., 2004 et Trivedi et al., 2006).

Il ressort de la figure 21 que les souches qui produisent une  $\alpha$ -amylase thermostable sont par ordre régressif : la souche  $L_7 \geq L_{12} \geq L_{11} \geq L_6 \geq L_3 \geq L_5 \geq L_9 \geq L_{10}$ . Pour la pullulanase thermostable, les souches sont  $L_7 \geq L_9 \geq L_{12} \geq L_5 \geq L_{11} \geq L_6 \geq L_{10}$ .

## Résultats et discussion

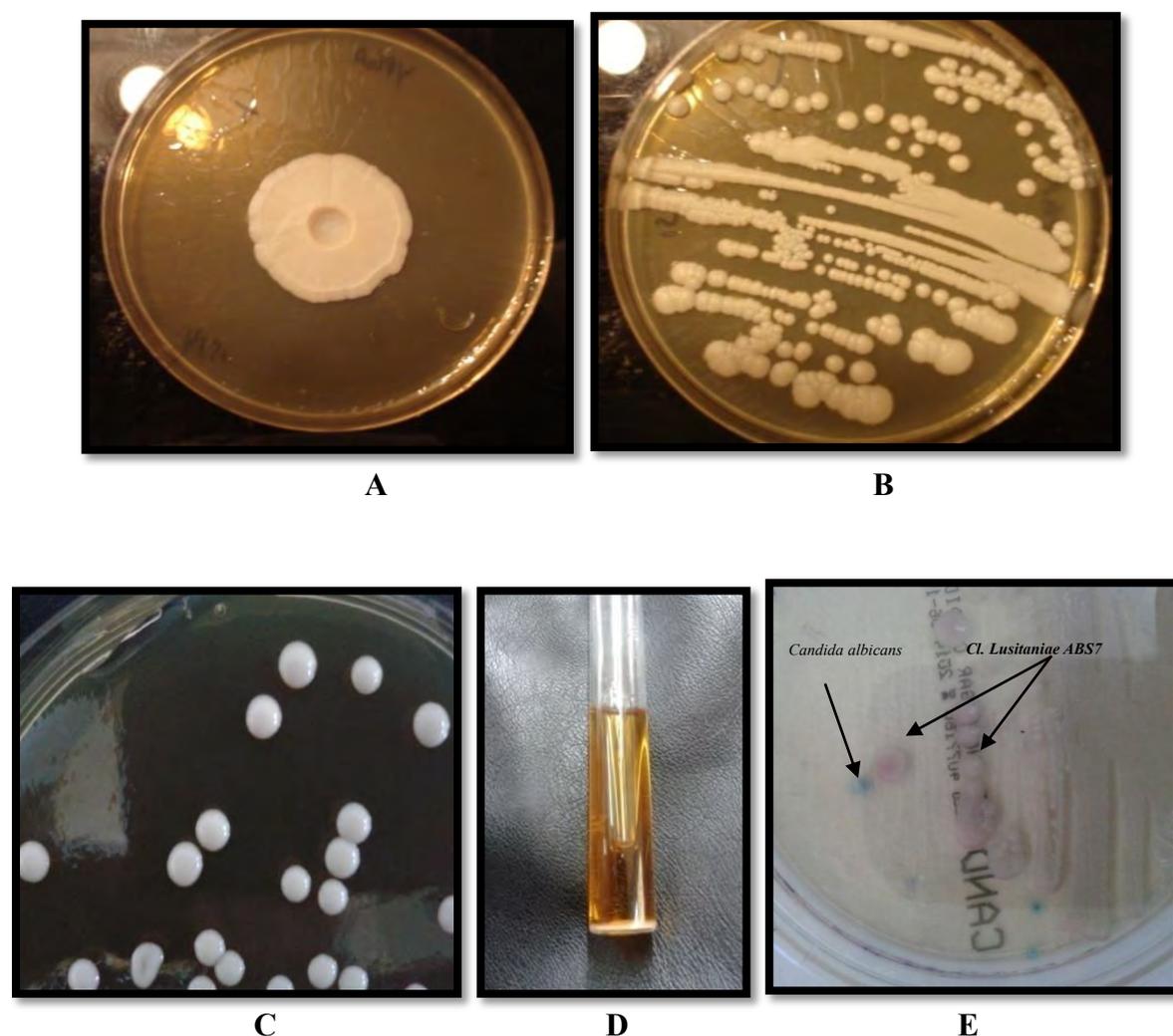
D'après les résultats, on remarque que les souches sont très proches : il y a un chevauchement des barres d'incertitude et que la population isolée est assez homogène quant à la thermostabilité des enzymes étudiées.

Cependant, la souche la plus performante dans la production des deux enzymes ( $\alpha$  amylase et pullulanase) thermostables est la levure L7, identifiée comme *Clavispora lusitaniae* ABS7.

### 1.8. Caractéristiques et propriétés de *Clavispora lusitaniae* ABS7

#### 1.8.1. Caractères macroscopiques

La souche L7 ou *Clavispora lusitaniae* ABS7 pousse rapidement sur milieux YPGA et YPSA (figures 18 A et B).



**Figure 18:** Caractères morphologiques de *Clavispora lusitaniae* ABS7 :  
A: *Clavispora lusitaniae* ABS7 sur YPGA, B: *Clavispora lusitaniae* ABS7 sur YPSA  
C: Forme des colonies, D: *Clavispora lusitaniae* ABS7 sur YPG  
E: *Clavispora lusitaniae* ABS7 sur Chromagar

Ses colonies sont blanches, crémeuses, lisses, d'aspect brillant (Figure 18C). Elle ne se distingue pas des autres espèces de *Candida* isolées. Des tests biochimiques sont donc nécessaires pour identifier au niveau de la sous-espèce. La croissance de *Clavispora*

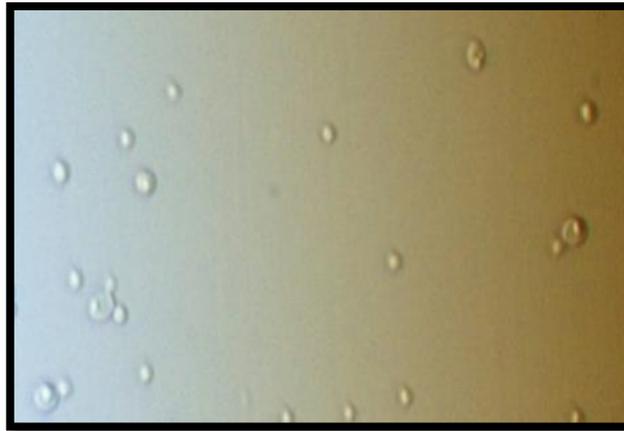
## Résultats et discussion

*lusitaniae* ABS7 en milieu liquide indique le caractère gazogène de la souche qui se traduit par la présence du CO<sub>2</sub> dans la cloche de Durham. De plus, un dépôt épais, renseignant sur la masse cellulaire est observé (Figure 18D).

Sur milieu Chromagar, les colonies de couleur rose violette (Figure 18E) permettent d'identifier la souche *Clavispora lusitaniae* alors que la souche *Candida tropicalis* apparaît en bleu foncé et *Candida albicans* en vert.

### 1.8.2. Caractères microscopiques

Les cellules de la levure *Clavispora lusitaniae* ABS7 ont une forme ronde ou allongée (ovoïde) (Figure 19). Leur taille varie de 4 à 10 µm.

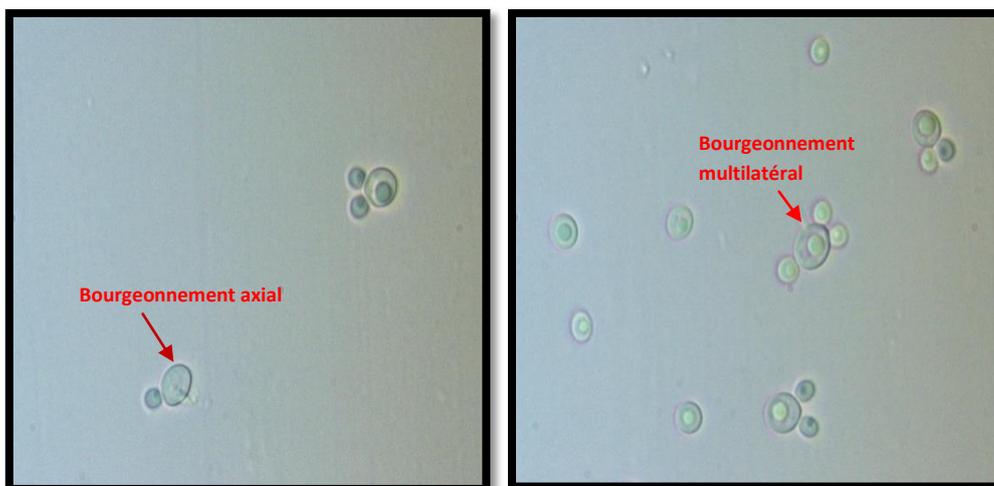


**Figure 19 :** Caractères microscopiques de *Clavispora lusitaniae* ABS7 :  
Forme des cellules

### 1.8.3 Reproduction

#### 1.8.3.1. Reproduction asexuée

La souche a une reproduction asexuée par bourgeonnement axial et multilatéral (Figure 20).

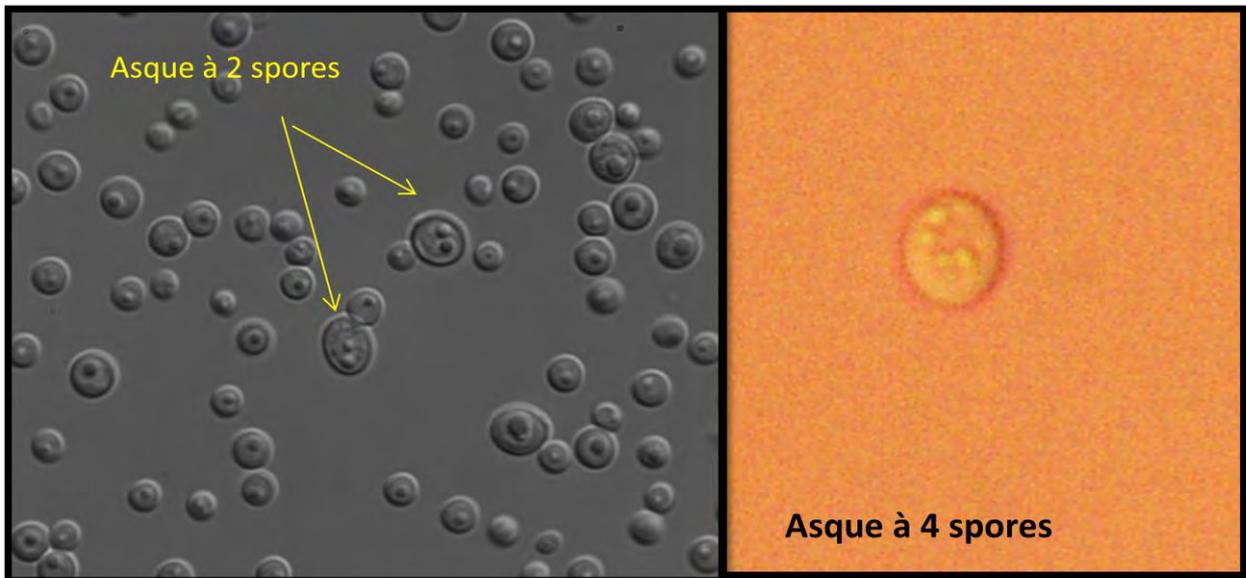


**Figure 20 :** Reproduction asexuée chez *Clavispora lusitaniae* ABS7 par bourgeonnement  
Culture sur milieu YPG

## Résultats et discussion

### 1.8.3.2. Reproduction sexuée

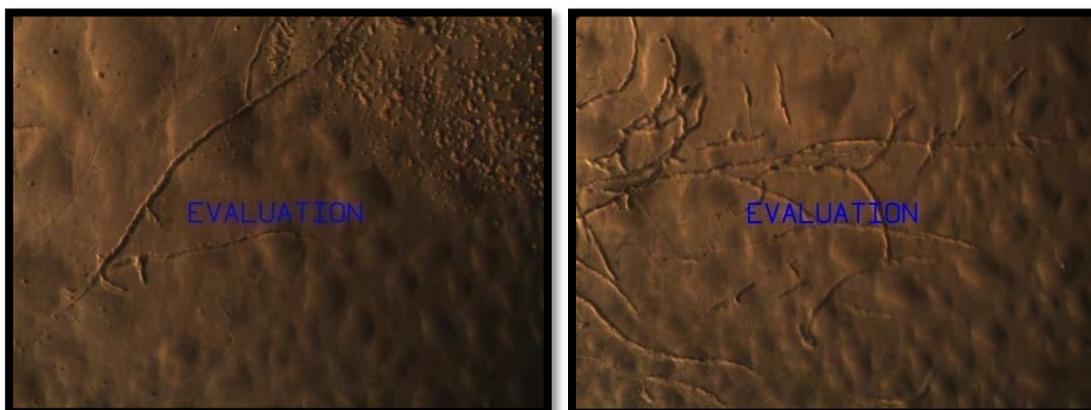
Sur des milieux appropriés : MaClary's et V8, la souche a une reproduction sexuée avec formation des ascospores (forme parfaite). Les ascques sont ellipsoïdaux à paroi évanescence et contiennent 1 à 4 ascospores, piriformes, à paroi lisse (Figure 21).



**Figure 21** : Reproduction sexuelle chez *Clavispora lusitaniae* ABS7 : Ascques contenant 2 et 4 spores

### 1.8.4. Filamentation

Sur le milieu RAT, on observe une apparition rapide d'un pseudomycélium fin, peu ramifié qui part de l'intérieur de la colonie de levure (Figure 22). Le pseudomycélium peut être absent, rudimentaire ou abondant. L'existence d'un vrai mycélium est parfois observée. La présence de blastospores ellipsoïdales est notée, avec une levure non pigmentée, sensible à l'actidione.



**Figure 22** : Formation de pseudomycélium chez *Clavispora lusitaniae* ABS7 cultivé sur milieu RAT.

## Résultats et discussion

---

1.8.5. Confirmation de l'identification de *Clavispora lusitaniae* par l'amplification de la région D1/D2

L'amplification et le séquençage de la région D1/D2 de l'ADN ribosomique 26S et la comparaison avec les bases de données du NCBI ont confirmé l'identification de **la souche ABS 7 à *Clavispora lusitaniae*** (Tableau 21).

**Tableau 21:** Identification taxonomique moléculaire réalisée par PCR de la région D1/D2 de l'ADN ribosomique 26S.

Désignation	Origine	Espèce	Taille de Fragment	%
ABS7	Blé stocké dans une zone aride-Saharienne (Biskra Algérie)	<i>Clavispora lusitaniae</i>	494/494	100%

## Résultats et discussion

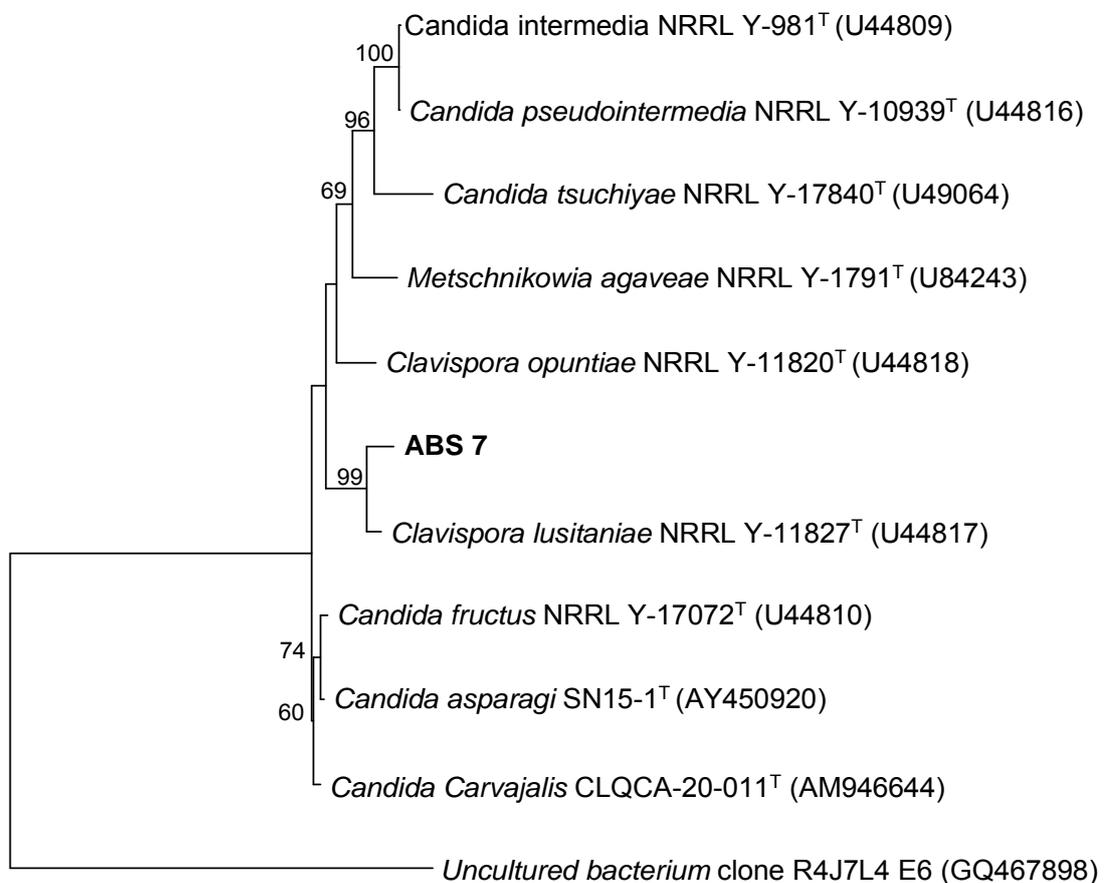
### 1.8.6. Séquençage de 26S rDNA de *Clavispora lusitaniae* ABS7

Les résultats du séquençage des amplicons obtenus après amplification par PCR, du domaine D1/D2 de la région 26S de l'ADN ribosomique et comparaison aux séquences de la base de données du NCBI a été réalisée à CIRM.

Le séquençage de 26S rDNA de *Clavispora lusitaniae*ABS7 est le suivant :

```
ACAAAAAATAAATTTTTTATTCTAACAAACTAAATCAAACCTTCAACAACGG
ATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAATTGCGATACGTAGTATGA
CTTGCAGACGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCTCGAGGCATTCC
TCGAGGCATGCCTGTTTGAGCGTCGCATCCCCTCTAACCCCCGGTTAGGCGTTGCT
CCGAAATATCAACCGCGCTGTCAAACACGTTTACAGCACGACATTTGCCCCTCAA
ATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAAAAAGGCG
```

### 1.8.7. Positionnement phylogénétique de *Clavispora lusitaniae* ABS7



0.1

**Figure 23:** Place de la souche ABS7 dans l'arbre phylogénétique du genre *Candida*

La séquence du gène 26S rDNA de la souche ABS 7 présente 94,12 % d'identité nucléotidique avec la séquence de la souche type *Clavispora lusitaniae* NRRL Y-11827 (Figure 23). Il y a 29 paires de bases de la séquence de *Clavispora lusitaniae* ABS7 différentes de celles de *Clavispora lusitaniae* NRRL Y-11827<sup>T</sup>.

## Résultats et discussion

### 1.8.8. Tests classiques de fermentation et assimilation des substrats

L'appartenance au même génotype que la levure *C. lusitaniae* est confirmée par les tests de fermentation classique des substrats. Les résultats des tests physiologiques de la méthode classique sont récapitulés dans les tableaux 22, 23, 24, 25 et 26. L'interprétation des résultats selon Barnett et al. (2000) et Payne et al., 2011 indiquent que la souche L7, *Clavispora lusitaniae* ABS7, présente quelques caractères à l'encontre du profil type, à savoir : fermentation du lactose (+), L-arabinose ( $\pm$ ), D-mannitol (-), nitrate (+) et créatinine (+). D'après les résultats, la souche *Clavispora lusitaniae* ABS7 (isolée de grains de blé provenant d'une zone aride-saharienne), montre une différence physiologique par rapport aux résultats annoncés par Barnett et al., 2000 et Payne et al., 2011. On note aussi une particularité génétique par rapport aux autres souches de *Clavispora lusitaniae* sélectionnées : deux bandes avec l'endonucléase HAE III au lieu d'une seule bande sont observées (Figure 19). Il s'agit vraisemblablement d'une sous espèce.

**Tableau 22 :** Tests de fermentation de la levure *Clavispora lusitaniae* ABS7.

Source carbonée	Souche
1-D-glucose	++++
2-D-galactose	++++
3-D-maltose	-
4-Saccharose	+
5-Trehalose	-
6-Mélibiose	-
7-Lactose	+
8-Cellobiose	++
9-Mélezitose	+
10-Raffinose	-

+ : positif, - : négatif,

**Tableau 23 :** Tests d'assimilation de sources carbonées de *Clavispora lusitaniae* ABS7.

DL-lactate	+/-	L-Rhamnose	+
Cellobiose	+	L-Sorbose	+
2-céto-D-Gluconate	+	Erythrytol	-
D-Gluconate	+	Trehalose	+
D-Glucosamine	+	Lactose	-
D-Glucuronate	-	Maltose	+
Mannitol	-	Myo-Inositol	-
D-Ribose	-	Mélibiose	-
Sorbitol	+	Mélezitose	+
D-Xylose	+	Méthyl-Glucoside	+
D-Galactose	+	Raffinose	+/-
D-Glucose	+	Saccharose	+
Glycérol	+	Esculine	+
L-Arabinose	+/-		

**Tableau 24 :** Tests d'assimilation de sources azotées de *Clavispora lusitaniae* ABS7.

Source azotée	Résultat
	s
<b>N1 : Nitrate</b>	+
N2 : Nitrite	-
N3 : Ethylamine	+
<b>N4 : L-lysine</b>	+
N5 : Cadaverine	+
N6 : Creatine	-
<b>N7 : Créatinine</b>	+

**Tableau 25 :** Thermotolérance de *Clavispora lusitaniae* ABS7

Température	Résultats
25	+
30	+
35	+
37	+
40	+
42	+
45	+
47	+
50	+

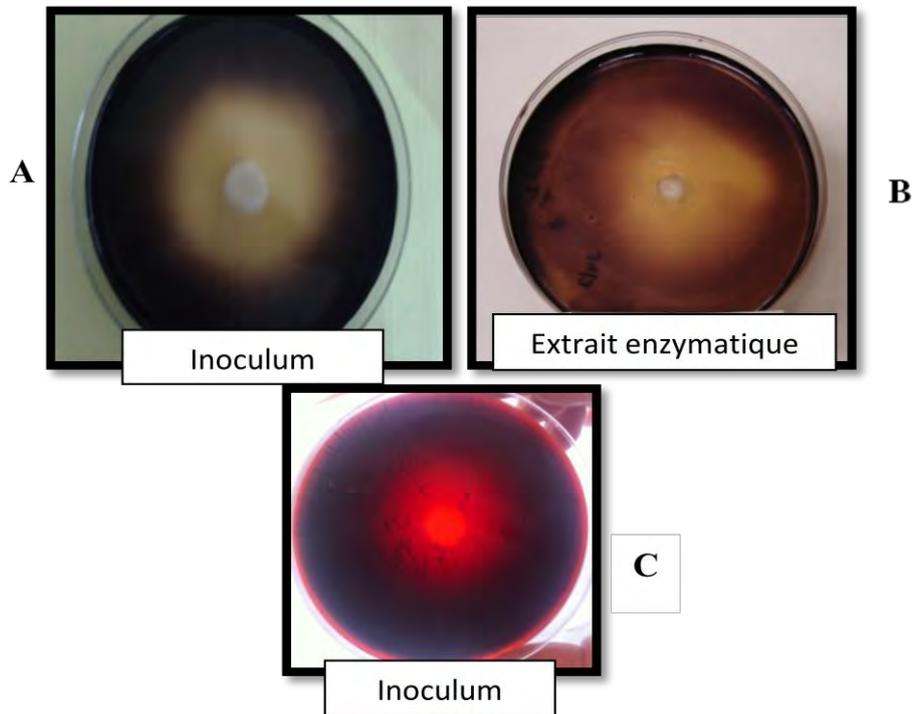
**Tableau 26 :** Autres test

Test	Résultat
Uréase	-
Glucose 50%	+
Sporulation	+

## Résultats et discussion

### 1.8.9. *Clavispora lusitaniae* ABS7 productrice d'enzymes amylolytiques

La croissance de *Clavispora lusitaniae* ABS 7 sur milieux YPSA et YPPA montre la capacité de cette souche à synthétiser l' $\alpha$ - amylase et la pullulanase (Figure 24)



**Figure 24:** Zones de lyse chez la souche *Clavispora lusitaniae* ABS7  
A: Inoculum; B: Extrait enzymatique ( $\alpha$ -amylase)  
C: Inoculum (pullulanase)

Les halos clairs autour des colonies, après coloration du substrat, indiquent une libération de l'enzyme par la souche et l'hydrolyse du substrat au voisinage de la colonie (zone de lyse).

La souche *Clavispora lusitaniae* ABS7 est sélectionnée comme étant la plus performante parmi les levures étudiées, pour la production d'enzymes thermostables. Ses différentes caractéristiques sont récapitulées dans le tableau 27.

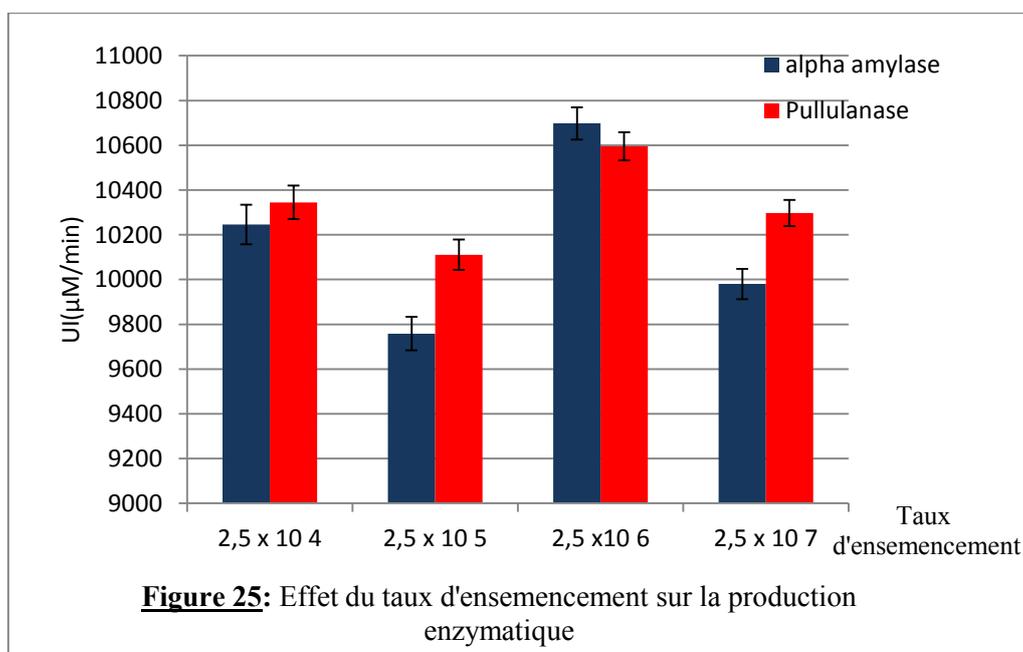
## Résultats et discussion

**Tableau 27:** Caractéristiques de *Clavispora lusitaniae* ABS7

Caractères macroscopiques	Colonies blanches, crémeuses, lisses, d'aspect brillant
Caractères microscopiques	Cellules rondes à allongées (ovoïdes), de 4 à 10 $\mu\text{m}$ sur 3 à 6 $\mu\text{m}$
Chromagar	Colonies du rose au violet
Reproduction asexuée	Bourgeonnements multilatéral
Reproduction sexuée	Asques ellipsoïdaux à paroi évanescence contenant de 1 à 4 ascospores, piriformes, à paroi lisse
Pseudomycélium	Présent,
Blastospores	Parfois présentes, ellipsoïdale
Pigment	Négatif
Tests Fermentation	Glucose, +++, Galactose + ++, Saccharose+, Lactose+ et Tréhalose -
Tests d'assimilation	Nitrate +, Créatinine +, Rhamnose +, Sorbose + et Gluconate +
Croissance sur YPSA	Positif
Croissance sur YPPA	Positif
Sensibilité à l'actidione	Positif

### 1.8.10. Densité de l'inoculum de la levure

Des taux d'ensemencement de 0;  $2,5 \times 10^4$ ;  $2,5 \times 10^5$ ;  $2,5 \times 10^6$  et  $2,5 \times 10^7$  cellules/ml sont testés pour déterminer le taux d'ensemencement adéquat pour la production  $\alpha$ -amylasique et pullulanase par la levure *Clavispora lusitaniae* ABS7. Les résultats sont présentés dans la figure 25.



D'après la figure 25, il ressort que la production de l' $\alpha$ -amylase et de la pullulanase est influencée par le taux d'ensemencement. La dose d'inoculum de  $2,5 \times 10^6$  cellules /ml semble

## Résultats et discussion

être suffisante pour obtenir une bonne activité  $\alpha$ -amylasique et pullulanase pour 40h d'incubation. Cette concentration d'inoculum va donc être adoptée par la suite de notre étude.

### 1.8.11. Conclusion partielle

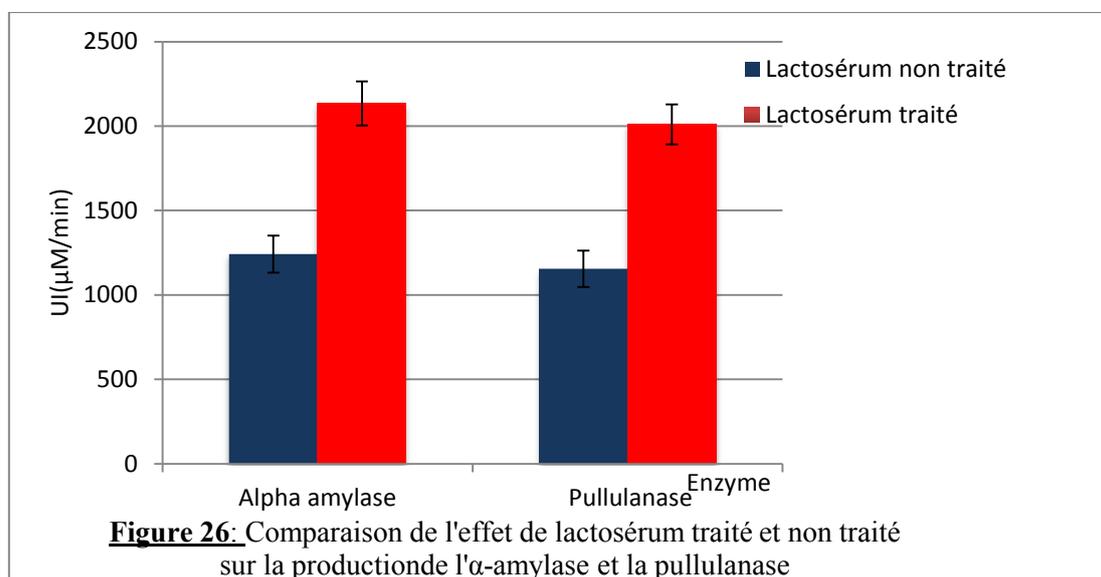
La meilleure production de l' $\alpha$ -amylase et de la pullulanase est obtenue avec la souche L7 identifiée comme *Clavispora lusitaniae* ABS7. Les enzymes produites présentent une bonne stabilité thermique (78% pour l' $\alpha$ -amylase et 76,5% pour la pullulanase), après un traitement thermique à 90°C pendant 120 min (Figure 17). Une dose d'inoculum de  $2,5 \times 10^6$  cellules /ml est suffisante pour obtenir une activité  $\alpha$ -amylasique et pullulanase maximales (Figure 25).

## 2. Production d'enzymes

### 2.1. Influence de la composition du milieu au lactosérum

#### 2.1.1. Milieu au lactosérum brut et milieu au lactosérum décaséiné

La comparaison des productions enzymatiques dans chacun des milieux est effectuée par l'analyse de la variance. Il s'avère que le traitement du lactosérum a un effet sur l'activité  $\alpha$ -amylasique [F = 11,32; P<0.0031] et aussi sur l'activité pullulanase [F= 16,86 ; P<0,0043] : les activités enzymatiques ont augmenté avec le traitement du lactosérum (Figure 26). L'élimination de la caséine a amélioré la production enzymatique : la cause peut en être le précipité de la caséine formé après stérilisation du lactosérum



#### 2.1.2. Etude physico-chimique du lactosérum décaséiné

Les résultats de l'analyse physico-chimique du lactosérum traité (décaséiné) sont présentés dans le tableau 28. Il est composé de 55,23 g/l de sucres, 1,12 g/l d'azote total, 835 mg/l de calcium  $Ca^{2+}$  et 9 g/l de protéines. Sa richesse en sources carbonées en fait un milieu favorable à la culture des micro-organismes et à la production des métabolites secondaires en particulier les enzymes amylolytiques.

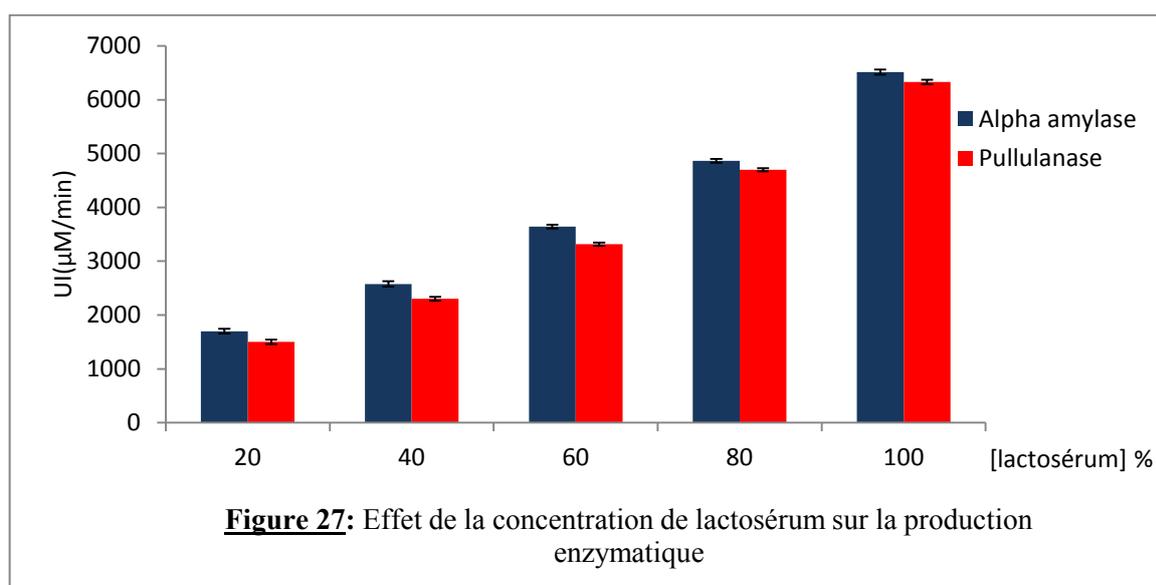
## Résultats et discussion

**Tableau 28** : Etude physico-chimique du lactosérum

pH	4,49
MS	9,82%
Cendre MM	<b>12,25 g/l</b>
Calcium	<b>835 mg/l</b>
Phosphore	132 mg/l
Sodium	294 mg/ml
Potassium	<b>1214 mg/ml</b>
Magnésium	72 mg/ml
Azote total	1,12 g/l
Protéines	1,12x 6,25= 9 g/l
Matière grasse	0,5 g/l
Chlore	<b>2,457 g/l</b>
Sucre (lactose)	<b>55,23 g/l</b>
Acidité	<b>68°D= 6,8 g d'acide lactique</b>

### 2.1.3. Détermination de la concentration optimale du lactosérum décaféiné

Les résultats de l'ANOVA (annexe 3) montrent que la concentration du lactosérum a un effet significatif sur la production  $\alpha$ -amylasique [F = 356,135; P=0] et sur l'activité pullulanase [F= 276,987 ; P=0]. L'analyse de l'ANOVA a montré que le test de Fisher est hautement significatif (avec p=0) ce qui indique que la production de l' $\alpha$ -amylase et de la pullulanase est très influencée par la concentration de lactosérum traité. Le test de Newman et Keuls (annexe) révèle que la concentration de lactosérum traité de 100% donne la meilleure production pour les deux enzymes (Figure 27). On peut déduire que les enzymes amylolytiques ( $\alpha$ -amylase et pullulanase) de notre souche de levure *C. lusitaniae* ABS 7, ne sont pas inhibées par le lactose à 5,5% dans le milieu (Tableau 28).



## Résultats et discussion

### 2.1.4. Conclusion partielle

L'utilisation du milieu lactosérum 100% (non dilué), décaséiné, avec une concentration de l'inoculum de  $2.5 \times 10^6$  cellules/ml améliorent la production de l' $\alpha$ -amylase et de la pullulanase (Figures 25, 26 et 27). Néanmoins, il convient d'étudier si cette production ne peut être améliorée (optimisation) en tenant en compte l'effet de 8 facteurs sélectionnés et en utilisant les Plans statistiques; Plackett - Burman (1946) et Plan de Box-Wilson (1951).

### 2.2. Recherche des conditions optimales de la production enzymatique

#### 2.2.1. Screening des facteurs

Le tableau 29 présente la conception expérimentale de Plackett-Burman pour 12 essais avec deux niveaux de concentrations pour chaque variable et les activités  $\alpha$ -amylasique et pullulanasiqque correspondantes. **A, B, C, E, F, G, I** et **J** représentent les constituants du milieu et **D, H** et **K** représentent les variables erreurs. Le niveau de confiance des variables de B (pH) et G (NH<sub>4</sub>Cl) étant inférieur à 70%, elles sont donc considérées comme insignifiantes. A l'inverse, les six variables (A: agitation, C: température, E: amidon, F: extrait de levure, I: solution de sels et J: solution d'oligo-éléments) ont un niveau de confiance supérieur à 70% et sont donc considérées comme significatives.

L'effet des variables est mesuré avec un intervalle de confiance  $\geq 70\%$  pour l' $\alpha$ -amylase; A (-1231), C (808,6), E (-344,4), F (-375), I (396,2) et J (-480,2) et pour la pullulanase; A (-1259,2), B(7818,3), E (-323, F (-401,6), I (409,1) et J (-514,9).

Compte tenu des résultats affichés dans le tableau 30, les équations polynomiales réduites peuvent être rédigées ainsi:

$$Y_1 = 8194,4 - 615,8 A + 404,3 C - 172,2 E - 187,5 F + 198,1 I - 240,1 J \quad (1)$$

$$Y_2 = 7989,6 - 629,6 A + 390,6 C - 161,8 E - 200,8 F + 204,6 I - 257,4 J \quad (2)$$

**Tableau 29:** Matrice expérimentale de Plackett-Burman (11 essais) et production d'enzymes.

Expériences	Variables											Activité $\alpha$ -amylase (UI)	Activité Pullulanasiqque (UI)
	A	B	C	(D)	E	F	G	(H)	I	J	(K)		
1	+1	+1	-1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	6693,04	6490,16
2	-1	+1	+1	-1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	8591,02	8380,00
3	+1	-1	+1	+1	-1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	8227,60	8022,60
4	-1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	+1	+1	-1	-1	9044,67	8976,60
5	-1	-1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	+1	+1	-1	8770,76	8530,12
6	-1	-1	-1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	+1	+1	8423,00	8212,00
7	+1	-1	-1	-1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	+1	6434,69	6201,00
8	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	7335,81	7098,00
9	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	+1	+1	-1	8181,70	7959,16
10	-1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	+1	+1	9222,20	9000,50
11	+1	-1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	+1	8598,78	8389,04
12	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	8809,00	8616,00

A, B, C, E, F, G, I et J sont désignés comme variables ; D, H et K sont des variables erreurs;  
UI:  $\mu$ Moles de maltose par min.

## Résultats et discussion

**Tableau 30** : Analyse statistique des résultats du plan de Plackett-Burman pour la production de l' $\alpha$ -amylase et de pullulanase

Code	Facteurs	Effet	Coefficient	T (xi)	p-value	Niveau de signification (%)
<b><math>\alpha</math>-amylase</b>						
	<b>Constante</b>		<b>8194,4</b>	71,48	0,000	
A	<b>Agitation</b>	<b>-1231,5</b>	<b>-615,8</b>	<b>-5,37</b>	<b>0,013</b>	<b>98,7</b>
B	pH	-32,6	-16,3	-0,14	0,893	10,7
C	<b>Température</b>	<b>808,6</b>	<b>404,3</b>	<b>3,53</b>	<b>0,039</b>	<b>96,1</b>
D	Erreur	-	-	-	-	
E	<b>Amidon</b>	<b>-344,4</b>	<b>-172,2</b>	<b>-1,50</b>	<b>0,230</b>	<b>77,0</b>
F	<b>Extrait de levure</b>	<b>-375,0</b>	<b>-187,5</b>	<b>-1,64</b>	<b>0,200</b>	<b>80,0</b>
G	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	-87,8	-43,9	-0,38	0,727	27,3
H	Erreur	-	-	-	-	
I	<b>Sels</b>	<b>396,2</b>	<b>198,1</b>	<b>1,73</b>	<b>0,182</b>	<b>81,8</b>
J	<b>Oligo-éléments</b>	<b>-480,2</b>	<b>-240,1</b>	<b>-2,09</b>	<b>0,127</b>	<b>87,3</b>
K	Erreur	-	-	-	-	
<b>Pullulanase</b>						
	<b>Constante</b>		<b>7989,6</b>	62,48	0,000	
A	<b>Agitation</b>	<b>-1259,2</b>	<b>-629,6</b>	<b>-4,91</b>	<b>0,016</b>	<b>98,4</b>
B	pH	-11,1	-5,5	-0,04	0,968	03,2
C	<b>Température</b>	<b>7818,3</b>	<b>390,6</b>	<b>3,05</b>	<b>0,056</b>	<b>94,4</b>
D	Erreur	-	-	-	-	
E	<b>Amidon</b>	<b>-323,6</b>	<b>-161,8</b>	<b>-1,26</b>	<b>0,296</b>	<b>70,46</b>
F	<b>Extrait de levure</b>	<b>-401,6</b>	<b>-200,8</b>	<b>-1,57</b>	<b>0,215</b>	<b>78,5</b>
G	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	-62,1	-31,0	-0,24	0,827	17,3
H	Erreur	-	-	-	-	
I	<b>Sels</b>	<b>409,1</b>	<b>204,6</b>	<b>1,60</b>	<b>0,209</b>	<b>79,1</b>
J	<b>Oligo-éléments</b>	<b>-514,9</b>	<b>-257,4</b>	<b>-2,01</b>	<b>0,138</b>	<b>86,2</b>

La production de l' $\alpha$ -amylase ( $Y_1$ ) et de la pullulanase ( $Y_2$ ) est mieux expliquée en utilisant les facteurs explicatifs (variables) A, C, E, F, I et J puisque leurs coefficients sont les plus importants et en raison du niveau de signification élevé (Tableau 30). La corrélation entre A, E, F et J, et la production d'enzymes est négative. D'autre part, elle est positive entre C, I et la production de l' $\alpha$ -amylase.

### 2.2.1.1. Effet de la source de carbone

La source de carbone est un des facteurs importants qui affectent la production enzymatique, en particulier lorsqu'elle joue le rôle d'inducteur d'enzyme. D'après nos expériences, l'ajout d'amidon au lactosérum (riche en lactose) a montré un effet négatif important sur la production de l' $\alpha$ -amylase ( $P \geq 77\%$ ) et celle de la pullulanase ( $P \geq 70,46\%$ ) avec une diminution des activités de 344,4 UI et 323,6 UI respectivement. Ce résultat permet d'avancer l'hypothèse qu'une certaine concentration de substrat carboné peut provoquer une inhibition de la production par répression catabolique (Mc Tighe et al., 1994).

Pour l' $\alpha$ -amylase, une augmentation de la production nécessite une diminution du niveau de la concentration de l'amidon qui doit être inférieur à 10 g/l. Il a été constaté qu'au-delà de 5 g/l, l'amidon inhibe la croissance de la levure et par conséquent, l'activité amylolytique (Mc Tighe et al. 1994). D'autres travaux rapportent que l'amidon constitue la meilleure source de

## Résultats et discussion

---

carbone pour la production de l' $\alpha$ -amylase de souches bactériennes ou fongiques (Irfan et al., 2012 et Sharma et al., 2014). Son addition dans le milieu augmente la production enzymatique. Les  $\alpha$ -amylases sont des enzymes extracellulaires et leur production est induite par leur substrat à une certaine concentration limite (Clementi et Rossi, 1986; Djekrif-Dakhmouche et al., 2006; Veralakshmi et al., 2009; Chimata et al., 2010 et Nair et Sabharwal, 2013). En plus de son rôle inducteur, l'amidon stabilise l'enzyme (De Mot et Verachtert, 1987).

Pour la pullulanase, la présence de substrats polysaccharides renfermant des liaisons  $\alpha$ -(1, 6) comme le pullulane à une concentration critique (Nair et al., 2007 et Asha et al., 2013), ou le glycogène (Gomes et al., 2003) induit sa production. Dans la littérature, l'effet du maltose est controversé: il est inducteur pour certaines pullulanases comme celle de *B. stearothermophilus* (Wind et al., 1994), de *C. thermosulfurogenes* (Reddy et al., 1999) et de *Rhizopus oligosporus*-ML-10 (Irfan et al., 2012), ou répresseur chez *Rhodothermus marinus* (Gomes et al., 2003). La production de la pullulanase est également induite en présence d'amidon soluble. Cependant, il a été démontré qu'une concentration supérieure à 1 % d'amidon réduit la productivité de l' $\alpha$ -amylase et de la pullulanase. L'amidon, à une concentration critique, a donc un rôle d'inducteur pour la pullulanase et l' $\alpha$ -amylase (Antranikian et al., 1987).

