



N °Ref :.....

Centre Universitaire Abdelhafid Boussouf-Mila

Institut des Sciences de la Nature et de la Vie

Département des Sciences de la Nature et de la Vie

Mémoire préparé en vue de l'obtention du diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Biochimie Appliquée

Thème :

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

Présenté par :

- MEKIRED Rima
- BOULEKHLALEF Widad
- ZOUAGHI Rania

Devant le jury composé de :

Président:Dr.RIHANI Lamia

M.C.ACentre.Univ.A.Boussouf - Mila

Rapporteur:Dr. BENSERRADJ Ouafa

M.C.A Centre.Univ.A.Boussouf - Mila

Examinatrice:Dr.Ayad Wissam

M.C.BCentre.Univ.A.Boussouf- Mila

Année Universitaire : 2022/2023

Remerciements

Nous adressons nos remerciements, en premier lieu, à le bon Dieu pour la volonté, la santé, le courage et la patience qui nous a donné pour mener ce travail à terme.

Nous voudrions exprimer, par ce modeste travail, notre gratitude, notre reconnaissance, notre considération et les grands remerciements à notre encadreur Docteur BEN SERRADJ OUAFA d'avoir proposé, suivi et corrigé ce travail, nous vous remercier chaleureusement pour le savoir que vous nous avez enseigné.

Nous exprimons également nos remerciements aux membres du jury Dr RIHANI Lamia et KEDDACHE Lilia, pour avoir accepté d'examiner et de juger ce travail.

Nous remercions nos amis et tous ceux qui ont contribué à réaliser ce travail.

Rima, Rania et Widad

Dédicaces

*Avec tout mon amour éternel et avec l'intensité de mes émotions.
Je dédie ce travail à mon cher père **Salah**, pour ton amour, ton soutien et
ta stimulante fierté. Que Dieu te garde et te procure santé et longue
vie...*

*À la lumière de ma vie et l'espoir de mon existence, de celle qui m'a
indiqué la bonne voie en me rappelant que la volonté peut réaliser
l'impossible Ma mère **Radja**, que ce travail soit pour le témoignage de
mon infinie reconnaissance pour ton aide précieuse et toutes ces années
de compréhension. Pour tous les peines et les sacrifices qu'elle m'avait
consentis pour mon éducation. Que Dieu, le tout puissant, te donne
santé et longue vie.*

*À mes chers frères **Sifou et Didou***

*À ma chère sœur : **Sirrine***

*À mon encadreur Mme **BENSERRADJ Ouafa***

*A toutes mes chères amies **Khawla, Rania et widad**, j'espère que vos
rêves se réaliseront !*

*Je ne peux exprimer à travers ses lignes tous mes sentiments d'amour et
de tendresse envers vous. Je vous souhaite la réussite dans votre vie.*

Et tous ceux qui m'aiment et que j'aime

Je vous dis Merci !

Mekired Rima

Dédicaces

Avec tout mon amour éternel et avec l'intensité de mes émotions.

*Je dédie ce travail à mon cher père, **El Fatmi** pour ton amour, ton soutien et ta stimulante fierté. Que Dieu te garde et te procure santé et longue vie...*

*À la lumière de ma vie et l'espoir de mon existence, de celle qui m'a indiqué la bonne voie en me rappelant que la volonté peut réaliser l'impossible Ma mère, **Naima** que ce travail soit pour le témoignage de mon infinie reconnaissance pour ton aide précieuse et toutes ces années de compréhension. Pour tous les peines et les sacrifices qu'elle m'avait consentis pour mon éducation. Que Dieu, le tout puissant, te donne santé et longue vie. À mes chers frères **Imad** et **Ahmed***

*À ma chère sœur : **Fatima-Zohra (Khadidja)***

*A mon fiancé **Radwan** pour son soutien moral, sa générosité, sa patience et ses encouragements.*

*À mon encadreur Mme **Benserradj Ouafa**.*

*A mes très chères amies, **Rania, Rawna** et **Rima** pour tous les moments que nous avons partagés. A toute la famille **Boulakhlal** et **Nouar**.*

Je ne peux exprimer à travers ses lignes tous mes sentiments d'amour et de tendresse envers vous. Je vous souhaite la réussite dans votre vie.