### 2.2.1.2. Effet de la source d'azote

La source d'azote est l'un des facteurs les plus courants affectant la production de l' $\alpha$ -amylase et de la pullulanase. Dans notre étude, le sulfate d'ammonium  $\text{NH}_2\text{SO}_4$  à 0,1% n'a pas d'effet sur l' $\alpha$ -amylase et la pullulanase. Cependant, l'activité enzymatique semble être affectée par l'extrait de levure : son effet est négatif et significatif sur la production de l' $\alpha$ -amylase ( $P \geq 80\%$ ) et de la pullulanase ( $P \geq 78, 5\%$ ), et conduit à une diminution respective de l'activité de 375 UI et de 401,6 UI. Cet effet négatif est dû probablement à une concentration excessive de l'extrait de levure, qui peut inhiber la production de l'enzyme lorsque la concentration est supérieure à une valeur critique (Pederson et Nielsen, 2000). La diminution de la production de l'amylase à des concentrations plus élevées d'extrait de bœuf ou d'extrait de levure pourrait être due à l'induction de protéases qui détruisent les enzymes amylolytiques (Kumar et Satyanarayana, 2001 et Sharma et al., 2014).

L'azote peut, donc, être un facteur limitant de la production enzymatique (Mc Tighe et al., 1994). Cependant, Hamilton et al., (1999) et Hernandez et al., 2006, mentionnent que la production de l'amylase est améliorée par l'ajout d'une source azotée organique. L'extrait de levure a permis la production maximale d'amylases :  $\alpha$ -amylase et glucoamylase (Pederson et Nielson, 2000; Oshoma et al., 2010; Valaparla, 2010 et Irfan et al., 2012). Par contre, la peptone a un effet inducteur pour la production de la pullulanase extracellulaire par *Bacillus halodurans* (Asha et al., 2013), *Raoultella planticola* DSMZ 4617 (Hii et al., 2009 a). Mrudula (2010) obtient une production maximale d' $\alpha$ -amylase et de pullulanase chez *Clostridium thermosulfurogenes* SVM17 en présence de peptone à 0,8% alors que Nair et al. (2006) ont obtenu le maximum de la pullulanase chez *Bacillus cereus* FDTA 3, après 24h de culture, en utilisant l'extrait de levure à 0,4 %. L'exigence en source azotée organique diffère selon les souches.

## Résultats et discussion

### 2.2.1.3. Effet de sels et des oligo-éléments

Les sels minéraux sont non seulement importants pour la croissance de micro-organismes, ils le sont également pour la production d'enzymes et leur activité.

Les sels ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  et  $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) ont un effet positif significatif sur la production de l' $\alpha$ -amylase et de la pullulanase ( $P \geq 81,81\%$  et  $79,1\%$  respectivement), provoquant une augmentation respective de l'activité de 396,2 UI et de 409 UI.

L'effet des oligo-éléments sur la production de l' $\alpha$ -amylase et de la pullulanase est significativement négatif ( $P \geq 87,3\%$  et  $86,2\%$ , respectivement) avec une réduction de 480,2 UI pour l' $\alpha$ -amylase et de 514,9 UI pour la pullulanase. Ces résultats sont probablement dus à la quantité excessive d'oligo-éléments à laquelle s'ajoute celle apportée par le lactosérum (Tableau 28).

Les résultats d'Ozdemir et al., (2013) rapportent que le  $\text{CaCl}_2$  à 20 mM provoque une augmentation de production de l' $\alpha$ -amylase par *Bacillus subtilis*. L' $\alpha$ -amylase est connue être une métalloenzyme à calcium dont la production y est dépendante (Asgher et al., 2007). Les ions  $\text{Ca}^{2+}$  jouent des rôles importants pour l' $\alpha$ -amylase (i) action significatif sur le métabolisme et la physiologie des microorganismes, (ii) action sur l'activité de l'enzyme par stabilisation et défense contre les protéases (Sarıkaya et al., 2000) et (iii) amélioration de la stabilité thermique de l'enzyme (Boel et al., 1990 et Gangadharan et al., 2008). Comme pour l' $\alpha$ -amylase, les ions  $\text{Ca}^{2+}$  stimulent fortement l'activité de la pullulanase de *Raoutella planticola* DSMZ4617 et de *Bacillus thermophile* 3183 (Shen et al., 1990 et Hii et al., 2009a). Ces ions stabilisent et maintiennent la conformation de la pullulanase de *Bacillus halodurans* (Asha et al., 2013).

Les cations  $\text{Mg}^{2+}$ , jouent également, un rôle important dans la production de l' $\alpha$ -amylase. Leur omission dans le milieu réduit de 50% la production de l'enzyme (Gupta et al., 2003). Ils ont un effet positif sur la production des deux enzymes chez *Clostridium thermosulforegenes* SVM17 (Mrudula (2010), *Bacillus halodurans* (Asha et al., 2013), *Aureobasidium pullulans* (Moubasher et al., 2010) et *Geobacillus sp.*L14 (Zareian et al., 2010).

L'anion  $\text{PO}_4^{3-}$  joue un rôle régulateur important dans la synthèse des métabolites primaires et secondaires chez les micro-organismes (Dean et al., 1972) et affecte ainsi leur croissance ainsi que la production de l' $\alpha$ -amylase (Saxena et al., (2007). Le composé  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  améliore la production de la pullulanase de *Bacillus cereus* EDTA13 (Nair et al., 2006; Hii et al., 2009a et Zareian et al., 2010) et la production de l' $\alpha$ -amylase d'*A. niger*-ML-17, *Rhizopus oligosporus*-ML-10 (Irfen et al., 2012). Les ions de  $\text{K}^+$  sont connus pour être nécessaires aux différentes activités physiologiques. En plus de l'effet tampon de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  et  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , ils sont utilisés comme source de  $\text{PO}_4^{3-}$  et d'ions  $\text{K}^+$  (Wiley et al., 2010).

Les cations  $\text{Mn}^{2+}$  améliorent la production de la pullulanase de *Bacillus cereus var. mycoide* (Takasaki, 1976) et celle de l' $\alpha$ -amylase de différentes sources (Ara et al., 1995 et Irfen et al., 2012). La production combinée de l' $\alpha$  amylase et de la pullulanase de *Rhodothermus marinus* (Gomes et al., 2003) et *Bacillus sp.* KSM-1378 (Ara et al., 1995) est stimulée par ce cation.

Le composé minéral  $\text{FeSO}_4$  est recommandé pour la production combinée de l' $\alpha$ -amylase et de la pullulanase (Ara et al., 1995; Gomes et al., 2003) et pour la production de la pullulanase (Hii et al., 2009b). Par contre, pour la production d' $\alpha$ -amylase par la moisissure *A.niger*, le

## Résultats et discussion

FeSO<sub>4</sub> abaisse la production par rapport au témoin. Gosh et Chandra (1984) ont rapporté que les ions métalliques Mn<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup> et Zn<sup>2+</sup> augmentent la production de l'enzyme de *Bacillus apiarius* CBML-152 alors que Fe<sup>2+</sup> et Fe<sup>3+</sup> avaient un effet inhibiteur sur la synthèse de l'enzyme. En outre, ZnCl<sub>2</sub> et NaCl stimulent la production de la pullulanase et/ou l' $\alpha$ -amylase de *Bacillus cereus* FDTA, *A. niger* ML-17, *Rhizopus oligosporus*-ML-10, *Bacillus halodurans* (Nair et al., 2006; Irfen et al., 2012 et Asha et al., 2013). Le chlorure de cuivre (CuCl<sub>2</sub>) améliore la production de la pullulanase et l' $\alpha$ -amylase de *Clostridium thermosulfurogenes* SV7 (Swamy et Seenayya, 1996) et de *Rhodothermus marinus* (Gomes et al., 2003).

### 2.2.1.4. Effet de la température

La variation de température de 30° C à 50° C a un effet positif (P $\geq$ 96,1% et P $\geq$ 94,4%) sur la production de l' $\alpha$ -amylase et de la pullulanase, avec une augmentation respective de l'activité de 808,6 UI et 781,3UI. En général, la température optimale de la production de l' $\alpha$ -amylase chez la levure se situe entre 25°C et 30°C. La dissemblance entre nos résultats et ceux rapportés dans la littérature peut être attribuée à plusieurs facteurs : à la variation de la souche, à la structure de l'enzyme, aux conditions environnementales et à la nature du biotope: *Clavispora lusitaniae* ABS7 est isolé à partir de grains de blé provenant de zone aride saharienne (Biskra, Sahara algérien). En outre, les enzymes amylolytiques peuvent différer considérablement dans leur spécificité et leurs propriétés en fonction de leur source (Fogarty et Kelly, 1990).

Les micro-organismes capables de se développer de façon optimale à des températures comprises entre 50°C et 60°C sont désignés comme thermophiles modérés. On peut supposer que les thermophiles modérés, étroitement liés phylogénétiquement aux organismes mésophiles, peuvent s'adapter à la vie dans des environnements chauds (Bertoldo et Antranikian, 2002).

Les micro-organismes thermophiles ont attiré l'attention des chercheurs car ils sont producteurs d'enzymes thermostables avec une stabilité de fonctionnement plus élevée et une durée de conservation plus longue (Nichaus et al., 1999 et Beg et al., 2000), d'où l'intérêt particulier des industriels pour ce type d'enzymes (Fitter et Heberle, 2000).

### 2.2.1.5. Effet de l'agitation

La vitesse d'agitation est un effet négatif significatif sur la production de l' $\alpha$ -amylase (P $\geq$  98,7%) et de la pullulanase (P $\geq$  98,4%). Elle réduit l'activité  $\alpha$ -amylasique de 1231, 5 UI et celle de la pullulanase de 1259, 2 UI. Une grande vitesse d'agitation est bénéfique pour un bon mélange tout au long de la fermentation, ce qui assure un transfert d'oxygène suffisant dans la culture aérobie et par conséquent, améliore la croissance cellulaire et la synthèse d'un métabolite. Cependant, lorsqu'elle est élevée, les forces de cisaillement intenses provoquent des dommages aux structures cellulaires et par conséquent, le rendement en métabolites diminue (Gao et Gu, 2007). Une vitesse modérée est recommandée pour la production de pullulanase: 135 rpm pour la production combinée de l' $\alpha$ -amylase et de la pullulanase par *Rhodothermus marinus* (Gomes et al., 2003).

## Résultats et discussion

La conception statistique Plackett-Burman est un outil puissant pour identifier les facteurs qui influencent significativement la production des enzymes étudiées ( $\alpha$ -amylase et pullulanase). La détermination des valeurs optimales exactes nécessite une autre conception: plan composite central de Box-Wilson (1951).

### 2.2.2. Optimisation des facteurs sélectionnés

#### 2.2.2.1. Analyse statistique

Les résultats des expériences de l'optimisation sont présentés dans le tableau 31 et sont analysés en utilisant le logiciel Minitab17, pour calculer les coefficients de régression des équations (Tableaux 32 et 33). La signification de chaque coefficient est déterminée par les valeurs de t et les valeurs de p correspondantes (Tableaux 32 et 33). Les valeurs de p, inférieures à 0,05, indiquent que les coefficients sont significatifs. La valeur élevée de t et la valeur faible de p indiquent la signification élevée du coefficient correspondant et les variables ayant des coefficients négligeables ont été omis.

Les équations de régression suivantes sont ainsi

$$Y_1 = 11790,5 + 982 C + 198,8 E + 229,5 J - 843 C^2 - 1309 E^2 - 1304F^2 - 1243 I^2 - 1319 J^2 + 718AC - 811 AE - 548 AF - 774 AJ - 511 CE + 893 CJ + 432 EI - 466 FI + 416 IJ \quad (3)$$

$$Y_2 = 11421 + 952,4 C + 159,2 E + 269,1 J - 789 C^2 - 1306 E^2 - 1300F^2 - 1240 I^2 - 1316 J^2 + 602AC - 927 AE - 445AF - 658 AJ - 371 CE + 753 CJ - 386 FI + 425 FJ + 556 IJ. \quad (4)$$

$Y_1$  est l'activité de l' $\alpha$ -amylase,  $Y_2$  l'activité de la pullulanase et **A**, **C**, **E**, **F**, **I** et **J** sont les valeurs des variables d'essai ; **A** : agitation (rpm), **C** : température ( $^{\circ}$  C), **E** : amidon (g/l), **F** : extrait de levure (g/l), **I** : solution de sels (ml/l) et **J** : solution d'oligo-éléments (ml/l).

L'analyse statistique indique des coefficients de détermination de  $R^2 = 0,929$  pour l' $\alpha$ -amylase et  $R^2 = 0,9201$  pour la pullulanase. Cela signifie que 92,9% de la variation de la production de l' $\alpha$ -amylase et 92% de la variation de la production de la pullulanase peuvent être expliquées par les six variables étudiées. Selon Vimal et al., 2015, le coefficient de détermination est une mesure globale pour la qualité du modèle. Les  $R^2$  prédits pour les deux enzymes concordent avec les  $R^2$  ajustés indiquant un bon accord entre les valeurs expérimentales et prédites pour la production des deux enzymes (Bari et al. 2009). L'ANOVA (Annexe 3) indique des valeurs de Fisher de 26,20 (pour l' $\alpha$ -amylase) et de 23,03 (pour la pullulanase) hautement significatives avec des probabilités correspondantes nulles ( $p=0,000$ ) pour les deux enzymes, ce que signifie que le modèle choisi est adéquat pour la production des deux enzymes.

## Résultats et discussion

**Tableau 31:** Production de l' $\alpha$ -amylase et la pullulanase selon le Plan Composite Centré.

Exp. no.	Variables						Activité (UI)	
	A	C	E	F	I	J	$\alpha$ -amylasique	pullulytique
1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	10589,5	10213,5
2	+1	-1	-1	-1	-1	-1	11071,7	10695,7
3	-1	+1	-1	-1	-1	-1	10816,7	10440,7
4	+1	+1	-1	-1	-1	-1	11664,7	11288,7
5	-1	-1	+1	-1	-1	-1	11003,3	10627,3
6	+1	-1	+1	-1	-1	-1	10836,8	10460,8
7	-1	+1	+1	-1	-1	-1	10822,8	10446,8
8	+1	+1	+1	-1	-1	-1	11566,0	11190,0
9	-1	-1	-1	+1	-1	-1	10664,0	10288,0
10	+1	-1	-1	+1	-1	-1	10630,0	10254,0
11	-1	+1	-1	+1	-1	-1	11226,8	10850,8
12	+1	+1	-1	+1	-1	-1	11648,5	11272,5
13	-1	-1	+1	+1	-1	-1	10869,5	10493,5
14	+1	-1	+1	+1	-1	-1	10854,0	10478,0
15	-1	+1	+1	+1	-1	-1	11407,7	11031,7
16	+1	+1	+1	+1	-1	-1	11540,0	11164,0
17	-1	-1	-1	-1	+1	-1	10625,1	10249,1
18	+1	-1	-1	-1	+1	-1	10654,7	10278,7
19	-1	+1	-1	-1	+1	-1	10908,4	10532,4
20	+1	+1	-1	-1	+1	-1	11405,0	11029,0
21	-1	-1	+1	-1	+1	-1	11163,6	10787,6
22	+1	-1	+1	-1	+1	-1	10844,6	10468,6
23	-1	+1	+1	-1	+1	-1	10874,2	10498,2
24	+1	+1	+1	-1	+1	-1	11661,0	11285,0
25	-1	-1	-1	+1	+1	-1	10127,1	9751,1
26	+1	-1	-1	+1	+1	-1	10413,5	10037,5
27	-1	+1	-1	+1	+1	-1	10885,2	10509,2
28	+1	+1	-1	+1	+1	-1	11277,0	10901,0
29	-1	-1	+1	+1	+1	-1	10913,1	10537,1
30	+1	-1	+1	+1	+1	-1	10669,4	10293,4
31	-1	+1	+1	+1	+1	-1	10934,9	10558,9
32	+1	+1	+1	+1	+1	-1	11197,6	10821,6
33	-1	-1	-1	-1	-1	+1	10234,5	9858,5
34	+1	-1	-1	-1	-1	+1	10687,4	10311,4
35	-1	+1	-1	-1	-1	+1	11451,6	11075,6
36	+1	+1	-1	-1	-1	+1	11627,9	11251,9
37	-1	-1	+1	-1	-1	+1	10657,7	10281,7
38	+1	-1	+1	-1	-1	+1	10460,2	10084,2
39	-1	+1	+1	-1	-1	+1	11675,7	11299,7
40	+1	+1	+1	-1	-1	+1	11491,9	11115,9
41	-1	-1	-1	+1	-1	+1	10806,0	10430,0
42	+1	-1	-1	+1	-1	+1	10788,3	10412,3
43	-1	+1	-1	+1	-1	+1	11520,0	11144,0
44	+1	+1	-1	+1	-1	+1	11959,0	11583,0
45	-1	-1	+1	+1	-1	+1	10911,5	10535,5
46	+1	-1	+1	+1	-1	+1	10703,0	10327,0
47	-1	+1	+1	+1	-1	+1	11859,5	11483,5
48	+1	+1	+1	+1	-1	+1	11265,5	10889,5
49	-1	-1	-1	-1	+1	+1	10541,8	10261,2
50	+1	-1	-1	-1	+1	+1	10516,2	10286,8
51	-1	+1	-1	-1	+1	+1	11285,1	10909,1

## Résultats et discussion

Exp. no.	Variables						Activité (UI)	
	A	C	E	F	I	J	$\alpha$ -amylasique	pullulytique
52	+1	+1	-1	-1	+1	+1	11989,0	11613,0
53	-1	-1	+1	-1	+1	+1	11022,0	10646,0
54	+1	-1	+1	-1	+1	+1	10530,2	10154,2
55	-1	+1	+1	-1	+1	+1	11821,2	11445,2
56	+1	+1	+1	-1	+1	+1	11687,4	11311,4
57	-1	-1	-1	+1	+1	+1	10763,7	10387,7
58	+1	-1	-1	+1	+1	+1	10150,5	10652,5
59	-1	+1	-1	+1	+1	+1	11456,3	11080,3
60	+1	+1	-1	+1	+1	+1	11668,7	11292,7
61	-1	-1	+1	+1	+1	+1	11460,9	11084,9
62	+1	-1	+1	+1	+1	+1	10674,9	10298,9
63	-1	+1	+1	+1	+1	+1	12013,2	11637,2
64	+1	+1	+1	+1	+1	+1	11191,7	10815,7
Points étoiles								
65	$-\alpha$	0	0	0	0	0	12049,8	11673,8
66	$+\alpha$	0	0	0	0	0	11839,4	11463,4
67	0	$-\alpha$	0	0	0	0	10056,0	9680,0
68	0	$+\alpha$	0	0	0	0	11759,4	11483,4
69	0	0	$-\alpha$	0	0	0	10248,5	9872,5
70	0	0	$+\alpha$	0	0	0	10634,5	10258,5
71	0	0	0	$-\alpha$	0	0	10332,5	9956,5
72	0	0	0	$+\alpha$	0	0	10561,3	10185,3
73	0	0	0	0	$-\alpha$	0	10653,2	10277,2
74	0	0	0	0	$+\alpha$	0	10362,1	9986,1
75	0	0	0	0	0	$-\alpha$	10186,0	9810,0
76	0	0	0	0	0	$+\alpha$	10676,5	10300,5
Points Centraux								
77	0	0	0	0	0	0	11821,9	11445,9
78	0	0	0	0	0	0	11984,0	11608,0
79	0	0	0	0	0	0	11607,2	11231,2
80	0	0	0	0	0	0	11807,9	11431,9
81	0	0	0	0	0	0	11572,3	11196,3
82	0	0	0	0	0	0	11789,6	11413,6

$$\alpha = 2,828$$

En outre, la valeur de Fisher pour le test de manque d'ajustement est de 1,39 pour l' $\alpha$ -amylase et 1,51 pour la pullulanase (tableaux 32 et 33). La valeur élevée de Fisher et la valeur non significative du test de manque d'ajustement indiquent que le modèle est accepté. Le P-valeur pour le modèle est nulle (pour les deux productions) et celui du test de manque d'ajustement est de 0,390 et 0,347 pour l' $\alpha$ -amylase et la pullulanase respectivement. Ceci suggère également que les données expérimentales obtenues sont en bonne adéquation avec le modèle.

## Résultats et discussion

**Tableau 32 :** Coefficient de régression de l'équation de la production de l' $\alpha$ -amylase.

Variable	Effet	Coefficient de régression	Erreur Standard	t-value	p-value
Constante		11790,5	± 66,8	176,472	0.000
$\beta_1$	100,3	50,2	± 55,9	0,9	0,373
$\beta_2$	1964,1	982	± 55,9	17,57	<b>0,000<sup>a</sup></b>
$\beta_3$	397,5	198,8	± 55,9	3,56	<b>0,001<sup>a</sup></b>
$\beta_4$	64,4	32,2	± 55,9	0,58	0,567
$\beta_5$	-198,5	-99,3	± 55,9	-1,78	0,081
$\beta_6$	459,1	229,5	± 55,9	4,11	<b>0,000<sup>a</sup></b>
$\beta_{11}$	388	194	± 144	1,35	0,182
$\beta_{22}$	-1685	-843	± 144	-5,87	<b>0,000<sup>a</sup></b>
$\beta_{33}$	-2618	-1309	± 144	-9,11	<b>0,000<sup>a</sup></b>
$\beta_{44}$	-2607	-1304	± 144	-9,07	<b>0,000<sup>a</sup></b>
$\beta_{55}$	-2486	-1243	± 144	-8,65	<b>0,000<sup>a</sup></b>
$\beta_{66}$	-2638	-1319	± 144	-9,18	<b>0,000<sup>a</sup></b>
$\beta_{12}$	1437	718	± 177	4,07	<b>0,000<sup>a</sup></b>
$\beta_{13}$	-1621	-811	± 177	-4,59	<b>0,000<sup>a</sup></b>
$\beta_{14}$	-1097	-548	± 177	-3,10	<b>0,003<sup>a</sup></b>
$\beta_{15}$	-635	-318	± 177	-1,80	0,078
$\beta_{16}$	-1547	-774	± 177	-4,38	<b>0,000<sup>a</sup></b>
$\beta_{23}$	-1022	-511	± 177	-2,89	<b>0,005<sup>a</sup></b>
$\beta_{24}$	86	43	± 177	0,24	0,809
$\beta_{25}$	-148	-74	± 177	-0,42	0,677
$\beta_{26}$	1787	893	± 177	5,06	<b>0,000<sup>a</sup></b>
$\beta_{34}$	108	54	± 177	0,31	0,761
$\beta_{35}$	863	432	± 177	2,44	<b>0,018<sup>b</sup></b>
$\beta_{36}$	-142	-71	± 177	-0,40	0,688
$\beta_{45}$	-931	-466	± 177	-2,64	<b>0,011<sup>b</sup></b>
$\beta_{46}$	690	345	± 177	1,95	0,056
$\beta_{56}$	832	416	± 177	2,36	<b>0,022<sup>b</sup></b>

<sup>a</sup> P<0, 01 indique que les coefficients du modèle sont hautement significatifs.

<sup>b</sup> P<0, 05 indique que les coefficients du modèle sont significatifs.

Coefficient de Détermination R<sup>2</sup>= 0.9291, R<sup>2</sup> Prédit = 0, 8364 and R<sup>2</sup> Ajusté = 0.8936

La Fisher du modèle: F=26, 20 et p-value=0,000

## Résultats et discussion

**Tableau 33:** Coefficient de régression de l'équation de la production de la pullulanase

Variable	Effet	Coefficient de régression	erreur Standard	t-value	p-value
Constante		11421	± 69,5	164,43	0,000
$\beta_1$	166	83	± 58,1	1,43	0,159
$\beta_2$	1904,9	952,4	± 58,1	16,39	<b>0,000<sup>a</sup></b>
$\beta_3$	318,4	159,2	± 58,1	2,74	<b>0,008<sup>a</sup></b>
$\beta_4$	109,3	54,7	± 58,1	0,94	0,351
$\beta_5$	-119,3	-59,7	± 58,1	-1,03	0,309
$\beta_6$	538,3	269,1	± 58,1	4,63	<b>0,000<sup>a</sup></b>
$\beta_{11}$	395	197	± 149	1,32	0,192
$\beta_{22}$	-1579	-789	± 149	-5,29	<b>0,000<sup>a</sup></b>
$\beta_{33}$	-2611	-1306	± 149	-8,74	<b>0,000<sup>a</sup></b>
$\beta_{44}$	-2601	-1300	± 149	-8,71	<b>0,000<sup>a</sup></b>
$\beta_{55}$	-2479	-1240	± 149	-8,30	<b>0,000<sup>a</sup></b>
$\beta_{66}$	-2632	-1316	± 149	-8,81	<b>0,000<sup>a</sup></b>
$\beta_{12}$	1205	602	± 184	3,28	<b>0,002<sup>a</sup></b>
$\beta_{13}$	-1853	-927	± 184	-5,05	<b>0,000<sup>a</sup></b>
$\beta_{14}$	-890	-445	± 184	-2,42	<b>0,019<sup>b</sup></b>
$\beta_{15}$	-403	-202	± 184	-1,10	0,277
$\beta_{16}$	-1315	-658	± 184	-3,58	<b>0,001<sup>a</sup></b>
$\beta_{23}$	-742	-371	± 184	-2,02	<b>0,048<sup>b</sup></b>
$\beta_{24}$	-73	-37	± 184	-0,20	0,843
$\beta_{25}$	-428	-214	± 184	-1,16	0,249
$\beta_{26}$	1507	753	± 184	4,10	<b>0,000<sup>a</sup></b>
$\beta_{34}$	-51	-25	± 184	-0,14	0,890
$\beta_{35}$	583	292	± 184	1,59	0,118
$\beta_{36}$	-422	-211	± 184	-1,15	0,255
$\beta_{45}$	-772	-386	± 184	-2,10	<b>0,040<sup>b</sup></b>
$\beta_{46}$	849	425	± 184	2,31	<b>0,025<sup>b</sup></b>
$\beta_{56}$	1112	556	± 184	3,03	<b>0,004<sup>a</sup></b>

<sup>a</sup> P<0, 01 indique que les coefficients du modèle sont hautement significatifs.

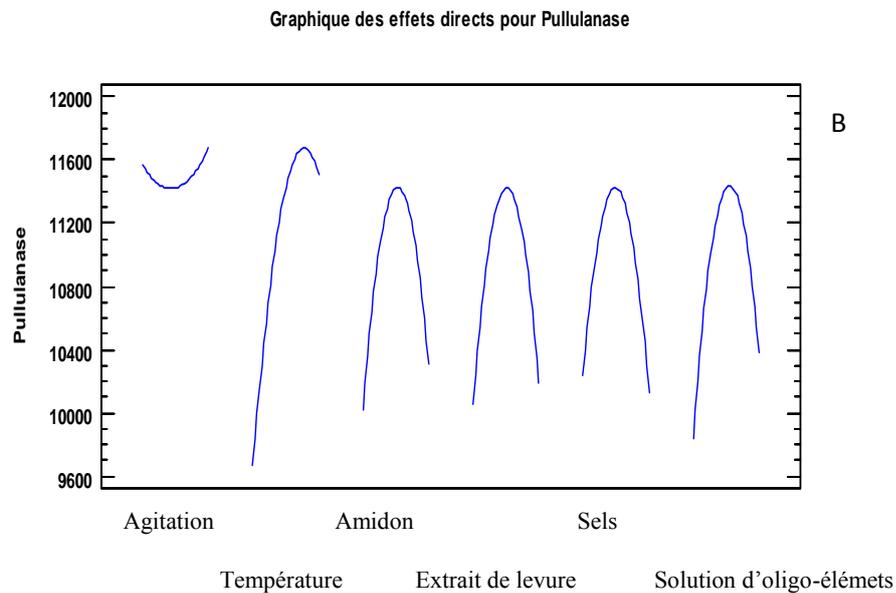
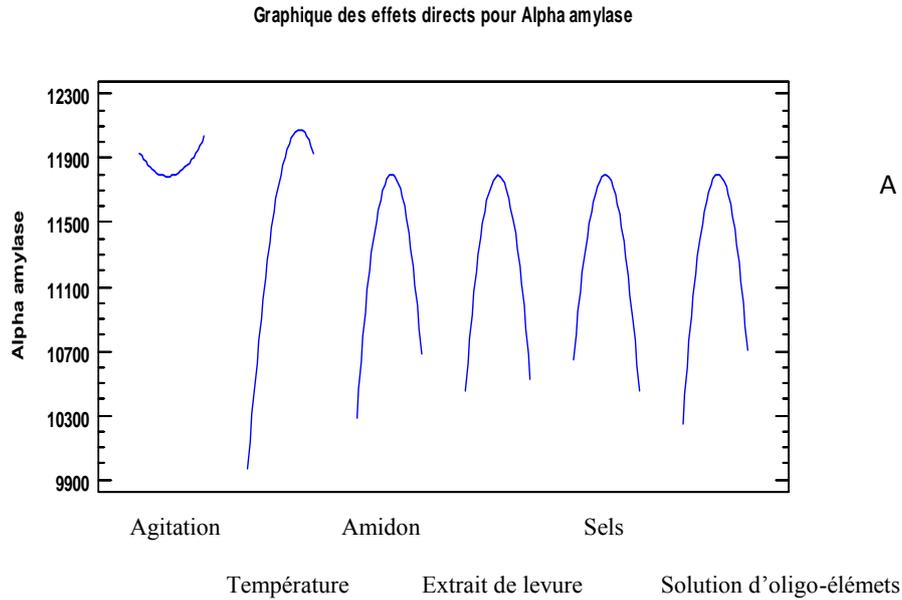
<sup>b</sup> P<0, 05 indique que les coefficients du modèle sont significatifs.

Coefficient de Détermination R<sup>2</sup>= 0.9291, R<sup>2</sup> Prédit = 0, 8364 and R<sup>2</sup> Ajusté = 0.8936

Fisher du modèle: F=23, 03 and p-value=0,000

## Résultats et discussion

### 2.2.2.2. Graphiques des effets directs



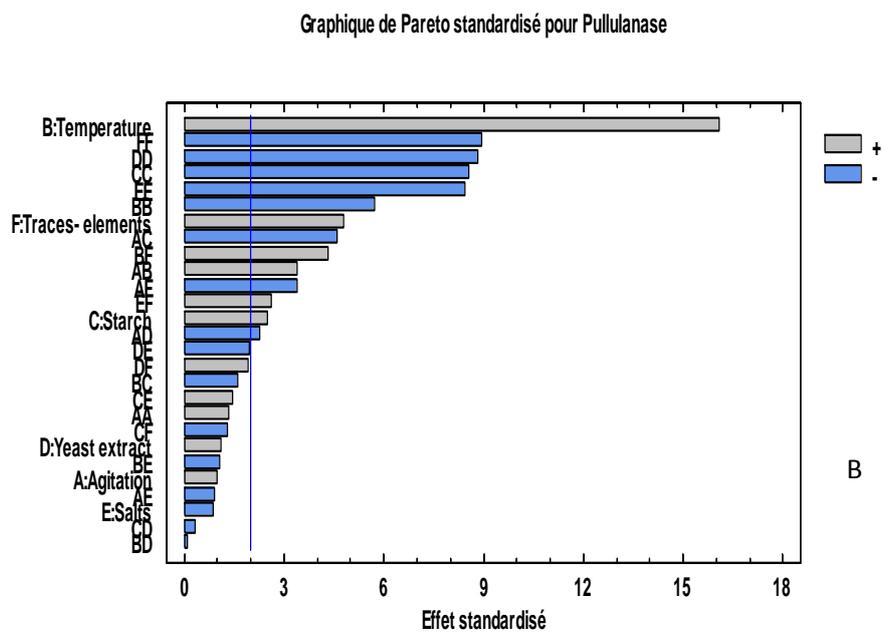
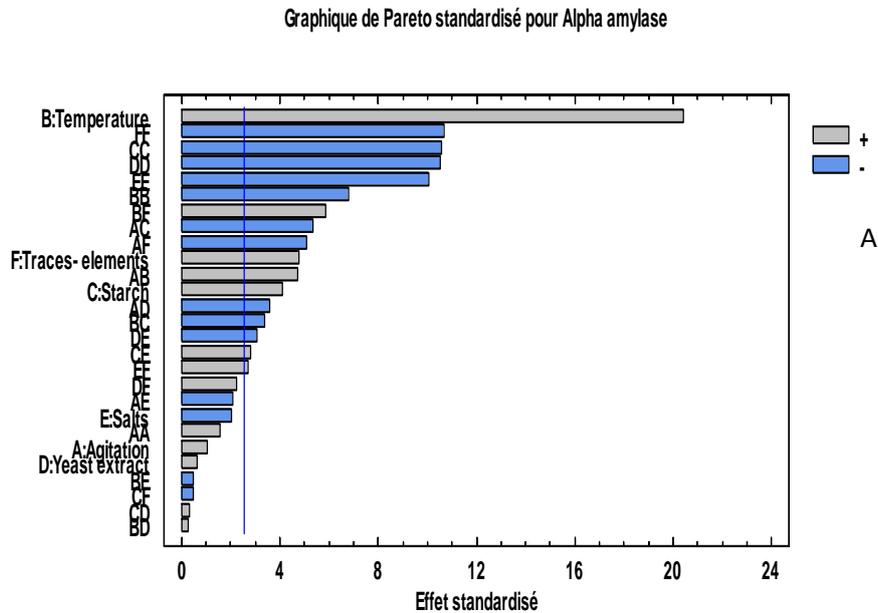
**Figure 28:** Graphique des effets directs pour l' $\alpha$ -amylase (A) et la pullulanase (B)

La figure 28 montre que les effets linéaires des variables (température, amidon, extrait de levure, sels et oligoéléments) sont forts et leurs effets quadratiques sont importants pour la production  $\alpha$ -amylasique (A) et pullulanasique (B). Seule l'agitation a un effet quadratique important pour les deux enzymes.

## Résultats et discussion

### 2.2.2.3. Graphiques de Pareto

Le diagramme de Pareto (Figure 29) permet de représenter graphiquement les résultats de l'analyse du plan. Pour la production de l' $\alpha$ -amylase (A) et de la pullulanase (B), les effets qui apparaissent les plus forts, sont ceux des facteurs B, F et C ainsi que leurs interactions mutuelles (BF, AC, AF, AB, AD, BC, DE, CE et EF).

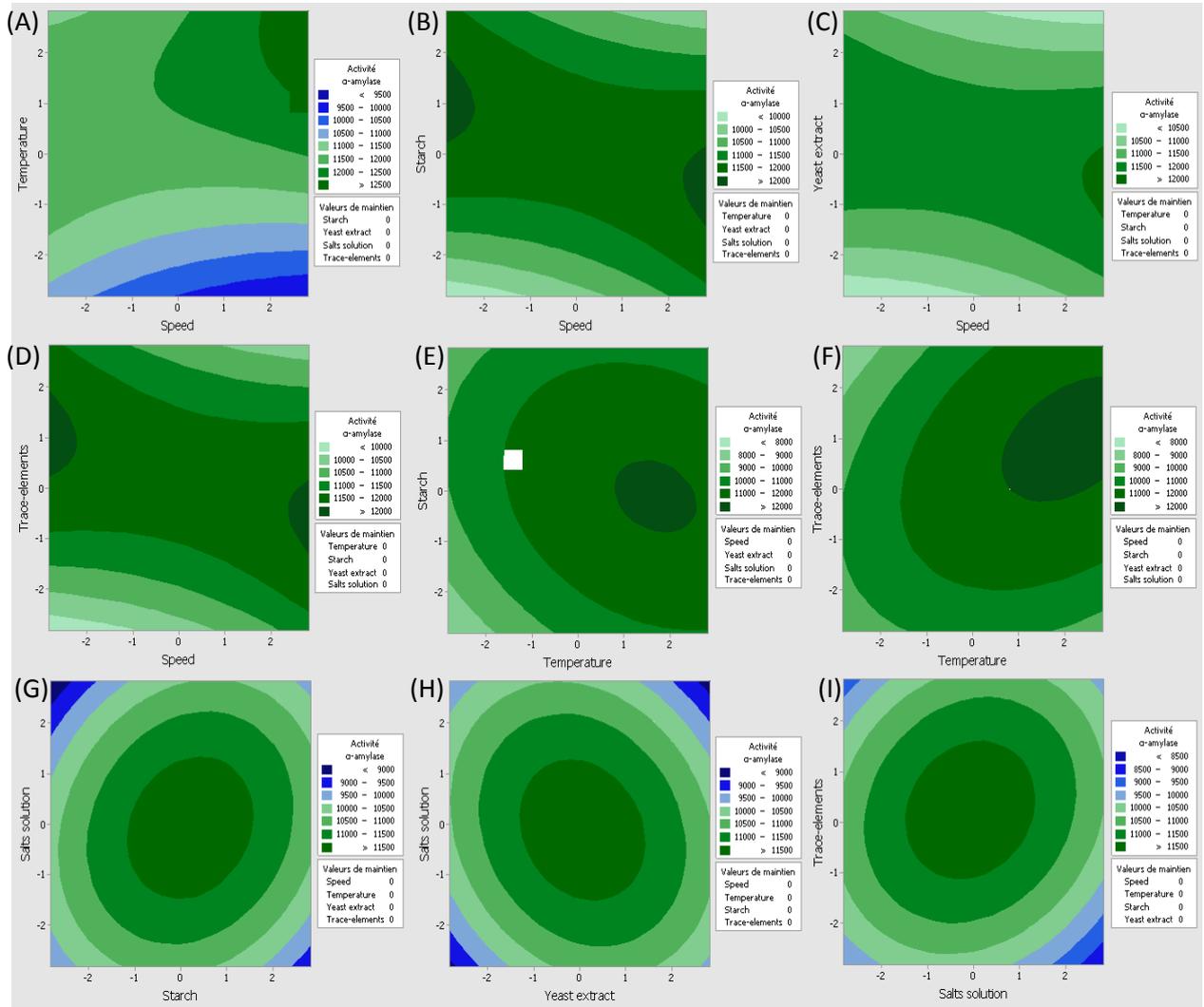


**Figure 29** Représentation de Pareto des effets des différents facteurs sur la production de l' $\alpha$ -amylase (A) et la production de la pullulanase (B) pour un niveau de test  $\alpha=5\%$ .

# Résultats et discussion

## 2.2.2.4. Tracés des surfaces de réponse

Le tracé d'iso-réponses de la production de l' $\alpha$ -amylase et de la pullulanase est généré à partir de l'équation (2) et de l'équation (3) en utilisant le logiciel Minitab version 17. Les figures 30 et 31 représentent les équations de régression en 2D.

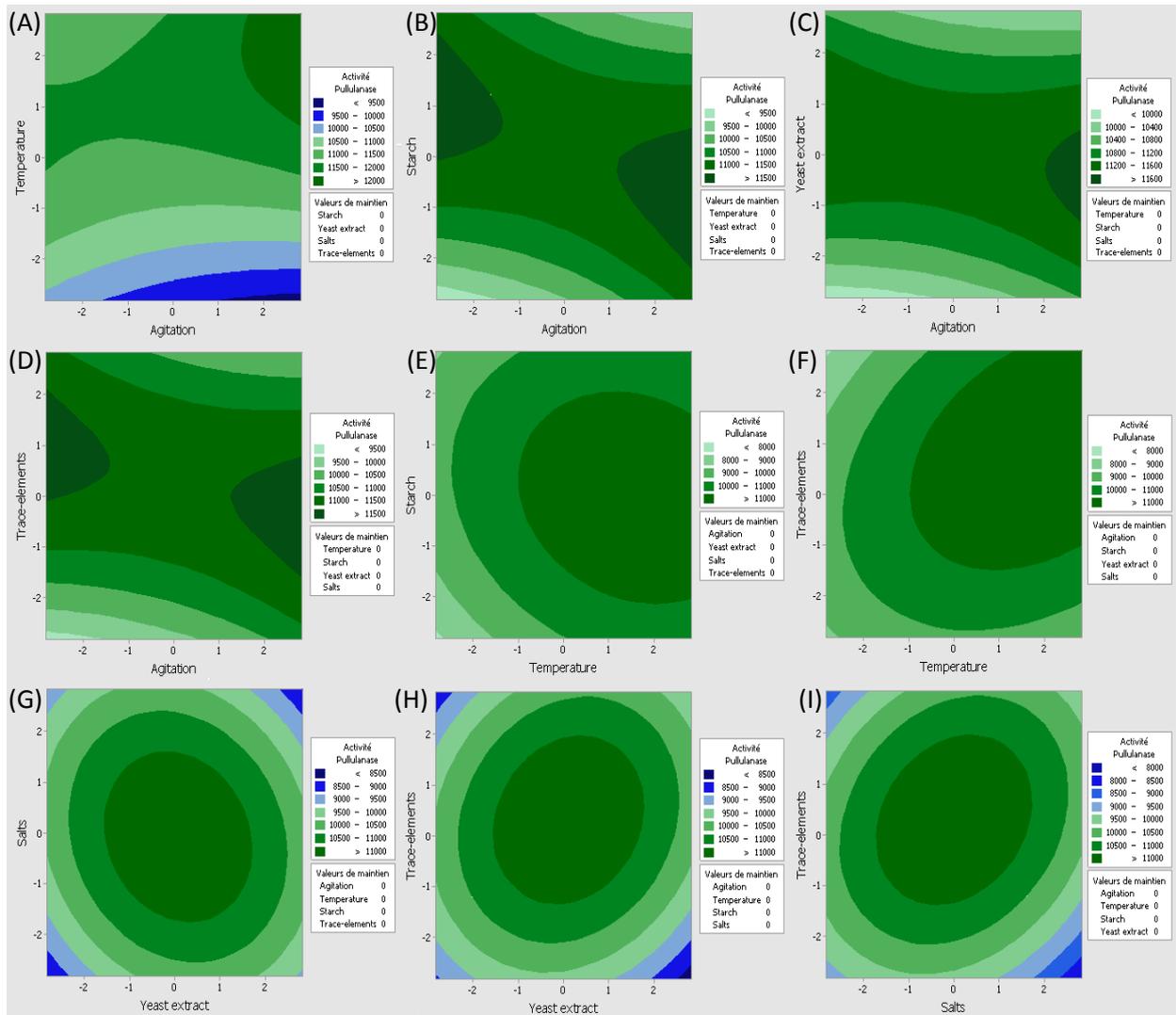


**Figure 30** : Courbes d'iso-réponses pour la production d' $\alpha$ -amylase thermostable par *Clavispora lusitanae* ABS7. (A) Effet de l'agitation et de la température, (B) Effet de l'agitation et de l'amidon, (C) Effet de l'agitation et de l'extrait de levure, (D) Effet de l'agitation et oligo-éléments, (E) Effet de la température et de l'amidon, (F) Effet de la température et des oligo-éléments, (G) Effet de l'amidon et des sels, (H) Effet de l'extrait de levure et leurs sels, (I) Effet des Sels et des oligo-éléments

Chaque courbe de contour représente un nombre infini de combinaison de deux variables de test avec les quatre autres maintenues à leur niveau respectif zéro. Les ellipses sont obtenues quand il y a une interaction parfaite entre la variable d'indépendance (Zhang et al., 2013). Les tracés de contours interprètent visuellement l'interaction entre les deux variables, et facilitent la localisation des conditions expérimentales optimales. Les zones foncées nous renseignent sur les conditions qui optimisent la production de l'enzyme.

## Résultats et discussion

Les figures 30A et 31A montrent les effets de l'agitation et de la température sur la production des enzymes ( $\alpha$ -amylase et de pullulanase). L'analyse statistique montre une forte interaction entre l'agitation et la température pour l' $\alpha$ -amylase ( $p= 0,000$ ) et la pullulanase ( $p= 0002$ ) (Tableaux 35 et 36) avec un effet positif. Par conséquent, une température de 54,14°C et une agitation de 135,56 rpm sont favorables pour un rendement maximal en  $\alpha$ -amylase et en pullulanase.



**Figure 31** : Courbes d'iso-réponses de la production de la pullulanase thermostable par *Clavispora lusitaniae* ABS7. (A) Effet de l'agitation et de la température, (B) Effet de l'agitation et de l'amidon, (C) Effet de l'agitation et de l'extrait de levure, (D) Effet de l'agitation et des oligo-éléments, (E) Effet de la température et de l'amidon, (F) Effet de la température et des oligo-éléments, (G) Effet de l'extrait de levure et des sels, (H) Effet de l'extrait de levure et des oligo-éléments, (I) Effet des sels et des oligo-éléments.

Par ailleurs, la production des deux enzymes ( $\alpha$ -amylase et pullulanase) est influencée fortement par la variation de l'agitation et de la concentration en amidon (Figures 30B et 31B). L'intrigue 2D ainsi qu'une P-valeur forte (0000) montrent également une interaction significative entre les deux variables. Le coefficient estimé pour ces termes d'interaction a un signe négatif et pour l' $\alpha$ -amylase ( $\beta_{13} = -811$ ) et la pullulanase ( $\beta_{13} = -927$ ) et corrobore une augmentation de la réponse.

Les figures 30 C et 31 C montrent l'effet négatif de l'interaction entre l'agitation et de l'extrait de levure sur la production de l' $\alpha$ -amylase et de la pullulanase, en augmentant l'agitation et en

## Résultats et discussion

diminuant l'extrait de levure. Le maximum de production des enzymes est obtenu avec des niveaux élevés d'agitation de 136,56 rpm et 0 de faibles niveaux d'oligo-éléments soit environ 4g/l.

Les figures 30 D et 31 D montrent l'effet négatif de l'interaction de l'agitation et des oligo-éléments sur la production des enzymes en augmentant l'agitation et en réduisant la concentration en oligo-éléments, ou vice versa.

Les contours elliptiques obtenus (Figures 30 E et 31 E) indiquent une interaction parfaite entre la température et l'amidon ( $p= 0,005$ ) (Tableaux 32 et 33). Pour une production de l' $\alpha$ -amylase prédite ( $>12\ 000\text{IU}$ ). Il faut donc augmenter la température d'incubation à  $54^\circ\text{C}$  et réduire la concentration de l'amidon à 3g/L.

La température et les oligo-éléments sont des facteurs importants pour la production des deux enzymes ( $p= 0,000$ ) (Tableau 6). La température de culture (environ  $54^\circ\text{C}$ ) et la quantité d'oligo-éléments (environ 4,5ml/l) semblent être les conditions les plus favorables pour une production maximale de l' $\alpha$ -amylase et de la pullulanase (Figures 30 F et 31 F).

La figure 30 G représente un tracé de contour d'une surface de réponse calculée à partir de l'interaction entre l'amidon et la concentration des sels: la production de l' $\alpha$ -amylase est considérablement affectée par une légère variation du niveau de ces deux facteurs. La concentration la plus élevée et la plus faible de ces deux variables a donné une faible production d'enzymes alors que la concentration moyenne (niveau 0) permet un rendement maximal des enzymes.

Les figures 30 H et 31 G montrent le tracé de la surface de réponse elliptique de la production des enzymes amylolytiques en fonction de l'extrait de levure et la concentration en sels. Cette production diminue avec une réduction de la concentration en extrait de levure et en sels.

La nature elliptique des tracés de contour indique que l'interaction mutuelle entre l'extrait de levure et les oligo-éléments est significative (Figure 31 H). Dans ces conditions, l'activité maximale de la pullulanase est de 11 000 UI.

Les représentations 2D (Figures 30I et 31I) montrent qu'il existe une interaction significative entre les sels et les oligo-éléments ( $p= 0,022$  pour l' $\alpha$ -amylase et  $p= 0,004$  pour la pullulanase). Les résultats montrent que les productions de l' $\alpha$ -amylase et de la pullulanase sont fortement affectées par la variation de la concentration des sels et des oligo-éléments. La production maximale est obtenue au point de l'intersection des deux axes de l'ellipse.

L'analyse statistique par le Minitab 17 est utilisée pour résoudre les équations de régression (2) et (3). Les valeurs optimales des variables sont : agitation 136,56 rpm, température  $54,14^\circ\text{C}$ , amidon 2,66g/l, extrait de levure 0,365 g/l, sels 8,75ml/l et solution standard d'oligo-éléments 4,3ml/l.

### 2.3. Validation du modèle

Les valeurs maximales de production de l' $\alpha$ -amylase et de la pullulanase atteignent respectivement  $13\ 456,36 \pm 300$  UI et  $12\ 611,6 \pm 154$  UI en erlenmeyers de 250 ml. Ces performances sont en accord étroit avec la prédiction du modèle statistique, qui évalue les activités à 13 231 UI pour l' $\alpha$ -amylase et à 12 825,5 UI pour la pullulanase (Tableau 34).

Après optimisation, en fermenteur de 2L, la production des deux enzymes par la levure *Clavispora lusitaniae* ABS7, a pratiquement doublé : on observe des activités de 22 038 UI pour l' $\alpha$ -amylase et 20 716 UI pour la pullulanase. Ces valeurs sont obtenues après 28 h de fermentation à  $54^\circ\text{C}$  et pH 8 (Figure 32), et après 40h d'incubation dans les mêmes conditions qu'en erlenmeyers.

## Résultats et discussion

**Tableau 34:** Production de l' $\alpha$ -amylase et de la pullulanase avant et après l'optimisation

Variables	Avant optimisation	Niveau après optimisation	Avant optimisation	Après optimisation	
				Predit	Experimental
A : Agitation (rpm)	200	136,56		production de l' $\alpha$ -amylase (UI)	
C : Température (°C)	30	54,14			
E: Amidon (g/l)	10	2,66		6639,16	13128
F: Extrait de levure (g/l)	1	0,365	production de la pullulanase (UI)		
I: Sels (ml/l)	0	8,75	6308,5	12825,1	12611,6 $\pm$ 154
J: Oligo-elements (ml/l)	0	4,3			

Un gain de temps de 70% est observé dans le cas de la culture en fermenteur. On peut l'expliquer par la bonne maîtrise des conditions de culture, une distribution uniforme des nutriments et une meilleure aération (Narang et Satyanarayana, 2001).

Habituellement, le pH de la production d' $\alpha$ -amylase de la plupart des levures est compris entre 5 et 7: un pH de 5 pour l'enzyme de *Candida utilis* NOY1 (Ouédraogo et al., 2012), de 5,5 pour *Saccharomyces fibuligera* DSM-70554 (Gonzalez et al., 2008), un pH compris entre 5,5 et 7 pour *Schwanniomyces castelli* (Clementi et Rossi, 1986) et un pH de 6,5 pour *Candida antractica* CBS 6678 (de Mot et Verachtert, 1987). Le pH idéal pour la production de la pullulanase par la levure *Aureobasidium pullulans* est de 5, 5 (Moubasher et al., 2010).

Dans le cas de notre étude, le pH de la production des enzymes augmente progressivement et atteint une valeur finale de 8 (Figure 32). Cette singularité doit résulter certainement des propriétés physico-chimiques de l'enzyme. Cependant, une souche d'*Aspergillus niger* SK01 isolée à partir de l'eau de mer présente un pH fortement alcalin de production (pH10) de l'enzyme et une production optimale de température beaucoup plus élevée (70°C) (Karthick et Nirmala, 2011).

Nous pouvons conclure que la niche écologique des micro-organismes a vraisemblablement une influence sur la production d'enzymes (pH, température, quantité d'enzyme).

### 2.4. Propriétés de la souche de *Clavispora lusitaniae* ABS7

A ce jour, aucune donnée bibliographique ne fait référence à une production concomitante de l' $\alpha$ -amylase et de la pullulanase par *Clavispora lusitaniae* (*Candida lusitaniae*). Peu d'études concernent le genre *Candida* et la production d'enzymes amylolytiques: *Candida antractica* CBS 6678 (De Mot et Verachtert, 1987), *Candida utilis* et *Pichia guilliermondii* (Acourene et Ammouche, 2012).

Les levures *Candida utilis* ou *C. guilliermondii* sont utilisées dans la production alimentaire comme la production des protéines de la biomasse microbienne, des vitamines et de l'acide citrique (Walker, 2009).

La souche *Candida guilliermondii* pousse dans d'autres écosystèmes comme les déchets de pommes de terre (Ouédraogo et al., 2012) et présente une activité  $\alpha$ -amylasique faible par rapport à la souche

## Résultats et discussion

---

de notre étude: 345 UI vs 13456 UI. Par contre, la culture de la levure *Cryptococcus flavus* sur un milieu synthétique contenant de l'amidon produit, en erlenmeyer, une quantité d' $\alpha$ -amylase équivalente: 11750 UI après 24 heures d'incubation (Wanderly et al., 2004).

### 3. Etude de la cinétique de croissance de *Clavispora lusitaniae* ABS7 et de la production de l' $\alpha$ -amylase et de la pullulanase

#### 3.1. Etude de cinétique de croissance

La cinétique de la croissance de *Clavispora lusitaniae* ABS7, sur le milieu optimisé à base de lactosérum, est similaire aux cinétiques classiques de la croissance des microorganismes avec une phase de latence, une phase exponentielle et une phase stationnaire, en soulignant que la phase de déclin n'a pas été atteinte après 03 jours d'incubation (Figure 32).

D'après la figure 32, la phase de latence paraît courte, ceci est du probablement au fait que l'ensemencement du milieu provenant d'une préculture de 12 h. Cet inoculum a permis aux cellules levuriennes de s'adapter facilement au nouveau milieu. Cette observation est similaire à celle d'Annous et Blaschek (1991) pour la production d'amylase par *Clostridium acetobutylicum* et aussi à celle de Joshi (2011) pour la production de l' $\alpha$ -amylase alcaline et thermostable de *Bacillus circulans* PN5.

La phase exponentielle dure une vingtaine d'heures. La multiplication cellulaire augmente exponentiellement en fonction du temps jusqu'à 28h, puis devient linéaire jusqu'à 40h ce qui témoigne d'une limitation cinétique, soit à cause de l'oxygène soit le pH. Quant à la phase stationnaire, elle est entamée à 40h. La production maximale des enzymes amylolytiques extracellulaires ( $\alpha$ -amylase et pullulanase) se fait essentiellement durant la phase exponentielle comme observée pour les enzymes amylolytiques de plusieurs espèces de levures (Clementi et al. 1980, Oteng-Gyang et al., 1981, Simoes-Mendes, 1984, De Mot et Verachtert, 1985).

#### 3.2. Etude de la production enzymatique

Les activités amylolytiques sont maximales au bout de 28h d'incubation et atteignent les valeurs record de 22038 UI pour l' $\alpha$ -amylase et 20214 UI pour la pullulanase. Une augmentation du pH est concomitante à cette production enzymatique alors que la production protéique demeure modérée jusqu'à 40 h.

La période, au cours de laquelle une enzyme est obtenue à partir de la culture, est un facteur important dans la production d'enzymes. La plupart des rapports de la littérature ont confirmé que la sécrétion maximale d'enzymes se produit généralement à la fin de la phase exponentielle et au début de la phase stationnaire. Selon Gupta et al. (2003), la sécrétion d'enzyme se produit au maximum à la fin de la phase de la croissance en raison de la réduction de la répression catabolique car les nutriments sont épuisés dans le milieu de croissance.

La plupart des microorganismes amylolytiques étudiés montrent une sécrétion maximale d'amylase au début de la phase stationnaire: *Endomycopsis capsularis* (Ebertova 1966), *E. fibuligera* (Clementi et al., 1980), *Bacillus polymyxa* (Griffin et Fogarty, 1973), *Trichoderma viride* (Schellart et al., 1976) et *Schwanniomyces castellii* (Clementi and Rossi, 1986).

Un screening de levures amylolytiques à partir de fruits brésiliens, indique que la souche *Cryptococcus flavus* a produit un maximum d' $\alpha$ -amylase après 24h d'incubation sur un milieu contenant 2% d'amidon (Wanderly, 2004).

## Résultats et discussion

---

La levure *Candida ontarionensis*, en culture en batch sur un milieu contenant 1% d'amidon soluble, produit un maximum d' $\alpha$ -amylase au bout de 25h d'incubation (Hernandez-Montanez et al., 2010).

La levure *Trichosporon pullulans* IGC 3488 produit des activités maximales d' $\alpha$ -amylase et de glucoamylase, en phase stationnaire sur un milieu contenant le «corn steep liquor» comme source azotée et de l'amidon comme source carbonée (De Mot et Verachtert, 1986).

Dans des conditions optimales de culture, l'activité enzymatique maximale ( $\alpha$ -amylase et pullulanase) produite par *Clavispora lusitaniae* ABS 7 est observée à 28h d'incubation et se poursuit jusqu'à 96h (Figure 32). Selon Scandurra et al. (2000) des enzymes provenant de micro-organismes thermophiles ont une haute résistance à la dénaturation par la température, la protéolyse ou aux produits chimiques.

### 3.3. Etude de l'évolution du pH, de la concentration en protéines et des sucres

La phase stationnaire dure sur 32 h (de 40h à 72h), caractérisée par la continuité de l'augmentation du pH qui atteint la valeur 9. Durant cette phase, une impressionnante production des sucres est observée, matérialisée par une substance qui nappe la paroi du fermenteur. La forte production de cette substance était accompagnée par l'augmentation de la consommation de l'oxygène, et l'augmentation du pH. Selon Rezki-Bekki, 2014, la formation de cette pellicule a été déjà observée chez la levure *Issatchenkia orientalis* et correspond à des polysaccharides. L'augmentation remarquable des sucres, durant la phase stationnaire, est donc due probablement à la production des polysaccharides par *Clavispora lusitaniae* ABS 7.

Le fait que le milieu est enrichi progressivement en polysaccharides et que la souche ne présente aucune phase de déclin, nous laisse supposer qu'elle utilise une partie de ces polysaccharides pour son maintien. Les résultats montrent également l'absence de lyse significative des protéines (Figure 32).

L'absence de la phase de déclin est expliquée par l'hypothèse de la phase de déclin prolongée où une diminution exponentielle de la viabilité est parfois remplacée par un déclin graduel du nombre de cellules cultivable. Ce déclin peut durer des mois à des années (Wiley et al., 2010)

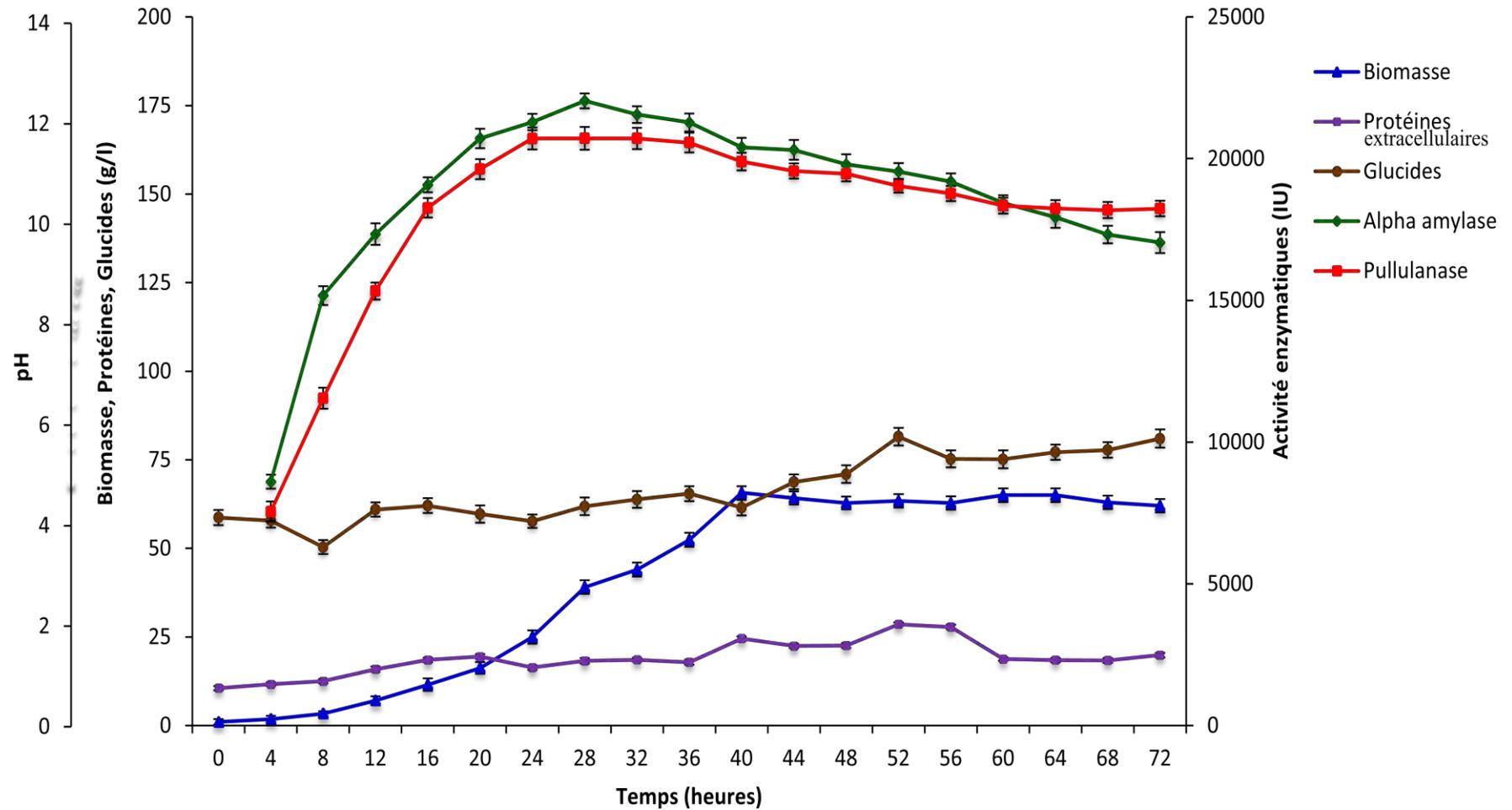
L'augmentation du pH dans le milieu de fermentation peut être provoquée par le glucose. Son internalisation dans les cellules microbiennes s'accompagne par le transport, dans le même sens, des ions  $H^+$ , ce qui provoque l'alcalinisation du milieu externe. Le symport glucose- $H^+$  est observée dans 34% des souches levuriennes appartenant aux genres *Rhodotorula*, *Hansenula* et *Candida* (Loureiro-Dias, 1988).

Aussi, Wyder et Puhan (1999) expliquent l'alcalinisation du milieu chez *Clavispora lusitaniae* par la libération de produits alcalins issus de la protéolyse et de la dégradation de l'acide lactique.

Il a été trouvé que *Raoultella planticola* DSMZ 4617 est capable de produire la pullulanase extracellulaire à pH initial variant de 5 à 8 (Hii et al., 2012 b). Aussi Ohba et Ueda (1982) ont reporté que le pH optimum de la production de la pullulanase extracellulaire d'*Aerobacter aerogenes* RS-1 est situé entre pH 7 et pH 9.

A 40h d'incubation, la levure *Clavispora lusitaniae* ABS7 atteint sa croissance cellulaire (biomasse) maximale. Une légère diminution de biomasse est observée juste après 40h et elle est supposée être due soit à la formation de spores ou à un début de la mort cellulaire ou les deux à la fois (Teka, 2006).

## Résultats et discussion



**Figure 32** : Etude cinétique de la croissance et de la production amylolytique ( $\alpha$ -amylase et pullulanase) chez *Clavispora lusitaniae* ABS7 cultivé sur milieu optimisé à base de lactosérum

### 3.4. Conclusion partielle

Une nouvelle souche de levure *Clavispora lusitaniae* ou *Candida lusitaniae* ABS7 amylolytique est isolée du blé cultivé dans un écosystème extrême (Biskra, 400 Km Sud-Est Alger, Sahara Algérien). Dans cette étude, cette souche a la particularité d'hydrolyser complètement l'amidon car elle secrète deux enzymes : une  $\alpha$ -amylase qui hydrolyse les liaisons  $\alpha$ -1,4 et une pullulanase qui rompt les liaisons  $\alpha$ -1,6. Nous avons entrepris une amélioration de la production de ces 2 enzymes par utilisation d'une conception statistique basée sur les plans de Plackett-Burman et Box-Wilson. La production enzymatique a doublé dans le milieu optimisé.

La souche produit des enzymes thermostables résistants à un traitement thermique de 90°C pendant 120 min.

En fermenteur de 2 L, après 28h d'incubation en conditions optimales (la température optimale de 54,14°C et pH 8), la souche *Clavispora lusitaniae* ABS7 produit des activités de l'ordre de 20716 UI pour l' $\alpha$ -amylase et de 22038 UI pour la pullulanase. La température élevée et le pH basique permettent de préserver le milieu de culture des contaminations bactériennes lors de la production des enzymes.

Ces deux propriétés qualifient la souche *Clavispora lusitaniae* pour des applications industrielles impliquant l'hydrolyse de l'amidon dans des conditions de pH élevé et aux températures élevées. C'est le cas en particulier, des industries de l'amidon, du textile, des détergents, des blanchisseries automatiques et du papier (Ara et al., 1995; Kamakchi et al., 1999; Burhan et al., 2003; Gupta et al., 2003 et Murakami et al., 2007).

Il serait intéressant d'approfondir l'étude de cette souche, afin de mettre en évidence éventuellement d'autres possibilités enzymatiques et métaboliques susceptibles d'offrir de nouvelles fonctionnalités.

### 4. Purification des enzymes

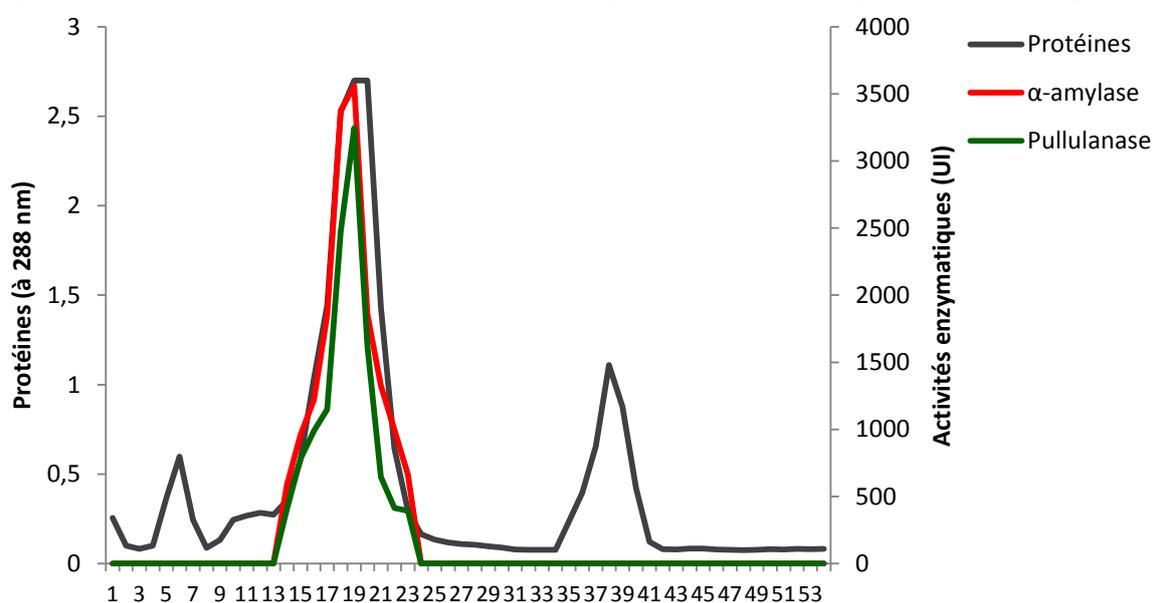
*Clavispora lusitaniae* ABS7 produit des activités  $\alpha$ -amylasique et pullulanasiq, respectivement, de 346340 UI et de 325900 UI par litre après lyophilisation de l'extrait enzymatique. L'utilisation de l'acétone a conduit à la concentration de protéines et une augmentation de l'activité spécifique de l' $\alpha$ -amylase de 79,97 à 352,41 U/mg et de la pullulanase de 75,25 à 291,33 U/mg de protéines avec une récupération de 45,79% et 40,23 % respectivement (Tableau 35).

## Résultats et discussion

**Tableau 35:** Purification des enzymes amylolytiques produites par *Clavispora lusitaniae* ABS7

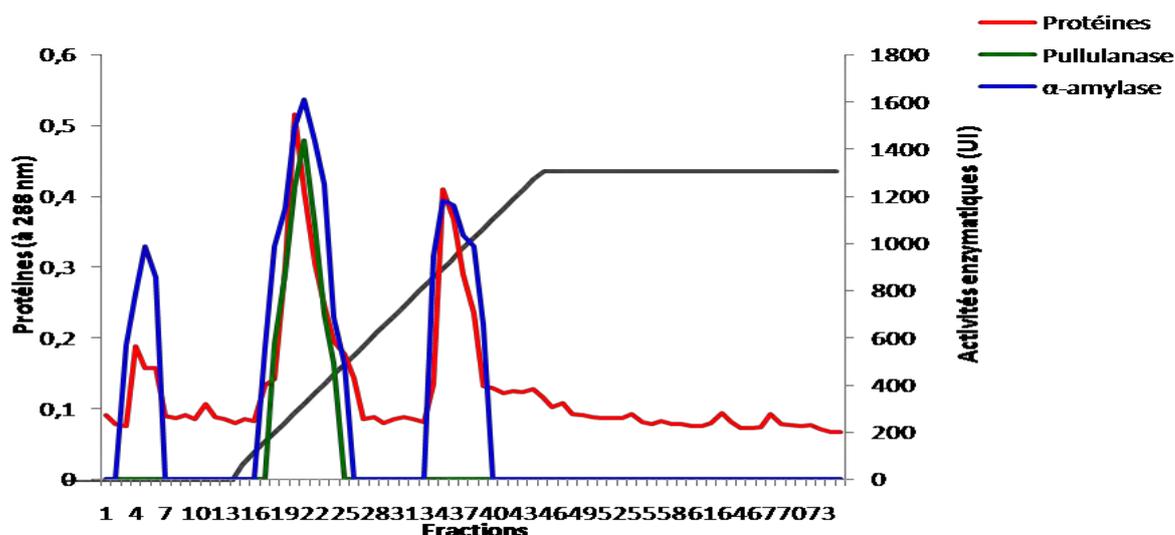
Etape	Protéines totaux (mg/ml)	Activité totale (UI)		Activité spécifique UI/mg	Taux de purification	Rendement (%)
		$\alpha$ -amylase	Pullulanase			
Extrait brut lyophilisé	4330,6	$\alpha$ -amylase	346340	79,975	1	100
		Pullulanase	325900	75,25	1	100
Précipitation par l'acétone	450	$\alpha$ -amylase	158587	352,41	4,40	45,79
		Pullulanase	131102,5	291,33	3,87	40,23
Séphacryl S 200	75,22	$\alpha$ -amylase	106122	1410,82	17,64	30,64
		Pullulanase	85386,1	1135,15	15,08	26,2
DEAE Cellulose	20,5	$\alpha$ -amylase	82728,4	4035,53	50,45	23,9
		Pullulanase	68792	3355,70	44,59	21

Le profil d'éluion de l'enzyme sur colonne de Séphacryl S200 est représenté sur la figure 33.



**Figure 33 :** Profil chromatographique de l' $\alpha$ -amylase et de la pullulanase sur Séphacryl-S200

Dans l'ensemble, les activités spécifiques de l' $\alpha$ -amylase et de la pullulanase ont augmenté respectivement de 17 et de 15 fois. L'éluion sur une colonne de DEAE cellulose (Figure 34) montre l'existence de trois fractions protéiques contenant des activités  $\alpha$ -amylasiques.



**Figure 34:** Profil chromatographique de l'α-amylase et de la pullulanase sur DEAE cellulose

Le deuxième pic renferme, en plus de l'activité α-amylasique, l'activité pullulanasiq (Figure 34).

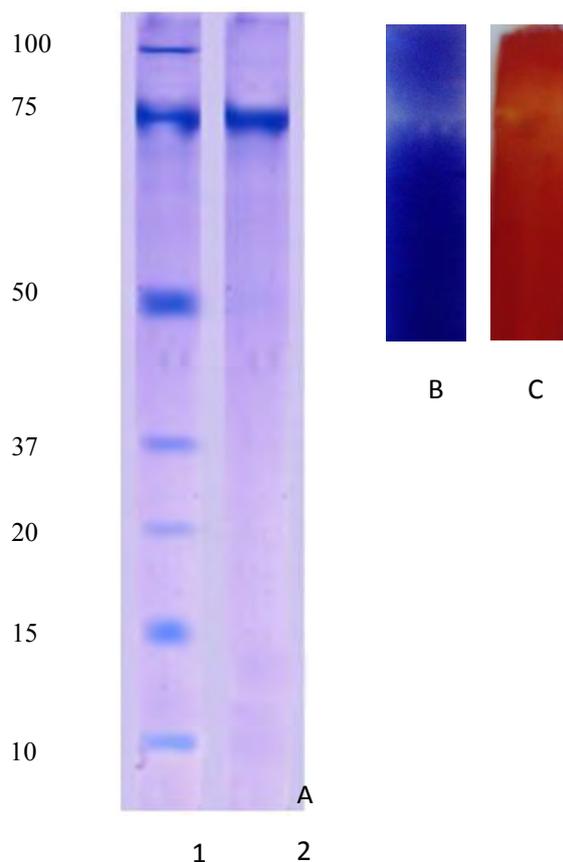
Le tableau 35 indique que les activités spécifiques de l'α-amylase et la pullulanase ont augmenté respectivement de 50 et de 44 fois avec des rendements respectifs de 23,9 et 21%. Nous nous sommes intéressés au 2<sup>ème</sup> pic car il contient des enzymes à activité amylolytique totale (hydrolyse des liaisons α-1,4 et α-1,6).

### 5. Mise en évidence de la pureté des enzymes par SDS PAGE

L'analyse par SDS-PAGE de l'enzyme purifiée indique une bande apparente d'une seule protéine avec un poids moléculaire de 75 kDa (Figure 35). Ceci indique que l'enzyme purifiée est un monomère. Vishnu et al., 2002, ont décrit une enzyme monomérique de *L. amylophilus* GV6 de 90 kDa correspondant à une pullulanase de type I.

La purification et la caractérisation biochimique des pullulanases ont montré que leurs masses moléculaires se situent entre 54 kDa et 134 kDa (Wasko et al., 2011). La révélation avec le lugol et le rouge de Congo a montré que cette unique bande possède les deux activités α-amylasique et pullulanasiq. Lors de la SDS-PAGE, l'amylopullulanase alcaline de *Bacillus sp.* KSM-1378, la seule protéine obtenue, possède deux sites actifs différents, un pour hydrolyser les liaisons α-1,4 et l'autre pour couper les liaisons α-1,6. Deux activités catalytiques de l'enzyme impliquent deux sites actifs différents (Ara et al., 1995). Il a été suggéré que les deux activités : α-amylasique et pullulanasiq de *Clostridium thermohydrosulfuricum*, *Bacillus circulans* F-2 et de *L. amylophilus* GV6 sont des fonctions d'une seule nouvelle enzyme thermostable (Melasniemi, 1987, Kim et al, 1990 b et Vishnu et al., 2006, Mathupala et al., 1990).

L'enzyme amylolytique de notre souche de levure *Clavispora lusitaniae* ABS7 est une enzyme bifonctionnelle amylopullulanasiq avec 2 sites actifs pour l'α-amylase et la pullulanase.



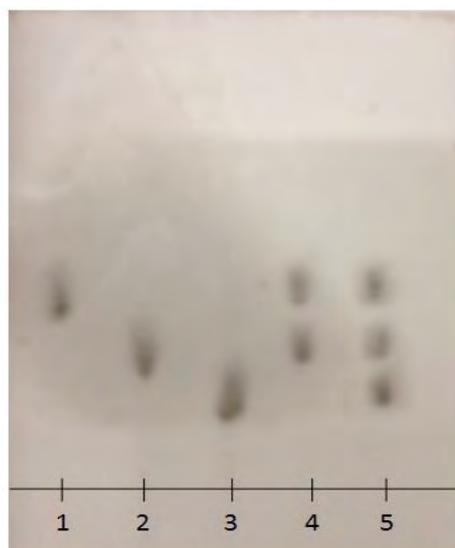
**Figure 35 :** Profil électrophorétique SDS-PAGE de l'enzyme purifiée. Révélation des protéines par le bleu de Coomassie. 1. Marqueurs de taille, 2. Amylopullulanase de *Clavispora lusitaniae* ABS 7

### 6. Chromatographie sur Couche Mince (CCM)

Pour confirmer la présence des deux enzymes amylolytiques, l' $\alpha$ -amylase et de la pullulanase, leurs produits d'hydrolyse (issus de l'amidon et du pullulane), une CCM est réalisée avec l'enzyme purifiée.

Après incubation avec le pullulane, l'enzyme purifiée produit exclusivement un mélange de glucose, maltose et maltotriose (Figure 36) identifiés par CCM. L'enzyme attaque aussi bien les liaisons glycosidiques  $\alpha$ -1,6 et  $\alpha$ -1,4 du pullulane et d'autres polysaccharides ramifiés comme l'amidon pour produire du glucose et du maltose (Figure 36).

## Résultats et discussion



**Figure 36:** Chromatogramme par CCM et analyse des produits à partir de l'amidon et du pullulan. 1. Glucose, 2. Maltose, 3. Maltotriose, 4. Enzyme + Amidon, 5. Enzyme + Pullulane

On peut émettre l'hypothèse que le mécanisme enzymatique possible de la formation du glucose et du maltose à partir du pullulane, se produit après l'hydrolyse des liaisons  $\alpha$ -1,6, pour donner le maltotriose, qui sera ensuite hydrolysé lentement en glucose et en maltose. L'hydrolyse des liaisons  $\alpha$ -1,6 de l'amylopectine de l'amidon donne des chaînes de maltodextrines beaucoup plus longues que celles du maltotriose. Il est probable que les chaînes du maltotriose soient hydrolysées plus rapidement pour donner exclusivement du glucose et du maltose (Zareian et al., 2010).

L'amylase maltogénique dégrade le pullulane principalement en maltose et en glucose avec une quantité relativement faible de panose (Oh et al., 2005). Par contre, le principal produit issu de l'amidon est évidemment le maltose (De Souza et De Oliveira, 2010).

Le profil électrophorétique par SDS-PAGE montre une seule bande possédant des activités  $\alpha$ -amylasique et pullulanase à la fois, confirmé également par CCM. Cette enzyme est désignée de type endo pour son action et forme une pullulanase type II (Sepreinat et Antranikian, 1990 et Mrudhula et al., 2011a) ou une amylopullulanase (Saha et Zeikus, 1989 et Mrudhula et al., 2011b). Hii et al., 2009b ont montré que la pullulanase de *Bacillus cereus* H1. 5 ne peut pas attaquer le dextrane contenant des liaisons glycosidiques  $\alpha$ -1,6 (Hyun et Zeiku, 1985 et Duffner et al., 2000) mais hydrolyse le pullulane en maltotriose (comme produit majeur) et d'autres polysaccharides comme l'amidon en maltose et glucose et par conséquent, elle peut être classée comme une pullulanase de type II ou une amylopullulanase (Hii et al., 2009b). Leveque et al., 2000 ont démontré que toutes les pullulanases thermostables des archées thermophiles sont de type II et aucune amylopullulanase type I n'a été caractérisée chez ces microorganismes thermophiles.

### 7. Immobilisation des enzymes

L'application industrielle d'enzymes est souvent entravée par un manque de disponibilité, un prix élevé et une stabilité limitée dans des conditions opérationnelles. L'utilisation d'enzymes sous une forme libre n'est pas très économique parce qu'ils ne peuvent pas être récupérés à la fin du processus. Ces inconvénients peuvent être surmontés par leur immobilisation qui les stabilise pour être récupérer et recycler (Sheldon et al., 2005, Talekar et al., 2010). Les enzymes immobilisées ouvrent la voie au développement industriel de réacteurs enzymatiques en continu. Cette procédure empêche les pertes d'enzymes en raison de lavage et dans le même temps maintient les enzymes à des concentrations élevées afin de réduire leur coût (Baldino et al., 2001).

#### 7.1. Résultat de l'optimisation

Pour déterminer avec précision les optima des trois facteurs étudiés (concentration du gel d'alginate, quantité d'enzyme et pH) sur l'immobilisation de l' $\alpha$ -amylase et la pullulanase de *Clavispora lusitaniae* ABS7, nous avons appliqué le plan de Box-Behnken qui offre la possibilité d'être économiques et efficaces. Dans ce plan, nous déterminons un polynôme quadratique où chaque facteur doit être étudié à 3 niveaux. La matrice expérimentale et les résultats expérimentaux sont représentés dans le tableau 36. Le traitement statistique de la matrice a été réalisé par le logiciel Statgraphics plus V5. 1 pour le calcul des coefficients de régression, le test de Fisher, l'ANOVA la probabilité et les coefficients de détermination. Les résultats sont présentés dans les tableaux 12 et 13 en annexe.

La statistique de l'ANOVA (Tableau annexe 3) indique une signification pour chacun des effets en comparant la moyenne quadratique par rapport à une estimation de l'erreur expérimentale.

Le test-F de Fisher significatif indique que l'effet est vraiment dû au changement du niveau de la variable (facteur) et non au hasard ni aux erreurs expérimentales. Autrement dit, le changement de la variable du niveau (-) au niveau (+) entraîne un effet positif ou négatif sur la réponse. Dans ce cas, 4 effets (pour l' $\alpha$ -amylase) et 5 effets (pour la pullulanase) ont des probabilités inférieures à 0,05, ce qui indique qu'ils ont un effet significatif différent de zéro au niveau de confiance de 95 % sur l' $\alpha$ -amylase et la pullulanase immobilisées.

La statistique du  $R^2$  indique 92,2 % de la variabilité de l' $\alpha$ -amylase et 90,8% de la variabilité de pullulanase sont expliquées par les trois facteurs étudiés : Concentration de l'alginate, quantité de l'enzyme et pH (Tableau 36).

## Résultats et discussion

**Tableau 36:** Effet des trois facteurs étudiés sur l'activité de l' $\alpha$ -amylase et de la pullulanase après l'immobilisation

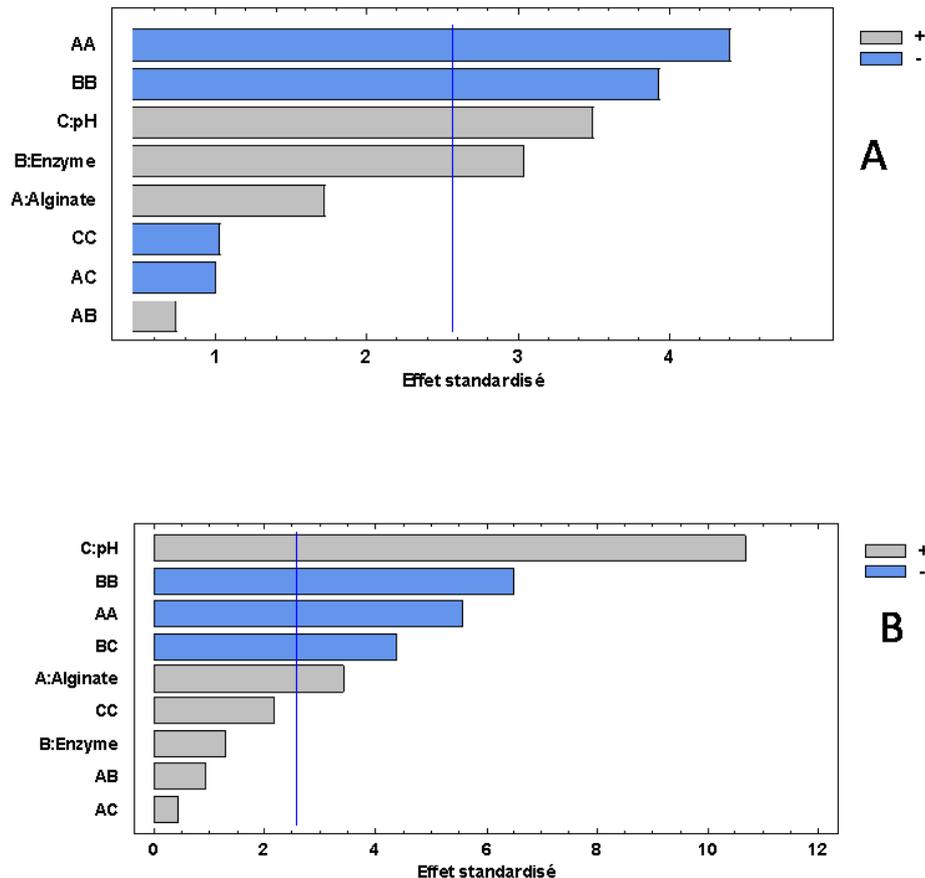
N° essai	[Alginate] %	Quantité d'enzyme (g)	pH	Pullulanase (UI)	$\alpha$ -amylase (UI)
1	0	0	0	4328,16	4828,16
2	1	0	1	4069,0	4568,74
3	-1	-1	0	4358,7	4858,69
4	0	-1	-1	4310,2	4810,0
5	-1	0	-1	4330,0	4830,0
6	0	-1	+1	4062,0	4562,11
7	+1	0	-1	3705,08	4205,12
8	0	0	0	3754,3	4254,36
9	-1	1	0	4062,3	4562,23
10	0	1	-1	3996,0	4495,68
11	0	1	+1	3857,6	4357,64
12	+1	1	0	3652,0	4152,23
13	-1	0	+1	4438,6	4638,58
14	0	0	0	3852,5	4352,5
15	+1	-1	0	4087,0	4586,5

Par l'utilisation des valeurs des coefficients de régression pour les deux réponses (Tableau annexe 3). Les équations de l'alpha amylase et de la pullulanase s'écrivent respectivement :

$$\alpha\text{-amylase} = 894,4 + 118,57 \times \text{Alginate} + 351,53 \times \text{Enzyme} + 361,87 \times \text{pH} - 2,52 \times \text{Alginate}^2 + 1,35 \times \text{Alginate} \times \text{Enzyme} - 2,74 \times \text{Alginate} \times \text{pH} - 24,92 \times \text{Enzyme}^2 - 5,74 \times \text{Enzyme} \times \text{pH} - 14,6 \times \text{pH}^2$$

$$\text{Pullulanase} = 271,1 + 126,08 \times \text{Alginate} + 401,71 \times \text{Enzyme} + 324,54 \times \text{pH} - 2,14 \times \text{Alginate}^2 + 1,35 \times \text{Alginate} \times \text{Enzyme} - 6,5 \times \text{Alginate} \times \text{pH} - 29,094 \times \text{Enzyme}^2 - 5,76 \times \text{Enzyme} \times \text{pH} - 5,25 \times \text{pH}^2$$

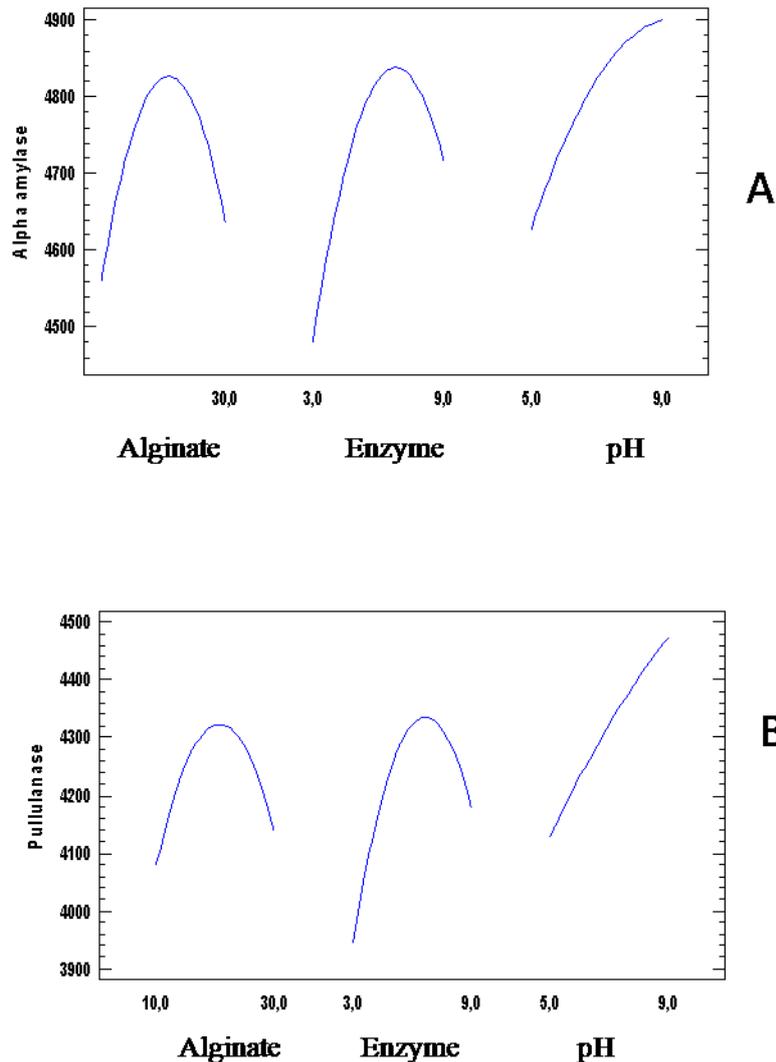
## Résultats et discussion



**Figure 37** : Graphique de Pareto pour un niveau de test  $\alpha=5\%$   
A :  $\alpha$ -amylase, B : Pullulanase

Le graphique de Pareto (Figure 37) permet de représenter graphiquement les résultats de l'analyse de ce plan pour l' $\alpha$ -amylase et la pullulanase. Les effets les plus forts sont ceux des facteurs C, B ainsi que les effets quadratiques des facteurs A et B (pour l' $\alpha$ -amylase, Figure 37A) et des facteurs A, C ainsi que l'interaction BC et les effets quadratique de A et B (pour la pullulanase, Figure 37 B).

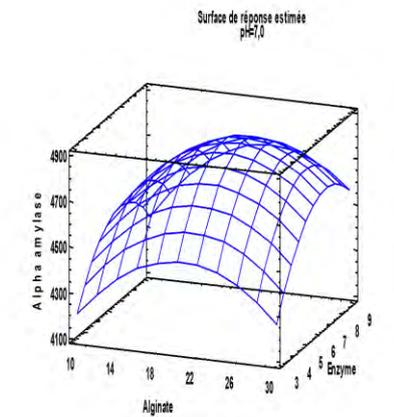
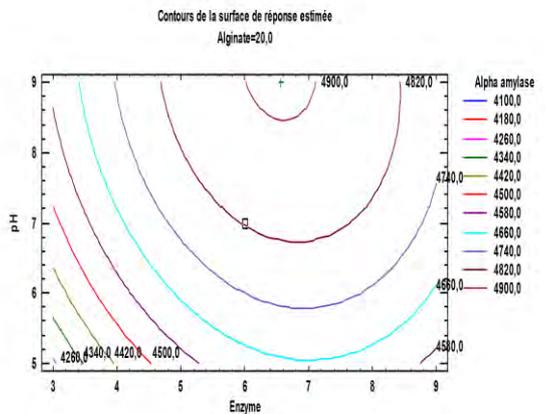
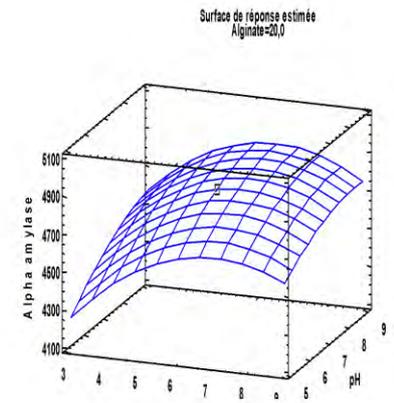
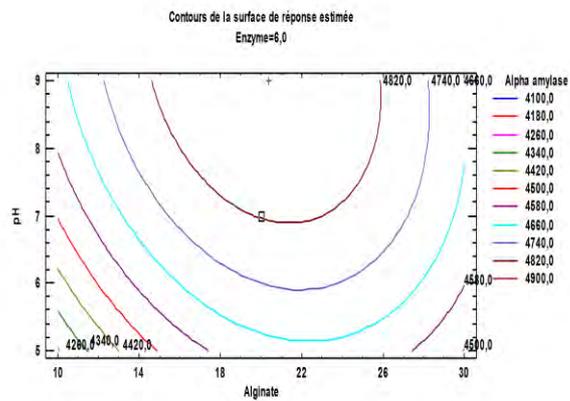
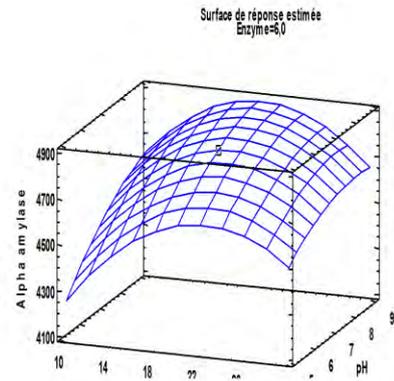
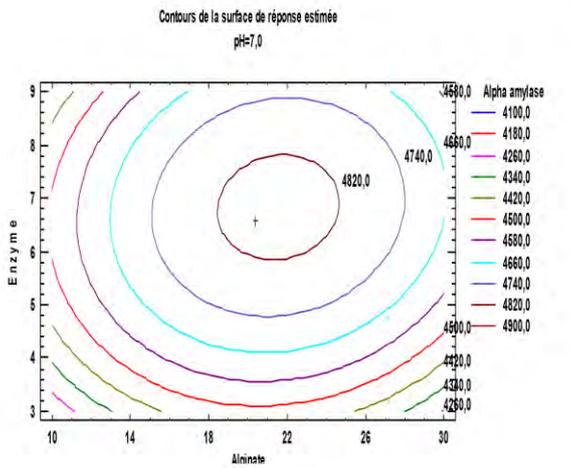
## Résultats et discussion



**Figure 38** : Effets directs pour l'activité  $\alpha$ -amylasique (A) et l'activité pullulanase (B)

Les effets linéaires et quadratiques de l'alginate et de la quantité d'enzymes sont importants pour les deux enzymes (Figure 38). Un effet linéaire fort du pH sur l' $\alpha$ -amylase (Figure 38 A), alors que son effet quadratique est léger. Pour la pullulanase, seul, l'effet linéaire du pH est important (Figure 38B).