Et tous ceux qui m'aiment et que j'aime

Je vous dis Merci ...

Widad Boulakhlal

Dédicaces

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

*À toi papa, **Mohamed Zouaghi** qui m'a toujours fait confiance et m'a
poussé à donner le meilleur de moi-même,*

*À toi maman, **Samia Meghzifi** qui m'a appris que la persévérance finie
toujours par payer et qui a toujours cru en moi et m'a offert la meilleure
des éducations*

*À mon frère, **Zizou** et à mes sœurs, **Rhima** et **Mina** qu'ils trouvent ici le
témoignage de ma profonde tendresse.*

*À mes très chères amies qui ont su arroser dans mon cœur la Joie et le
bonheur (**Widad, Rawnaq, Rima**)*

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

Rania Zouaghi

Liste des abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique.

ATP : Adénosine triphosphate.

B²⁺: Anion de bore.

Cd²⁺: Anion de cadmium.

Cl: Ion chlor.

Co²⁺: Anion de cobalt.

Cr⁺: Anion de chrome.

Cu²⁺: Anion de cuivre.

EC: Enzym Commission number.

Fe²⁺: Anion de fer binaire.

Fe³⁺: Anion de fer triangulaire.

H : lait de vache.

I : Ion d'iode.

K⁺: Anion de potassium.

L : petit lait.

Mg²⁺: Anion de magnésium.

Mo⁺: Anion de molybdène.

Mn²⁺: Anion de manganèse.

Ni²⁺: Anion de nickel.

PE : pectinestérase.

PGA : Acide poly galacturonique.

PPT : Pelure de pomme de terre.

R : Lait caillé.

YPG: Yeast Peptone Glucose.

YCB: Yeast Carbon Base.

YPMA: Yeast Peptone Strach Agar.

YPPA: Yeast Pepton Pectin Agar.

YPSA : Yeast Peptone Maltose Agar.

Zn²⁺ : Anion de zinc.

Liste des figures

Figure 01: Structure cellulaire des levures (Thuriaux, 2004).....	5
Figure 02: Reproduction des levures par bourgeonnement.(Jeffrey C.2012)	7
Figure 03: Schéma de la reproduction asexuée par scission d'une levure (Thuriaux,	7
Figure 04: Schéma de la reproduction sexuée d'une levure (Thuriaux, 2004)	8
Figure 05: Structure monomérique de l' α -amylase (Li et al., 2014).....	13
Figure 06: Mode d'action de l' α -amylase (Florimont, 2013).	14
Figure 07: Structure monomérique de la maltase liée à 4-O- α -D-Glucopyranosyl-Dglucose (C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁), chez <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Barker et al., 2013).....	16
Figure 08 : Petit lait.....	25
Figure 09 : Lait caillé	25
Figure 10 : pelure pomme de terre	25
Figure 11 : Lait de vache.....	25
Figure 12: Fréquence des souches levuriennes.	31
Figure 13: Couleur des isolats.....	33
Figure 14: Résultat du test de fermentation.	38
Figure 15: Résultat d'assimilation des substrats azotés.	39
Figure 16: Mise en évidence de α -amylase	42
Figure 17: Mise en évidence de la maltase	43
Figure 18: Mise en évidence de la protéase.	44

Liste des tableaux

Tableau 01: Les différentes classes d'enzymes	11
Tableau 02: Quelques levures productrices d' α amylase.....	14
Tableau 03: Applications industrielles de L' α amylase.....	15
Tableau 04: Exemples des protéases microbiennes (Belmessikh <i>et al.</i> , 2011).....	18
Tableau 05: Origine et codage des souches isolées.	32
Tableau 06: caractères cultureux des souches de levures isolées après une culture de 3 jours sur YPG à 30.	33
Tableau 07: caractères morphologiques des souches de levures isolées cultivées pendant 2 jours à 30°C dans YPG.....	35
Tableau 08: Résultats du test de fermentation de différents sucres par les isolats de levures ...	37
Tableau 09: Résultats du test d'assimilation des sources azotées des souches de levures isolée.	38
Tableau 10: Mise en évidence des activités enzymatiques des 7 souches de levures sélectionnées.....	41