# Résultats et discussion

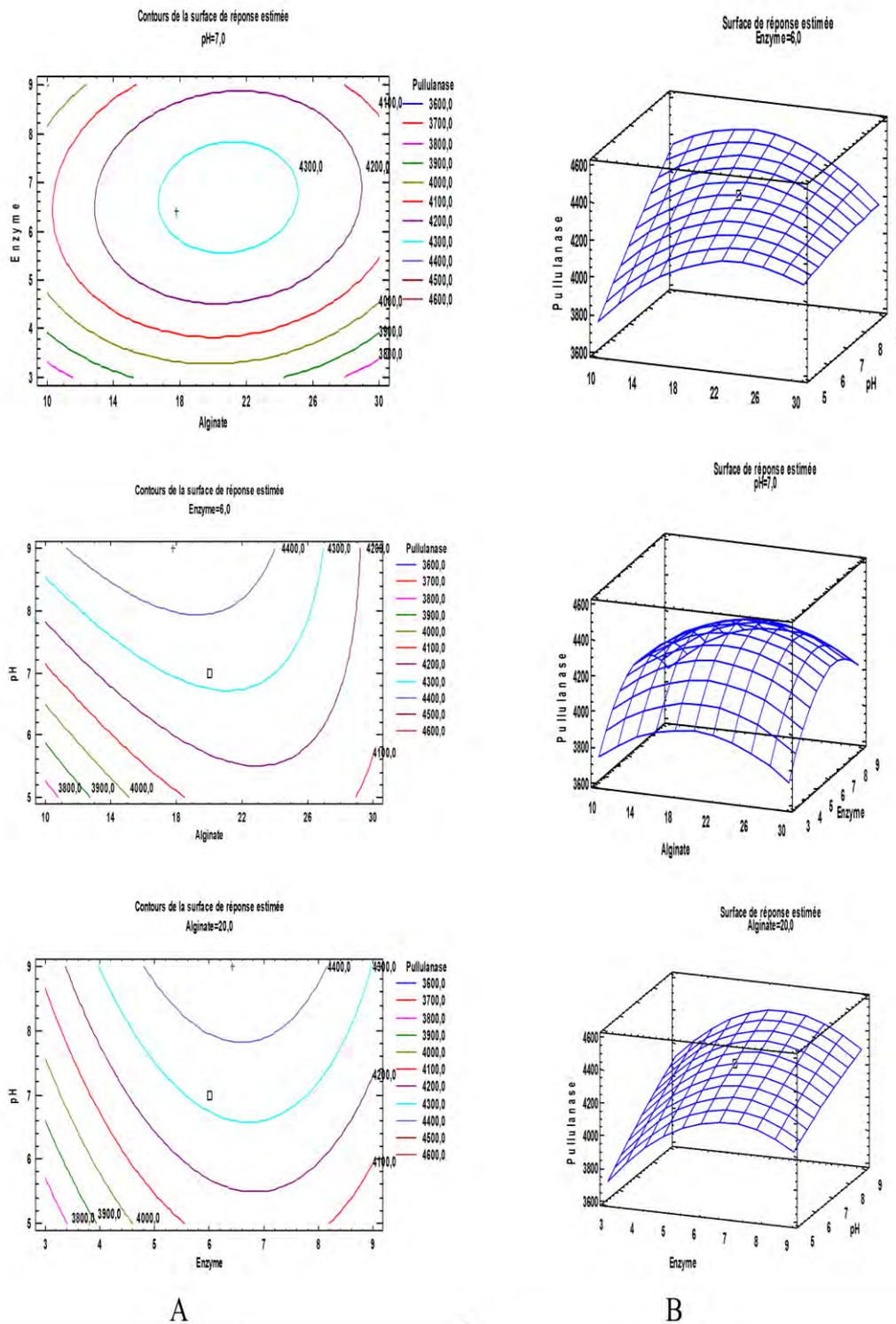


A

B

**Figure 39:** Iso-réponses A et surface de réponse B de l'activité  $\alpha$ -amylasique

## Résultats et discussion



**Figure 40** : Iso-réponses A et surface de réponse B de l'activité pullulanase

La surface de réponse et les courbes d'iso-réponses de l' $\alpha$ -amylase et la pullulanase sont représentées dans les figures 39 et 40, montrant des effets relatifs de chacun des deux facteurs étudiés lorsque le troisième facteur est maintenu à son niveau central. La méthodologie RSM est très efficace dans la détermination des conditions optimales pour la production des enzymes (Yasser et al., 2013 et Dave et al., 2015).

## Résultats et discussion

D'après cette étude statistique, la valeur optimale prédit une activité  $\alpha$ -amylasique de 4907,75 et une activité pullulanase de 4491,83 UI (avec l'alginate à 2,88-3%, la quantité d'enzyme de 6,5 g et un pH de 9).

L'essai en conditions optimales a permis l'obtention d'une activité  $\alpha$ -amylasique de 4863,16 $\pm$ 110 UI et une activité pullulanase de 4503,5  $\pm$ 175 UI. Ce qui indique que le modèle utilisé est adéquat pour les deux activités de l'enzyme immobilisée.

**Tableau 37:** Réponse optimisée pour maximiser l' $\alpha$ - amylase et la pullulanase

<i>Facteur</i>	<i>Réponse</i>	<i>Bas</i>	<i>Haut</i>	<i>Optimum</i>
Alginate (g/l)	$\alpha$ -amylase	20,0	40,0	30,3
	Pullulanase	20,0	40,0	28,8
Enzyme (g)	$\alpha$ -amylase	3,0	9,0	6,56
	Pullulanase	3,0	9,0	6,4
pH	$\alpha$ -amylase	5,0	9,0	9,0
	Pullulanase	5,0	9,0	9,0
Valeur optimum	$\alpha$ -amylase	<b>4907,75 UI</b>		
	Pullulanase	<b>4491,83 UI</b>		

Les résultats (Tableau 37) montrent que la concentration de 3% d'alginate de sodium est l'optimum pour une activité  $\alpha$ -amylasique et pullulanase maximale à pH 9. Avec cette concentration, les bons rendements d'immobilisation sont améliorés : 72,3 % pour l' $\alpha$ -amylase et 70,1% pour la pullulanase (Tableau 38).

**Tableau 38 :** Activités de l' $\alpha$ -amylase et la pullulanase thermostable dans les différentes fractions durant le processus de l'immobilisation.

Etape	$\alpha$ -amylase	Pullulanase
Enzyme immobilisée(UI)	4713,6	4567,3
Enzyme libre (UI)	7613,6	7415,45
Enzyme dans l'eau de lavage et la solution de chlorure de calcium filtré (UI)	1095	901,85
Rendement %	72,3	70,11

Cette concentration d'alginate de 3% est révélée par plusieurs études comme la meilleure concentration pour l'immobilisation des amylases dans les billes d'alginate de sodium (Rajagopalan et Krishnan, 2008, Prabakaran et Pugalvendhan, 2009, Talekar et Chavare, 2012). Par contre, la concentration de 2% d'alginate de sodium semble être la meilleure pour l'immobilisation de la protéase (Anwar et al., 2009). D'autre auteurs préconisent une

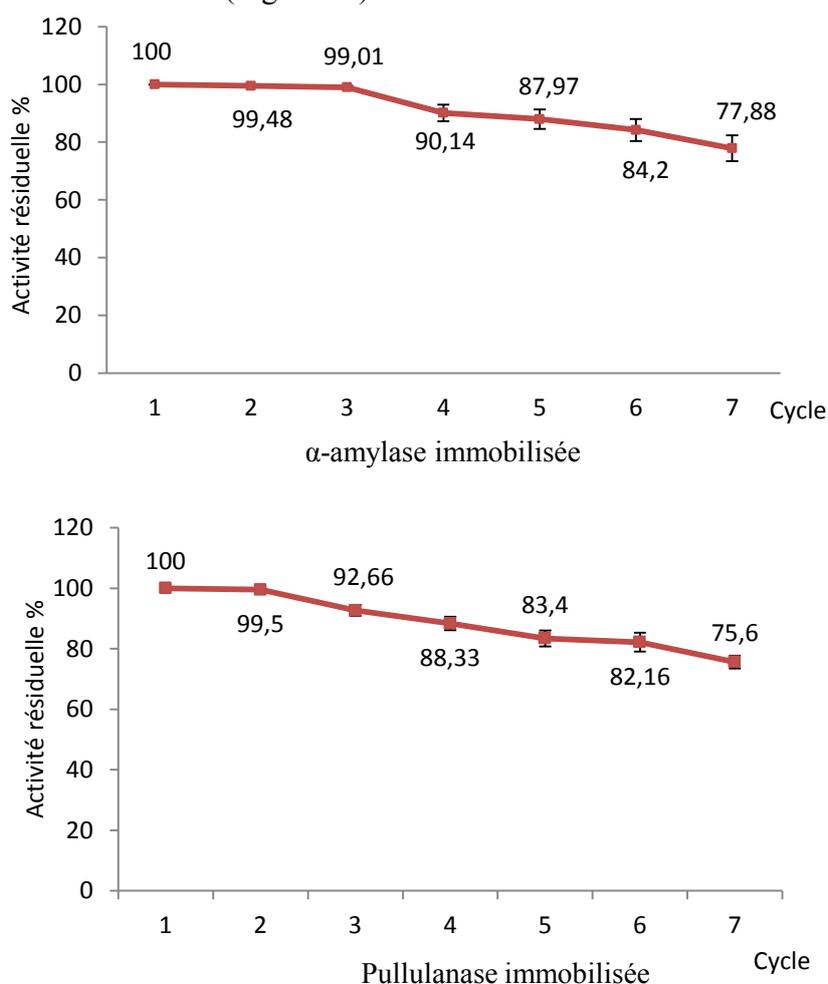
## Résultats et discussion

concentration de 4% pour l'immobilisation de l' $\alpha$ -amylase (Dey et al., 2003 ; Riaz et al., 2009 ; Sakaran et Ravikumar, 2011). La concentration du gel a une influence sur la porosité des billes d'alginate de calcium et cette différence dépend du type d'alginate et de la concentration de l'agent gélifiant (Longo et al., 1992, Nouadri, 2011).

La diminution de rendement d'immobilisation avec l'augmentation de la concentration d'alginate de sodium est due à la diminution de la porosité des billes de gel, qui cause la limitation de diffusion du substrat et une certaine fuite initiale de la molécule d'enzyme (Zaborsky, 1973).

### 7.2. Efficacité de la réutilisation des enzymes immobilisées

Le principal avantage de l'immobilisation de l'enzyme est son recyclage. L'efficacité de la réutilisation de l'enzyme est un facteur clé pour son utilisation industrielle rentable. La stabilité opérationnelle de l'amylopullulanase est évaluée en fermenteur Air lift. L'amylopullulanase immobilisée dans les perles d'alginate de calcium à 3% peut être réutilisée après filtration. La réutilisation de l'amylopullulanase immobilisée est étudiée jusqu'à 07 cycles. L'activité de l' $\alpha$ -amylase garde 77,9 % de son activité initiale et celle de la pullulanase conserve 75,6 % de son activité (Figure 41).



**Figure 41** : Réutilisation de l' $\alpha$ -amylase et de la pullulanase immobilisées

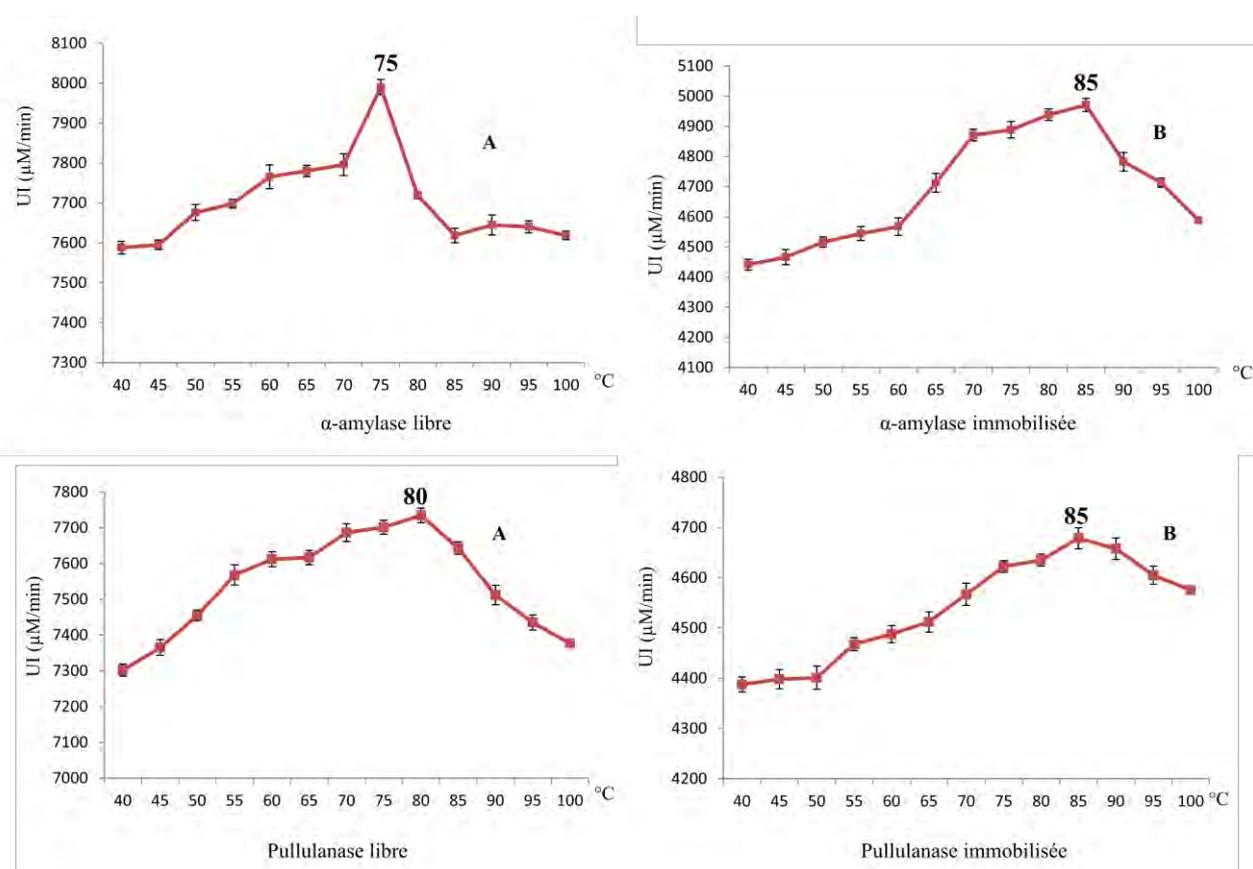
## Résultats et discussion

Après la réutilisation de l' $\alpha$ -amylase après 10 cycles, l'enzyme perd 35% de son activité initiale (Telekare et Chavare, 2012). L'enzyme de *B. circulans* GRS 313 maintient 83% de son activité initiale après le septième cycle, suite à la dénaturation de l'enzyme. Notre enzyme immobilisée est opérationnellement plus stable que l' $\alpha$ -amylase immobilisée sur la membrane de nitrocellulose qui conserve seulement 65% de son activité initiale après 07 cycles (Tanyolac et al., 1998). D'autres supports d'immobilisation (3-aminopropyl de silice) améliorent le rendement en activité de l' $\alpha$ -amylase de 75%, mais réduisent son recyclage, 5<sup>ème</sup> cycle (Kumar et Khare, 2015).

### 8. Etude des paramètres physicochimiques des enzymes libres et immobilisées

#### 8.1. Effet de la température sur l'amylopullulanase libre et immobilisée

L'influence de la température sur l'activité de l'amylopullulanase alcaline avec le pullulane et l'amidon comme substrats, est déterminée par la mesure des activités à différentes températures (dans le tampon Glycine-NaOH 0,1M, pH 9). Les quatre profils des activités de la température obtenus avec de l'amidon et le pullulane présentent un aspect un peu large (Figure 42).



**Figure 42** : Effet de la température sur les activités de l' $\alpha$ -amylase et la pullulanase libres (A) et immobilisées (B).

L'activité de l'enzyme est également fortement dépendante de la température. Les activités des deux enzymes sous les deux formes, augmentent avec la température et les activités maximales de l'enzyme libre sont obtenues à 80°C avec le pullulane et 75°C avec l'amidon

## Résultats et discussion

(Figure 42). Après l'immobilisation dans les billes d'alginate de calcium, les températures optimales des deux activités se sont élevées et décalées à 85°C (Figure 42).

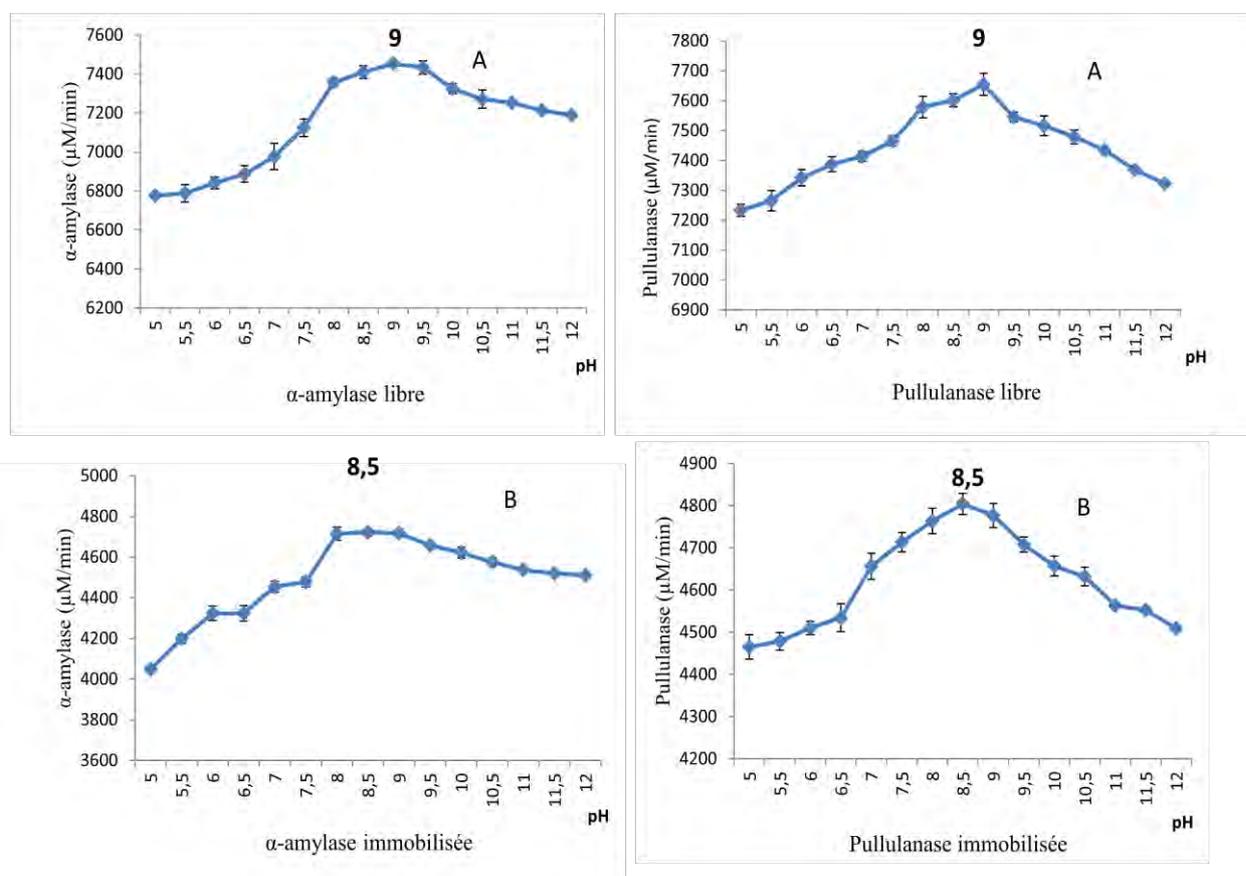
Différentes études ont démontré que les  $\alpha$ -amylases, immobilisées dans les billes d'alginate de calcium possèdent une résistance à la température par rapport à l'enzyme libre (Dey et al., 2003 et Konsoula et al., 2006). La température optimale de la pullulanase recombinante est 75°C, compatible avec la température optimale de la croissance de *Fervidobacterium pennavorans* Ven 5, (Bertoldo et al., 1999). De Souza et De Oliveira (2010), dans une analyse de la documentation sur l'application de l' $\alpha$ -amylase dans l'industrie, ont trouvé que parmi une dizaine d'espèces de levures et de moisissures étudiée, aucune n'a montré une température optimale de l'activité enzymatique supérieure à 75°C.

Les enzymes amylolytiques immobilisées de notre souche levurienne *Clavispora lusitaniae* ABS7 (isolée du blé cultivé et stocké dans des conditions arides, Biskra, Sud Algérien) ont battu les records en thermostabilité: température optimale de 85°C.

L'étude de Nakamura et al., 2000 a révélé que *Clavispora lusitaniae* a produit une phytase ayant une température optimale de 70°C.

### 8.2. Effet du pH sur les activités de l' $\alpha$ -amylase et de la pullulanase libres et immobilisées

En présence du substrat, le pullulane ou l'amidon, l'activité maximale de l'enzyme libre est observée à pH 9 et celle de l'enzyme immobilisée à pH 8,5 (Figure 43).



**Figure 43** : Effet du pH sur les activités de l' $\alpha$ -amylase et la pullulanase libres (A) et immobilisées (B)

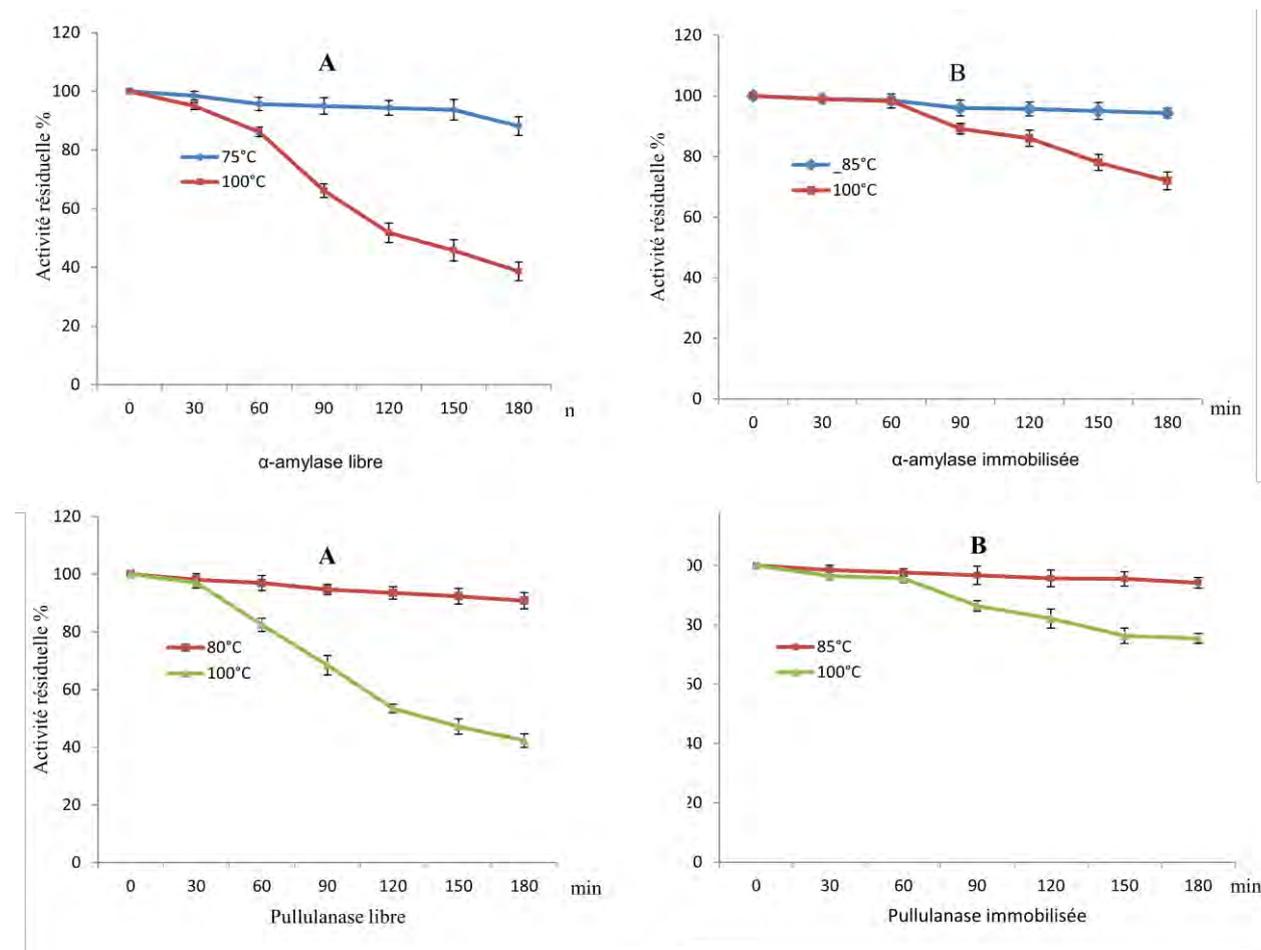
## Résultats et discussion

Au cours de l'immobilisation de l' $\alpha$ -amylase, un changement similaire dans le pH optimal vers la direction acide est observé (Prakash et al., 2012).

Ce changement de pH optimal peut être du à un changement de l'ionisation de la chaîne latérale des acides aminés basiques et acides dans le microenvironnement autour du site actif (Talekar et al., 2010 ; Talekar et Chavare, 2012). De plus, les deux activités des deux formes enzymatiques (libre et immobilisée) sont apparues sur une large gamme de valeurs de pH, avec plus de 50% de l'activité maximale, détectée entre pH 5 et pH 12. Le pH optimum de 5,5 à 6 est très commun chez les pullulanases bactériennes: *Thermococcus litoralis*, *T. hydrothermalis*, *Pyrococcus furiosus*, *P. woesei*, *Bacillus stearotherophilus*, *T. maritima* et *Exiguobacterium acetylicum* (Kuriki et al., 1988 b; Brown et Kelly, 1993 ; Kim et al., 1996 ; Gantelet et Duchiron, 1998 et Qiao et al., 2015). Kim et al., 1993, ont décrit une pullulanase type I issue d'une souche bactérienne mésophile et alcalophile de *Bacillus sp.* S-1 avec un pH optimum se situe entre 8-10.

### 8.3. Etude de thermostabilité de l' $\alpha$ -amylase et la pullulanase libres et immobilisées

La stabilité thermique de l'enzyme est étudiée après son incubation à différentes températures pendant 30-180 min dans le tampon à pH 9 pour les deux activités de l'enzyme libre et à pH 8,5 pour l'enzyme immobilisée.



**Figure 44** : Etude de la thermostabilité de l' $\alpha$ -amylase et la pullulanase libres (A) et immobilisées (B)

## Résultats et discussion

---

D'après la figure 44, il ressort que :

- L' $\alpha$ -amylase libre maintient 51,76% de son activité initiale, après incubation de 120 min à 100°C. Après 180 min, elle perd 61,4 % de son activité. A 75°C et après 3 h de traitement thermique, l'enzyme maintient 88% de son activité.
- L' $\alpha$ -amylase immobilisée conserve 72% de son activité, après son incubation pendant 180 min à 100°C et 94% de son activité, après 180 min à 85°C.
- Après une incubation de 120 min à 100°C, la pullulanase libre garde 53,4% de son activité initiale et après 180 min dans les mêmes conditions, elle maintient 42%. A 80°C après 180 min, elle maintient 91% de son activité.
- Un traitement thermique à 100°C pendant trois heures a provoqué une perte de 25% de l'activité initiale de la pullulanase immobilisée, alors qu'à 85°C, elle conserve 94% de son activité après 180 min d'incubation.

En résumé, les deux enzymes amylolytiques immobilisée conservent plus de 90% de leurs activités initiales en subissant un traitement thermique de 85°C pendant 3h. En forme libre et pour le même traitement 50% d'activité se conservent après 2h. La pullulanase de la souche thermophile de *Fervidobacterium pennavorans* Ven 5 a montré une activité maximale à pH 6 et à 85°C. Sa demi-vie est obtenue après 2h d'incubation à 80°C et après 5 min à 90°C (Koch et al., 1997)

La résistance des amylases à la dénaturation thermique peut être expliquée par la présence de calcium dans le milieu qui les stabilisent et augmentent leur activité (Bertoldo et al., 1999, Annamalai et al., 2011 et Deb et al., 2013). Le substrat a également un effet stabilisateur pour l'enzyme (Larpent et Larpent-Gourgand, 1997).

La thermostabilité des enzymes est également due à la présence de certains groupements des chaînes latérales des acides aminés et à leur séquence (cyt, tyr, ser, glu, asp, arg, lys et leu) (Ghosh et chandra, 1984 et Larpent et Larpent-Gourgand, 1997).

En plus des facteurs qui accentuent la thermostabilité des enzymes cités dans le paragraphe 6.1. d'autres facteurs de stabilisation comme (a) la composition en acides aminés (y compris une diminution de résidus thermolabiles tels que Asn et Cys); (b) des interactions aromatiques, les paires d'ions et l'augmentation des réseaux en pont de sel; (c) des interactions d'oligomérisation; (d) les liaisons métalliques et (g) des modifications dans l'hélice  $\alpha$  et le feuillet  $\beta$  (Russell et al., 1997 et Vielle et Zeikus, 2001).

L'enzyme traitée par la chaleur doit faire face à deux exigences contradictoires : consolider sa structure de façon à résister à l'agitation thermique, mais être assez flexible au niveau du site actif. La rigidité peut s'acquérir par la multiplication des associations hydrophobes, qui tendent à se renforcer par élévation de température (Pelmont et al., 2000).

De plus, les enzymes naturelles ont tendance à ajuster leur flexibilité conformationnelle afin d'atteindre l'efficacité catalytique optimale dans la gamme de température qu'ils sont censés fonctionner (Declerck et al., 2003). Les protéines thermophiles sont généralement des protéines plus rigides que les psychrophiles, plus souples que leurs homologues mésophiles (Lonhienne et al., 2001).

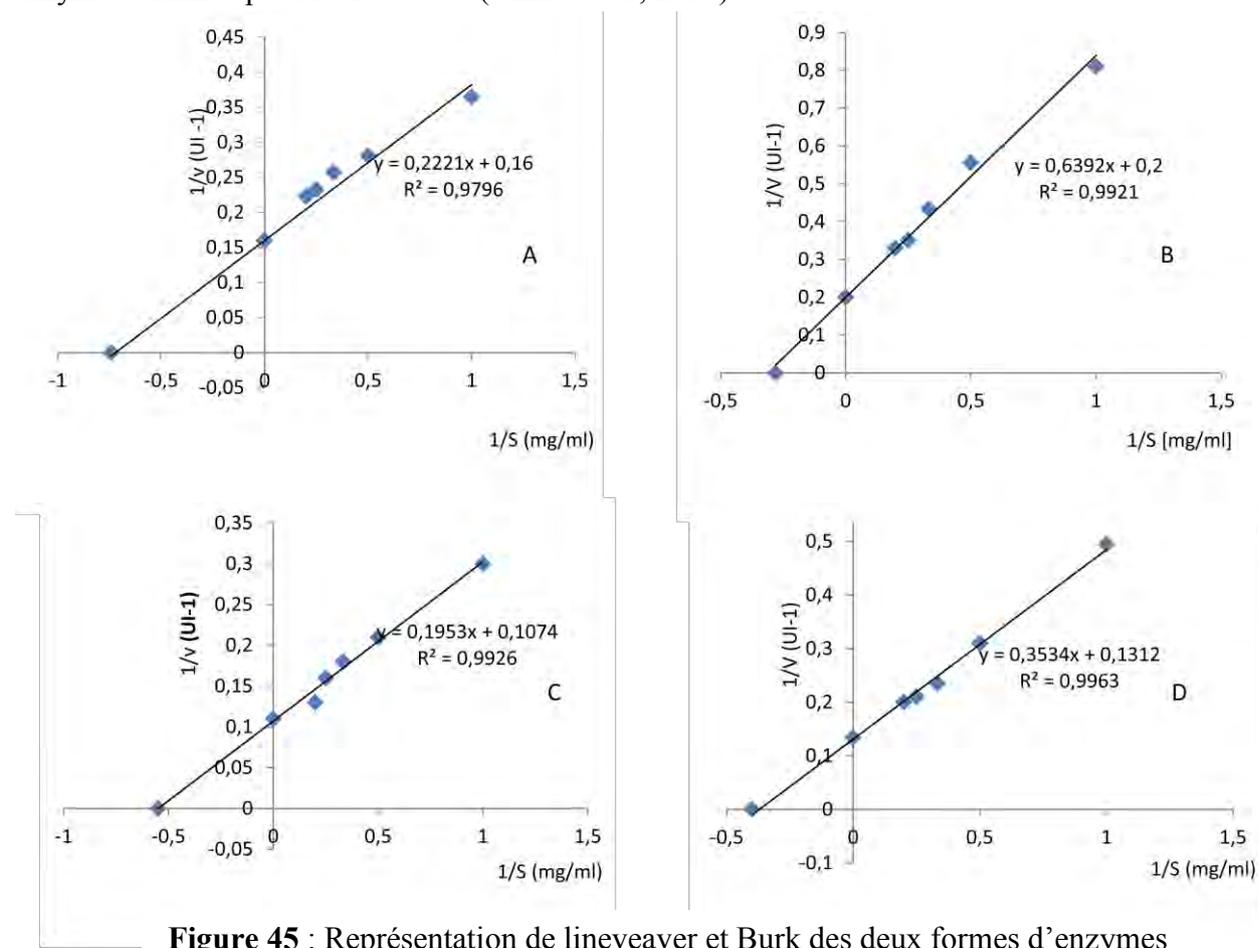
Les molécules de protéines n'ont pas une structure fixe, mais présentent un caractère dynamique avec une flexibilité conformationnelle (Unsworth et al., 2007). Plusieurs travaux (Koutsopoulos et al., 2005 et Tehei et Zaccai, 2005) sur les protéines mésophiles et

## Résultats et discussion

thermophiles ont suggéré qu'une flexibilité moléculaire suffisante (via mouvements atomiques) existe pour faciliter les changements de conformation nécessaires pour l'activité enzymatique (par exemple, la fixation et la libération du substrat, ...etc.).

### 8.4. Etude des paramètres cinétiques des enzymes libres et immobilisées

Les paramètres cinétiques des deux formes enzymatiques (libres et immobilisés) pour l' $\alpha$ -amylase et la pullulanase sont déterminés par la représentation de Lineweaver et Burck (Figure 45 et Tableau 39). La forme immobilisée des deux enzymes, voit sa  $V_{max}$  diminuée et son  $K_m$  augmenté par rapport à la forme libre. Après immobilisation, l'affinité des deux enzymes diminue pour leur substrat (Ghina et al., 2015).



**Figure 45** : Représentation de lineveaver et Burk des deux formes d'enzymes  
A : l' $\alpha$ -amylase libre, B : l' $\alpha$ -amylase immobilisée, C : la pullulanase libre  
et D : la pullulanase immobilisée.

Il est difficile de comparer les paramètres cinétiques  $K_m$  et  $V_{max}$  de diverses amylases à cause de l'origine de substrat, de l'origine de l'enzyme, de la méthode de dosage de l'enzyme. Le  $K_m$  augmente avec la taille des billes d'alginate et aussi avec l'augmentation de la température tandis que la vitesse maximale ( $V_{max}$ ) diminue pour l' $\alpha$ -amylase immobilisée de la bactérie *B. circulans* GRS 313 (Dey et al., 2003) et pour celle de *B. acidocaldarius* (Singh et al., 2012).

Les valeurs des  $K_m$  et  $V_{max}$  des deux formes enzymatiques de cette étude se situe dans la gamme :  $K_m$  : 0,31- 29,71mg/ ml,  $V_{max}$  : 0,25- 80  $\mu$ mole/min, des valeurs apportées par la

## Résultats et discussion

littérature (El Batal et al., 2005; Li et al., 2007; Ahmed et al., 2008; Zarairan et al., 2010 et Talekar et Chavare, 2012).

L'augmentation de la concentration du substrat peut être due à l'incapacité du substrat à poids moléculaire élevé (comme l'amidon et le pullulane) à diffuser rapidement dans la matrice du gel d'alginate de calcium ce qui empêche l'accès du substrat au site actif de l'enzyme piégé d'où la diminution de la  $V_{max}$  de l'enzyme immobilisée (Anwar, 2009 et Norouzian, 2003). La résistance à la diffusion rencontrée par les molécules de produits pourrait provoquer l'accumulation du produit à proximité du centre du gel, ce qui conduit à une rétro-inhibition de certaines enzymes (Anwar, 2009).

**Tableau 39:** Paramètres cinétiques de l' $\alpha$ -amylase et de la pullulanase libres et immobilisées

Enzymes		Km (mg/ml)	Vmax ( $\mu$ mole/min)
<b><math>\alpha</math>-amylase</b>	Libre	1,39	6,25
	<b>Immobilisée</b>	<b>3,33</b>	<b>5</b>
<b>Pullulanase</b>	Libre	1,82	9,34
	<b>Immobilisée</b>	<b>2,69</b>	<b>7,63</b>

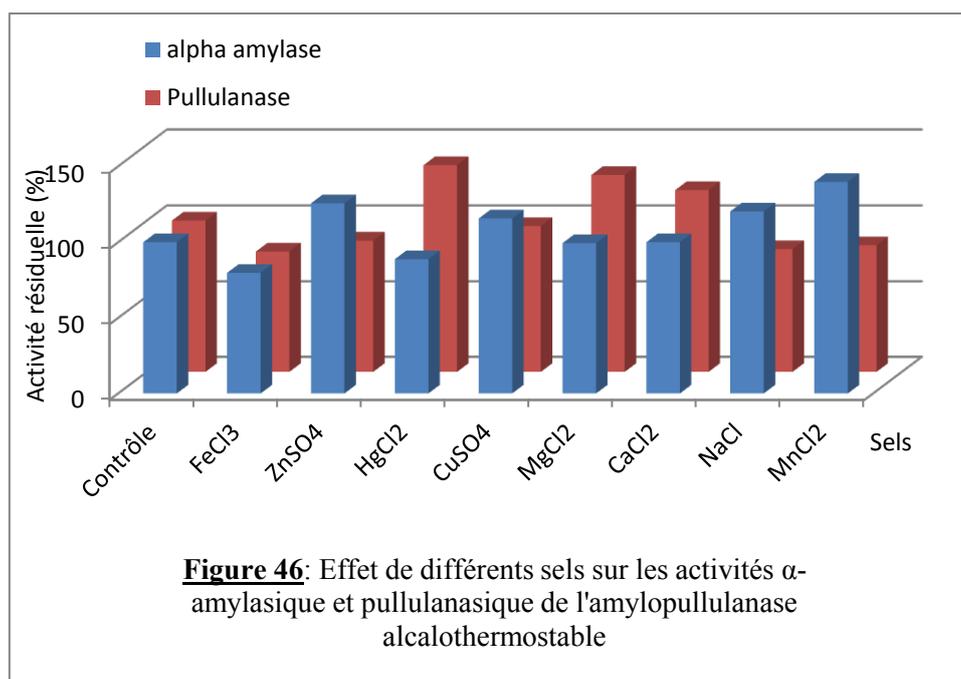
### 9. Effet de différents sels et réactifs chimiques sur les activités $\alpha$ -amylasique et pullulanasiq ue de *Clavispora lusitaniae* ABS7

#### 9.1. Effet des sels

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

L'activité pullulanasiq ue de l'enzyme de *Clavispora lusitaniae* ABS 7 est diminuée par les cations  $Zn^{2+}$   $Mn^{2+}$ ,  $Na^{+}$ , fortement inhibée par les ions  $Fe^{3+}$  (20,46%) et légèrement par le  $Cu^{2+}$  (3,62%) (Figure 46). Les résultats de Qiao et al., 2015 indiquent que l'activité de la pullulanase d'*Exiguobacterium acetylicum* augmente en présence de  $Fe^{2+}$  et  $Mn^{2+}$  et diminue en présence de  $Cu^{2+}$ . Les résultats (Figure 46) représentent la moyenne de trois essais. Ils montrent que les cations  $Hg^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$  et le  $Ca^{2+}$  sont des stimulateurs de la pullulanase de *Clavispora lusitaniae* ABS7, résultats corroborant ceux obtenus avec la pullulanase de *Bacillus stearothermophilus* (Kuriki et al., 1988b). D'autres cations,  $Zn^{2+}$ ,  $Na^{+}$  et  $Mn^{2+}$  augmentent l'activité de l' $\alpha$ -amylase de *Clavispora lusitaniae* ABS7 de 25,62%, 20,28% et 39,73% respectivement.

## Résultats et discussion



L'activité amylasique est également inhibée par les cations  $\text{Fe}^{2+}$  (20,19%),  $\text{Hg}^{2+}$  (11,17%) et légèrement par le  $\text{Mg}^{2+}$  (0,6%). L' $\alpha$ -amylase recombinante de la levure *Cryptococcus flavus* maintient son activité initiale, après l'ajout de  $\text{CaCl}_2$  (Galdino et al., 2011). La même observation est indiquée pour l' $\alpha$ -amylase de *Cryptococcus sp.* S-2 en présence des cations  $\text{Ca}^{2+}$  1mM (Iefuji et al., 1996).

Le calcium augmente l'activité amylasique (Leveque et al., 2000; Al Quadan et al., 2009 et Hii et al., 2009). L'effet stabilisateur de calcium sur la thermostabilité de l'enzyme peut être expliqué par le relargage des résidus hydrophobes par les ions de  $\text{Ca}^{2+}$  dans la protéine, engendrant une structure compacte (Al Quadan et al., 2009). Les ions de calcium rendent la molécule de la protéine plus rigide, ce qui conduit à une augmentation de la stabilité thermique de l' $\alpha$ -amylase de *Streptomyces avermitilis* (Hwang et al., 2013) et de la pullulanase de *Bacillus cereus* H1.5 (Hii et al., 2009b). Mais certaines amylases sont indépendantes de calcium: l'amylase de *Bacillus thermoleovorans* NP 54 (Malhota et al., 2000) n'exige pas le calcium pour son activité ou sa production. Vishnu et al., 2006 ont montré que le  $\text{CaCl}_2$  à 2,5mM augmente l'activité  $\alpha$ -amylasique et pullulanasiqque de *Lactobacillus amylophilus* GV6 mais à 5mM, il devient inhibiteur des deux enzymes. Les ions de  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$  et  $\text{Li}^{2+}$  à 5 mM inhibent les deux activités  $\alpha$ -amylasique et pullulanasiqque de *Clostridium thermosulfurogenes* SVM17 (Mrudula et al., 2011b).

De nombreuses enzymes amylasiques, y compris les amylopullulanases sont dépendantes des ions  $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{Mg}^{2+}$ . En revanche, l' $\alpha$ -amylase de notre souche de la levure *Clavispora lusitaniae* ABS7 a montré une légère inhibition en présence des ions de  $\text{Mg}^{2+}$  (à 5 mM). Cette inhibition modérée de l' $\alpha$ -amylase et de la pullulanase par ces ions est observée dans d'autres études:  $\alpha$ -amylase de bactéries: *Thermoanaerobacterium* B6A (Saha et al., 1990), *B. licheniformis* (Umesh Kumaret al., 1990), *Bacillus sp.* LI711 (Bernhardsdotter et al., 2005) et la pullulanase de la bactérie *B. stearothermophilus* KP1064 (Suzuki et Imai, 1985).

## Résultats et discussion

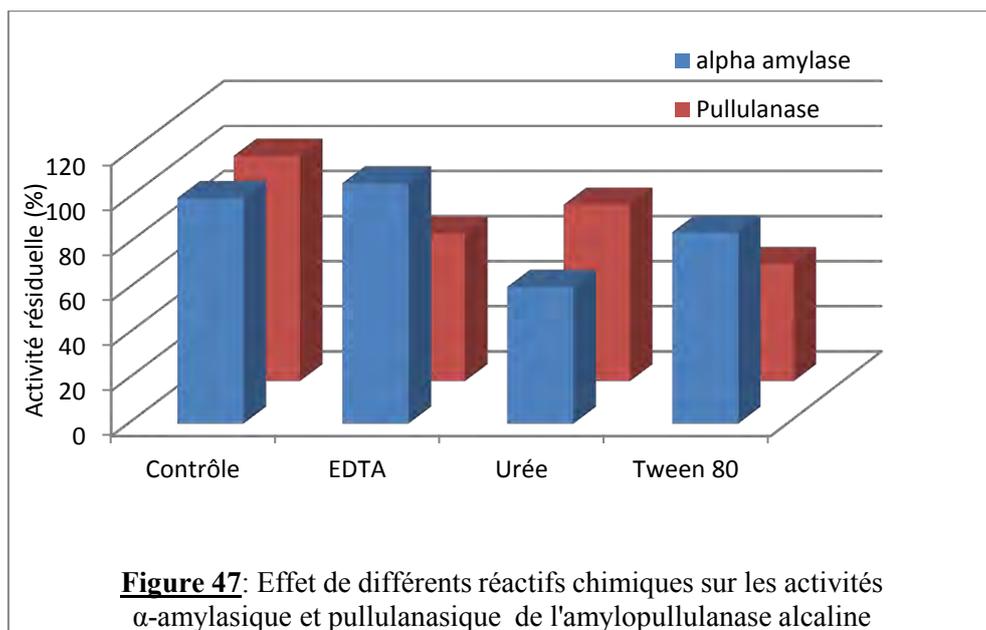
L'effet inhibiteur provoqué par les ions  $Hg^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  sur l'activité d' $\alpha$ -amylase peut être dû à la compétition entre les cations exogènes et les cations associés à la protéine, conduisant à une diminution de l'activité (Lin et al., 1998).