Table des matières

<i>Introduction</i>	1
---------------------------	---

Revue bibliographique

Chapitre 1 : Généralités sur Les levures

1. Définition.....	4
2. Habitat	4
3. Morphologie	4
4. Besoins nutritionnels	5
5. Reproduction	6
5.1. La reproduction asexuée	6
5.1.1. Le processus de reproduction asexuée par bourgeonnement	6
5.1.2. La reproduction asexuée par scission.....	7
5.2. La reproduction sexuée	7
6. Classification des levures	8
7. Conditions physicochimiques de croissance des levures	8
8. Biotechnologie des levures	9

Chapitre 2 : Les enzymes

1. Définition.....	11
2. Classification	11
3. Origine des enzymes utilisées en biotechnologie	12
3.1. Amylase (EC 3.2.1.1).....	12
3.1.1. Définition	12
3.1.2. Structure	12
3.1.3. Origine microbienne de l'α-amylase	13
3.1.4. Mode d'action	14

3.1.5. Applications industrielles	15
3.2. Maltase (EC 3.2.1.20)	16
3.2.1. Définition	16
3.2.2. Structure de la maltase	16
3.2.3. Mode d'action	17
3.2.4. Applications industrielles	17
3.3. Protéase (EC 3.4.21-24)	18
3.3.1. Définition	18
3.3.2. . Origine microbienne de la protéase.....	18
3.3.3. Mode d'action de protéase	19
3.3.4. Applications industrielles	19
3.4. Pectinase (EC 3.2.1.15).....	20
3.4.1. Définition	20
3.4.2. Mode d'action	21
3.4.3. Origine microbienne de la pectinase	21
3.4.4. Applications industrielles	21

Matériel et méthodes

1. Echantillonnage	25
2. Isolement des levures.....	26
2.1. Milieu d'isolement	26
2.2. Préparation des solutions mère	26
2.2.1. Solution mère du lait	26
2.2.2. Solution mère du petit lait	26
2.2.3. Solution mère du lait caillé.....	26
2.2.4. Solution mère de pelure de pomme de terre.....	26
2.3. Préparation des dilutions	26
2.4. Méthode d'isolement	27

3. Purification et conservation des levures isolées	27
4. Identification des levures.....	27
4.1. Caractéristiques morphologiques.....	27
4.1.1. Aspect macroscopique (Aspects en milieu solide).....	27
4.2. Caractéristiques microscopiques.....	28
4.3. Caractéristiques physiologiques.....	28
4.3.1. Fermentation des sucres (méthode de Kluyver, 1974).....	28
4.3.2. Assimilation de substrats azotés.....	28
5. Mise en évidence des activités enzymatiques.....	28
5.1. Mise en évidence de l'activité α - amylasique	28
5.2. Mise en évidence de l'activité protéolytique	29
5.3. Mise en évidence de l'activité Pectinolytique	29
5.4. Mise en évidence de l'activité Maltasique.....	29

Résultats et Discussion

1. Isolement des levures.....	31
2. Identification des levures.....	32
2.1. Caractéristiques morphologiques.....	33
2.1.1. Aspects macroscopiques (aspects au milieu solide).....	33
2.1.2. Caractéristiques microscopiques	35
2.2. Caractéristiques physiologiques.....	37
2.2.1. Fermentation des sucres	37
2.2.2. Assimilation des substrats azotés	38
3. Mise en évidence des activités enzymatiques.....	39
3.1. Screening des souches productrices de l' α -amylase	41
3.2. Screening des souches productrices de la maltase	43
3.3. Screening des souches productrices de la protéase.....	44
3.4. Screening des souches productrices de la pectinase	45

Conclusion et perspectives..... 47

Références bibliographiques..... 49

Annexes

Abstract

المخلص

Résumé

Introduction

Les enzymes, substances vitales dans le système biologique, ont été exploitées depuis l'Antiquité pour la production d'alcool ainsi que pour d'autres boissons (**Singh et al.,2016**).

Elles sont actuellement utilisées dans plusieurs applications industrielles : dans l'industrie des détergents, des papiers, de textile, de brasserie, dans l'industrie alimentaire, etc. (**Admasu et al.,2015**).