Les ions  $Mn^{2+}$  stimulent l'activité de l' $\alpha$ -amylase de notre souche et inhibent celle de la pullulanase de *Bacillus halodurans* (Asha et al., 2013) et de *Bacillus stearothermophilus* (Kuriki et al., 1988a). Le comportement différentiel des activités de l' $\alpha$ -amylase et de la pullulanase envers certains ions métalliques peut être du à la présence de deux sites actifs différents, l'un pour l' $\alpha$ -amylase et l'autre pour la pullulanase (Rudiger et al., 1995).

Les ions qui stimulent l'activité enzymatique comme  $Zn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Na^+$  et  $Mn^{2+}$  (pour l' $\alpha$ -amylase) et  $Hg^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$  et  $Ca^{2+}$  (pour la pullulanase), peuvent agir comme cofacteurs nécessaires pour augmenter l'activité enzymatique.

### 9.2. Influence de différents réactifs chimiques

L'influence de différents réactifs chimiques sur les activités  $\alpha$ -amylasique et pullulanasiq ue est également étudiée et les résultats indiquent la moyenne de trois essais et sont présentés dans la figure 47.



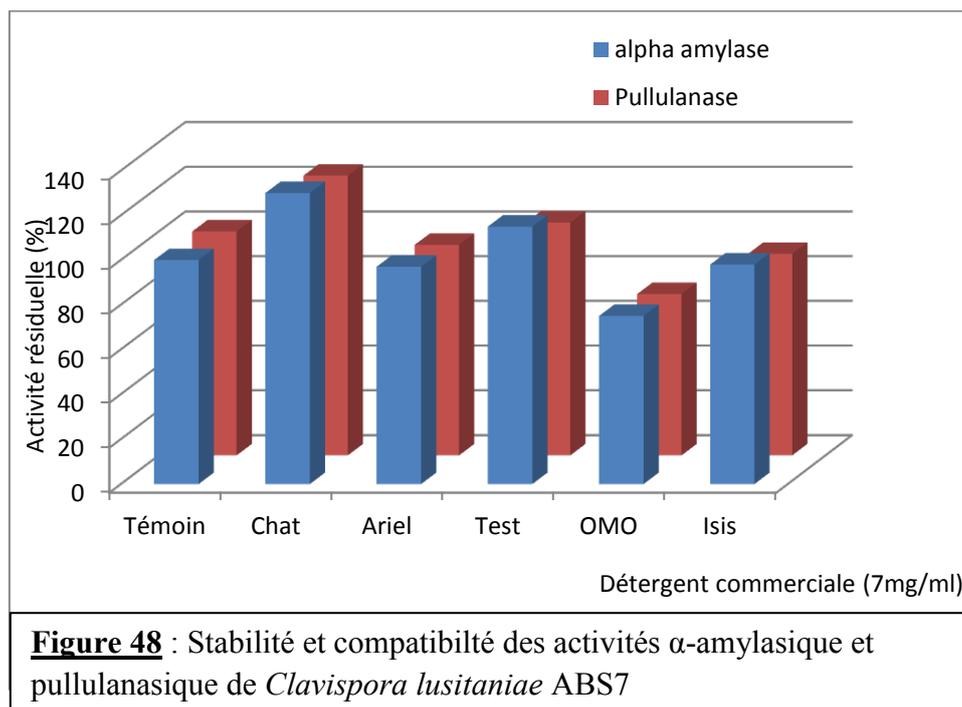
Nous remarquons que l'effet inhibiteur de l'urée est plus important sur l' $\alpha$ -amylase que sur la pullulanase. Par contre celui du tween 80 est moins fort sur l' $\alpha$ -amylase que sur la pullulanase. L'absence d'inhibition de l' $\alpha$ -amylase par l'EDTA, qui est un agent chélateur fort de métal, suggère que l'enzyme isolée peut ne pas être une métalloenzyme. La présence de  $CaCl_2$  n'a pas d'effet sur l'activité  $\alpha$ -amylasique (Figure 46) ce qui nous permet de conclure que les ions de  $Ca^{2+}$  ne sont pas nécessaires à l'activité de cette  $\alpha$ -amylase et probablement importants pour la stabilité de l'enzyme et le maintien de sa conformation. En revanche, l'EDTA inhibe l'activité pullulanasiq ue, avec une perte de 35% de son activité résiduelle. Ce résultat indique que la pullulanase est une métallo enzyme et l'activité est dépendante de  $CaCl_2$  car en présence des ions de calcium, l'activité augmente (Figure 46). L'effet nul de l'EDTA sur l' $\alpha$ -amylase levurienne est signalé par Iefuji et al. (1996), chez la levure

## Résultats et discussion

*Cryptococcus sp.* S-2. L'effet inhibiteur de l'urée sur l' $\alpha$ -amylase a été aussi signalé chez *Thermomyces lanuginosus* F1 (Odibo et Ulbrich-Hofmann, 2001).

9.3. Test de la compatibilité de l'amylopullulanase de *Clavispora lusitaniae* ABS7 avec divers détergents à lessives commerciales.

Les activités  $\alpha$ -amylasique et pullulanasiqque de *Clavispora lusitaniae* présentent une compatibilité importante avec tous les détergents des lessives commerciales (Figure 48). Les résultats représentent la moyenne de trois essais.



En présence des lessives Le Chat, Ariel, Test, OMO et Isis, l' $\alpha$ -amylase alcaline a maintenu respectivement 130, 97,115, 75 et 98% de son activité initiale. De même, l'alcalino-pullulanase a préservée 125, 94, 104, 72 et 90% de son activité initiale.

L'augmentation de l'activité de l'enzyme à 37°C peut être attribuée à l'effet stimulateur des composants détergents (Maurer, 2004).

L'activité  $\alpha$ -amylase est maximale avec le détergent à lessive le Chat à 45°C. La stabilité d'une quelconque enzyme dans des formulations des détergents dépend principalement de différents ingrédients tels que des tensioactifs, les agents de blanchiment et des stabilisants utilisés pour les formulations des détergents (Joo et Chang, 2006). Par conséquent, une perte partielle de l'activité  $\alpha$ -amylase dans certains détergents peut être attribuée à l'effet inhibiteur d'un composant de ces détergents.

En revanche, certains composants du détergent peuvent avoir un effet stimulateur sur l' $\alpha$ -amylase et la pullulanase de *Clavispora lusitaniae* ABS7 (Joo et Chang, 2006) (augmentation de l'activité enzymatique en présence de détergent par rapport à celle du témoin sans détergent). Une telle observation pour d'autres enzymes hydrolytiques en présence de constituants détergents a déjà été signalée (Joo et Chang, 2006). Cependant, des études plus

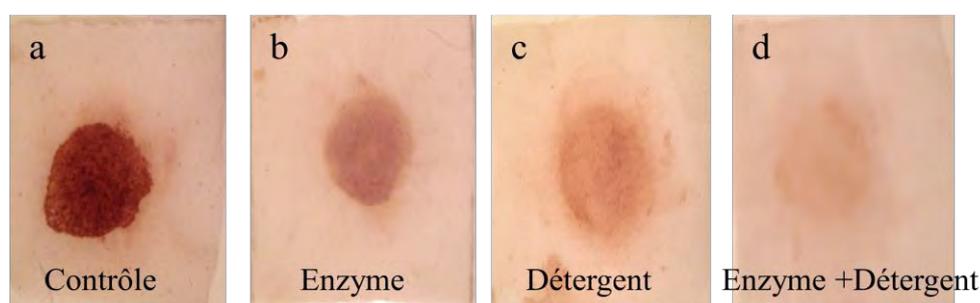
## Résultats et discussion

détaillées sont nécessaires pour élucider le mécanisme de l'inhibition / activation des deux enzymes de *Clavispora lusitaniae* ABS7 par différents composants de détergents.

En conclusion, l' $\alpha$ -amylase et la pullulanase thermostables et alcalines de *Clavispora lusitaniae* ABS7 ont démontré une excellente stabilité et une compatibilité avec les détergents à lessives commerciales à 45°C (généralement, utilisé au lavage) qui favorise son inclusion dans les formulations des détergents de blanchisserie commerciale.

### 9.4. Analyse de la performance du Lavage

La capacité d'élimination des taches par l'amylopullulanase alcaline purifiée est évaluée en utilisant des tissus de coton teinté de chocolat et de confiture. La Figure 49 montre que le traitement des taches de chocolat par le détergent (Le Chat) supplémenté avec l'amylopullulanase alcaline purifiée a abouti à une élimination parfaite par rapport à l'élimination des taches avec le détergent ou de l'enzyme seule.



**Figure 49** : Test d'analyse des performances du lavage de la tache chocolat-confiture sur les morceaux de tissu lavés.

**a** : Contrôle (eau de robinet) ; **b** : Enzyme (500UI)

**c** : Détergent (7 mg/ml) ; **d** : Enzyme (500UI) + Détergent (7mg/ml)

# **Conclusion générale et perspectives**

### Conclusion générale et perspectives

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

Un lot de souches de levures isolées à partir de grains de blé en provenance de zones semi-arides et aride-sahariennes climatiquement distinctes, est obtenu et contribue aujourd'hui à enrichir la mycothèque du laboratoire d'un ensemble de souches dont les spécificités métaboliques présentent un intérêt certain. Il offre au Laboratoire la perspective d'études diverses et plusieurs travaux sur cette mycocénose ont été déjà réalisés dans le cadre de mémoires de Master.

Parmi ces isolats, la méthode de plate-test-agar a permis de mettre en évidence des levures productrices d'enzymes amylolytiques ( $\alpha$ -amylase et pullulanase), secondairement isolées et caractérisées. Une douzaine de souches amylolytiques ont été sélectionnées sur la base de leur productivité enzymatique et de la thermostabilité de leurs enzymes.

Ces souches se développent et produisent l' $\alpha$ -amylase et la pullulanase sur lactosérum (lactose), lactosérum à 100% supplémenté par 1% d'amidon et sur milieu YNB contenant 1% d'amidon. Ces expressions enzymatiques nous indiquent que la production amylyasique de ces souches est constitutive (Malhotra et al., 2000).

L'étude des caractères morphologiques, physiologiques et moléculaires des souches retenues a permis de répartir la population de levures comme suit : 50% *Clavispora lusitaniae* (forme anamorphe de *Candida lusitaniae*), 25% *Pichia guilliermondii*, 8% *Pichia carribbica*, 8% *Meyerozyma guilliermondii* et 8% *Rhodotorula rubra*. Les genres *Candida*, *Pichia* et *Rhodotorula* sont cités comme étant les plus fréquemment rencontrés dans le blé. Bourgeois et al., 1996, et Laitila et al., 2006 mentionnent que ce biotope riche en amidon est favorable à la survie de levures amylolytiques.

La majorité des souches étudiées sont productrices d'un pseudo ou d'un vrai mycélium et possèdent des caractères trophiques particuliers : elles montrent une résistance à la température et supportent la salinité et les stress osmotique et éthanoïque,

Notre isolat est formé d'une population assez homogène quant à la thermostabilité des enzymes produites. La levure *Clavispora lusitaniae* ABS7 isolée de grains de blé de la zone aride de Biskra est sélectionnée pour ces performantes dans la production d'enzymes amylolytiques thermostables.

Concernant l'identification moléculaire de la souche *Clavispora lusitaniae* ABS7, elle a montré deux bandes avec l'endonucléase HAE III alors que les souches de la même espèce (L5, L9, L10, L11 et L12) présentent une seule bande. Ceci indique l'existence de particularités métaboliques pour cette souche et corrobore la mise en évidence de caractères biochimiques spécifiques comme l'assimilation des nitrates et de la créatinine.

Pour la production enzymatique, le milieu au lactosérum traité est à privilégier avec un taux d'ensemencement de  $2,5 \times 10^6$  cellules /ml. Ce sous-produit, le lactosérum, issu de la laiterie et à l'origine d'une pollution environnementale, peut être valorisé par les levures productrices d'enzymes amylolytiques.

L'optimisation des paramètres physicochimiques de la production enzymatique est effectuée en erlenmeyers et en fermenteur. Elle a permis de déterminer les conditions optimales de la fermentation : agitation 136,56 rpm, température 54,14°C, concentration d'amidon

## Conclusion générale

---

2,66g/l, quantité d'extrait de levure 0,365 g/l, volume des solutions standard de sels 8,75ml/l et d'oligo-éléments 4,3ml/l.

Les activités amylolytiques obtenues dans les conditions optimales de production sont : de 13456,36±300 UI pour l'  $\alpha$ -amylase et de 12611, 6±154 UI pour la pullulanase. Ces performances sont en accord étroit avec le modèle de production, évalué à 13 231UI pour l' $\alpha$ -amylase et 12825,5 UI pour la pullulanase. L'optimisation des conditions de culture a permis de doubler la production enzymatique : sans optimisation, les activités maximales enregistrées étaient de 6639,16 UI pour l' $\alpha$ -amylase et de 6308,5 UI pour la pullulanase. L'étude cinétique en fermenteur 2 L montre que les deux activités évoluent de façon concomitante.

La production maximale des enzymes d'intérêt par *Clavispora lusitaniae* ABS7 est obtenue au bout de 28 heures et semble être partiellement dissociée de l'évolution de la biomasse. La phase stationnaire débute seulement après 40 h de fermentation et se poursuit jusqu'à 96 h, sans que la phase de déclin ne soit amorcée. Lors de la croissance, le pH évolue de façon progressive et atteint un optimum à pH 8. Cette observation identifie le caractère alcalophile de la souche *Clavispora lusitaniae* ABS7, capable de se développer sur une large gamme de pH comprise entre pH5 et pH 9. La souche *Clavispora lusitaniae* ABS7 est une levure alcalothermophile. De plus, la production enzymatique en milieu constitué principalement de lactosérum s'accompagne d'une substance blanche qui s'accroche à la paroi du fermenteur et dont on suppose, d'après les résultats bibliographiques, qu'elle est un exopolysaccharide dont la nature reste à déterminer.

L'extrait enzymatique est lyophilisé et purifié par les méthodes classiques de purification. Le profil chromatographique sur Séphacryl S 200 révèle deux activités  $\alpha$ -amylasique et pullulanasique éluées conjointement avec le pic protéique. L'élution sur DEAE-cellulose confirme la présence des deux activités dans la même fraction, ce qui montre qu'elles sont portées par la même molécule. L' $\alpha$ -amylase et la pullulanase sont purifiées respectivement avec des taux de purification de 50,45 et 44,59 et des rendements de 23,88% et 21,11%.

L'enzyme purifiée montre une seule bande sur le gel de SDS-PAGE avec une masse moléculaire estimée à 75 KDa. L'analyse de cette bande signale que les deux activités amylosique et pullulanasique cohabitent, ce qui laisse supposer que la souche *Clavispora lusitaniae* ABS7 possède une enzyme amylolytique bifonctionnelle avec deux sites actifs : l'un pour l' $\alpha$ -amylase et l'autre pour la pullulanase permettant ainsi l'hydrolyse simultanée des liaisons glycosidiques  $\alpha$ -1,4 et  $\alpha$ -1,6.

La chromatographie sur couche mince confirme que l'enzyme hydrolyse l'amidon en maltose et glucose et le pullulane en maltotriose, maltose et glucose. En conséquence, il s'agit d'une enzyme saccharifiante qui présente une seule bande sur le gel de SDS-PAGE ; nous sommes vraisemblablement en présence d'une pullulanase de type II appelée amylopullulanase.

L'enzyme amylopullulanase est immobilisée sur billes d'alginate de calcium à 3% et les performances du processus d'immobilisation sont évaluées. Le procédé d'immobilisation optimisé améliore les activités enzymatiques : une augmentation de 34,5% pour l'activité de l' $\alpha$ -amylase (de 3216,24 UI à 4907,75 UI) et une augmentation de 37% pour l'activité de la pullulanase (de 2853,6 UI à 4491,8 UI). Les rendements respectifs sont de 72% et 70%.

## Conclusion générale

---

Les activités de l'enzyme amylopullulanase augmentent avec la température. Les températures optimales d'activité décalent à 85°C après immobilisation. Les pH optimum de l'enzyme immobilisée régressent légèrement et passent de 9 à 8,5.

La thermostabilité de l'amylopullulanase type II libre de *Claviospora lusitaniae* ABS7 a été précisée et confirmée. Après des traitements thermiques respectivement de 3 heures à 75°C, 120 min à 100°C, 180 min à 100°C, l' $\alpha$ -amylase libre conserve 88%, 51,76% et 38,6% de son activité. La pullulanase libre maintient 91% et 42% de son activité, après des incubations de 180 min à 80°C et 100°C.

De plus, l'immobilisation améliore la thermostabilité des activités enzymatiques, puisque des traitements thermiques de 180 min à 85°C et 100°C préservent respectivement 94,33% et 72% de l'activité  $\alpha$ -amylasique ainsi que 94,2% et 75% de l'activité de la pullulanase, soit une amélioration de la thermostabilité de l'ordre de 44% pour la pullulanase et 46% pour l'amylase comparée aux traitements à 100°C pour les enzymes libres.

Etant données les performances de ses enzymes amylolytiques et son caractère thermoalcalophile, *Claviospora lusitaniae* ABS7, isolé d'un environnement saharien aride, peut être qualifié de souche d'utilité industrielle plus particulièrement dans le cas des industries des détergents et du textile ou dans la valorisation des sous-produits amylacés.

Les paramètres cinétiques des deux enzymes sont déterminés : les Km des enzymes respectivement libres et immobilisées sont égaux à 1,39 mg/ml et 3,33 mg/ml pour l' $\alpha$ -amylase et 1,82 mg/ml et 2,69 mg/ml pour la pullulanase. Les Vmax ont pour valeur de 6,25 et 5 UI ( $\alpha$ -amylase) et 9,34 et 7,63 UI (pullulanase). L'immobilisation a permis d'augmenter l'affinité des enzymes pour leur substrat mais a réduit leur vitesse maximale. Une explication peut être donnée : les substrats à poids moléculaire élevé, comme l'amidon et le pullulane, présentent un retard à la diffusion dans la matrice du gel et l'accès du substrat au site actif n'est pas facilité ce qui entraîne une diminution de Vmax de l'enzyme immobilisée (Norouzian, 2003 ; Anwar, 2009).

L'immobilisation sur billes d'alginate de calcium à 3% montre une grande stabilité opérationnelle puisque, après sept cycles d'utilisation, 77,9 % (cas de l' $\alpha$ -amylase) et 75,6% (cas de pullulanase), des activités initiales sont conservées. L'immobilisation de l'amylopullulanase alcalo-thermostable pourrait générer un système d'hydrolyse en continu de l'amidon et être utilisée en lessives commerciales au vu de sa compatibilité.

Les sels et les substances chimiques ont des effets variables sur les activités de l'amylopullulanase de *Claviospora lusitaniae* ABS 7. Les cations  $Zn^{2+}$   $Mn^{2+}$ ,  $Na^+$  inhibent l'activité pullulanasique alors qu'ils semblent augmenter celle de l' $\alpha$ -amylase respectivement de 25,62%, 39,73% et 20,28%. Les cations  $Hg^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$  et  $Ca^{2+}$  sont des stimulateurs de la pullulanase alors que l'activité  $\alpha$ -amylasique est inhibée par  $Hg^{2+}$  (11,17%) et  $Mg^{2+}$  (0,6%), le  $Ca^{2+}$  étant sans effet. Les deux types d'activité sont fortement inhibés par  $Fe^{3+}$  (20,46% dans le cas de la pullulanase et 20,19% dans le cas de l' $\alpha$ -amylase). Il en est de même de l'urée et du tween 80.

En revanche, l'EDTA a des effets diamétralement opposés. Celui-ci entraîne une perte de 35% de l'activité résiduelle de la pullulanase ; nous sommes donc en présence d'une métallo-enzyme,  $CaCl_2$  dépendante. A l'inverse, l'absence d'inhibition de l' $\alpha$ -amylase par

## Conclusion générale

---

l'EDTA, suggère qu'elle n'est pas une métallo-enzyme et que son activité est de plus indépendante de  $\text{CaCl}_2$ .

En conclusion, cette étude nous a permis d'isoler une levure amylolytique *Clavispora lusitaniae* ABS qui possède, à la fois, les activités extracellulaires  $\alpha$ -amylasique et pulllanasique. Cette propriété lui fournit ainsi la capacité d'hydrolyser les liaisons glycosidiques  $\alpha$ -1,4 et  $\alpha$ -1,6 des polysaccharides. Ces deux activités sont vraisemblablement localisées dans deux sites actifs distincts d'une l'amylopullulanase type II ayant un pouvoir saccharifiant. La pullulanase est une metalloenzyme calcium dépendante. L'activité de l' $\alpha$ -amylase est indépendante du calcium, même s'il est indispensable à sa stabilité et au maintien de la structure de l'enzyme.

*Clavispora lusitaniae* ABS7, isolée de grains de blé issu d'une zone aride saharienne, est thermophile et alcalophile et produit des enzymes thermostables et actives en milieu alcalin. Les propriétés de l'amylopullulanase de *Clavispora lusitaniae* ABS7 la désignent pour une application industrielle plus particulièrement dans le domaine des industries « de l'amidon » et des détergents. L'étude de sa compatibilité avec divers détergents à lessives commerciales a montré qu'elle offrait une excellente stabilité et une compatibilité avec les détergents commerciaux.

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

- Expliquer la thermostabilité et le fonctionnement à pH alcalin de l'amylopullulanase grâce à l'outil moléculaire par la technique protéomique
- Rechercher chez *Clavispora lusitaniae* ABS7 d'autres enzymes d'intérêt, pouvant ouvrir à d'autres applications industrielles.
- Identifier la substance blanche secrétée massivement (probablement un EPS) par cette souche.
- Certaines souches de nos isolats méritent une étude approfondie au vu de leur performance proche de la souche de cette étude (*C. lusitaniae* ABS7) ; ABS4, ABS6 et SCS2.

# **Références bibliographiques**

## Références bibliographiques

- Acourene S.** and Ammouche A. Optimization of ethanol, citric acid and  $\alpha$ -amylase production from date wastes by strains of *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus niger* and *Candida guilliermondii*. J. Ind. Microbiol. Biotechnol., **2012**, 39: 759-766.
- AFNOR**, Lait. Recueil de normes françaises. Laites et produits laitiers. Méthodes d'analyse, Paris La Défense, **1980**, p. 33-54, 212-215.
- Aghajari N.**, Feller G., Gerday C. and Haser R. . Structural basis of  $\alpha$ -amylase activation by chloride. Protein Sci., **2002**, 11(6): 1435–1441.
- Ahmed S. A.**, El-Sayed M. E. M., Hassan O., Nabel A. S., and Hossam A. G. Studies on the Activity and Stability of Immobilized *Bacillus acidocaldarius* alpha-amylase. Aust.J. Basic Appl. Sci., **2008**, 2(3): 466-474.
- Aiyer P. V.** Amylases and their applications. African Journal of Biotechnology, **2005**, 4(13): 1525-1529.
- Almeida C.**, Brányik T., Moradas-Ferreira P. and Teixeira J. Continuous production of pectinase by immobilized yeast cells on spent grains. Biosci. and Bioeng., **2003**, 96(6): 513-8.
- Al-Quadan F.**, Akel H. and Natshi R. Characteristics of a novel highly thermostable and extremely thermophilic alkalitolerant amylase from hyperthermophilic *Bacillus* Strain HUTBS71. J. Biol. Sci., **2009**, (3): 67-74.
- Alvaro-Benito M.**, Polo A, Gonzalez B, Fernández-Lobato M and Sanz-Aparicio J. Structural and kinetic analysis of *Schwanniomyces occidentalis* invertase reveals a new oligomerization pattern and the role of its supplementary domain in substrate binding. J. Biol. Chem., **2010**, 285(18): 13930-41.
- Annamalai N.** , Thavasi R. , Vijayalakshmi S. , and Balasubramanian T. Extraction, Purification and Characterization of Thermostable, Alkaline Tolerant  $\alpha$ -Amylase from *Bacillus cereus*. Indian J. Microbiol., **2011**, 51(4): 424-429.
- Annous B. A.** and H. P. Blaschek.. Isolation and characterization of *Clostridium acetobutylicum* mutants with enhanced amyolytic activity. Applied Environ. Microbiol., **1991**, 57: 2544-2548.
- Antranikian G.** Microbial degradation of starch. In G. Winkelman (ed.), Microbial degradation of natural products, **1992**. VCH, New York, p. 27-56.
- Antranikian G.**, Herzberg C. and Gottschalk G. Production of thermostable  $\alpha$ -amylase, pullulanase and  $\alpha$ -glucosidase in continuous culture by a new *Clostridium* isolate. Appl. Environ. Microbiol., **1987**, 53 (7), 1668-1673.
- Anwar A.**, UI Qader S. A., Raiz A., Iqbal S. and Azhar A. Calcium alginate. A support material for immobilization of proteases from newly isolated strain of *Bacillus subtilis* KIBGE-HAR. World Appl. Sci. J., **2009**, 7(10):1281-1286.

- Ara K.**, Igarashi K., Saeki K., Kawai S., and Ito S. Purification and some properties of an alkaline pullulanase from alkalophilic *Bacillus sp.* KSM-1876. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, **1992**, 56 (1): 62-65.
- Ara K.**, Saeki K., Igarashi K., Takaiwa M., Uemura T., Hagihara H., Kawai S., Ito S. Purification and characterization of an alkaline amylopullulanase with both  $\alpha$ -1,4 and  $\alpha$ -1,6 hydrolytic activity from alkalophilic *Bacillus sp.* KSM-1378 *Biochimica et Biophysica Acta*, **1995**, 1243(3): 315-324.
- Arikan B.** Highly thermostable, thermophilic, alkaline, SDS and chelator resistant amylase from a thermophilic *Bacillus sp.* Isolate A3-15. *Bioresource Technology*, **2007**, 99(8): 3071-6
- Asgher M.**, Javaid Asad M., Rahman Sajjad Ur and Legge R. L. A thermostable  $\alpha$ -amylase, from a moderately thermophilic *Bacillus substilis* strain for starch processing. *J. Food Eng.*, **2007**, 79: 950-955.
- Asha R.**, Niyonzima F. N. and Sunil S. M. Purification and properties of pullulanase from *Bacillus halodurans*. *Int. Res. J. Biol. Sci.*, **2013**, 2(3): 35-43.
- Ba K.** Tine Emmanuel, Destain Jacqueline, Cissé Ndiaga and Thonart Philippe. Étude comparative des composés phénoliques, du pouvoir antioxydant de différentes variétés de sorgho sénégalais et des enzymes amylolytiques de leur malt. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*, **2010**, 14: 131-139.
- Baldino A.**, Macias M. and Cantero D. Immobilization of glucose oxidase with calcium alginate gel capsules. *Process Biochem.*, **2001**, 36: 601-606.
- Banner D. W.**, Bloomer A. C., Petsko G. A., Phillips D. C., Pogson C.I., Wilson I.A., Corran P. H., Furth A. J., Milaman J. D., Offord R. E., Priddle J. D. and Waley S. G. Structure of Chicken muscle triose phosphate isomerase determined cristallographically at 2,5 Å resolution using amino acid sequence data. *Nature*, **1975**, 255: 609-703.
- Bari N. Md.**, Alam Z. Md., Muyibi, S. A., Parveen J. and Mamun A. A. Improvement of production of citric acid from oil palm empty fruit bunches: Optimization of media by statistical experimental designs. *Bioresource Technology*, **2009**, 100: 3113-3120.
- Barnett J. A.**, Payne R. W. and Yarrow D. 2000. *Yeast: Characteristics and identification*. Third edition 2000, reprinted **2007**. Cambridge University Press.
- Basaran P.** and Hang Y. D. Purification and characterization of acetyl esterase from *Candida guilliermondii*. *Letters in Applied Microbiology* **2000**, 30: 167-171.
- Beg Q. K.**, Bhushan B., Kapoor M. and Hoondal G. S. Production and characterization of thermostable xylanase and pectinase from *Streptomyces sp.* QG-11-3. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2000**, 24: 396-402.
- Bekatorou A.**, Psarianos C. and Koutinas A. A. Production of food grade yeasts. *Food Technol. Biotechnol.* **2006**, 44: 407-415.
- Bennamoun L.**, Meraihi Z. and Dakhmouche S. Use of experimental planning for the optimization of the production of  $\alpha$ -amylase by *Aspergillus oryzae* Ahlburg (Cohen) 1042.72 cultivated on medium containing orange scrap. *J. Food Eng.* **2004**, 64: 257-264.

- Bernfeld P.** Amylase  $\alpha$  and  $\beta$ . In Colowick, S. P., Kaplan, O. N. (Eds), *Methods in enzymology*. Academic Press. New York, **1955**, p. 140-146.
- Bernhardsdotter Eva C.M.J.**, Ng Joseph D., Garriott Owen K. and Pusey M. Enzymatic properties of an alkaline chelator-resistant  $\alpha$ -amylase from an alkaliphilic *Bacillus sp.* isolate L1711, *Process Biochem.*, **2005**, 40 : 2401- 2408.
- Bertoldo C.** and Antranikian G. Starch-hydrolyzing Enzymes from Thermophilic Archaea and Bacteria. *Current Opinion in Chemical Biology* **2002**, 6: 151-160.
- Bertoldo C.**, Duffner F., Jorgensen P. I. and Antranikian G. Pullulanase Type I from *Fervidobacterium pennavorans* Ven5: Cloning, Sequencing, and Expression of the Gene and Biochemical Characterization of the Recombinant Enzyme. *Applied and Environmental Microbiology*, **1999**, 65(5): 2084-2091.
- Beuchat L .R.** Influence of water activity on growth, metabolic activities and survival of yeasts and moulds. *J. Food Prot.*, **1983**, 46: 135-141.
- Binetti A.**, Carrasco M., Reinheimer J. and Suarez V. Yeasts from autochthonal cheese starters: technological and functional properties. *Journal of Applied Microbiology*, **2013**, 115:434-444.
- Bird A. R.**, Brown I. L. and Topping D. L. Starches, resistant starches, the gut microflora and human health. *Curr. Issues Intest. Microbiol.*, **2000**, 1 (1): 25-37.
- Boel E.**, Brady L., Brzozowski A. M., Derewenda Z., Dodson G. G., Jenson V. J. Calcium binding in  $\alpha$ -amylase an X-ray diffraction study at 2.1 Å resolution of two enzymes from *Aspergillus*, *Biochemistry*, **1990** 29 (26): 6244-6249.
- Bouix M.** et Leveau J.Y. Les levures Ds : Bourgeois C. M., Leveau J.Y., *Techniques d'analyse et de contrôle dans les industries agroalimentaires* **1991**, édition 2 Lavoisier-Tec et Doc.
- Bourgeois C.M.**, Mescle 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.
- Bourgeois C. M.** et Larpent J. P. *Microbiologie alimentaire. Tome II aliment fermenté et fermentations alimentaires.* Ed. Tec. et Doc. Lavoisier, Paris, **1996**, p.100-450.
- Box G. E. P.** and Wilson K. B. On the experimental attainment of optimum condition. *Royal Stat. Soc.* (Ser B), **1951**, 13: 1-45.
- Brayer G. D.**, Luo Y. G., and Withers S. G. The structure of human pancreatic  $\alpha$ -amylase at 1.8 Å resolution and comparisons with related enzymes. *Protein Sci.* **1995**, 4:1730-1742.
- Brown S. H.** and Kelly R. M. Characterization of amyolytic enzymes, having both  $\alpha$ -1,4 and  $\alpha$ -1,6 hydrolytic activity, from the thermophilic archaea *Pyrococcus furiosus* and *Thermococcus litoralis*. *Applied and Environmental Microbiology*, **1993**, 59 (8): 2614-2621.
- Brown S. H.**, Costantino H. R., and Kelly R. M. Characterization of amyolytic enzyme activities associated with the hyperthermophilic archaeobacterium *Pyrococcus furiosus*. *Applied and Environmental Microbiology*, **1990**, 56 (7): 1985-1991.
- Brunswick J. M.**, Kelly C. T. and Fogarty W. M. The Amylopullulanase of *Bacillus sp.* DSM 405. *Applied Microbiology Biotechnology*, **1999**, 51: 170-175.
- Burden D. W.** and Eveleigh D. E. Yeast's-diverse substrates and products. In: *Yeast technology.* Spencer J. F. Spencer D. M. Hrsg, Springer-Verlag, Berlin, **1990**.

- Burhan A.**, Nisa U., Khan G. C., Omer C., Ashabil A., Osman G., Enzymatic properties of a novel thermostable, thermophilic, alkaline and chelator resistant amylase from an alkaliphilic *Bacillus sp.* Isolate ANT-6. *Process Biochem.*, **2003**, 38: 1397-1403.
- Buzzini P.** An optimization study of carotenoid production by *Rhodotorula glutinis* DBVPG 3853 from substrates containing concentrated rectified grape must as the sole carbohydrate source. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, **2000**, 24: 41-45.
- Canganella F.**, Andrade C. M. and Antranikian G. Characterization of amylolytic and pullulytic enzymes from thermophilic archaea and from a new *Fervidobacterium* species. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **1994**, 42 (2-3): 239-245.
- Catley B. J.** and Whelan W.J. Observations on the structure of pullulan. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **1971**, 143 (1) : 138-142.
- Chen Y.**, Shivappa R. R., Keshwani D. and Chen C. Potential of agricultural residues and hay for bioethanol production, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **2007**, 142:276-290.
- Chi Z.**, Chi Z., Liu G., Wang F., Ju L., Zhang T. *Saccharomycopsis fibuligera* and its applications in biotechnology. *Biotechnol Adv.*, **2009**, 27 (4): 423-431.
- Chimata M. K.**, Sasidhar P. and Challa S. Production of extracellular amylase from agricultural residues by a newly isolated *Aspergillus* species in solid state fermentation. *Afr. J. Biotechnol.*, **2010**, 9(32): 5162-5169.
- Chirife Jorge** and Maria Del Pilar Buera. Water Activity, Glass Transition and Microbial Stability in Concentrated /Semimoist Food Systems. *Journal of Food Science*, **1994**, 59 (5): 921-927.
- Clementi Francesca** and Jone Rossi.  $\alpha$ -amylase and glucoamylase production by *Schwanniomyces castellii*. *Antonie Van Leeuwenhoek*, **1986**, 52: 343-352.
- Clementi F.**, Rossi J., Costamagna L. and Rosi J. Production of amylase (s) by *Schwanniomyces castellii* and *Saccharomycopsis fibuligera*. *Antonie van Leeuwenhoek*, **1980**, 46: 399-405.
- Cocconcelli P. S.**, Morelli L., Vescovo M. and Bottazzi V. Intergeneric protoplast fusion in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.*, **1986**, 35(2-3): 211-214.
- Covadonga R.** Arias, Jacqueline K. Burns, Lorrie M. Friedrich, Renee M. Goodrich, and Mickey E. Parish. Yeast species associated with orange juice: Evaluation of different identification methods. *Applied and Environmental Microbiology*, **2002**, 68(4): 1955-1961.
- Cui W.**, Xu J., Cheng J. J. and Stomp A. M. Starch accumulation in Duckweed for bioethanol production, *biosystems engineering*, **2011**, 110: 67-72.
- Dave Bhaumik R.**, Pritesh Parmar, Ankit Sudhir, Ketankumar Panchal and Subramanian R. B. Optimization of Process Parameters for Cellulase Production by *Bacillus licheniformis* MTCC 429 using RSM and Molecular Characterization of Cellulase. *Gene J. Bioprocess Biotech.*, **2015**, 5: 212 doi:10.4172/2155-9821.1000212.
- De Mot R.** and Verachtert H. Secretion of alpha-amylase and multiple forms of glucoamylase by the yeast *Trichosporon pullulans*. *can j microbiol.*, **1986**, 32 (1): 47-51.
- De Mot René** and Verachtert Hubert. Purification and characterization of extracellular  $\alpha$ -amylase and glucoamylase from the yeast *Candida Antarctica* CBS6678. *Eur. J. Biochem.*, **1987**, 164:643-654.

- De Mot R.**, Andries K. and Verachtert H. Comparative study of starch degradation and amylase production by ascomycete yeast species. *Systematic and Applied Microbiology*, **1984**, 5:106-118.
- De Mot R.** and Verachtert H. Purification and characterization of extracellular amylolytic enzymes from the yeast *Filobasidium capsuligenum*. *Applied and Environmental Microbiology*, **1985**, 50 (6): 1474-1482.
- De Oliveira A.P.A.**, Silvestre M. A., Alves-Prado H. F., Rodrigues A., da Paz M. F., Fonseca G. G. and Leite R.S.R. Bioprospecting of yeasts for amylase production in solid state fermentation and evaluation of the catalytic properties of enzymatic extracts. *African Journal of Biotechnology*, **2015**, 14 (14):1215-1223.
- De Souza Paula Monteiro** and Perola De Oliveira Magalhaes. Application of microbial  $\alpha$ -amylase in industry - A review. *Braz J Microbiol.*, **2010**, 41(4): 850-861.
- Deak Tibor.** Chapitre 8: environmental Factors. Influencing yeasts. In *Yeast Handbook: Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts*. Carlos Rosa, Gabor Peter (Eds.), Springer-Verlag Berlin Heidelberg, **2006**, p. 155-174.
- Deak M.**, Kiss G. B., Koncz C. and Dudits D. Transformation of Medicago by Agrobacterium mediated gene transfer. *Plant Cell Rep*, **1986**, 5(2): 97-100.
- Dean A. C. R.** Influence of environment on the control of enzymes synthesis. *J. Appl. Chem. Biotechnol.*, **1972**, 22, 245-259.
- Deb Promita**, Talukdar Saimon Ahmad , Mohsina Kaniz , Sarker Palash Kumar and Abu Sayem S. M. Production and partial characterization of extracellular amylase enzyme from *Bacillus amyloliquefaciens* P-001. Springerplus, **2013**, 2: 154, p. 1-12.
- Declerck N.**, Machinus M., Joyet P., Wiegand G., Huber R. and Gaillardin C. Hyperthermostabilization of *Bacillus licheniformis* alpha amylase and modulation of its stability over a 50 degrees C temperature range. *Protéin Eng.*, **2003**, 16 (4): 287-293.
- Dereeper A.**, Guignon V., Blanc G., Audic S., Buffet S. , Chevenet F., Dufayard J. F., Guindon S., Lefort V., Lescot M., Claverie J. M. and Gascuel O. Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist. *Nucleic Acids Research*, **2008**, 36: 465-469.
- Dey Gargi**, Bhupinder Singh and Rintu Banerjee. Immobilization of  $\alpha$ -amylase produced by *Bacillus circulans* GRS313. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, **2003**, vol.46 (2):167-176.
- Djekrif D. S.**, Gheribi A. Z., Meraihi Z. and Bennamoun L. Application of a statistical design to the optimization of culture medium for  $\alpha$ -amylase production by *Aspergillus niger* ATCC 16404 grown on orange waste powder, *Journal of Food Engineering*, **2006**, 73:190-197.
- Djekrif D. S.**, Gillmann L., Cochet N., Bennamoun L., Ait-kaki A., Labbani K., Nouadri T. and Meraihi Z. Optimization of thermophilic pullulanase and  $\alpha$ -amylase production by amylolytic yeast. *International Journal of Microbiology Research*, **2014**, 6 (2): 559-569.
- Dohmen R.**, Jurgen, Alexander W. M. Strasser, Richard S. Zitomer and Cornelis P. Hollenberg. Regulated overproduction of  $\alpha$ -amylase by transformation of the amylolytic yeast *Schwanniomyces occidentalis*. *Current Genetics*, **1989**, 15: 319-325.
- Dong G.**, Vieille C. and Zeikus J. G. Cloning, sequencing and expression of the gene encoding amylopullulanase from *Pyrococcus furiosus* and biochemical characterization of the recombinant enzyme. *Applied and Environmental Microbiology*, **1997**, 63: 3577-3584.

- Doyon Y.**, Home W., Daull P. and LeBel D. Effect of C-domain N-glycosylation and deletion on rat pancreatic  $\alpha$ -amylase secretion and activity. *Biochem. J.*, **2002**, 362: 259-264.
- Drummond G. S.**, Smith E. E. and Whelan W. J. Mechanism of Action of Pullulanase. *FEBS Letters*, **1969**, 51: 85-88.
- Dubois M.**, Gills K. A., Hamilton J. K., Rebers P. A. and Smith F. Colorimetric method for determination of sugar and related substances. *Anal. Chem.*, **1956**, 28: 350-356.
- Duffner F.**, C. Bertoldo, J. T. Andersen, K. Wagner, and G. Antranikian. A new thermoactive pullulanase from *Desulfurococcus mucosus*: cloning, sequencing, purification, and characterization of the recombinant enzyme after expression in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, **2000**, 182(22): 6331-6338.
- Dung N. T. P.**, Rombouts F. M. and Nout M.J.R.. Functionality of selected strains of moulds and yeasts from Vietnamese rice wine starters. *Food Microbiology*, **2006**, 23: 331-340.
- Ebabhi Abosede Margaret**, Adekunle Adedotun Adeyinka , Okunowo Wahab Oluwanisola and Osuntoki Akinniyi Adediran. Isolation and characterization of yeast strains from local food crops. *Journal of Yeast and Fungal Research*, **2013**, 4(4): 38-43.
- Ebertova H.** Amylolytic enzymes of *Endomycopsis capsularis*. H. A study of the properties of isolated  $\alpha$ -amylase, amyloglucosidase and maltase-transglucosidase. *Folia Microbiol.*, **1966**, 11(6): 422-438.
- El-Batal A. I.**, Atia K. S. and Eid M. A. Stabilization of  $\alpha$ -amylase by using anionic surfactant during the immobilization process. *Radiat. Phys. Chem.*, **2005**, 74: 96-101.
- Elleuche S.** and Antranikian G. Starch-hydrolyzing enzymes from thermophiles. In: Satyanarayana T, Littlechild J, Kawarabayasi Y (Ed.), *Thermophilic Microbes Environmental and Industrial Biotechnology*. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo, **2013**, p. 509-533.
- El-Naggar N. A.**, Haroun S. A., Oweis E. A. and Sherief A. A. Identification of newly isolated *Talaromyces pinophilus* and statistical optimization of  $\beta$ -glucosidase production under solid-state fermentation. *Prep. Biochem. Biotechnol.*, **2015**, 45(7): 712-29.
- Erra-Pujada M.**, Debeire P., Duchiron, F. and O'Donohue M. J. The Type II Pullulanase of *Thermococcus hydrothermalis*: Molecular Characterization of the Gene and Expression of the Catalytic Domain. *Journal of Bacteriology*, **1999**, 181 (10): 3284-3287.
- Ettalibi Moussa** and Baratti Jacques C. Isolation and characterization of an amylolytic yeast : *Candida edax*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **1988**, 4 (2): 193-202.
- Farias S. T.** and Bonato M. C. Preferred amino acids and thermostability. *Genet Mol Res*, **2003**, 2(4):383-393.
- Federici Federico**, Maurizio Petruccioli and Martin W. Miller. Enhancement and stabilization of the production of glucoamylase by immobilized cells of *Aureobasidium pullulans* in a fluidized-bed reactor. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **1990**, 33 (4): 407-409.
- Feillet Pierre**. Le grain de blé: composition et utilisation. INRA Editions. Paris, **2000**, p. 114-121.
- Fickers P.**, Nicaud J. M., Gaillardin C., Destain J. , Thonart P. Carbon and nitrogen sources modulate lipase production in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *J Appl Microbiol.*, **2004**, 96 (4):742-9.
- Fitter J.** and Heberle J. Structural equilibrium fluctuations, in mesophilic and thermophilic  $\alpha$ -amylase. *Biophys. J.* **2000**, 79: 1629-1636.

- Flannigan B.** The microbiota of barley and malt. In F. G. Priest and I. Campbell (ed.), *Brewing Microbiology*, 3<sup>rd</sup> ed. Kluwer, New York, **2003**, p. 113-180.
- Fogarty W. M.** and Kelly C. T. Recent advantages in Microbial Amylases. In *Microbial Enzymes and Biotechnology*, 2nd ed.; Fogarty W. M. and Kelly C. T., Eds. Applied Science, London, **1990**, p. 71-132.
- Fossi Bertrand Tatsinkou**, Tavea Frederic and Ndjouenkeu Robert. Production and partial characterization of a thermostable amylase from ascomycetes yeast strain isolated from starchy soils. *African Journal of Biotechnology*, **2005**, 4(1): 14-18.
- François F.**, Noël T., Pépin R., A Brulfert., Chastin C., Favel A. and Villard J. Alternative identification test relying on sexual reproductive abilities of *Candida lusitanae* strains isolated from hospitalized patients. *J. Clin. Microbiol.*, **2001**, 39: 3906-14.
- Freer S.N.** and Greene R. V. Transport of glucose and cellobiose by *Candida wickerhamii* and *Clavispora lusitanae*. *J. Biol. Chem.*, **1990**, 265(22):12864-8
- Fujimoto Zui**, Kenji Takase, Nobiko Doui, Mitsuru Momma, Takashi Matsumoto and Hiroshi Mizumo. Crystal structure of a catalytic-site mutant  $\alpha$ -amylase from *Bacillus subtilis* complexed with maltopentaose. *Journal of Molecular Biology*, **1998**, 277(2): 393-40.
- Galdino Alexandro Sobreira**, Roberto Nascimento Silva, Muriele Taborda Lottermann, Alice Cunha Morales Álvares, Lídia Maria Pepe de Moraes, Fernando Araripe Gonçalves Torres, Sonia Maria de Freitas, and Cirano José Ulhoa. Biochemical and Structural Characterization of Amy1: An Alpha-Amylase from *Cryptococcus flavus* Expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme Research* Volume 2011 **2011**, Article ID 157294, p. 1-7.
- Gangadharan D.**, Sivaramakrishnan S., Nampoothiri K. M., Sukumaran R. K. and Pandey A. Response surface methodology for the optimization of alpha amylase production by *Bacillus amyloliquefaciens*. *Bioresour. Technol.*, **2008**, 99: 4597- 4602.
- Ganghofner D.**, Kellermann J., Staudenbauer L. W. and Bronnenmeier K. Purification and properties of an amylopullulanase, a glucoamylase, and an  $\alpha$ -glucosidase in the amylolytic enzyme system of *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum*. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, **1998**, 62: 302-308.
- Gantelet H.**, and Duchiron F. Purification and properties of a thermoactive and thermostable pullulanase from *Thermococcus hydrothermalis*, a hyperthermophilic archaeon isolated from a deep-sea hydrothermal vent. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **1998**, 49:770-777.
- Gao Lingmei**, Zhenming Ch, Jun Sheng, Lin Wang, Jing Li and Fang Gong. Inulinase production by a marine yeast *Pichia guilliermondii* and inulin hydrolysis by the crude inulinase. *Microbial Ecology*, **2007**, 54 (4): 722-729.
- Gao Hong** and Wen-Ying Gu. Optimization of polysaccharide and ergosterol production from *Agaricus brasiliensis* by fermentation process. *Biochem. Eng. J.*, **2007**, 33, 202-210.
- Gaouar O.**, Zakhia N., Aymard C. and Rios G. M. Production of maltose syrup by bioconversion of cassava starch in an ultrafiltration reactor, *Ind. Crops Prod.*, **1998**, 7:159-167.
- Gasson M. J.** and Davies F. L. The genetics of dairy lactic-acid bacteria. In: Davies F. L. and Law B. A. (eds). *Advances in the microbiology and biochemistry of cheese and fermented-milk*. Elsevier Applied Science Publishers Ltd.; Barking, Essex; UK, **1984**, p. 99-126.

- Gaur Rajeeva**, Singh Ramjan, Gupta Monike and Gaur Manogy Kumer. *Aureobasidium pullulans*, an economically important polymorphic yeast with special reference to pullulan. African Journal of Biotechnology, **2010**, 9 (47): 7989-7997.
- Ghina Ali**, Virginie Dulong, Sarah N. Gasmi, Christophe Rihouey, Luc Picton and Didier Le Cerf. Covalent immobilization of pullulanase on alginate and study of its hydrolysis of pullulan. Biotechnology Progress, **2015**, 31 (4): 883-889.
- Gholam Khayati** and Sahebeh Alizadeh. Extraction of lipase from *Rhodotorula glutinis* fermentation culture by aqueous two-phase partitioning. Fluid Phase Equilibria, **2013**, 353:132-134.
- Ghosh S. B.** and Chandra A. K., Nutritional requirements and cultural characteristics of *Bacillus apiarius* CBML-152 for the production of  $\alpha$ -amylase. Bibl. Microbiol., **1984**, 139: 293-304.
- Gomes E.**, Guez M. A. U., Martin N. and Silva R. Thermostable enzymes: sources, production and industrial applications. *Quim. Nova*, **2007**, 30:136-145.
- Gomes I.**, Gomes J. and Steiner W. Highly thermostable amylase and pullulanase of the extreme thermophilic eubacterium *Rhodothermus marinus*: production and partial characterization. Bioresource Technology, **2003**, vol. 90 (2): 207-214.
- Gonzalez C. F.**, Farina J. I. and de Figueroa L. I. C. Optimized amylolytic enzymes production in *Sacchromycopsis fibuligera* DSM-70554: An approach to efficient cassava starch utilization. Enzyme and Microbiol Technology, **2008**, 42: 272-277.
- Graham R.** Bignell, Ian J. Bruce and Ivor H. Evans. Amylolytic enzymes of *Lipomyces starkeyi*: purification and size-determination. Biotechnology Letters, **2000**, 22 (21):1713-1718.
- Greppi A.**, Krych L., Costantini A., Rantsiou K, Hounhouigan D. J., Arneborg N., Cocolin L. and Jespersen L. Phytase-producing capacity of yeasts isolated from traditional African fermented food products and PHYPk gene expression of *Pichia kudriavzevii* strains. Int J Food Microbiol., **2015**, 205: 81-9.
- Griffin Patrick J.** and William M. Fogarty. Production of an amylolytic enzyme by *Bacillus polymyxa* in batch cultures. Journal of Applied Chemistry and Biotechnology, **1973**, 23 (4): 301-308.
- Guiraud J. P.** Microbiologie alimentaire. Dunod, Paris, **1998**, p. 310-321.
- Gupta R.**, Gigras P., Mohapatra H., Goswami V. K. and Chauhan B. Microbial  $\alpha$ -amylases: a biotechnological perspective. Process Biochem., **2003**, 38: 1599-1616.
- Haki G. D.** and S. K. Rakshit. Developments in industrially important thermostable enzymes: a review. Bioresource Technology, **2003**, 89 (1):17-34.
- Halasz A.** and Lasztity R. Use of Yeast Biomass in Food Production. CRC Press, Boca Raton, FL, **1991** p. 312.
- Hames B.D.**, Hooper N. M. et Houghton J. D. Biochimie, édition Berti, **2000**, p. 61-77.
- Hamilton L. M.**, Kelly C. T., Fogarty W. M. Production and properties of the raw starch-digesting  $\alpha$ -amylase of *Bacillus sp.* IMD434. Process Biochem., **1999**, 35: 27-31.
- Hatada Y.**, Saito K., Hagihara H., Ozaki K. and Ito S. Nucleotide and deduced amino acid sequences of an alkaline pullulanase from the alkaliphilic bacterium *Bacillus sp.* KSM-1876. Biochimica et Biophysica Acta, **2001**, 1545(1-2): 367-371.

- Henrissat B.** and Davies G. Structural and Sequence-Based Classification of Glycoside Hydrolases. *Current Opinion in Structural Biology*, **1997**, 7: 637-644.
- Hernández Mabel Salas**, Rodríguez Marilú Rodríguez, Guerra Nelson Pérez and Rosés Renato Pérez. Amylase production by *Aspergillus niger* in submerged cultivation on two wastes from food industries *Journal of Food Engineering*, **2006**, 73 (1): 93-100.
- Hernandez-Montanez. Z.**, Chavez-Camarillo M. G., Villa-Tanaca L. and Gristiani-Urlina E. Evaluation of the production of an extracellular alpha-amylase by a yeast isolate. *Journal of Biotechnology*, **2010**, 1505: S1-S576.
- Hernandez-Montanez Z.**, Juarez-Montiel M., Velazquez-Avila M., Cristiani-Urbina E., Hernandez-Rodríguez C., Villa-Tanaca L. and Chavez-Camarillo G. Production and characterization of extracellular  $\alpha$ -amylase produced by *Wickerhamia sp.* X-Fep. *Appl Biochem Biotechnol.*, **2012**, 167(7): 2117-29.
- Hickey A.** and Singer G. A. C. Genomic and proteomic adaptations to growth at high temperature. *Genome Biology*, **2004**, 5: 117.
- Hii S. L.**, Ling T. C., Mohamed R. and Ariff A. B. Enhancement of extracellular pullulanase production by *Raoultella planticola* DSMZ 4617 using optimized medium based on sago starch. *The open biotechnol. J.*, **2009 a**, 3: 1-8.
- Hii S. L.**, Ling T. C., Mohamed R. and Ariff A. B. Characterization of pullulanase type II from *Bacillus cereus* HI5. *Am J. Biochem. Biotechnol* , **2009 b**, 5(4):170-179.
- Hii S. L.**, Tan J. S., Ling T., Bin C. and Ariff A. B. Pullulanase: Role in starch hydrolysis and potential industrial application: A review. *Enz. Res.*, **2012a**, volume 2012, Article ID 921362, 1-4.
- Hii S. L.**, Mohamad Rosfarizan, Ling T. and Ariff A. B. Statistical Optimization of Pullulanase Production by *Raoultella planticola* DSMZ 4617 Using Sago Starch as Carbon and Peptone as Nitrogen Sources. *Food and Bioprocess Technology*, **2012b** 5 (2): 729-737.
- Hiroshi Kuriyama**, Dudi Sastraatmadja, Yoko Igosaki, Kaoru Watanabe, Atit Kanti and Takema Fukatsu. Identification and characterization of yeast isolated from Indonesian fermented food. *Mycoscience*, **1997**, 38 (4): 441-445
- Hmidet Noomen**, Bayoudh Ahmed, Berrin Jean Guy, Kanoun Safia, Juge Nathalie and Nasri Moncef. Purification and biochemical characterization of a novel  $\alpha$ -amylase from *Bacillus licheniformis* NH1 Cloning, nucleotide sequence and expression of amyN gene in *Escherichia coli*. *Process Biochemistry*, **2009**, 43: 499-510.
- Hofemeister B.**, König S., Hoang V., Engel J., Mayer G., Hansen G. and Hofemeister J. (1994). The gene amyE (TV1) codes for a nonglucogenic  $\alpha$ -amylase from *Thermoactinomyces vulgaris* 94-2A in *Bacillus subtilis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **1994**, 60(9): 3381-3389.
- Hofer F.** Transfer of lactose fermenting ability in *Lactobacillus lactis*. *New Zealand J. Dairy Sci. Technol.*, **1985**, 20(3): 179-183.
- Horn C. H.**, Dekock A., Du Preez J. C. and Laegan P. M. A comparative study of the amylolytic ability of *Lipomyces* and *Swaniomyces* yeast species. *System. Appl. Microbiol.*, **1988**, 10: 106-110.

- Hossam E. F.** Abdel- Raheam, Mohamed K. A. Fereg, Wafeek S. M. Rageb, Elsayed A. Abdel-Rahman and Ghonaimy A. Ghonaimy. Isolation and identification of amylolytic yeasts from agricultural and industrial wastes. *Assuet J. of Agric. Sci.*, **2011**, 42 (3): 55-64.
- Hug-Iten S.**, Escher F. and Conde-Petit B. Staling of Bread: Role of Amylose and Amylopectin and Influence of Starch-Degrading Enzymes *Cereal Chem*, **2003**, 80: 654-661.
- Hwang S. Y.**, Nakashima K., Okai N., Okazaki F., Miyake M., Harazono K., Ogino C. and Kondo A. Thermal stability and starch degradation profile of  $\alpha$ -amylase from *Streptomyces avermitilis*. *Biosci Biotechnol Biochem.*, **2013**, 77(12):2449-53.
- Hyun H. H.** and Zeiku, J. G. General and biochemical characterization of thermostable extracellular  $\alpha$ -amylase from *Clostridium thermosulfurogenes*. *Applied and Environmental Microbiology*, **1985**, 49, 1162-1167.
- Ian Spencer** Homsey. Alcohol and its role in the evolution of human society. RSC publishing, **2012**, page 471.
- Iefuji H.**, Chino M., Kato M. and Iimura Y. Raw – starch- digesting and thermostable alpha-amylase from the yeast *Cryptococcus sp.* S-2: Purification, characterization cloning and sequencing. *Biochem. J.*, **1996**, 318: 989-996.
- Iefuji Haruyuki**, Iimura Yuzuru and Obata Takaji. Isolation and Characterization of a Yeast *Cryptococcus sp.* S-2 That Produces Raw Starch-digesting  $\alpha$ -Amylase, Xylanase, and Polygalacturonase. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, **1994**, 58(12): 2261-2262.
- Irfan M.**, Nadeem M. and Syed M., Media optimization for amylase production in solid state fermentation of wheat bran by fungal strains. *J. cell Molecular Biology*, **2012**, 10 (1): 55-64.
- Jacob A.** Rendleman Jr, Enhancement of cyclodextrin production through use of debranching enzymes, *Biotechnology and Applied Biochemistry*, **1997**, 26(1):51-61.
- Jacques Noémie** and Serge Caseregola. Safety assessment of dairy microorganisms: The hemiascomycetous yeasts. *International Journal of Food Microbiology*, **2008**, 126: 321-326.
- Jaeger K.E.** and Reetz M.T., Microbial lipase form versatile tools for biotechnology. *TIBTECH*, **1998**, 16, 396-403.
- Jain Sumat Chand**, Jain P.C. and Kango Naveen. Production of inulinase from *Kluyveromyces marxianus* using Dahlia tuber extract. *Braz. J. Microbiol.*, **2012**, 43 (1): 62-69.
- Jairath Saloni**, Parampal Sahota and Gulab Pandove. Preparation of Non-Alcoholic Naturally Carbonated Beverage Using Yeast Isolate from Whey Beverage. *Czech J. Food Sci.*, **2012**, 30 (2): 135-143.
- Jespersen H. M.**, MacGregor E. A., Henrissat B., Sierks M. R. and Svensson B. Starch- and glycogen-debranching and branching enzymes: prediction of structural features of the catalytic (b/a)8-barrel domain and evolutionary relationship to other amylolytic enzymes. *J. Protein. Chem.*, **1993**, 12:791-805.
- Jobling Steve.** Improving starch for food and industrial applications. *Current Opinion in Plant Biology*, **2004**, 7:210-218
- Johnson E. A.** and Echavarri C. Erasm. Part II, Chapter 3: Yeast biotechnology in Kurtzman C. P., Fzll J. W. and Boekhout T. (eds). *The yeast. A taxonomic study. Volume 1. Fifth edition.* Elsevier., **2011**, p. 21-45.

- Joo H.** and Chang C. Production of an oxidant and SDS-stable alkaline protease from an alkaliophilic *Bacillus clausii* I-52 by submerged fermentation: Feasibility as a laundry detergent additive. *Enzyme Microbiol. Technol.*, **2006**, 38:176-183
- Joshi B. H.** A novel thermostable alkaline  $\alpha$ -amylase from *Bacillus circulans* PN5: Biochemical characterization and production. *Asian Journal of Biotechnology*, **2011**, 3 (1): 58-67.
- Kamakshi P.**, Raj Devi and Ganesa Yogeeswaran. Co-expression of saccharifying alkaline amylase and pullulanase in *Micrococcus halobius* OR-1 isolated from tapioca cultivar soil. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **1999**, 15 (2): 223-229.
- Kamoun Pierre.** Appareils et méthodes en biochimie et biologie moléculaire.. Medecine-Sciences, Flammarion, **1997**.
- Kang H.K.**, Lee J. H., Kim D., Day D. F., Robyt J. F., Park K. H. and Moon T. W. Cloning and expression of *Lipomyces starkeyi* alpha-amylase in *Escherichia coli* and determination of some of its properties. *FEMS Microbiol Lett.*, **2004**, 233(1): 53-64.
- Karthick Raja Namasivayam, Nirmala D.** Enhanced production of alpha amylase using vegetable wastes by *Aspergillus niger* strain SK01 marine isolate. *Indian j. Geo-Mar. Sci.*, **2011**, 40 (1), 130-133.
- Kato S.**, Shimizu Ibuka A., Mura K., Takeuchi A., Tokue C. and Arai S. Molecular cloning and characterization of an alpha amylase from *Pichia burtonii* 15-1. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **2007**, 71 (12): 3007-3013.
- Kennedy J. F.** Enzyme in: specialist periodical reports : Carbohydrates chemistry volume 10. The chemical society burlington house. London, **1978**, p. 364-372.
- Kennedy J. F.** Enzyme in: specialist periodical reports : Carbohydrates chemistry volume 11. The chemical society burlington house. London, **1979**, p. 396-402.
- Khady B. A.** Contribution à l'étude des amylases du sorgho et leurs utilisations dans la transformation des produits amylicés. Thèse : Sciences Agronomique et ingénierie biologique, Liège. Belgique. **2013**.
- Khairul Anwar Mohamad Said** and Mohamed Afizal Mohamed Amin. Overview on the Response Surface Methodology (RSM) in Extraction Processes. *Journal of Applied Science & Process Engineering*, **2015**, 2(1): 8-17.
- Kim C. H.**, Ryu Y. W., Kim C. and Rhee S. K. Semi- batch ethanol production from starch by simultaneous saccharification and fermentation using cell recycle. *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.*, **1990a**, 5: 335-339.
- Kim C. H.** and Kim D. S. Purification of  $\alpha$ -amylase-pullulanase bifunctional enzyme by high-performance size-exclusion and hydrophobic-Interaction. *Journal of Chromatography*, **1990b**, 512: 131-137.
- Kim Cheorl-Ho,** Ho-Il Choi and Dae-Sil Lee. Purification and Biochemical Properties of an Alkaline Pullulanase from Alkalophilic *Bacillus sp.* S-1. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **1993**, 57 (10): 1632-1637
- Kim C. H.**, Nashiru O., and Ko J. H. Purification and biochemical characterization of pullulanase type I from *Thermus caldophilus* GK-24. *FEMS Microbiology Letters*, **1996**, 138 (2-3): 147-152.

- Kim C. H.**, Kim Y. S. Substrate specificity and detailed characterization of a bifunctional amylase-pullulanase enzyme from *Bacillus circulans* F-2 having two different active sites on one polypeptide. *Eur J Biochem.*, **1995**, 227(3): 687-93.
- Kim T. U.**, Gu B. G., Jeong J. Y., Byun S. M. and Shin Y. C. Purification and characterization of maltotetraose forming alkaline *Bacillus* strain GM 8901. *Applied and Environmental Microbiology*, **1995**, 61: 3105-3112.
- Klein R. D.**, and M. A. Favreau. The *Candida* species: biochemistry, molecular biology, and industrial applications. In: Y.H. Hui and G. G. Khachatourians (Eds), *Food Biotechnology. Microorganisms*. VCH Publishers, New York, **1995**, p. 297-371.
- Klosowski G.**, Mikulski D., Czuprynski B., Kotarska K. Characterisation of fermentation of high-gravity maize mashes with the application of pullulanase, proteolytic enzymes and enzymes degrading non-starch polysaccharides. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **2010**, 109: 466-471.
- Koch R.**, Canganella F., Hippe H., Jahnke K. D. and Antranikian G. Purification and properties of a thermostable pullulanase from a newly isolated thermophilic anaerobic bacterium, *Fervidobacterium pennavorans* Ven5. *Applied and Environmental Microbiology*, **1997**, 63 (3): 1088-1094,
- Koch R.**, Zabłowski P., Spreinat A. and Antranikian G.. Extremely thermostable amylolytic enzyme from the archaeobacterium *Pyrococcus furiosus*. *FEMS Microbiol. Lett.*, **1990**, 71:21-26.
- Konsoula Z.** and Liakopoulou-Kyriakides M. Starch hydrolysis by the action of an entrapped in calcium alginate capsules  $\alpha$ -amylase produced from *B. subtilis*. *Process Biochem.*, **2006**, 41: 343-9.
- Koutsopoulos S.**, Van der Oost J., and Norde W. Temperature-dependent structural and functional features of a hyperthermostable enzyme using elastic neutron scattering. *Proteins*, **2005**, 61(2): 377-384.
- Krishman T.** and Chandra A. K. Purification and characterization of  $\alpha$ -amylase from *Bacillus licheniformis* CUMC 305. *Applied and Environmental Microbiology*, **1983**, 46(2): 430-437.
- Kumar Sanjeev** and Satyanarayana T. Medium optimization for glucoamylase production by a yeast, *Pichia subpelliculosa* ABWF-64, in submerged cultivation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **2001**, 17: 83-87.
- Kumar Sumit** and Khare S. K. Chloride Activated Halophilic  $\alpha$ -Amylase from *Marinobacter sp.* EMB8: Production, Optimization and Nanoimmobilization for Efficient Starch Hydrolysis. *Enzyme Research*, volume 2015 **2015**, Article ID 859485, 9.
- Kuriki Takashi**, Okada Shigetaka and Imanaka Tadayuki. New Type of Pullulanase from *Bacillus stearothermophilus* and Molecular Cloning and Expression of the Gene in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, **1988a**, 170 (4): 1554-1559.
- Kuriki Takashi**, Jong-Hyun Park, Shigetaka Okada, and Tadayuki Imanaka. Purification and Characterization of Thermostable Pullulanase from *Bacillus stearothermophilus* and molecular cloning and expression of the gene in *Bacillus subtilis*. *Applied and Environmental Microbiology*, **1988b**, 54 (11): 2881-2885.
- Kurtzman C. P.**, Part Iva. Classification of the Ascomycetous Taxa Chapitre 13. Discussion of Teleomorphic and Anamorphic Ascomycetous and Yeasts-Like-Taxa. In Kurtzman C. P., Fell J.

- W. and Boekhout T (Eds). The yeasts, a taxonomic study. Volume 2. Fifth edition. Elsevier, **2011 a**, p. 293-311.
- Kurtzman Cletus P.**, Jack W. Fell, Teun Boekhout and Vincent Robert. Chapter 7: Methods for isolation, phenotypic characterization and maintenance of yeasts. In Kurtzman C. P., Fell J. W. and Boekhout T. (Eds). The yeasts, a taxonomic study. Volume 1, Fifth edition. Elsevier, **2011 b**, p. 87-111.
- Kurtzman, C. P.** and Suzuki M. Phylogenetic analysis of ascomycete yeasts that form coenzyme Q-9 and the proposal of the new genera *Babjeviella*, *Meyerozyma*, *Millerozyma*, *Priceomyces* and *Scheffersomyces*. *Mycoscience*, **2010**, 51(1): 2-14.
- Kwak Y.**, Akeba T. and Kudo T. Purification and characterization of  $\alpha$ -amylase from hyperthermophilic archaeon *Thermococcus profundus*, which hydrolyses both  $\alpha$ -1,4 and  $\alpha$ -1,6-glucosidic linkages. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, **1998**, 86: 363-367.
- Kwon J. S.**, Lee J.S., Shin W. C., Lee K. E. and Hong E. K. Optimization of culture conditions and medium components for the production of mycelia biomass and exo-polysaccharides with *Cordyceps militaris* in liquid culture. *Biotechnol. Bioproc. E.*, **2009**, 14: 756-762.
- Lachance Marc-André.** Yeast. *Encyclopaedia of Life Sciences*, Wiley John Wiley and sons, **2011a**, p.12-56.
- Lachance Marc-André.** Chapitre 21: Clavispora Rodrigues de Miranda (1979) in Kurtzman C; P., Fell J. W. and Boekhout T. The yeast. A taxonomic study. Volume 2. Fifth edition **2011b**. Elsevier.
- Laemmli U. K.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **1970**, 227: 680-683.
- Lagzouli Mohamed**, Reda Charouf, Mohamed El Yachioui, Mohamed Ouhssine, El Hassan Berny and Mohamed Jadal. Optimisation de La croissance et de la production de glucoamylase extracellulaire par *Candida guilliermondii*. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, **2007**, 146: 251-270.
- Laitila A.** Wilhelmson E. Kotaviita J. Olkku S. Home and R. Juvonen. Yeasts in an industrial malting ecosystem. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, **2006**, 33: 953-966.
- Landolt E.** and Kandeler R. The family of Lemnacea monographic study. In *Phytochemistry, physiology, application and bibliography*, vol.2, **1987**. Switzerland, Stiftung Rubel.
- Larpent J. P.** et Larpent-Gourgaud M. *Mémento technique de microbiologie*. 3e édition, Lavoisier-Tec & Doc, Paris. 8, **1997**, p. 217-240.
- Larpent-Gourgaud M.** et Sanglier J-J. *Biotechnologies. Principes et méthodes*, **1992**, p. 574-581.
- Las Heras-Vazquez F. J.**, Mingorance-Cazorla L., Clemente-Jimenez J. M. and Rodriguez-Vico F. Identification of yeast species from orange fruit and juice by RFLP and sequence analysis of the 5.8S rRNA gene and the two internal transcribed spacers. *FEMS Yeast Res.*, **2003**, 3(1): 3-9.
- Lecoq R.** *Manuel d'analyse et d'expertises usuelles*, Tome 1, **1965**, Edition Doin: 200-203.
- Leveau J.Y.** et Bouix M. Etude des conditions extrêmes de croissance des levures osmophiles. *Ind. Alim. Agric.*, **1979**, 11: 1147-1151.
- Leveau J.Y.** et Bouix M. *Microbiologie industrielle. Les micro-organismes d'intérêt industriel*. Lavoisier TEC et DOC, Paris. 08, **1993**, p. 2-92.

- Leveque E.**, Janeček Š., Haye B. and Belarbi A. Thermophilic archaeal amylolytic enzymes. *Enzyme and Microbial Technology*, **2000**, 26 (1): 3-14.
- Li Heifeng**, Chi Zhenming, Wang Xiadong, Duan Xiaohui, Ma Liyan and Gao Lingmei. Purification and characterization of extracellular amylase from the marine yeast *Aureobasidium pullulans* N13d and its raw potato starch digestion. *Enzyme and Microbiol Technology*, **2007**, 40:1006-1012.
- Liang Xian**, Fei Wang, Xiang Luo, Yu-Liang Feng, and Jia-Xun Feng. Purification and Characterization of a Highly Efficient Calcium-Independent  $\alpha$ -Amylase from *Talaromyces pinophilus* 1-95. *PLoS One*. **2015**, 10(3): e0121531.
- Liese A.**, Weelbach K. and Wandrey C. *Industrial BioTransformations*, 2<sup>nd</sup> eds. Wiley VCH Verlag, Weinheim, **2000**.
- Lin L.**, Chyau C. C. and Hsu W. H. Production and properties of a raw starch-degrading amylase from the thermophilic and alkaliphilic *Bacillus sp.* TS-23. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, **1998**, 28: 61-68.
- Linardi V. R.**, M. C. Andrade, M. M. Figueira, M. C. Andrade and Souza A. A. V. Characterization of the amylolytic system of *Candida* strains. *Folia Microbiol.*, **1993**, 38(4), 281-284.
- Linden G.** et Lorient D. *Biochimie agro-industrielle. Valorisation alimentaire de la production agricole.* (1994) Masson. Paris, Milan, Barcelone.
- Longo M. A.**, Novella I. S., Gacia L. A. and Diaz M. Diffusion of protease in calcium alginate beads. *Enzyme Microb. Technol.*, **1992**, 14: 586-590.
- Lonhienne T.**, Zoidakis J., Vorgias E., Feller G., Gerday C. and Bouriotis V. Modular structure, local flexibility and cold activity of a novel chitobiase from psychrophilic antarctic bacterium. *J. Mol. Biol.* **2001**, 310: 291-297.
- Lopandic K.**, Zelger S., Banzsky L. K., Eliskases-Lechner F. and Prillinger H. Identification of yeasts associated with milk products using traditional and molecular techniques. *Food Microbiol.*, **2006**, 23: 341-350.
- Lorient D.**, Closs B. and Courthaudon J.L. Connaissances nouvelles sur les propriétés fonctionnelles des protéines du lait et des dérivés. *Le Lait*, **1991**, 71 (2): 141-171.
- Loureiro-Dias M. C.** Movements of protons coupled to glucose transport in yeasts. A comparative study among 248 yeast strains. *Antonie Van Leeuwenhoek*, **1988**, 54: 331-343.
- Lowry O. H.**, Rosebrough N. J., Farr A. L. and Randall R. J. Protein measurement with folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, **1951**, 193: 265-275.
- Madigan M. T.**, Martinko J. M. and Parker J. *Brock biology of microorganisms*, 8th edn. Prentice Hall, **1997**. Upper Saddle River, NJ, USA.
- Madigan M. T.**, Martino J. M. *Brock Biology of Microorganisms*. Pearson Education, **2006**. Upper Saddle River, NJ, USA.
- Malakar Ramdas**, Tiwari D. Archana and Malviya S. N. Pullulanase: a potential enzyme for industrial application. *International Journal of Biomedical Research*, **2010**, 1 (2): 10-20.
- Malhotra R**, Noorwez SM, Satyanarayana T. Production and partial characterization of thermostable and calcium independent  $\alpha$ - amylase of extreme thermophile *Bacillus thermooleovorans* NP54. *Lett. Appl. Microbiol.*, **2000**, 31: 378-384.

- Mallick P.**, Broutz D. R., Eisenberg D., Yeates T O. Genomic evidence that the intracellular proteins of archaeal microbes contain disulfide bonds. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **2002**, 99 (15): 9679-9684.
- Malloch D.** Moulds isolation, cultivation and identification. University of Toronto, **1997**.  
[http// www. Botany.utoronto.ca/researchlabs/malloch/moulds/html](http://www.Botany.utoronto.ca/researchlabs/malloch/moulds/html).
- Mamo G** and Gessesse A. Purification and characterization of two raw-starch-digesting thermostable  $\alpha$ -amylase from a thermophilic *Bacillus*. *Enzyme Microb. Technol.*, **1999**, 25: 433-438.
- Mathupala S.**, Saha B. C. and Zeikus J. G. Substrate competition and specificity at the active site of amylopullulanase from *Clostridium thermohydrosulfuricum*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **1990**, 166: 126-132.
- Mathupala S.P.**, Lowe S. F., Podkovyrov S. M. and Zeikus J. G. Sequencing of the Amylopullulanase (Apu) Gene of the *Thermoanaerobacter ethanolicus* 39E, And Identification of the Active Site by Site-Directed Mutagenesis. *Journal of Biological Chemistry*, **1993**, 268 (22): 16332-16344.
- Maurer K.** Detergent proteases, *Current Opinion in Biotechnology*, **2004**, 15: 330-334.
- McTigue M. A.**, Kelly C. T., Fogarty W. M. and Doyle E. M. Production studies on the alkaline amylases of three alkalophilic *Bacillus sp.* *Biotechnol. Lett.*, **1994**, 16 (6): 569-574.
- Melasniemi H.** Effect of Carbon Source on Production of Thermostable  $\alpha$ -Amylase, Pullulanase and  $\alpha$ -Glucosidase by *Clostridium thermohydrosulfuricum*. *Journal of General Microbiology*, **1987**, 133: 883-890.
- Michelin M.**, Silva T.M., Benassi V.M., Peixoto-Nogueira S.C., Moraes L.A., Leao J.M., Jorge J.A., Terenzi H.F. and Polizeli Mde L. Purification and characterization of a thermostable  $\alpha$ -amylase produced by the fungus *Paecilomyces variotii*. *Carbohydr. Res.*, **2010**, 345 (16): 2348-2353.
- Minussi R. C.**, Pastore G. M. and Duran N. Potential application of laccase in food Industry. *Trends Food Sci. Tech.*, **2002**, 13, 205-216.
- Mitidieri S.**, Martinelli A. H. S., Schrank A and Vainstein M. H. Enzymatic detergent formulation containing amylase from *Aspergillus niger*: A comparative study with commercial detergent formulations, *Bioresource Technology*, **2006**, 97(10): 1217-1224.
- Mizuno M.**, Koide A., Yamamura A., Akeboshi H., Yoshida H., Kamitori S., Sakano Y., Nishikawa A. and Tonozuka T. Crystal structure of *Aspergillus niger* isopullulanase, a member of glycoside hydrolase family 49. *J. Mol Biol.*, **2008**, 376 (1): 210-20.
- Mobini-Dehkordi Mohsen** and Javan Afzal Fahime. Application of alpha-amylase in biotechnology. *Journal of Biology and today's world*, **2012**, 1(1): 39-50.
- Mohagir A. M.**, Bup N. D, Abi C. F., Kamga R. and Kapseu C. Optimisation of Kernels Preparation Conditions Involved in the Press Extraction of Shea (*Vitellaria paradoxa* Gaertner F.) Butter. *American Journal of Food Science and Technology*, **2015**, 3(4):103-110.
- Moletta R.** Procédés biologiques anaérobies, dans gestion des problèmes environnementaux dans les industries agroalimentaires. *Technique et documentation*, Editions Lavoisier, Paris, **2002**.
- Moller K.**, Sharif M. Z. and Olsson L. Production of fungal alpha-amylase by *Saccharomyces kluyveri* in glucose-limited cultivations. *J. Biotechnol.*, **2004**, 111: 311-318.

- Moranelli F.**, Yaguchi M., Calleja G. B. and Nasim A. Purification and characterization of the extracellular  $\alpha$ -amylase activity of the yeast *Schwanniomyces alluvius*. *Biochem. Cell. Biol.*, **1987**, 65: 899-908.
- Moreau C.** Les moisissures In Bourgeois C. M., Mescle J. F. and Zucca J. *Microbiologie alimentaire*, tome 1 Aspect microbiologique de la securite et de la qualite des aliments, **1996**, Ed Tec et Doc.
- Morvan J.** Marché européen des enzymes dans les applications alimentaires M55B, **2010**.  
<http://www.frost.com>.
- Moubasher Hani**, Salwa S. Wahsh and Nabil Abo El-Kassem. Purification of pullulanase from *Aureobasidium pullulans*. *Microbiology*, **2010**, 79 (6): 759-766.
- Moubasher Hani**, Salwa S. Wahsh and Nabil Abo El Kassem. Isolation of *Aureobasidium pullulans* and the effect of different conditions for pullulanase and pullulan production. *Microbiology*, **2013**, 82 (2): 155-161.
- Mouranche A.** et Costes C. Hydrolases et dépolymérasés. *Enzymes d'intérêt industriel*. Collection dirigée par Costes C. **1985**, France.
- Mrudula S.** Optimization of thermostable amylopullulanase production in solid state fermentation by *Clostridium thermosulfurogenes* SVM17 through Plackett Burman and response surface methodological approaches. *Malaysian J. Microbiol.*, **2010**, 6(2): 181-195.
- Mrudula S.**, Gopal Reddy and Seenayya G. Effect of process parameters on production of thermostable amylopullulanase by *Clostridium thermosulfurogenes* SVM 17 under solid state fermentation. *Malaysian Journal of Microbiology*, **2011 a**, 7(1): 19-25.
- Mrudula Soma**, Gopal Reddy and Seenayya Gunda. Purification and characterization of highly thermostable amylopullulanase from a thermophilic, anaerobic bacterium *Clostridium thermosulfurogenes* SVM17. *Malaysian Journal of Microbiology*, **2011 b**, 7(2): 97-106.
- Mukherjee Ashis K.**, Borah Munindra and Rai Sudhir K. To study the influence of different components of fermentable substrates on induction of extracellular  $\alpha$ -amylase synthesis by *Bacillus subtilis* DM-03 in solid-state fermentation and exploration of feasibility for inclusion of  $\alpha$ -amylase in laundry detergent formulations. *Biochemical Engineering Journal*, **2009**, 43: 149-156.
- Murakami S.**, Nishimoto H., Toyama Y., Shimamoto E., Takenaka S., Kaulpiboon J., Prousoontorn M., Limpaseni T., Pongsawasdi P. and Aoki K. Purification and characterization of two alkaline, thermotolerant  $\alpha$ -amylases from *Bacillus halodurans* 38C2-1 and expression of the cloned gene in *Escherichia coli*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **2007**, 71: 2393-2401.
- Mysore S.**, Rudrapatnam S. and Tharanathan N. Nonspecific activity of *Bacillus acidopullulyticus* pullulanase on debranching of Guar Galactomannan. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2008**, 56: 10858-10864.
- Nie Y.**, Yan W., Xu Y., Chen W. B., Mu X. Q., Xinye W., Rong X. High-Level Expression of *Bacillus naganoensis* Pullulanase from Recombinant *Escherichia coli* with Auto-Induction: Effect of lac Operator. *LoS ONE*, **2013**, 8 (10): e78416.
- Nair Roopa** and Sabharwal Sushma. Studies on a thermostable  $\alpha$ -amylase from *Geobacillus sp.*: Optimization of culture conditions for production of the extracellular  $\alpha$ -amylase. *Res. J. Biotechnol.*, **2013**, 8(2): 90-95.

- Nair S. U.**, Singhal R. S., Kamat M. Y. Induction of pullulanase production in *Bacillus cereus* FDA-13. *Bioresource Technol.*, **2007**, 98(4): 856-859.
- Nair S. U.**, Singhal R. S. and Kamat M. Y. Enhanced production of thermostable pullulanase type I using *Bacillus cereus* FDA13 and its mutant. *Food Technol. Biotechnol.*, **2006**, 44 (2): 275-282.
- Nakamura Yoshihiro**, Fukuhara Hiroshi and Sano Konosuke. Secreted Phytase Activities of Yeasts. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, **2000**, 64 (4): 841-844.
- Narang S.** and Satyanarayana T. Thermostable  $\alpha$ -amylase production by an extreme thermophilic *Bacillus thermooleovorans*. *Lett. Appl. Microbiol.*, **2001**, 32: 31-35.
- Nichaus F.**, Bertoldo C., Kahler M. and Antranikian G. Extremophiles as a source of novel enzymes for industrial application. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **1999**, 51: 711-729.
- Niehaus F.**, Peters A., Groudieva T. and Antranikian G. Cloning, expression and biochemical characterisation of a unique thermostable pullulan-hydrolysing enzyme from the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus aggregans*. *FEMS Microbiology Letters*, **2000**, 190 (2): 223-229.
- Nigam J. N.**, Margaritis A. and Lachance M. A. Aerobic fermentation of D-xylose to ethanol by *Clavispora sp.* *Applied and Environmental Microbiology*, **1985**, 50(4): 763-766.
- Nigam P.** and Singh D. Enzyme and Microbial Systems Involved in Starch Processing. *Enzyme and Microbial Technology*, **1995**, 17: 770-778.
- Nisha M.** and Satyanarayana Tulasi. Thermostable archaeal and bacterial pullulanases and amylopullulases. In Tulasi Satyanarayana, Jennifer Littlechild and Yutaka Kawarabayasi (Eds). *Thermophilic Microbes in Environmental and industrial Biotechnology. Biotechnology of thermophiles. Second Edition. Springer*, **2013**, p. 535-589.
- Noorwez S. M.**, Ezhilvannan M. and Satyanarayana T. Production of a High Maltose-Forming Hyperthermostable and  $\text{Ca}^{2+}$  Independent Amylopullulanase by an Extreme Thermophil *Geobacillus thermoleovorans* in submerged fermentation. *Indian Journal of Biotechnology*, **2006**, 5: 337-345.
- Norouzi D.** Review, Enzyme immobilization, the state of art in Biotechnology, Iranian J. *Biotechnol.*, **2003**, 1: 197-206.
- Nouadri Tahar.** L' $\alpha$ -amylase de *Penicillium camemberti* PL21: Production, Purification, caractérisation et immobilisation. Thèse de doctorat d'état, **2011**, Université Mentouri, Constantine.
- Nurdagul Orhan**, Nilay Atlas Kiyamaz and Aysegul Peksal. A novel pullulanase from a fungus *Hypocrea jecorina* QM9414 : Production and biochemical characterization. *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics*, **2014**, 51: 149-155.
- Odibo J. F.C.** and Ulbrich-Hofmann R. Thermostable  $\alpha$ -amylase and glucoamylase from *Thermomyces lanuginosus* F1, *Acta Biotechnology*, (**2001**), 21 (2): 141-153.
- Odibo F. J. C.**, and Obi S. K. C. Purification and characterization of a thermostable pullulanase from *Thermoactinomyces thalophilus*. *Industrial Microbiology and Biotechnology*, **1988**, 3: 343-350.
- Octave Stéphane** and Thomas Daniel. Biorefinery: Toward an industrial metabolism. *Biochimie*, **2009**, 91 (6): 659-664.

- Oh Ko-Woon**, Myo-Jeong Kim, Hae-Yeong Kim, Byung-Yong Kim, Moo-Yeol Baik, Joong-Hyuck Auh and Cheon-Seok Park. Enzymatic characterization of a maltogenic amylase from *Lactobacillus gasseri* ATCC 33323 expressed in *Escherichia coli*. FEMS Microbiology Letters, **2005**, 252: 175-181.
- Ohba R.** and Ueda S. Purification, crystallization and some properties of intracellular pullulanase from *Aerobacter aerogenes*. Agricultural and Biological Chemistry, **1973**, 37 (12): 2821-2826.
- Ohba R.** and Ueda S. An inductive effector in production of extracellular pullulanase by *Aerobacter aerogenes*. Agric. Biol. Chem., **1982**, 6: 2425-31
- Olasupo N. A.**, Teniola O. D., Okosun R., Omowaye A. and Olatope S. O. Studies on an amylolytic strain of *S. cerevisiae* isolated from yam tuber. J. Basic Microbiol., **1996**, 36 (4): 283-288.
- Olsen H. S.**, Goddard P., and Novo Nordisk A. S., Enzymes at Work: A Concise Guide to Industrial Enzymes and their Uses, **2000**, Novo Nordisk A/S.
- Omar N.**, Abou-Dobara M. and El-Sayed A. Studies on amylase produced by some actinomycetes, Lambert, **2011**, Academic publishing. Germany.
- Oshoma C. E.**, Imarhiagbe E. E., Ikenebomeh M., J. and Eigbaredon H. E. Nitrogen supplements effect on amylase production by *Aspergillus niger* using cassava whey medium. Afri. J. Biotechnol., **2010**, 9(5): 682-686.
- Oteng-Gyang K.**, Moulin G. and Golzy P. Effect of medium composition on excretion and biosynthesis of the amylases of *Schwanniomyces castellii*. European J. Appl. Microbiol. Biotechnol., **1980**, 9: 129-132.
- Oteng-Gyang K.**, Moulin G. and Galzy P. A study of the amylolytic system of *Schwanniomyces castellii*. Journal of Basic Microbiology, **1981**, 21(7): 537-544.
- Oteng-Gyang K.** Introduction à la microbiologie alimentaire dans les pays chauds. Edition Technique et documentation, Paris, **1984**.
- Ouédraogo N.**, Savadogo A., Zongo C., Somda K. M. A. and Traoré S. High performance amylolytic yeast strains isolation and identification for valorization of potatoes waste available in Burkina Faso. Int. Food Res. J., **2012**, 19(4): 1463-1469.
- Ozdemir S.**, Okumus V., Ulutas M.S., Dundar A. and Akarsubası A.T. Isolation of a Novel Thermophilic *Anoxybacillus flavithermus* SO- 13, Production, Characterization and Industrial Applications of its Thermostable  $\alpha$ -Amylase. J. Bioprocess Biotech. , **2015**, 5(7): 237.
- Ozdemir Sadin**, Matpan Fatma, Guven Kemal, Baysal Zubeida. Production and characterization of partially purified extracellular thermostable  $\alpha$ -amylase by *Bacillus subtilis* in submerged fermentation (SmF). Prep. Biochem. Biotechnol., **2013**, 41 (4): 365-381.
- Panchal C.J.** Yeasts strain selection. Marcel Dekker (ed), USA, **1990**, p. 189.
- Pandey A.**, Webb C., Coccol C.R. and Larroche C. (Eds). Enzyme Technology. Springer. Asiatech Publishers, **2006**, New Delhi.
- Pandey A.**, Nigam P., Socol C. R., Singh D., Socol V. T., Mohan R. Advances in microbial amylases, Biotechnology and Applied Biochemistry, **2000**, 31(2): 135-152.
- Pastor-Pascual F**, Espana-Gregori E, Avino-Martinez J, Gallego-Pinazo R. dacryocystitis caused by *Candida lusitanae*. Arch Soc Esp Oftalmol, **2007**, 82: 365-368.

- Payne Roger W.**, Kurtzman Cletus P., Fell Jack W. and Boekhout Teun. Chapter Key to Species. In The yeast. A taxonomic study. Volume 1. Edited by C. P. Kurtzman, J. W. Fell and T. Boekhout. Fifth edition. Elsevier, **2011**, p. 175-223.
- Paz A.**, Mester D., Baca I., Nevo E. and Korol A. Adaptive role of increased frequency of polypurine tracts in mRNA sequences of thermophilic prokaryotes. Proc Natl Acad Sci USA, **2004**, 101(9): 2951-6.
- Pedersen H.**, Nielsen J. The influence of nitrogen sources on the  $\alpha$ -amylase productivity of *Aspergillus oryzae* in continuous cultures. Appl. Microbiol. Technol., **2000**, 53 (3): 278-281.
- Pelmont Jean.** Enzymes Catalyseurs du monde vivant. **2000**. Collection Grenoble Sciences, p. 290-295.
- Pérez-Brito D.**, Magaña-Alvarez A., Lappe-Oliveras P., Cortes-Velazquez A., Torres-Calzada C., Herrera-Suarez T., Larqué-Saavedra A. and Tapia-Tussell R. Genetic diversity of *Clavispora lusitaniae* isolated from Agave fourcroydes Lem, as revealed by DNA fingerprinting. J Microbiol., **2015**, 53(1): 14-20.
- Petters H. I.**, Flannigan B. and Brian Austin Quantitative and qualitative studies of the microflora of barley malt production. Journal of Applied Microbiology, **2008**, 65(4): 279-297.
- Plackett R. L.** and Burman, J. P. The Design of Optimum Multifactorial Experiments. Biometrika, **1946**, 33: 305-325.
- Plant A. R.**, Morgan H. W. and Daniel R. M. A highly stable pullulanase from *Thermus aquaticus* YT-1. Enzyme and Microbial Technology, **1986**, 8: 668-672.
- Prabakaran G.** and Pugalvendhan R. Production and immobilization of alpha amylase by using *bacillus subtilis*. Recent Research in Science and Technology, **2009**, 1(4): 189-194.
- Prakash N.**, Gupta S., Ansari M., Khan Z. A. and Suneetha V. Production of economically important products by the use of pullulanase enzyme. International Journal of Science Innovations and Discoveries, **2012**, 2(2): 266-273.
- Prakash O.** and Jaiswal N. alpha-Amylase: an ideal representative of thermostable enzymes. Appl Biochem Biotechnol., **2010**, 160(8): 2401-14.
- Priest F. G.** Synthesis and secretion of extracellular enzymes in bacteria, In G. Winkelmann (ed.), Microbial degradation of natural products. VCH, New York, **1992**, pp. 1-26.
- Prieto José Antonio**, Bort Bernardo Roque, Martinez Javier, Randez-Gil Francisca, Sanz Pascual, and Buesa Carlos. Purification and characterization of a new  $\alpha$ -amylase of intermediate thermal stability from the yeast *Lipomyces kononenkoae*. Biochemistry and Cell Biology, **1995**, 73(1-2): 41-49.
- Prillinger Hansjorg**, Molnar Orsolya, Frieda Eliskases- Lechner and Ksenga Lapandic. Phenotypic and genotypic identification of yeast from cheese. Antonie Van Leeuwenhoek., **1999**, 75: 267-283.
- Qian M.**, Haser R. et Payan F. Structure and molecular model refinement of pig pancreatic alpha-amylase at 2,1 Å resolution. J. Mol. Biol., **1993**, 231: 785-799.
- Qiao Y.**, Peng Q., Yan J., Wang H., Ding H. and Shi B. Gene cloning and enzymatic characterization of alkali-tolerant type I pullulanase from *Exiguobacterium acetylicum*. Letters in Applied Microbiology, **2015**, 60 (1): 52-59.

- Rajagopalan G.** and Krishnan C. Immobilization of maltooligosaccharide forming alpha amylase from *Bacillus subtilis* KGG 103, properties and application in starch hydrolysis. J. Chem. Technol. Biotechnol., **2008**, 83: 1511-1517.
- Ramachandran Nivetha**, Isak S. Pretorius and Ricardo R. Cordero Otero. Amylolytic enzymes from the yeast *Lipomyces kononenkoae*. Biologia, Bratislava, **2005**, 60/Suppl. 16: 103-110.
- Ramesh B.**, Reddy P. R. M., Seenayya G., and Reddy G. Effect of various flours on the production of thermostable  $\beta$ -amylase and pullulanase by *Clostridium thermosulfurogenes* SV2. Bioresource Technology, **2001**, 76: 169-171.
- Rameshkumar A.** and Sivasudha T. Optimization of Nutritional Constitute for Enhanced Alpha amylase, Production Using by Solid State Fermentation Technology. International Journal of Microbiological Research, **2011**, 2 (2): 143-148.
- Rao R. S.**, Bhadra B. and Shivaji S. Isolation and characterization of ethanol-producing yeasts from fruits and tree barks . Letters in Applied Microbiology., **2008**, 47 (1): 19-24.
- Raspor P.** and Zupan J. Yeasts in extreme environments. In: Rosa C. A. Peter G. (eds). Biodiversity and ecophysiology of yeasts. Springer, Berlin, **2006**, p. 371-417.
- Ratanakhanokchai K.**, Kaneko J., Kamio Y. and Izaki K. Purification and properties of a maltotetraose and maltotriose producing amylase from *Chloroflexus aurantiacus*. Appl. Environ. Microbiol., **1992**, 58 (8): 2490-2494.
- Reddy P.R.M.**, Reddy G. and Seenayya G. Production of Thermostable  $\beta$ -amylase and Pullulanase by *Clostridium thermosulfurogenes* SV2 in solid-stat fermentation: Screening of nutrients using Plackett-Burman design. Bioprocess Engineering, **1999**, 21: 175-179.
- Reiss T.** Consequences, Opportunities and Challenges of Modern Biotechnology for Europe , Task 2 Main Report, Reference Reports du Centre commun de recherche, IPTS, **2007**, Séville.
- Rezki-Bekki Meriem Amina**, Laurent Benbadis, Gustavo DeBillerbeck, Zoubida Benbayer and Jean Marie François. Isolation and physiological characterization of indigenous yeasts from some Algerian agricultural and dairy products. Journal of Yeast and Fungal Research., **2013**, 4(6): 75-83.
- Rezki-Bekki Meriem Amina.** Production de métabolites par les levures : Caractérisation et identification des arômes et des alcools 158 p. Thèse : Biotechnologie, Oran : **2014**.
- Riaz Aliya**, Shah Ali UI Qader, Abida Anwar and Samina Iqbal. Immobilization of thermostable  $\alpha$ -amylase on calcium alginate beads from *Bacillus subtilis* KIBGE-HAR. Australian Journal of Basic and Applied Sciences, **2009**, 3(3): 2883-2887.
- Rifkin Jeremy.** La troisième révolution industrielle: comment le pouvoir latéral va transformer l'énergie, l'économie et le monde. Paris (France) : Les Liens qui Libèrent, **2012**, p. 380.
- Rivière Jacques.** Les applications industrielles de microbiologie. Masson et Cie éditeurs, **1975**, p.180-184.
- Roovers Martine**, Wouters Johan, Bujnicki Janusz M. , Tricot Catherine, Stalon Victor, Grosjean Henri and Droogmans Louis. A primordial RNA modification enzyme: the case of tRNA (m1A) methyltransferase. Nucleic Acids Res., **2004**, 32 (2): 465-476.
- Rose A. H.** Responses to the chemical environment. In : Rose A. H., Harrison J. S. edit. The yeast, vol. 2, 2<sup>nd</sup> edition, physiology and biochemistry of yeasts. Academic Press, Londres, Royaume-Uni, **1987**, p.5.

- Roy A.**, Messaoud E. B., and S. Bejar. Isolation and purification of an acidic pullulanase type II from newly isolated *Bacillus sp.* US149. *Enzyme and Microbial Technology*, **2003**, 33 (5): 720-724.
- Rudiger A.**, P. L. Jorgensen, and G. Antranikian. Isolation and characterization of a heat-stable pullulanase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus woesei* after cloning and expression of its gene in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, **1995**, 61(2): 567-575.
- Russell R. J.**, Ferguson J. M., Hough D. W., Danson M. J. and Taylor G. L. The crystal structure of citrate synthase from the hyperthermophilic archaeon *pyrococcus furiosus* at 1.9 Å resolution. *Biochemistry*, **1997**, 36(33): 9983-94.
- Saha B. C.**, Lamed R., Lee C. Y., Mathupala S. P., and Zeikus J. G.. Characterization of an endo-acting amylopullulanase from *Thermoanaerobacter* strain B6A. *Applied and Environmental Microbiology*, **1990**, 56 (4): 881-886.
- Saha B. C.** and Zeikus J. G. Novel Highly Thermostable Pullulanase from Thermophiles. *Trends in Biotechnology*, **1989a**, 7: 234-239.
- Saha B. C.**, Mathupala S. P. and Zeikus J. G. Purification and characterization of a highly thermostable novel pullulanase from *Clostridium thermohydrosulfuricum*. *Biochemical Journal*, **1988**, 252: 343-348.
- Saha, B.C.**, Shen, G.J., Srivastava, K.C., Loyd, W.L and Zeikus, J.G., New thermostable  $\alpha$ -amylase-like pullulanase from thermophilic *Bacillus sp.* 3183. *Enzyme and Microbial Technology*, **1989b**, 11: 760-764.
- Sahota Param Pal** and Kaur Navjot. Characterization of enzyme naringinase and the production of debittered low alcoholic kinnow (*Citrus raticulata* blanco) beverage. *International Journal of Advanced Research* **2015**, 3 (6): 1220-1233.
- Saitou N.** and Nei M. The Neighbor-joining Method: A New Method for Reconstructing Phylogenetic Trees. *Molecular Biology and Evolution*, **1987**, 4: 406-425
- Sankaran K.** and Ravikumar S. Enhanced production and immobilization of alpha amylase using recombinant *Bacillus subtilis* (MTCC 2423). *International Journal of Current Research*, **2011**, 2 (1): 176-181.
- Sarikaya E.** and Gurgun V. Increase of the  $\alpha$ -amylase yield by some *Bacillus* strains. *Turk J. Biol.*, **2000**, 24: 299-308.
- Sata H.**, Umeda M., Kim C. H., Taniguchi H. and Maruyama Y. Amylase-Pullulanase enzyme produced by *B. Circulans* F-2. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1989**, 991: 388-394.
- Saxena R. K.**, Dutt K., Agarwal L. and Nayyar P. A highly thermostable and alkaline amylase from a *Bacillus sp.* PN5. *Bioresource Technol.*, **2007**, 98: 260-265.
- Saxena Rajshree** and Singh Rajni. Amylase production by solid-state fermentation of agro-industrial wastes using *Bacillus sp.* *Braz J Microbiol.*, **2011**, 42(4): 1334-1342.
- ScandurraR.**, Consalvi V., Chiaraluce R. and Engel P. C. Protein stability in extremophilic Archaea. *Frontiers in Bioscience*, **2000**, 5(1): D787-95.
- Schallmeyer M.**, Singh A., Ward O.P. Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. *Can. J. Microbiol.*, **2004**, 50:1-17.

- Schellart J. A.**, Visser F. M. W., Zandstra T. and Middelhoven W. J. Starch degradation by the mould *Trichoderma uiride*. I. The mechanism of starch degradation. *Antonie Van Leeuwenhoek*, **1976**, 42: 229-238.
- Sharma Kinshuk** , Sarita Bhutty, S. M. Pau, Khurana Urvashi and Kumar Kohli. Isolation, Identification and Optimization of Culture Conditions of *Bacillus sp.* Strain PM1 for Alkalothermostable Amylase Production. *Brit. Microbiol. Res. J.* **2014**, 4(4): 369-380.
- Sheldon R. A.**, Schoevaart R. and van Langen L. M. Cross-linked enzyme aggregates (CLEAs) : A novel and versatile method for enzyme immobilization (a review). *Biocatal. Biotransform.*, **2005**, 23: 141-147.
- Shen G. J.**, Srivastava K. C., Saha B. C. and Zeikus J. G. Physiological and enzymatic characterization of a novel pullulan-degrading, thermophilic *Bacillus* strains 3138. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **1990**, 33(3): 340-344.
- Shin K. S.**, Shin Y. K., Yoon J. H. and Park Y. H. *Candida thermophila* sp. nov., a novel thermophilic yeast isolated from soil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **2001**, 51: 2167-2170.
- Shingel K.I.** Current knowledge on biosynthesis, biological activity and chemical modification of the exopolysaccharide, pullulan. *Carbohydrate Res.*, **2004**, 339: 447- 460.
- Shobha M. S.**, Tharanathan R. N. Rheological behaviour of pullulanase-treated guar galactomannan on co-gelation with xanthan. *Food Hydrocolloids*, **2009**, 23(3): 749-754.
- Sills A. M.** and Stewart G.G. Production of amylolytic enzymes by several yeast species. *J. Inst. Brew.* **1982**, 88: 313-316.
- Sills A. M.**, Zygora P. S. J. and Stewart G. G. Characterization of *Schwanniomyces castellii* mutants with increased productivity of amylases. *Applied Microbiology and Biotechnology* **1984**, 20: 124-128.
- Silva T. M.**, Attili Angelis, Carvalho A. F. A., Silva R. D., Boscolo M. and Gomes E. Production of Saccharogenic and Dextrinogenic Amylases by *Rhizomucor Pusillus* A 13.36, *Journal of Microbiology*, **2005**, 43: 561-568.
- Simoës-Mendes B.** Purification and characterization of the extracellular amylases of the yeast *Schwanniomyces alluvis*. *Can J Microbiol*, **1984**, 30: 1163-1170.
- Singh R. S.**, Saini G. K. and Kennedy J. F. Pullulan: Microbial sources, production and applications. *Carbohydr Polymer.*, **2008**, 73: 515-531.
- Singh Pushendra**, Gupta Paras, Singh Ravindra and Sharma Rajesh. Activity and stability of immobilized alpha-amylase produced by *Bacillus acidocaldarius*. *International Journal of Pharmacy and Life Sciences*, **2012**, Vol. 3, Issue 12 (Suppl.): 2247-2253.
- Smitha Robinson Babysarojam**, Sreedharan Sajith, Prakasan Priji, Kizhakepowathial Nair Unni, Trikaryoor Asokan Nidheesh Roy and Sailas Benjamin . Purification and characterization of amylase from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*, *Bt Research*, **2015**, 6(3): 1-8.
- Soni S. K.**, Sandhu I. K., Bath K. S., Banerjee U. C. and Patnaik P. R. Extracellular amylase production by *Saccharomycopsis capsularis* and its evaluation for starch saccharification. *Folia Microbiol.*, **1996**, 41(3): 243-248.
- Spencer-Martins I.** and Van Uden N. Extracellular amylolytic system of the yeast *Lypomyces kononenkoae*. *European Journal Applied Microbiology and Biotechnology*, **1979**, 6: 241-250.

- Spreinat A.** and Antranikian G. Purification and properties of a thermostable pullulanase from *Clostridium thermosulfurogenes* EM1 which hydrolyses both  $\alpha$ -1,6 and  $\alpha$ -1,4 glycosidic Linkages. Applied Microbiology and Biotechnology, **1990**, 33: 511-518.
- Springer M.** New stabilizing systems using galactomannans. Dairy Industrial International, **1990**, 55:19-21.
- Stefanova M.** and Emanulilova E. Characterization of a thermostable  $\alpha$ -amylase from *Bacillus brevis* Eu. J. Biochem., **1992**, 207(1): 345-349.
- Sunna A.**, Moracci M., Rossi M., and Antranikian G. Glycosyl hydrolases from hyperthermophiles. Extremophiles, **1997**, 1(1): 2-13.
- Suzuki Y.**, Hatagaki K. and Oda H. A hyperthermostable pullulanase produced by an extreme thermophile, *Bacillus flavocaldarius* KP 1228, and evidence for the proline theory of increasing protein thermostability. Applied Microbiology and Biotechnology, **1991**, 34 (6): 707-714.
- Suzuki Yuzuru** and Imai Tetsuro . *Bacillus stearothermophilus* KP 1064 pullulan hydrolase. Its assignment to a unique type of maltogenic  $\alpha$ -amylase but to neither pullulanase nor isopullulanase. Applied Microbiology and Biotechnology, **1985**, 21 (1): 20-26.
- Suzuki Y.** and Chishiro M. Production of extracellular thermostable pullulanase by an amylolytic obligately thermophilic soil bacterium, *Bacillus stearothermophilus* KP-1064. Eur. J. Appl. Microbiol., **1983**, 17: 24-29.
- Swamy M. V.**, Sai Ram M. and Seenayya G.  $\beta$ -Amylase from *Clostridium thermocellum* SS8-A thermophilic, anaerobic, cellulolytic bacterium. Letters in Applied Microbiology, **1994**, 18, 301-304.
- Swamy M. V.** and Seenayya G. Thermostable Pullulanase and  $\alpha$ -Amylase Activity from *Clostridium thermosulfurogenes* SV9- Optimization of Culture Conditions for Enzyme Production. Process Biochemistry, **1996**, 31(2): 157-162.
- Swetha Sivaramakrishnan**, Dhanya Gangadharan, Kesavan Madhavan Nampoothiri, Carlos Ricardo Soccol and Ashok Pandey.  $\alpha$ -Amylases from Microbial Sources - An Overview on Recent Developments. Food Technol. Biotechnol., **2006**, 44 (2): 173–184.
- Szejtli J.** Introduction and general overview cyclodextrin chemistry. Chem. Rev., **1998**, 98:1743-1754.
- Takasaki Y.** Production and utilization of  $\beta$ -amylase and pullulanase from *Bacillus cereus* var. *mycoide*, Agr. Biol. Chem., **1976**, 40: 1515-1522.
- Takeuchi A.**, Shimizu-Ibuka A., Nishiyama Y., Mura K., Okada S., Tokue C. and Arai S. Purification and characterization of an alpha-amylase of *Pichia burtonii* isolated from the traditional starter "murcha" in Nepal. Biosci Biotechnol Biochem., **2006**, 70(12): 3019-24.
- Talekar S.**, Ghodake V., Kate A. Samant N., Kumar C. and Gadagkar S. Preparation and characterization of cross-linked enzyme aggregates of *Saccharomyces cerevisiae* invertase. Aust. J. Basic Appl.Sci., **2010**, 4: 4760-4765.
- Talekar Sachin** and Chavare Sandeep. Optimization of immobilization of amylase in alginate gel and its comparative biochemical studies with free  $\alpha$ -amylase. Recent Research in Science and Technology, **2012**, 4(2): 1-5.

- Tanaka A.**, and Ueda. M. Assimilation of alkanes by yeasts - functions and biogenesis of peroxisomes. *Mycol. Res.*, **1993**, 97: 10-44.
- Tanyolac D.**, Yuruksoy B. I. and Ozdural A. R. Immobilization of thermostable  $\alpha$ -amylase Termamyl on to nitrocellulose membrane by cibacron blue F3GA dye binding. *Biochem. Eng. J.*, **1998**, 2:179-186.
- Tehei M.** and Zaccai Guisappe. Adaptation to extreme environments: Macromolecular dynamics in complex systems, *Biochimica et Biophysica Acta*, **2005**, 1724 (3): 404-410.
- Teka Muluye.** Amylases of potential industrial application from microbial sources. MSc thesis. Adis Ababa University, **2006**.
- Thanh Vu Nguyen.** *Lipomyces orientalis* sp. Nov., a yeast species isolated from soil in Vietnam. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **2006**, 56: 2009-2013.
- Trivedi S.**, Gehlot H. S. and Rao S. R. Protein Thermostability in Archaea and Eubacteria. *Genet Mol Res.*, **2006**, 5 (4): 816-827.
- Tsuyoshi Naoko,** Ryosuke Fudo, Shigeru Yamanaka, Michio Kozaki, Namrata Tamang, Saroj Thapa and Jyoti P. Tamang. Identification of yeast strains isolated from marcha in Sikkim, a microbial starter for amylolytic fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, **2005**, 99: 135-146.
- Turner Pernilla,** Gashaw Mamo, and Eva Nordberg Karlsson. Potential and utilization of thermophiles and thermostable enzymes in biorefining. *Microb Cell Fact.*, **2007**, 6(9): 1-23.
- Umesh-Kumar S.**, Rehana F. and Nand K. Production of an extracellular thermostable calcium-inhibited  $\alpha$ -amylase by *B. licheniformis* MY10. *Enzyme Microbial Technol.*, **1990**, 12: 714-716.
- Unsworth L. D.**, Van de Oost J. and Koutsopoulos S. Hyperthermophilic enzymes-stability, activity and implantation strategies for high temperature applications. *FEBS Journal*, **2007**, 274: 4044-4056.
- Valaparla V. K.** Purification and properties of a thermostable  $\alpha$ - amylase by *Acremonium Sporosulcatum*. *Int. J. Biotechnol. Biochem.*, **2010**, 6: 25-34.
- Van Der Maarel M. J. E. C.**, Van Der Veen B., Uitdehaag J. C. M., Leemhuis H., and Dijkhuizen L. Properties and applications of starch-converting enzymes of the  $\alpha$ -amylase family. *Journal of Biotechnology*, **2002**, 94(2): 137-155.
- Varalakshmi K. N.**, Kumudini B. S., Nadin B. N., Solomon J., Suhas R., Mahesh B. and Kavitha A. P. Production and characterization of  $\alpha$ -amylase from *Aspergillus niger* JGI24 isolated in Bangalore. *Polish J. Micobiol.*, **2009**, 58: 29-36.
- Verdugo Valdez A.**, Segura Garcia L., Kirchmayr M., Ramírez Rodríguez P., González Esquinca A., Coria R. and Gschaedler Mathis A. Yeast communities associated with artisanal mezcal fermentations from Agave salmiana. *Antonie Van Leeuwenhoek.*, **2011**, 100 (4):497-506.
- Verma Shikha,** Aurobindo Kumar Ray and Bijay Krishna De. Bioconversion of heptanal to heptanol by *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, **2010**, 27 (5): 269-275.

- Vieille C.**, Epting K. L., Kelly R. M. and Zeikus J. G. Bivalent cations and amino-acid composition contribute to the thermostability of *Bacillus licheniformis* xylose isomerase. *European Journal of Biochemistry*, **2001**, 268 (23): 6291- 6301.
- Vieille C.** and Zeikus J. G. Hyperthermophilic enzymes: Sources, uses, and Molecular mechanisms for thermostability. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **2011**, 65:1- 43.
- Vimal S.** Prajapati, Ujjval B. Trivedi and Kamlesh C. Patel. A statistical approach for the production of thermostable and alklophilic alpha-amylase from *Bacillus amyloliquefaciens* KCP2 under solid-state fermentation. *3 Biotech.*, **2015**, 5 (2): 211-220.
- Vishnu C.**, Naveena B.J., Altaf Md., Venkateshwar M. and Reddy, G. Amylopullulanase - a novel enzyme of *Lactobacillus amylophilus* GV6 in direct fermentation of starch to L(+) lactic acid. *Enzyme Microb. Technol.*, **2006**, 38: 545–550.
- Vishnu C.**, Seenayya G. and Reddy G. Direct fermentation of various pure and crude starchy substrates to L(+) lactic acid using *Lactobacillus amylophilus* GV6. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, **2002**, 18: 429-433.
- Vorweg W.**, Radosta S. and Leibnitz E. Study of a preparative scale process for the production of amylose. *Carbohydr. Polym.*, **2002**, 47: 181-189.
- Walker G. M.** Yeast. In M. Schaechter, ed. *Desk Encyclopedia of Microbiology*. 2<sup>nd</sup> ed. London : Elsevier/ Academic Press., **2009**, p. 1174-1187.
- Walker G.M.** Yeast. *Physiology and Biotechnology* John Wiley and Sons, **1998**, Chichester.
- Wanderly J. K.**, Torres A. G. F., Maraes M. P. L. and Cirano J. U. Biochemical characterization of  $\alpha$ -amylase from the yeast *Cryptococcus flavus*. *FEMS Microbiology Letters*, **2004**, 23 (1):165-169.
- Wasko A.**, Polak-Berecka M. and Targoriski Z. Purification and characterization of pullulanase from *Lactococcus lactis*. *Prep. Biochem. Biotechnol.*, **2011**, 41 (3): 252-261.
- Wiley Prescott**, Sherwood Harley and Woolverton Klein. *Microbiologie*. 3<sup>ème</sup> editions. Editions De Boeck, **2010**, p. 101-125.
- Wilson J. Jeffrey** and Ingledew Michael. Isolation and characterization of *Schwanniomyces alluvius* amylolytic enzymes. *Applied and Environmental Microbiology*, **1982**, 44(2): 301-307.
- Wind R.D.**, Buitelaar R. M. G., Huizing H. J. and Dijkhuizen L. Characterization of a new *Bacillus stearothermophilus* isolate; a highly thermostable  $\alpha$ -amylase producing strain. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **1994** 41:155-162.
- Wolf Klaus.** *Nonconventional Yeasts in Biotechnology. A Handbook*. Springer, Berlin, (**1996**).
- Wyder Marie-Therese** and Zdenko Puhán. Role of selected yeasts in cheese ripening: an evaluation in aseptic cheese curd slurries. *International Dairy Journal*, **1999**, 9: 117-124.
- Yamasaki Y.**, Nakashima S and Konno H. Pullulanase from rice endosperm. *Acta Biochim. Pol.*, **2008**, 55 (3): 507-10.
- Yasser R. Abdel-Fattah**, Nadia A. Soliman, Nabil M. El-Toukhy, Hamada El-Gendi, and Rania S. Ahmed. Production, purification, and characterisation of thermostable  $\alpha$ -amylase produced by *Bacillus licheniformis*. Isolate AI20. *Journal of Chemistry* Volume 2013, **2013**, Article ID 673173 : 1-11.

- Zaborsky O. R.** Entrapment within cross linked polymers. In: Immobilized enzymes. CRC Press, **1973**, p. 83-91.
- Zaitlin B.**, Watson S. B., Ridal D., Stachwill T. & Parkinson D. Actinomycetes in Lake Ontario, habitats and geosmin and MIB production. J. AM. Water Works Assoc., **2003**, 95 (2) :113-118.
- Zareian S.**, Khajeh **K.**, Ranjbar B., Dabirmanesh B., Ghollasi M. and Mollania N. Purification and characterization of a novel amylopullulanase that converts pullulan to glucose, maltose, and maltotriose and starch to glucose and maltose. Enzyme Microbial Technol., **2010**, 46 (2): 57–63.
- Zhang H.**, Tian Y., Bai Y., Xu X. and Jin Z. Structure and properties of maize starch processed with a combination of  $\alpha$ -amylase and pullulanase. Int. J. Biol.Macromol., **2013**, 52: 38-44.
- Zhang Hao**, Yuping Ran Dongming Li, Yongfang Liu, Yun Xiang, Ruifeng Zhang and Yaling Dai. *Clavispora lusitaniae* and *Chaetomium atrobrunneum* as Rare Agents of Cutaneous Infection. Mycopathologia, **2010**, 169 (5): 373-380.
- Zobel H. F.** and Kulp K., The staling mechanism. In: R. E. Hebeda and H. F. Zobel, Baked Goods Freshness: Technology, Evaluation, and Inhibition of Staling, New York, Marcel Dekker, **1996**, p. 1-64.

# **Annexes**

# Annexe1

## Composition des milieux de culture

### 1. Milieu Yeast Peptone Glucose (YPG) (Kurtzman et al., 2011)

Dissoudre dans 1 litre d'eau déminéralisée :

20 g de glucose,

10 g de peptone

5 g d'extrait de l'extrait de levure,

Stériliser à l'autoclave à 121 ° C pendant 15 min.

### 2. Yeast Extract Peptone Glucose Agar (YPGA)

Il s'agit du milieu précédent gélosé à 2%

### 3. Yeast Extract Peptone Starch Agar (YPSA)

Dissoudre dans 1 litre d'eau déminéralisée :

20 g d'amidon,

10 g de peptone

5 g d'extrait de l'extrait de levure,

20 g d'agar

Stériliser à l'autoclave à 121 ° C pendant 15 min.

### 4. Yeast Extract Peptone Glucose Agar (YPPA)

Dissoudre dans 1 litre d'eau déminéralisée :

20 g de Pullulan,

10 g de peptone

5 g d'extrait de l'extrait de levure,

20 g d'agar

Stériliser à l'autoclave à 121 ° C pendant 15 min.

## **5. Preparation de PDA (Potato Dextrose Agar) (Guiraud, 1998)**

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

200g de pommes de terre non pelés, lavés et coupés en petits dés; mis ensuite dans 1 litre d'eau distillée, puis portés à l'ébullition pendant 1 heure. Ils sont enfin écrasés et le volume est complété à 1 litre.

### **-Composition du milieu PDA**

Extrait de pomme de terre : 1000ml

20g Glucose

15-20g Agar

Dissoudre l'Agar à chaud dans l'extrait puis ajouter le glucose

Stériliser à 110°C pendant 30 min.

En cas de dépôt, agiter avant de le répartir dans des tubes à vis.

## **6. Milieu de Mc Clary's Acétate Agar (Kurtzman et al., 2011)**

Dissoudre 1 g de glucose,

1,8 g de chlorure de potassium,

8,2 g d'acétate de sodium

2,5 g d'extrait de levure et

15 g d'agar dans 1 litre d'eau déminéralisée.

pH7, Stériliser à l'autoclave à 121 °C pendant 15 min

## **7. Corn meal agar (CMA) (Kurtzman et al., 2011)**

Chauffer 42 g de maïs dans 1 litre d'eau déminéralisée à 60°C pendant 1 h,

Filtrer sur papier puis restaurer le volume à 1 litre par addition d'eau.

Ajouter et dissoudre 12 g d'agar.

Stériliser à 121°C pendant 15 min.

Les produits commerciaux sont disponibles chez divers fournisseurs.

## **8. Milieu R.A.T. (Rice Agar Tween) (Kurtzman et al., 2011)**

Laisser mijoter 20 g de riz non poli dans 1 litre d'eau pour 45 min,

Filtrer, et ajouter de l'eau pour rétablir le volume à 1 litre.

Ajouter et dissoudre 20 g d'agar. Stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 15 min.

Les produits commerciaux sont disponibles, mais les résultats obtenus sont en général inférieurs à ceux obtenus avec le milieu fraîchement préparé avec infusion de riz.

### **9. Milieu de Wickerham (Guiraud, 1998)**

10g Peptone

5g Extrait de levure

5mg Bleu de bromothymol

pH7, 2. Répartir en tubes a essai (9ml). Ajouter une cloche de Durham. Autoclaver 15 min à 120°C.

### **10. Milieu Yeast Nitrogen Base Agar (YNBA)**

Erlens :

6,7g Milieu Yeast Nitrogen Base

100 ml Eau distillée

Stériliser par filtration.

### **11. Milieu Yeast Carbon Base**

20g Glucose

1g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

0, 5 g MgSO<sub>4</sub>

20 g Agar

1000 ml Eau distillée

## Annexe 2

### Méthodes d'analyse

#### 1. Détermination de la matière sèche (AFNOR 1986)

La matière sèche est déterminée sur un échantillon de 10 ml de lactosérum par évaporation à une température 105 °C jusqu'à poids constant à 0.1%.

##### Expression des résultats

Le résidu sec total exprimé en % de masse est:  $(m_2 - m_0) \times 100 / m_1 - m_0$

$m_0$  est la masse, en gramme, du creuset vide.

$m_1$  est la masse, en gramme, du même creuset contenant la prise d'essai avant dessiccation.

$m_2$  est la masse, en gramme, du creuset après dessiccation.

#### 2. Détermination du taux des cendres (AFNOR 1986)

La différence entre les deux pesées ne doit pas dépasser 0.05 %.

Expression des résultats:

$$\frac{(m_2 - m_0)}{(m_1 - m_0)} \times 100 \quad \text{avec}$$

$m_0$  est la masse, en gramme, du creuset vide.

$m_1$  est la masse, en gramme, du même creuset contenant la prise d'essai avant incinération.

$m_2$  est la masse, en gramme, du creuset après incinération.

Remarque : La matière organique = La matière sèche - Les cendres

#### 3. Dosage de la matière grasse totale

##### -Principe

L'acide chlorhydrique dilué libère à chaud la matière grasse des protéines et des autres substances. Elle est séparée par filtration sur sable, et après séchage, elle est extraite à l'éther de pétrole dans un Soxhlet ou appareil similaire. La solution étherée est distillée et le résidu pesé.

Cette technique appelée technique de Wiseman (Le coq 1965).

### **-Réactifs**

- Acide chlorhydrique N.
- Solution aqueuse d'acétate de zinc à 20%.
- Solution aqueuse de ferrocyanure de potassium à 10%.
- Sable purifié pour analyse.
- Ether de pétrole séché : Son point d'ébullition doit être compris entre +40° et +60.

### **-Mode opératoire**

- A 10ml de l'échantillon. Ajouter 50ml d'acide chlorhydrique N, et faire bouillir pendant 5mn.
- Laisser déposer si le liquide n'est pas clair, ajouter 1ml de solution d'acétate de zinc à 20% et 1ml de solution de ferrocyanure de potassium à 10%.
- Filtrer sur un filtre contenant 5g de sable purifié, puis sécher à l'étuve à + 100°C.
  
- Extraire le papier filtre séché et le résidu avec de l'éther de pétrole pendant 2h-3h dans un soxhlet, dont le ballon aura été taré.
- Evaporer le solvant, sécher à l'étuve à + 100°C jusqu'à poids constant.

### **-Expression des résultats**

Soit :  $m_1$  = masse du ballon.

$m_2$  = masse de l'ensemble ballon + matière grasse.

P = prise d'essai.

$$\% \text{ lipides} = \frac{m_2 - m_1}{p} \times 100$$

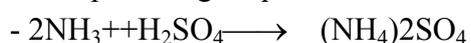
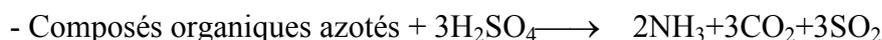
## **4. Dosage de l'azote total par la méthode de kjeldahl**

Les matières azotées sont constituées par des matières protéiques et des substances dans lesquelles l'azote est non protéique.

### **• Principe**

L'échantillon est minéralisé par l'acide sulfurique concentré à chaud, en présence d'un catalyseur. L'azote organique est transformé en azote ammoniacal (sulfate d'ammonium), alcalinisation de produit de la réaction, distillation de l'ammoniac libéré et titrage de l'ammoniac dans une solution d'acide borique.

Ces étapes peuvent être résumées en réactions chimiques:



## **-Réactifs et appareillage**

- Catalyseurs : mélange de sélénium.
- H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentré (d=1,84), H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,1 N.
- Lessive de soude à 33%
  - Soude 0,1N.
  - Indicateur rouge de méthyle 5%.
  - Billes de verre, ou pierre ponce.
  - Balance de précision.
  - Distillateur d'azote.
  - Matras KJELDHAL de 500ml.
  - Verrerie : Burette, becher, Eprouvette, fiole de 100 ml.

## **-Mode opératoire**

### **-Minéralisation sulfurique**

- Introduire dans une fiole de kjeldahl de 500ml :
- La prise d'essai (10ml).
  - 2g de catalyseur (pour prise d'essai de 1g), bien mélangé.
  - 20 ml d'H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentré.
- Porter ensuite sur une rampe chauffante permettant l'aspiration des vapeurs sulfuriques.
- Chauffer doucement en agitant au début jusqu'à disparition de tout fragment de l'échantillon et formation d'une solution homogène noire.
- Augmenter le chauffage jusqu'à douce ébullition du mélange acide.
- Agiter périodiquement de manière de ramener dans le fond de la fiole les parcelles de substances qui adhèrent aux parois.
- Prolonger le chauffage une demi-heure après décoloration complète, c'est à dire après que la solution sera devenue limpide, laisser refroidir.

### **-Alcalinisation et distillation**

- Transvaser quantitativement dans une fiole, rincer le matras et l'entonnoir à l'eau distillée, compléter le volume à 100 ml.
- Le dosage de l'azote se fera sur cette solution versée dans 3 erlen -meyers à 20ml chacun.
- Ajouter 20ml de lessive de soude Pour l'alcalinisation de NH<sub>3</sub>.
- Ajouter quelques billes de verre pour régulariser l'ébullition, une fois quel'appareil à distiller est prêt à fonctionner : réfrigération assurée et extrémité de l'appareil plongeant dans un erlen-meyer de 300 ml contenant 20ml d'H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,1N (l'extrémité de l'appareil doit être en contact avec le liquide).

-Après avoir ajouté délicatement la lessive de soude (sans agitation car risque de perte  $\text{NH}_3$ ), mettre la fiole en place pour la distillation.

-Vérifier la fin de la distillation en recevant quelques gouttes de distillat, soit sur un papier tournesol rouge (qui bleuit en présence de  $\text{NH}_3$ , car milieu basique), soit du papier pH.

Remarque : Nous prenons aussi un matras témoin contenant tous les produits sauf la substance à analysée.

### **-Titrage**

-Récupérer  $\text{NH}_3$  distillé dans l'erlemeyer contenant de l' $\text{H}_2\text{SO}_4$  en excès (20ml).

-Ajouter dans l'eren-meyer quelques gouttes de rouge de méthyle et titrer par la soude 0,1N l' $\text{H}_2\text{SO}_4$  restant (proportion, qui n'a pas réagi avec  $\text{NH}_3$ ).

-Doser goutte à goutte avec la soude contenue dans la burette, jusqu'au virage jaune pâle persistant.

### **-Résultats et calcul**

Pourcentage d'azote sur matière telle quelle :

$$\text{N}\% = \frac{a \times v \times 100}{p}$$

v = Volume de l'acide sulfurique qui a réagi avec  $\text{NH}_3$ .

P = Prise d'essai = 10ml.

a = Quantité d'azote en g, neutralisée par 1 ml de solution acide titrée.

Pour une solution  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,1N

$$a = 0,0014\text{g.}$$

Pourcentage de protéines (en % MS) :

$$\% \text{ protéines} = \frac{0,0014 \times v \times 100 \times k}{p} \times \frac{100}{(100-H)} = \% \text{ de protéines.}$$

k= Coefficient qui varie suivant les produits, pour notre produit k= 6,25.

H= Humidité de la substance.

## **5. Dosage de l'activité amylasique (méthode de Bernfeld 1955)**

### **-Principe**

L'activité de l' $\alpha$ -amylase ou de la pullulanase est évaluée par l'hydrolyse de l'amidon ou du pullulan par les extraits enzymatiques. L'amidon ou le pullulan hydrolysé libère du maltose dosé par la méthode de Bernfeld (1955) qui utilise l'acide 3,5-dinitrosalicylique

(DNSA) comme inhibiteur de l'amylase. La réaction est colorimétrique et l'intensité de la coloration est proportionnelle à la quantité du maltose libérée.

### -Préparation du substrat

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

### -Préparation du réactif DNSA

Dissoudre 1g de l'acide 3,5-dinitrosalicylique dans 20 ml de NaOH 2N et 50 ml d'eau distillée

Ajouter 30g de tartrate double de sodium et potassium, compléter à 100 ml avec de l'eau distillée, filtrer.

### -Dosage de l'activité de l'extrait enzymatique

- Ajouter 0.5 ml du filtrat dilué à 0.5ml d'amidon soluble (ou pullulane) à 1% dans le tampon

phosphate pH 6,5(ou Tris HCl pH8)

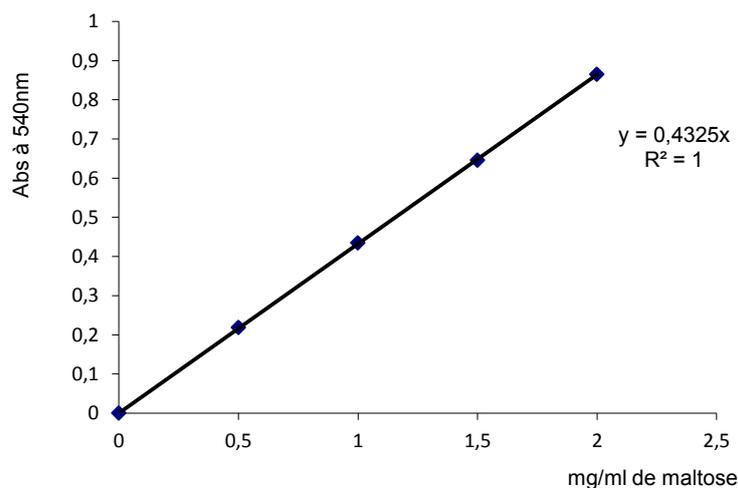
- Incuber à 40°C pendant 30mn

- Arrêter la réaction par l'addition de 1 ml de DNSA

- Incuber à 100°C pendant 10mn.

- Après refroidissement dans un bain de glace, ajouter 10ml d'eau distillée

L'absorbance est déterminée à 540 nm par rapport à une gamme d'étalon de 0 à 2 mg/ml de maltose. L'unité amyliques est le nombre de  $\mu$ mole de maltose libéré par minute.



Courbe étalon du maltose

## 6. Dosage des protéines (méthode de Lowry 1951)

### -Principe

Les protéines sont quantifiées en utilisant la méthode du Folin Ciocalteu (Lowry et al 1951).

L'addition successive à une solution protéique diluée d'un sel de cuivre en milieu alcalin et du réactif des phénols de Folin Ciocalteu donne une coloration bleue foncée. Celle-ci résulte de la réaction du cuivre sur les liaisons peptidiques.

### -Réactifs

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

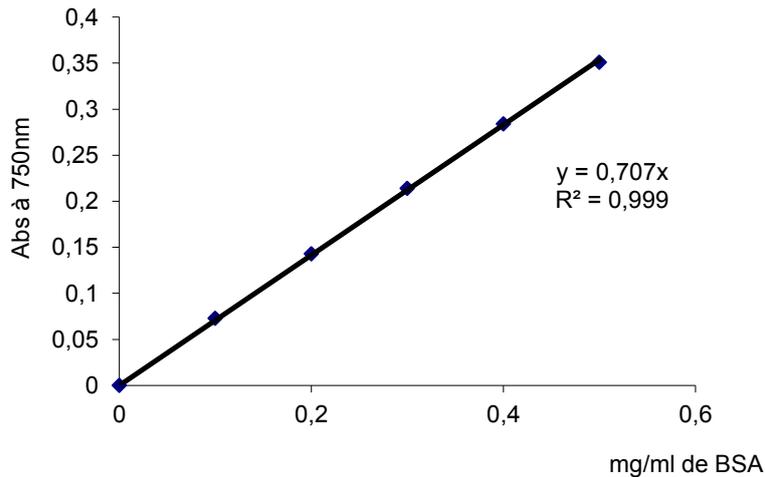
Préparer extemporanément la solution réactive M en respectant l'ordre d'addition des réactifs et en agitant bien après chaque addition :

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

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

### -Mode opératoire

- Ajouter à 0,5 ml de l'extrait enzymatique dilué 2,5ml de la solution M.
- Agiter et laisser reposer 10 min à température ambiante
- Ajouter 0,25 ml de réactif de Folin
- Agiter et laisser la coloration se développer 30 min à l'obscurité.
- Lire l'absorbance contre le blanc à 650 nm.



Courbe étalon des protéines

## 7. Dosage des sucres totaux (méthode de Dubois 1956)

### -Principe

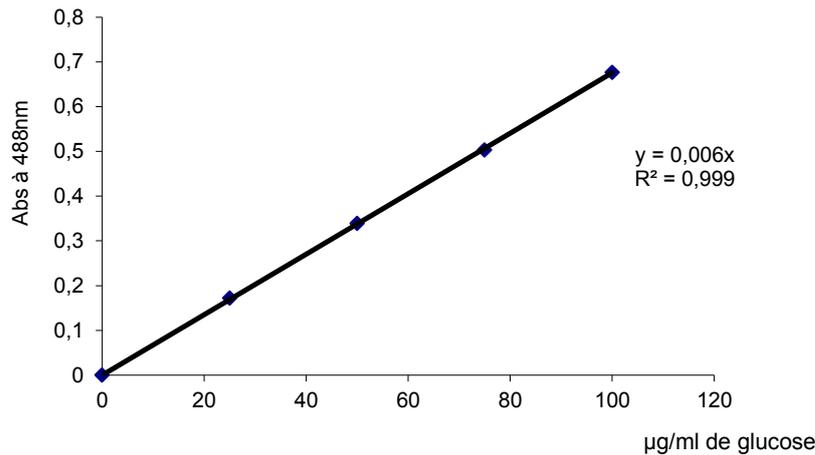
L'acide sulfurique concentré provoque à chaud la déshydratation des oses avec la formation d'hydroxy-méthyl furfural (cas d'un hexose) et d'un furfural (cas d'un pentose). Ces composés se condensent avec le phénol pour donner des composés colorés dont l'intensité de la coloration est proportionnelle à la concentration en oses.

### -Réactifs

- Acide sulfurique concentré  $d = 1.84$
- Phénol 5%

### -Mode opératoire

- Ajouter à 1ml de l'extrait enzymatique dilué 1ml de phénol 5% et 5ml d'acide sulfurique concentré
- Après agitation, laisser reposer 10 mn
- Incuber au bain-marie à 30°C pendant 20 à 30 mn
- Lecture à 488 nm par rapport à un témoin et une gamme étalon à 100 µg/ml de glucose.



Courbe étalon des sucres totaux

## 8. PCR

La réaction de PCR se fait dans un volume final de 20 µl contenant 0,2 µl dNTP (15 et 30 pb) dans notre cas, 20pb (dNTP) + 0,5 µl d'amorce ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG -3'), 0,5 µl d'amorce ITS4 (5'- TCCTCCGCTTATTGATATGC -3'), 1,2 µl de MgCl<sub>2</sub>, 4 µl tampon 5X de la Taq polymérase, 0,2µl de Taq polymérase, et 11,4µl H<sub>2</sub>O. Dans chaque microtube de 200 µl, on met 18 µl du mélange et on ajoute 2 µl de l'ADN. Une centrifugation à 3000-3500 tr/min pendant 1 à 2 min est réalisée.

Le mélange réactionnel est soumis à une amplification de 35 cycles, chaque cycle renferme une dénaturation initiale à 95 ° C pendant 5 min ; une séparation à 95°C pendant 30 sec une hybridation à 56 ° C pendant 45s, et extension à 72 ° C pendant 45s ; et une étape d'extension finale de 5 min à 72 ° C. Enfin, Le produit est conservé à 4°C à l'∞. La PCR est réalisée dans le thermocycleur BIORAD.

## 9. Etapes de la CCM

La chromatographie sur couche mince comprend :

- une phase stationnaire constituée d'une couche mince de matériel absorbant (usuellement du gel de silice ou de la cellulose) ;
- une phase liquide, dite phase mobile ou éluant : il s'agit d'un solvant ou un mélange de solvants qui va entraîner et séparer les composés le long de la phase stationnaire.

Les différentes solutions sont préparées comme suit :

- solutions témoins : Glucose, maltose et maltotriose à 5% dans du tampon tris HCl pH 8
- échantillons : ajouter à 0,5 ml d'enzyme purifié concentré, 0,5 ml de pullulan ou d'amidon dans le tampon tris HCl pH 8 et incuber à 40°C pendant 6h.
- phase mobile : elle est constituée de butanol 3v, d'acide acétique 1v et d'H<sub>2</sub>O 1v.

Les différentes étapes consistent à préparer d'abord la cuve d'électrophorèse et la phase stationnaire, puis à déposer les solutions étalons et les échantillons à l'aide d'un capillaire, et

enfin, après la migration du solvant, à révéler les tâches résultant de la séparation des constituants.

L'étape finale consiste à mesurer les hauteurs  $h$  de migration des différentes tâches et calculer les rapports frontaux  $R_f$ .

$$R_f = \frac{\text{Distance parcourue par le soluté (h)}}{\text{Distance parcourue par le solvant (H)}}$$

#### **-Préparation de la cuve de l'électrophorèse**

Mettre un volume du solvant à l'intérieur de la cuve de migration, dont la hauteur ne dépasse pas 1 cm. Fermer hermétiquement avec son couvercle, et laisser l'atmosphère intérieure de la cuve se saturer en vapeur de solvant afin d'éviter la formation de l'effet de bord.

#### **-Préparation de la phase stationnaire**

La phase stationnaire est une feuille en aluminium de gel de silice à activer en la mettant dans l'étuve 105°C avant son emploi.

#### **-Dépôt**

Tracer la ligne de dépôt des solutions à 1 cm du bas de la plaque avec un crayon. Déposer, avec un capillaire, les solutions étalons et les échantillons, laisser sécher et recommencer l'opération minimum deux fois.

#### **-Préparation d'un capillaire**

Les capillaires sont préparés à partir de pipettes Pasteur :

- Chauffer la partie centrale de la pipette dans la flamme de bec de benzène en tournant la pipette jusqu'à ce qu'elle soit mout.
- Retirer de la flamme et étirer la pipette.
- Laisser refroidir et couper la partie fine du milieu

#### **-Migration**

Introduire délicatement la plaque dans la cuve.

Laisser migrer le solvant, lorsque le front de solvant est à 1 cm du bord supérieur, retirer la plaque (elle dure environ 2h). Sécher à l'air libre ou au sèche cheveux, ensuite à 105°C.

#### **-Révélation**

Pulvériser le révélateur (acide sulfurique/méthanol, 1 :1 v/v) sur la plaque et la mettre dans une étuve thermostatée jusqu'à l'apparition des tâches (Zareian et al., 2010) .

## **10. Protocole de l'électrophorèse**

### **-Préparation des Solutions**

#### **Solution A**

Acrylamide/bis acrylamide 40 %

### **Solution B**

- 75 ml Tris HCl 2M pH 8,8
- 4ml SDS 10%
- 21ml H<sub>2</sub>O

### **Solution C**

- 50 ml Tris HCL 1M pH 6,8
- 4 ml SDS 10%
- 46 ml H<sub>2</sub>O

### **-Préparation des différents Gels d'électrophorèse**

#### **-Gel de séparation (Separating gel 10%)**

- 3,3ml Solution A
- 2,5ml ml Solution B
- 4,2ml H<sub>2</sub>O

Pour la polymérisation du gel de séparation on ajoute:

- APS 60µl
- TEMED 10µl

#### **-Gel de concentration (Stacking gel)**

- 0,67ml ml Solution A
- 1 ml Solution C
- 2,3 ml H<sub>2</sub>O

Pour la polymérisation du gel de séparation on ajoute :

- APS 25 µl
- TEMED 8µL

### **-Préparation du tampon de migration (Running Buffer)**

Pour 1000 ml :

Glycine 14,4 g  
Tris 3 g  
SDS 1g  
pH 8,8

### **-Préparation du tampon de Laemmli (Sample 5X)**

Tris-HCl (0,5M), pH=6,8 1,25 ml

SDS 10%	2ml
Glycérol 20%	5ml
B-marcaptoéthanol 0,04%	0,5 ml
Bleu de Bromophénol 1%	1ml
Eau bidistillée q.s.p.	10ml

### **-Préparation des échantillons et du standard**

- Mettre dans un tube Ependorff
- 40µl de protéine (échantillon)
  - 10µl Sample 5X (Tampon de Laemmli)
- Préparation de marqueurs de taille (Standard)
- 36µl H<sub>2</sub>O
  - 4µl standard
  - 10µl Sample 5X

### **-Solution mère de Coomassie R2**

Les échantillons et le standard sont incubés dans un bain marie à 100°C pendant 5 min pour la dénaturation des protéines puis centrifuger 2 s à 10 000 – 12 000 tr/min.

### **Note :**

Solution à préparer ex temporement :

**SDS 10%** et **APS 10%**.

### **-Solutions de coloration et de décoloration**

#### **-Solution de coloration**

-Acide trichloroacétique (TCA) 60%	100ml
-Solution mère de bleu de Coomassie R250	25ml
-Eau distillée	qsp 500ml
-Bleu de coomassie R250	10g
-Ethanol 95°	qsp 1000ml

#### **-Solution de décoloration**

4V méthanol : 1V acide acétique : 5V eau distillée

### **Mode opératoire**

- Après l'installation et la fixation des plaques, la vérification de la fuite d'eau pendant 5 à 10min est réalisée.
- Couler 40 ml de gel de séparation, ajouter de l'eau pure pour avoir une surface linéaire.
- Attendre 15 à 20 min pour une bonne polymérisation du gel. L'apparition d'un trait horizontal séparant le gel de l'eau est un repaire indiquant que le gel est bien polymérisé.

- Débarrasser l'eau et couler le gel de concentration et mettre rapidement le peigne ; l'espace entre la limite du gel de séparation et le bout des dents du peigne est de 1 cm. Attendre 15-20 min pour la polymérisation du gel.
- Enlever délicatement le peigne pour ne pas abîmer le gel, et mettre les dépôts avec une micro-seringue.
- Transférer les plaques dans la cuve de l'électrophorèse remplie à moitié de tampon de migration. Ajouter le tampon de migration dans les compartiments(intérieure et extérieur) jusqu'à le niveau maximale.
- Lancer la migration à 200 v.
- Immerger le gel dans une solution de fixation et de coloration, laisser sous une faible agitation 2 heures ou même toute une nuit à température ambiante.
- Rincer avec de l'eau distillée pour éliminer l'excès du colorant. Décolorer le gel dans la solution de décoloration, puis rincer avec de l'eau distillée.

#### 10. Matrice des estimations de la divergence évolutive entre les séquences de *C. lusitaniae* et les souches types

```

Title: fasta title
Description
Analysis ----- Distance Estimation
Scope ----- Pairs of taxa
Estimate Variance
Variance Estimation Method ----- None
Substitution Model
Substitutions Type ----- Nucleotide
Model/Method ----- No. of differences
Substitutions to Include ----- d: Transitions + Transversions
Rates and Patterns
Rates among Sites ----- Uniform rates
Pattern among Lineages ----- Same (Homogeneous)
Data Subset to Use
Gaps/Missing Data Treatment ----- Pairwise deletion
Codons Included ----- 1st+2nd+3rd+Non-Coding
No. of Sites : 494
d : Estimate

```

```

[ 1] #Clavispora
[ 2] #Clavispora lusitaniae NRRL_Y-11827T_(U44817)
[ 3] #Candida_intermedia_NRRL_Y-981T_(U44809)
[ 4] #Candida_pseudointermedia_NRRL_Y-10939T_(U44816)
[ 5] #Candida_tsuchiyae_NRRL_Y-17840T_(U49064)
[ 6] #Metschnikowia_agaveae_NRRL_Y-1791T_(U84243)
[ 7] #Clavispora_opuntiae_NRRL_Y-11820T_(U44818)
[ 8] #Candida_fructus_NRRL_Y-17072T_(U44810)
[ 9] #Candida_asparagi_SN15-1T_(AY450920)
[10] #Candida_carvajalis_CLQCA-20-011T_(AM946644)
[11] #Uncultured_bacterium_clone_R4J7L4_E6_(GQ467898)

```

```

[ 1] 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 ]
[ 2] 29
[ 3] 93 84
[ 4] 91 82 2
[ 5] 99 92 57 57
[ 6] 83 79 68 68 75
[ 7] 83 76 66 64 76 76
[ 8] 60 57 67 66 76 68 55
[ 9] 59 55 69 68 78 71 57 7
[10] 61 59 64 63 78 65 52 15 12
[11] 278 275 281 279 289 276 270 265 264 264

```

Table. Estimates of Evolutionary Divergence between Sequences  
The number of base differences per sequence from between sequences are shown.

## Annexe 3

### Analyse statistique

#### 1. Matrice du plan composite centré utilisé pour l'optimisation de la production enzymatique

**Tableau 1:** La matrice expérimentale du plan composite centré pour l'étude de six facteurs.

N° d'essai	Facteurs					
	X1	X2	X3	X4	X5	X6
1	-1	-1	-1	-1	-1	-1
2	+1	-1	-1	-1	-1	-1
3	-1	+1	-1	-1	-1	-1
4	+1	+1	-1	-1	-1	-1
5	-1	-1	+1	-1	-1	-1
6	+1	-1	+1	-1	-1	-1
7	-1	+1	+1	-1	-1	-1
8	+1	+1	+1	-1	-1	-1
9	-1	-1	-1	+1	-1	-1
10	+1	-1	-1	+1	-1	-1
11	-1	+1	-1	+1	-1	-1
12	+1	+1	-1	+1	-1	-1
13	-1	-1	+1	+1	-1	-1
14	+1	-1	+1	+1	-1	-1
15	-1	+1	+1	+1	-1	-1
16	+1	+1	+1	+1	-1	-1
17	-1	-1	-1	-1	+1	-1
18	+1	-1	-1	-1	+1	-1
19	-1	+1	-1	-1	+1	-1
20	+1	+1	-1	-1	+1	-1
21	-1	-1	+1	-1	+1	-1
22	+1	-1	+1	-1	+1	-1
23	-1	+1	+1	-1	+1	-1
24	+1	+1	+1	-1	+1	-1
25	-1	-1	-1	+1	+1	-1
26	+1	-1	-1	+1	+1	-1
27	-1	+1	-1	+1	+1	-1
28	+1	+1	-1	+1	+1	-1
29	-1	-1	+1	+1	+1	-1
30	+1	-1	+1	+1	+1	-1
31	-1	+1	+1	+1	+1	-1
32	+1	+1	+1	+1	+1	-1
33	-1	-1	-1	-1	-1	+1
34	+1	-1	-1	-1	-1	+1
35	-1	+1	-1	-1	-1	+1
36	+1	+1	-1	-1	-1	+1
37	-1	-1	+1	-1	-1	+1
38	+1	-1	+1	-1	-1	+1
39	-1	+1	+1	-1	-1	+1
40	+1	+1	+1	-1	-1	+1

41	-1	-1	-1	+1	-1	+1
42	+1	-1	-1	+1	-1	+1
43	-1	+1	-1	+1	-1	+1
44	+1	+1	-1	+1	-1	+1
45	-1	-1	+1	+1	-1	+1
46	+1	-1	+1	+1	-1	+1
47	-1	+1	+1	+1	-1	+1
48	+1	+1	+1	+1	-1	+1
49	-1	-1	-1	-1	+1	+1
50	+1	-1	-1	-1	+1	+1
51	-1	+1	-1	-1	+1	+1
52	+1	+1	-1	-1	+1	+1
53	-1	-1	+1	-1	+1	+1
54	+1	-1	+1	-1	+1	+1
55	-1	+1	+1	-1	+1	+1
56	+1	+1	+1	-1	+1	+1
57	-1	-1	-1	+1	+1	+1
58	+1	-1	-1	+1	+1	+1
59	-1	+1	-1	+1	+1	+1
60	+1	+1	-1	+1	+1	+1
61	-1	-1	+1	+1	+1	+1
62	+1	-1	+1	+1	+1	+1
63	-1	+1	+1	+1	+1	+1
64	+1	+1	+1	+1	+1	+1
65	$-\alpha$	0	0	0	0	0
66	$+\alpha$	0	0	0	0	0
67	0	$-\alpha$	0	0	0	0
68	0	$+\alpha$	0	0	0	0
69	0	0	$-\alpha$	0	0	0
70	0	0	$+\alpha$	0	0	0
71	0	0	0	$-\alpha$	0	0
72	0	0	0	$+\alpha$	0	0
73	0	0	0	0	$-\alpha$	0
74	0	0	0	0	$+\alpha$	0
75	0	0	0	0	0	$-\alpha$
76	0	0	0	0	0	$+\alpha$
77	0	0	0	0	0	0
78	0	0	0	0	0	0
79	0	0	0	0	0	0
80	0	0	0	0	0	0
81	0	0	0	0	0	0
82	0	0	0	0	0	0

$\alpha = 2.828.$

## 2. Optimisation de la production enzymatique

**Tableau 2:** ANOVA du modèle quadratique de l' $\alpha$ -amylase

Source	DDL	SC	CM	F	P
Model	<b>27</b>	22096378	818384	<b>26,20</b>	<b>0,000</b>
Linéaire	6	10702626	1783771	57,10	0,000
Carré	6	7447566	1241261	39,74	0,000
Intéraction	15	3946187	263079	8,42	0,000
Erreur résiduelle	54	1686775	31237		
Adjustment inadéquat	49	1571105	32063	1,39	0,390
Total	81	23783153			

**Tableau 3:** ANOVA du modèle quadratique de la pullulanase

Source	DDL	SC	CM	F	P
Model	<b>27</b>	20988487	777351	<b>23,03</b>	<b>0,000</b>
Linéaire	6	10186022	1697670	50,29	0,000
Carré	6	7385919	1230986	36,46	0,000
Intéraction	15	3416546	227770	6,75	0,000
Erreur résiduelle	54	1823051	33760		
Adjustment inadéquat	49	1707381	34845	1,51	0,347
Total	81	22811537			

## 3. Effet de la concentration de lactosérum sur la production enzymatique

✓ Amylase

**Tableau 4:** ANOVA de la concentration de lactosérum sur l' $\alpha$ -amylase

	SC	DDL	MC	F	p
<b>ord. origine</b>	223481370	1	223481370	7363,987	0,000000
<b>Lactosérum</b>	43231780	4	10807945	356,135	0,000000
<b>Erreur</b>	303479	10	30348		

**Tableau 5:** Groupes homogènes (Newman-Keuls) de l'étude de la concentration de lactosérum sur l' $\alpha$ -amylase

	<b>Production</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>
20	1700,240	****				
40	2576,498		****			
60	3643,123			****		
80	4866,600				****	
100	6512,993					****

✓ **Pullulanase**

**Tableau 6:** ANOVA de la concentration de lactosérum sur la production de la pullulanase

	<b>SC</b>	<b>DDL</b>	<b>MC</b>	<b>F</b>	<b>p</b>
<b>ord. origine</b>	197576087	1	197576087	4925,561	0,000000
<b>Lactosérum</b>	44442450	4	11110613	276,987	0,000000
<b>Erreur</b>	401124	10	40112		

**Tableau 7:** Groupes homogènes (Newman-Keuls) de l'étude de la concentration de lactosérum sur la production de la pullulanase

	<b>Production</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>
20	1501,597	****				
40	2301,993		****			
60	3316,160			****		
80	4698,499				****	
100	6328,197					****

#### 4. Etude de la production de l'alpha amylase des levures sélectionnées sur différents milieux

**Tableau 8:** ANOVA Factorielle de l'effet de différents milieux sur la production de l'alpha-amylase

	SC	DDL	MC	F	p
<b>ord. origine</b>	2,734565E+09	1	2,734565E+09	63287,37	0,00
<b>Souche</b>	4,028363E+08	11	3,662148E+07	847,55	0,00
<b>Substrat</b>	2,688147E+08	2	1,344074E+08	3110,66	0,00
<b>Souche*Substrat</b>	6,055577E+07	22	2,752535E+06	63,70	0,00
<b>Erreur</b>	3,111026E+06	72	4,320869E+04		

**Tableau 9:** Groupes homogènes (Newman-Keuls) de l'effet de différents milieux sur la production de l'alpha-amylase

	Souche	Substrat	Production de l'alpha-amylase	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
11	L4	Amid	1343,950	***									
				*									
5	L2	Amid	1376,630	***									
				*									
2	L1	Amid	1399,970	***									
				*									
23	L8	Amid	1446,667	***									
				*									
26	L9	Amid	1499,577	***									
				*									
32	L11	Amid	2456,660		**								
					**								
8	L3	Amid	2559,120		**	**							
					**	**							
12	L4	Lacto-amid	2771,840		**	**							
					**	**							
4	L2	Lacto	2820,090		**	**							
					**	**							
24	L8	Lacto-amid	2821,640		**	**							
					**	**							
6	L2	Lacto-amid	2840,320		**	**							
					**	**							
3	L1	Lacto-amid	2852,767		**	**							
					**	**							
10	L4	Lacto	2871,440		**	**							
					**	**							
22	L8	Lacto	2961,720		**	**							
					**	**							
1	L1	Lacto	3018,990			**							
						**							

35	L12	Amid	3879,590	**			
				**			
17	L6	Amid	4256,657		**		
					**		
29	L10	Amid	4450,597		**		
					**		
14	L5	Amid	4505,997		**		
					**		
20	L7	Amid	4527,395		**		
					**		
31	L11	Lacto	6583,330		**		
					**		
33	L11	Lacto- amid	6885,233		**	**	
					**	**	
7	L3	Lacto	7096,900			**	
						**	
16	L6	Lacto	7236,977			**	
						**	
13	L5	Lacto	7610,500				**
							**
28	L10	Lacto	7881,300			**	**
						**	**
34	L12	Lacto	7883,670			**	**
						**	**
19	L7	Lacto	7890,329			**	**
						**	**
25	L9	Lacto	7928,040			**	**
						**	**
30	L10	Lacto- amid	7978,899			**	**
						**	**
18	L6	Lacto- amid	8063,400			**	**
						**	**
36	L12	Lacto- amid	8087,800			**	**
						**	**
9	L3	Lacto- amid	8105,420			**	**
						**	**
27	L9	Lacto- amid	8194,397				**
							**
15	L5	Lacto- amid	8404,307				**
						**	**
21	L7	Lacto- amid	8656,370				**
							**

## 5. Etude de la production de la pullulanase des levures sélectionnées sur différents milieux

**Tableau 10** : ANOVA Factorielle de l'effet de différents milieux sur la production de la pullulanase

	SC	DDI	MC	F	p
<b>ord. origine</b>	2,219495E+09	1	2,219495E+09	3190,722	0,000
<b>Souche</b>	3,145912E+08	11	2,859920E+07	41,114	0,000
<b>Substrat</b>	1,828504E+08	2	9,142520E+07	131,432	0,000
<b>Souche*Substrat</b>	8,066626E+07	22	3,666648E+06	5,271	0,000
<b>Erreur</b>	5,008385E+07	72	6,956090E+05		

**Tableau 11** : Groupes homogènes (Newman-Keuls) de l'effet de différents milieux sur la production de la pullulanase

Souche	Substrat	Production	1	2	3	4	5	6	7	8	9
<b>de la pullulanase</b>											
5	L2	Amid	1076,627	****							
2	L1	Amid	1099,697	****							
23	L8	Amid	1146,667	****							
26	L9	Amid	1192,913	****							
10	L4	Lacto	2071,330	****	****						
12	L4	Lacto-amid	2134,000	****	****						
32	L11	Amid	2156,660	****	****						
8	L3	Amid	2259,000	****	****	****					
24	L8	Lacto-amid	2344,997	****	****	****					
22	L8	Lacto	2543,657	****	****	****					
6	L2	Lacto-amid	2611,997	****	****	****					
4	L2	Lacto	3018,157	****	****	****	****				
1	L1	Lacto	3519,993		****	****	****	****			
35	L12	Amid	3579,597		****	****	****	****			
3	L1	Lacto-amid	3744,995		****	****	****	****			

29	L10	Amid	3754,497	****	****	****	****		
11	L4	Amid	3895,450	****	****	****	****		
17	L6	Amid	3956,660	****	****	****	****		
14	L5	Amid	4056,993	****	****	****	****		
20	L7	Amid	4205,995	****	****	****	****		
7	L3	Lacto	4234,600	****	****	****	****		
9	L3	Lacto-amid	4576,600		****	****	****		
31	L11	Lacto	5282,993			****	****	****	****
33	L11	Lacto-amid	5452,263				****	****	****
13	L5	Lacto	6842,220				****		****
16	L6	Lacto	6936,980				****	****	****
25	L9	Lacto	6978,497				****	****	****
15	L5	Lacto-amid	7345,499					****	****
18	L6	Lacto-amid	7363,399					****	****
34	L12	Lacto	7377,997				****	****	****
36	L12	Lacto-amid	7481,100					****	****
28	L10	Lacto	7551,597					****	****
27	L9	Lacto-amid	7567,661					****	****
19	L7	Lacto	7610,493					****	****
30	L10	Lacto-amid	8022,998						****
21	L7	Lacto-amid	8204,310						****

## 6. Optimisation des enzymes immobilisées

**Tableau 12:** Analyse de la variance pour  $\alpha$ - amylase et pour la pullulanase

Source	Somme des carrés	DDL	Moyenne quadratique	F	Probabilité.
<b><math>\alpha</math>- amylase</b>					
A:Alginate	35608,5	1	35608,5	2,95	0,1466
B:Enzyme	111017,	1	111017,	9,20	<b>0,0290</b>
C:pH	146741,	1	146741,	12,15	<b>0,0175</b>
AA	234374,	1	234374,	19,41	<b>0,0070</b>
AB	6549,66	1	6549,66	0,54	0,4945
AC	12048,4	1	12048,4	1,00	0,3637
BB	185778,	1	185778,	15,39	<b>0,0112</b>
BC	4739,63	1	4739,63	0,39	0,5584
CC	12647,9	1	12647,9	1,05	0,3530
Erreur totale	60364,7	5	12072,9		
<b>Pullulanase</b>					
Source	Somme des carrés	DDL	Moyenne quadratique	Rapport F	Probabilité
A:Alginate	68690, 9	1	68690, 9	13,27	<b>0,0170</b>
B:Enzyme	110996,	1	110996,	0,92	0,5213
C:pH	239467,	1	239467,	19,01	<b>0,0011</b>
AA	169778,	1	169778,	14,19	<b>0,0117</b>
AB	6575,59	1	6575,59	0,55	0,4177
AC	67548,0	1	67548,0	0,564	0,1546
BB	253181,	1	253181,	16,21	<b>0,0018</b>
BC	4781,72	1	4781,72	9,61	<b>0,0241</b>
CC	1628,82	1	1628,82	0,40	0,662
Erreur Totale	91470,2	5	11966,5		
<b>Pour l'<math>\alpha</math>-amylase :</b>			<b>Pour la pullulanase :</b>		
$R^2 = 92, 2 \%$			$R^2 = 90,8 \%$		
$R^2$ (ajusté) = 78%			$R^2$ (ajusté) = 74%		

**Tableau 13:** Coefficients de régression pour l' $\alpha$  amylase et la pullulanase

Variables	Coefficient de régression	
	$\alpha$ -amylase	Pullulanase
constante	894,406	271,105
A:Alginate	118,566	126,077
B:Enzyme	351,53	401,715
C:pH	361,869	324,543
AA	-2,51945	-2,14433
AB	1,34883	1,3515
AC	-2,74412	-6,4975
BB	-24,9233	-29,0954
BC	-5,73708	-5,7625
CC	-14,6319	-5,25083

# **Publications et Communications**

## Liste des publications et des communications

### Publications

**Djekrif-Dakhmouche Scheherazed**, Bennamoun Leila, Ait Kaki Amel, Labani Kenza, Nouadri Tahar, Gheribi-Aoulmi Zoubida and Meraihi Zahia. An Optimization Study of  $\alpha$ -Amylase Production by *Aspergillus niger* ATCC 16404 Grown on Orange Waste Powder. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, **2016**, 07(03):123-132. DOI:10.4236/abb.2016.73011

Fatima-Zohra Kenza Labbani, Benedetta Turchetti, Leila Bennamoun, **Scheherazad Dakhmouche**, Rita Roberti, Lanfranco Corazzi, Zahia Meraihi and Pietro Buzzini. A novel killer protein from *Pichia kluyveri* isolated from an Algerian soil: purification and characterization of its in vitro activity against food and beverage spoilage yeasts. *Antonie van Leeuwenhoek*, **2015**, 107(4) : 961–970. DOI:10.1007/s10482-015-0388-4

**D. S. Djekrif** L. Gillmann, N. Cochet, L. Bennamoun, A. Ait-Kaki, K. Labbani, T. Nouadri and Z. Meraihi. Optimization of thermophilic pullulanase and  $\alpha$ -amylase production by amyolytic yeast. *International Journal of Microbiology research*, **2014**, 6 ( 2), :559-569.

A. Ait Kaki- El-Hadef El-Okki, H. Leghlimi, **S. Dakhmouche**, L. Bennamoun et Z. Meraihi. Utilisation de la planification expérimentale pour l'optimisation de la production de l'  $\alpha$  - amylase par *Rhizopus oryzae*. *Rev. Microbiol. Ind. San et Environn.*, **2012**, 6, (1) : 1-17.

Tahar Nouadri, Zahia Meraihi, **Djekrif-Dakhmouche Shahrazad** and Bennamoun Leila Purification and characterization of the  $\alpha$ -amylase isolated from *Penicillium camemberti* PL21. *African Journal of Biochemistry Research*, **2010**, 4(6) :155-162

**Scheherazad Djekrif-Dakhmouche**, Louisa Gillmann., Monique Saunier et Meraihi Z. Production d'une  $\alpha$ -amylase thermostable par culture mixte de microorganismes. 15ème Colloque National de la Recherche en IUT | CNRIUT **2009** - Lille - Les 8, 9 et 10 Juin 2009 online at <http://cnriut09.univlille1.fr/articles/Articles/Fulltext/206a.pdf>

**Djekrif Dakhmouche S.**, Gheribi Aoulmi Z., Meraihi Z. and Bennamoun L. Application of a statistical design to the optimization of culture medium for alpha-amylase production by *Aspergillus niger* ATCC 16404 grown on orange waste powder. *Journal of Food Engineering*, **2006**, 73: 190- 197.

Nouadri Al-Taher, Meraihi Z And **Djekrif Dakhmouche S.** Optimization of medium components for the production of alpha-amylase by *Penicillium camemberti* PL21. *The Arab Journal Of Laboratory Medicine*, **2005**, 31 (3) : 441-449.

Bennamoun L, Meraihi Z. and **Djekrif Dakhmouche S.** Utilisation de la planification expérimentale pour l'optimisation de la production de l'alpha-amylase par *Aspergillus oryzae* Ahlburg (Cohn) 1042.72 cultivé sur un milieu à base de déchets d'oranges. *Journal of Food Engineering*, **2004**, 64: 257-264.

## Communications

- **Communication orales**

**Dakhmouche Djekrif Scheherazed**, Gillmann Louisa and Meraihi Zahia. Immobilization of a thermostable  $\alpha$ -amylase produced by *Clavispora lusitaniae*. 17<sup>ème</sup> Journées Nationales de Microbiologie, Sétif, 20 et 21 novembre **2011**.

Ait Kaki -El-Hadef El Okki -A. Leghlimi H., **Dakhmouche C.**, Bennamoun L. Et Meraihi Z. Utilisation de la planification expérimentale pour l'optimisation d'un milieu de fermentation à base de farine de dattes déclassées pour la production d'alpha amylase thermostable. 17<sup>ème</sup> Journées Nationales de Microbiologie, Sétif, 20 et 21 novembre **2011**.

**Dakhmouche Sc.**, Gillmann L., Meraihi Z., Saunier Monique and Pascal Richomme Optimisation de la production de l' $\alpha$ -amylase levurienne. 16<sup>ème</sup> CNR-IUT **2010** d'Angers, 9-10 juin France.

**Djekrif Dakhmouche Scheherazed**, Gillmann Louisa and Meraihi Zahia. Optimization of media conditions for the production of extracellular  $\alpha$ -amylase by *Clavispora lusitaniae*/ Biotech World 2010 2<sup>ème</sup> Colloque International en Biotechnologie, 26-29 April, **2010**, Oran Algérie.

**Dakhmouche Djekrif S.**, Gillmann L. and Meraihi Z. Identification par PCR de souches levuriennes amylolytiques isolées de blé stocké dans des zones arides. Séminaire International de Biochimie et de Biotechnologie moléculaire, 13-14 Octobre **2009** à Constantine Algérie

T. Nouadri, **S. Dakhmouche** Djekrif, Z. Meraihi and L. Bennamoun. Immobilization of  $\alpha$ -amylase produced by *Penicillium camemberti* PL21. Séminaire International de Biochimie et de Biotechnologie moléculaire, 13 -14 Octobre **2009**, Constantine, Algérie.

**Scheherazad Djekrif-Dakhmouche**, Louisa Gillmann., Monique Saunier Et Meraihi Z. Production d'une  $\alpha$ -amylase thermostable par culture mixte de microorganismes. 15<sup>ème</sup> CNR-IUT **2009** de Lille, 8-10 juin France.

Bennamoun L, **Dakhmouche S.**, Ait Kaki A., Leghlimi H, Nouadri T. Et Meraihi Z. Utilisation de la poudre de déchets de dattes comme substrat de fermentation pour la production de l' $\alpha$ -amylase d'intérêt industriel. Séminaire International intitulé : La biotechnologie au service du secteur Agroalimentaire, le 17 et 18 juin **2008**, Université Saad Dahleb, Blida.

**Djekrif Dakhmouche S.**, Bennamoun L., Nouadri T., Ait Kaki A., Leghlimi H et Meraihi Z. Production d' $\alpha$ -amylase d'une culture mixte : *Aspergillus niger* et *Rhodotorula sp.* isolés à partir du blé. 1<sup>ères</sup> journées d'étude sur les biotechnologies au service de l'industrie agroalimentaire, Constantine le 11 et 12 novembre **2006**.

Bennamoun L, **Dakhmouche S.**, Gheribi Z., Leghlimi H, Ait Kaki A et Meraihi Z. Revalorisation de déchets d'oranges pour la production de l'alpha-amylase d'*Aspergillus oryzae* Ahlburg

(Cohen) 1042.72. 1<sup>ères</sup> journées d'étude sur les biotechnologies au service de l'industrie agroalimentaire, Constantine le 11 et 12 novembre **2006**.

Leghlimi H, Meraihi Z, **Dakhmouche S**, Bennamoun L. et Ait Kaki A. Détermination des optima des facteurs sélectionnés pour l'optimisation pour la production de la cellulase d'*Aspergillus niger* ATCC 16404 cultivée sur un milieu à base de lactosérum  
1<sup>ères</sup> journées d'étude sur les biotechnologies au service de l'industrie agroalimentaire, Constantine le 11 et 12 novembre **2006**.

Leghlimi H, **Dakhmouche D. S.**, Bennamoun L., Ait Kaki A. Et Meraihi Z, Optimisation De La production de La cellulase par la moisissure *Aspergillus niger* ATCC 16404 à partir d'un milieu à base de lactosérum. Xiii Journées Nationales De Microbiologie, Constantine, 21 et 22 Novembre **2006**.

Gheribi-Aoulmi Z., **Djekrif-Dakhmouche S.**, Bennamoun L. et Meraihi Z. Utilisation des plans factoriels fractionnés pour la modélisation et l'optimisation de la production d'alpha amylase par *Aspergillus niger* ATCC 16404 cultivé sur poudre de déchets d'oranges. Séminaire sur la statistique et ses applications à Tizi-Ouzou, 29-30 mai **2006**.

**Djekrif Dakhmouche S.**, Meraihi Z. , Bennamoun L., Nouadri T., Ait Kaki A. et Leghlimi H. Optimisation de la production de l'alpha-amylase d'une culture mixte par *Aspergillus niger* et *Rhodotorula sp* cultivés sur le lactosérum. 1<sup>er</sup> Séminaire International sur l'Environnement et ses Problèmes Connexes (SIEPC'2005- Béjaia du 05 au 07 juin **2005**.

El Hadeif El Okki A., **Djekrif Dakhmouche S.**, Bennamoun L., Leghlimi H et Meraihi Z. Valorisation et optimisation du lactosérum pour la production de l'alpha-amylase par *Rhizopus oryzae*. 1<sup>er</sup> Séminaire International sur L'environnement et ses problèmes connexes (SIEPC'2005- Béjaia du 05 au 07 juin **2005**.

Leghlimi H., Meraihi Z., **Djekrif Dakhmouche S.**, Bennamoun L. et Ait Kaki A. Etude de la stabilité thermique de la cellulase d'*Aspergillus niger* ATCC 16404 et *Aspergillus niger* O.Z. 3<sup>ème</sup> Journées de Microbiologie Appliquée. Béjaia 15 -16 novembre **2005**.

Leghlimi H, Meraihi Z. , Bennamoun L., Nouadri T., Ait Kaki A et **Djekrif Dakhmouche S**. Production d'alpha-amylase d'une culture mixte : *Aspergillus niger* et *Rhodotorula sp*. Isolés du blé. 3<sup>ème</sup> Journées de Microbiologie Appliquée. Béjaia 15 -16 novembre **2005**.

**Dakhmouche Djekrif S.**, Purification de l'alpha-amylase d'*Aspergillus niger* ATCC 16404 : Etude de ses propriétés physico-chimiques et de ses paramètres cinétiques. Passerelle Biologique et Ecologique, Batna 19 Mai **2004**.

Bennamoun L., Meraihi Z., **Dakhmouche S.** et Nouadri T. Utilisation de la planification expérimentale pour l'optimisation de la production de l'alpha-amylase d'*Aspergillus oryzae* Ahlburg (Cohen) 1042.72. Journées Scientifiques de Biotechnologie, Sétif 28 – 30 avril **2003**.

**Dakhmouche Sc.**, Bennamoun L., Meraihi Z., Mechakra A. Production d'alpha-amylase par *Aspergillus niger* ATCC 16404 à partir de poudre de déchets d'oranges. Optimisation du milieu de culture. **XII Journées Nationales de Microbiologie**. Constantine 10 - 11 avril **2000**.

- **Communication écrites**

Ait Kaki A., **Dakhmouche C.**, Bennamoun L. & Meraihi Z. Valorisation de déchets de dattes pour la production de l' $\alpha$ -amylase fongique. Séminaire International de Biotechnologies Constantine 19,20 et 21 Octobre 2015.

Leila Bennamoun, **Scheherazad Dakhmouche**, Fatima Zohta Kenza Lbbani, Ait-Kaki Amel Tahar Nouadri, Benedetta Tuechetti, Pietro Buzzini Philippe Thonart Utilization of by-products of tomato manufacturing for producing polygalacturonase by a strain of *Aureobasidium pullulans* isolated from saharian soil. ISSY 32 nd international specialized symposium on yeasts. Perugia, Italy, september 13-17, **2015**.

**Djekrif Dakhmouche S.**, Gillmann L., Cochet N., Bennamoun L., Aitkaki A., Labbani K., Nouadri T. and Meraihi Z. Thermophilic pullulanase and  $\alpha$ -amylase production by amyolytic yeast. Premier Congrès International de Biotoxicologie et Bioactivités, 26-27 nov. **2014** Oran (Algérie).

**Dakhmouche Djekrif Scheherazed**, Gillmann Louisa, Cochet Nelly, Saunier Monique, Kerkoud Mohamed and Meraihi Zahia. Amyolytic yeast identification in wheat seed from Algerian Sahara. World Biotechnology Congress, June 3-6, **2013**, Boston, USA.

Ait Kaki -El-Hadef El Okki A., **Dakhmouche C.**, Bennamoun L. et Meraihi Z. Etude de la contamination fongique du blé tendre local et imorté stocké au niveau de l'institut technique des grandes cultures (ITGC) de Constantine. 3<sup>ème</sup> Congrès Maghrébin sur les Toxi Infections Alimentaires TIA3- Constantine 2-4 avril **2013**.

Labbani F., Meraihi Z., Benaouida K., Leghlimi H., **Djekrif Dakhmouche S.**, Bennamoun L. et Meziani Z. Utilisation du lactosérum : déchet de l'industrie laitière, comme milieu de production de cellulase thermostable, voie alternative pour son recyclage. Conférence Nationale sur les Pollutions Industrielles et Environnement (CNIE-2011) (05 et 06 Juin **2011**, Skikda, Algérie).

Bennamoun L., **Djekrif Dakhmouche S.**, Ait Kaki A., Labbani F., Meraihi Z. Revalorisation de déchets de dattes pour la production de l' $\alpha$ -amylase d'intérêt industriel par *Aspergillus oryzae*. Conférence Nationale sur les Pollutions Industrielles et Environnement (CNIE-2011) (05 et 06 Juin **2011**, Skikda, Algérie).

Labbani F., Meraihi Z., K. Benaouida, , Leghlimi H., **Djekrif Dakhmouche S.** Bennamoun L. et Meziani Z. Production d'une cellulase thermostable par une levure *Sporobolomyces sp.* Isolée des milieux extrêmes (sources thermales, est algérien). Biotech World **2010** 2<sup>ème</sup> Colloque International en Biotechnologie, 26-29 April 2010 Oran Algérie.

Labbani Fatima-Zohra, Meraihi Zahia, Benaouida Karima, Leghlimi Hind, **Dakhmouche Scheherazad**, Bennamoun Leila & Meziani Zohra. Isolement de 5 souches levuriennes à partir des milieux extrêmes (sol de sources thermales) et la sélection d'une souche productrice de cellulase. 8<sup>ème</sup> Journées Biotechnologiques de l'Association Tunisienne de Biotechnologie (20 au 23 Décembre **2009**, Sousse, Tunisie).

Labbani F. Z. Kenza, Meraihi Zahia, Benaouida Karima, Leghlimi Hind, **Dakhmouche Scheherazad**, Bennamoun Leila & Meziani Zohra. Valorisation du lactosérum par la

production de cellulase thermostable à partir d'une souche levurienne cellulolytique (*Sporobolomyces sp.*) isolée des sources thermales. Colloque International de Biologie Environnementale (CIBE **2009**), 08-10 novembre, Skikda.

K. Benaouida, Meraihi Z., Labbani F., **Dakhmouche S.** Et Bennamoun L. Production d'une alpha amylase thermostable par *Schwanniomyces sp.* Séminaire International de Biochimie et de Biotechnologie moléculaire, 13 -14 Octobre **2009**, Constantine.

Ait Kaki -El-Hadef El Okki A., **Dakhmouche C.**, Bennamoun L., Leghlimi H. et Meraihi Z. Utilisation de la planification expérimentale pour l'optimisation de la production de l'amylase fongique sur un milieu à base de lactosérum. 1ères Journées Algéro-Tunisiennes de Microbiologie, organisées, Tebessa les 18 et 19 Mai **2008**.

Labbani F.Z. K; Meraihi Z., Benaouida K., Leghlimi H., **Dakhmouche Scheherazad**, Bennamoun Leila & Meziani Zohra. Caractérisation partielle d'une cellulase thermostable produite par *Sporobolomyces sp.*, isolée du sol des sources thermales (Algérie). 19<sup>ème</sup> Journées Biologiques de l'Association Tunisienne des Sciences Biologiques et 3<sup>ème</sup> Congrès International de Biotechnologie de l'Association Maghrébine de Biotechnologie (24-27 Mars **2008**, Hammamet Yasmine, Tunisie)

**Dakhmouche Djekrif S.**, Gillmann L., Saunier M. And Z. Meraihi. Etude de la production de l'alpha amylase par une co-culture *Aspergillus niger* et *Rhodotorula sp.* 14<sup>ème</sup> CNR-IUT **2008** de Lyon, France.

Labbani F.Z.K., Meraihi Z., Benaouida K., Leghlimi H., **Dakhmouche Scheherazad**, Bennamoun Leila & Meziani Zohra. Recherche de la cellulase thermostable de levures isolées d'écosystèmes extrêmes (sol de sources thermales). Production de l'enzyme sur lactosérum. Bio Tech World 2007, 24-25 novembre **2007** Oran Algérie.

**Djekrif Dakhmouche S.**, Bennamoun L., Nouadri T., Ait Kaki A., Leghlimi H et Meraihi Z. Purification de l' $\alpha$ -amylase d'une culture mixte d'*Aspergillus niger* et *Rhodotorula sp.* cultivés sur milieu à base du lactosérum. 1<sup>ères</sup> journées d'étude sur les biotechnologies au service de l'industrie agroalimentaire, Constantine le 11 et 12 novembre **2006**.

Bennamoun L., **Dakhmouche S.**, Leghlimi H., Ait Kaki A. et Meraihi Z. Purification partielle et étude de propriétés physico-chimiques de l'alpha amylase d'*Aspergillus oryzae* Ahlburg (Cohen) 1042.72. 1<sup>ères</sup> journées d'étude sur les biotechnologies au service de l'industrie agroalimentaire, Constantine le 11 et 12 novembre **2006**.

Leghlimi H., **Dakhmouche D. S.**, Bennamoun L., Ait Kaki A. Et Meraihi Z, Optimisation de la production de la cellulase par la moisissure *Aspergillus niger* ATCC 16404 à partir d'un milieu à base de lactosérum. Xiii Journées Nationales De Microbiologie, Constantine, 21 Et 22 Novembre **2006**

Leghlimi H., Meraihi Z., **Djekrif Dakhmouche S.**, Bennamoun L. et Ait Kaki A. Valorisation du lactosérum pour la production de la cellulase par la moisissure *Aspergillus niger* ATCC 16404. 1<sup>er</sup> Séminaire International sur L'environnement et ses problèmes connexes (SIEPC'2005- Béjaia du 05 au 07 juin **2005**.

**Djekrif Dakhmouche S.**, Meraihi Z., Bennamoun L., Nouadri T., Ait Kaki A. et Leghlimi H. Purification de l' $\alpha$ -amylase d'*Aspergillus niger* ATCC 16404 cultivé sur un milieu à base

de poudre de déchets d'oranges. Journées Scientifiques de Biotechnologie, Sétif 28 – 30 avril 2003.

Nouadri T., Meraihi Z., **Dakhmouche S.** Et Bennamoun L. Production de l' $\alpha$ -amylase par *Penicillium camemberti* PL21 cultivé sur un milieu à base de déchets d'orange. Cinétique de production et optimisation du milieu de culture. Journées Scientifiques de Biotechnologie, Sétif 28 – 30 avril 2003.

Ait Kaki A., Meraihi Z., **Djekrif Dakhmouche S.**, Bennamoun L. et Leghlimi H. Etude de la thermostabilité de l' $\alpha$ -amylase : critères de sélection de souches de *Rhizopus oryzae*. **Journées Scientifiques de Biotechnologie, Sétif 28 – 30 avril 2003.**

Leghlimi H., Meraihi Z., **Djekrif Dakhmouche S.**, Bennamoun L. et Ait Kaki A. Production et thermostabilité de la cellulase : étude comparative entre 2 souches de moisissures : *Aspergillus niger* ATCC 16404 et *Aspergillus niger* isolé localement. **Journées Scientifiques de Biotechnologie, Sétif 28 – 30 avril 2003.**

**Dakhmouche S.**, Arhab R., Ait Kaki B., Smati F. Etude de la prévalence des marqueurs sérologiques de l'hépatite virale B chez un groupe suspect. **Congrès International sur les Maladies Infectieuses.** Alger 12-14 mai 2001.

**Résumé :** Cette étude vise à produire deux enzymes amylolytiques ( $\alpha$ -amylase et pullulanase) thermostables par des levures contaminant le blé récolté dans des zones semi arides et arides (Biskra, Sahara, SUD Algérie) et capables d'hydrolyser à la fois, les liaisons  $\alpha$ -1-4 et  $\alpha$ -1-6 de polysaccharides comme l'amidon et le pullulane, molécules d'intérêt industriel. Après isolement et caractérisation de colonies levuriennes, la méthode de plate-test-agar permet d'isoler des souches amylolytiques et de montrer que la souche L7 est la plus performante dans la production enzymatique parmi une douzaine de souches de levures productrices d' $\alpha$ -amylase et de pullulanase thermostables. L'identification des souches, basée sur les caractères morphologiques, les tests biochimiques et la biologie moléculaire a permis de répartir la population comme suit : 50% *Clavispora lusitaniae* (forme anamorph *Candida lusitaniae*), 25%, *Pichia guilliermondii*, 8% *Pichia carribbica*, 8% *Meyerozyma guilliermondii* et 8% *Rhodotorula rubra*. Par sa richesse en amidon, le biotope du blé est favorable à la survie des levures amylolytiques. La majorité de ces souches, dont la souche L7, est productrice de pseudo ou vrai mycélium et est tolérante à certains paramètres comme la température, la salinité, les stress osmotique et éthanolique, La souche de levure L7 soit *Clavispora lusitaniae* ABS7 semble être la plus performante dans la production d'enzymes thermostables. Son identification moléculaire a montré deux bandes avec l'endonucléase HAE III alors que les autres souches de la même espèce de *Clavispora lusitaniae* (L5, L9, L10, L11 et L12) présentent une seule bande. En conditions optimales (agitation 136,56 rpm, température 54,14°C, amidon 2,66g/l, extrait de levure 0,365g/l, sels 8, 75ml/l et oligo-éléments 4,3ml/l en erlenmeyers de 250 ml), la production maximale atteint les valeurs suivantes : 13456,36±300 UI pour l' $\alpha$ -amylase et 12611, 6±154 UI pour la pullulanase. Ces performances sont en accord étroit avec la prédiction du modèle statistique évaluée à 13231UI pour l' $\alpha$ -amylase et 12825,5 UI pour la pullulanase. La production optimisée a pratiquement doublé par rapport à la production avant l'optimisation (6639,16 UI pour l' $\alpha$ -amylase et 6308,5 UI pour la pullulanase). En conditions optimales et en fermenteur de 2 L, la production maximale pour les deux enzymes de la levure *Clavispora lusitaniae* ABS7 est obtenue au bout de 28 h avec un optimum de croissance obtenu à 40 heures. La production des deux enzymes n'est donc pas associée à la croissance. La production maximale des deux enzymes s'effectue à pH 8. La cinétique est caractérisée par l'augmentation des glucides et une substance nappant la paroi du fermenteur, probablement un exopolysaccharide. Le profil chromatographique sur Séphacryl S200 révèle deux activités  $\alpha$ -amylasique et pullulanasiq ue éluées en même temps que le pic protéique. L'élu tion sur DEAE-cellulose confirme la présence des deux activités dans la même fraction. Les deux enzymes sont donc présentes sur la même molécule. L' $\alpha$ -amylase et la pullulanase sont purifiées avec un taux de purification de 50,5 et 44,6 respectivement et des rendements respectifs de 23,9% et 21,1%. L'extrait purifié montre une seule bande sur le gel de SDS-PAGE avec un poids moléculaire estimé à 75KDa et une activité amylolytique contenant à la fois les activités  $\alpha$ -amylasique (indépendante de  $Ca^{2+}$ ) et pullulanasiq ue (une métalloenzyme à calcium). La souche de la levure *Clavispora lusitaniae* ABS7 possède donc une enzyme amylolytique avec deux sites actifs. La CCM révèle une enzyme qui hydrolyse l'amidon en maltose et glucose et le pullulane en maltotriose, maltose et glucose, ce qui montre que l'enzyme est saccharifiante et correspond à une pullulanase de type II (amylopullulase). L'optimisation de l'immobilisation de l'enzyme a permis l'amélioration de l'activité:  $\alpha$ -amylasique à 4907,75 UI (rendement 72,3 %) et celle de la pullulanase à 4491,83 UI (rendement 70,1%) avec un pH optimum de 8,5. Il ressort de notre étude que l'amylopullulanase type II libre de *Clavispora lusitaniae* ABS7 est thermostable puisqu'elle résiste à un traitement thermique de 75°C pendant 3 heures d'incubation, et conserve 88% de son activité initiale. L'immobilisation a amélioré la thermostabilité des deux activités. Une incubation de 180 min à 85°C a permis de conserver sensiblement la même activité résiduelle pour les deux enzymes: 94,33% pour  $\alpha$ -amylase et 94,2 pour la pullulanase. Les performances des enzymes amylolytiques de cette souche de levure (isolée d'un environnement saharien aride) la qualifient de souche d'utilité industrielle en particulier dans les industries de l'amidon, du textile et des détergents puisque les enzymes alcalothermostables de *Clavispora lusitaniae* ABS7 ont démontré une excellente stabilité et une compatibilité avec les détergents à lessive commerciales.

**Mots Clé:**  $\alpha$ -amylase, pullulanase, levure, *Clavispora lusitaniae* optimisation, purification et immobilisation

**Jury :**

<b>Président:</b> Mr KHELIFI D.	Professeur, Université Frères Mentouri Constantine, Algérie.
<b>Directrice de Thèse:</b> Mme MERAIHI Z.	Professeur, Université Frères Mentouri Constantine, Algérie.
<b>Co-Directeur de Thèse:</b> Mr PAUSS A.	Professeur, UTC Compiègne, France.
<b>Examinatrice:</b> Mme COCHET N.	Professeur, UTC Compiègne, France.
<b>Rapporteur:</b> Mr BOUSSEBOUA H.	Professeur, et Directeur de l'E. N. B., Constantine, Algérie.
<b>Rapporteur:</b> Mr HADJ SASSI A.	M.C., Bordeaux (INP), (ENSCBP), France.
<b>Examinatrice:</b> Mme Gillmann L.	M.C., Université d'Angers, France.
<b>Examineur:</b> Mr NECIB Y.	Professeur Université Frères Mentouri Constantine, Algérie.