Ainsi, les enzymes produites à grande échelle sont principalement des enzymes extracellulaires qui dégradent des polymères naturels tels que les amidons, les pectines, les celluloses et les protéines (**Bouhadi, 2016**).

Ces dernières années, l'utilisation des microorganismes comme source biotechnologique des enzymes d'importance industrielle a stimulé l'intérêt pour l'exploration des activités enzymatiques extracellulaires (**Admasu et al., 2015**).

Par ailleurs, les enzymes produites par les levures sont de plus en plus utilisées dans différentes industries, et la recherche de nouvelles enzymes synthétisées par ces microorganismes possédant un potentiel d'application industrielle ne cesse de se développer(**Johnson et Echavarri-Erasum, 2011**).Aujourd'hui, plusieurs espèces de levures sont explorées pour des applications industrielles. En effet, ce sont des acteurs essentiels intervenant dans divers domaines et l'intérêt qu'elles suscitent aujourd'hui est dû à leur grande diversité (**Boulal et al., 2016**). De plus, l'état unicellulaire, la capacité à se multiplier rapidement et la rusticité des exigences nutritionnelles confèrent à ces eucaryotes des qualités qui permettent de les cultiver, de les étudier et de les utiliser aussi facilement que des microorganismes procaryotes (**Pol, 1999**).D'autre part, un grand nombre de levures communément utilisées en biotechnologie a été obtenu à partir d'habitats naturels où développer une faculté d'adaptation à un grand nombre de niches écologiques grâce à leurs propriétés physiologiques caractéristiques.

C'est dans ce contexte que s'intègre le présent travail dans lequel des levures ont été isolées à partir des pelures de pomme de terre, lait, lait caillé et petit lait afin d'évaluer leur capacité à produire de certaines activités enzymatiques d'intérêt biotechnologique à savoir: l' α -amylase, la maltase, la pectinase et la protéase.

Le présent mémoire est divisé en quatre chapitres. Le premier présente une généralité sur les levures et le deuxième apporte généralités sur les enzymes ainsi que leurs applications biotechnologiques.

Le et troisième chapitre est consacré aux matériel et méthodes utilisés pour réaliser ce travail.

Le quatrième chapitre représente et discute les résultats obtenus.

Revue bibliographique

Chapitre 1 : Généralité sur les levures

1. Définition

Les levures sont des champignons microscopiques, unicellulaires, se multipliant par bourgeonnement (blastospores) et produisant parfois du mycélium ou du pseudomycélium. Comme tous les champignons se sont des organismes hétérotrophes :ils ne peuvent se développer qu'en présence de matières organiques préformées. (**jean et al., 2010**).

Les levures ont une importance commerciale pour les humains parmi celles-ci *saccharomyces cerevisiae* qui est la plus remarquable pour son rôle dans l'industrie alimentaire comme levure de boulanger, levure fourragère, pour production de bière, de vin et de spiritueux (**Eman, 2021**). Leur reproduction se fait selon un mode asexué mais aussi sexué dans certaines conditions(**Pierre, 2004**).

2. Habitat

Les levures ne sont pas aussi omniprésentes que les bactéries dans l'environnement naturel. Mais pourtant, elles peuvent être isolées du sol, des produits laitiers, des insectes, de l'eau et des animaux. Les habitats de levure préférés sont les tissus végétaux (fruits, feuilles). Mais quelques espèces se trouvent en relation commensale ou parasitaire avec les animaux. Plusieurs espèces de levures peuvent être isolées de l'environnement spécialisé ou extrême, telles que celles avec un faible potentiel d'eau (concentration élevée de sucre ou de sel), une basse température (certaines levures psychrophiles ont été isolées des régions polaires) et une faible disponibilité en oxygène (**Walker, 2009**).

3. Morphologie

Les levures ont des formes variées, elle est sphérique, ovoïde, globuleuse, cylindrique, ellipsoïde, allongée, apiculée, ogivale, triangulaire ou forme de bouteille (**Walker, 2009 ; Kutzman et al., 2010**). Mais ces formes peuvent se modifier assez largement selon les étapes du cycle biologique et en fonction des conditions du milieu (**Bocquet, 1993**). La cellule de levure est typiquement eucaryote, caractérisée par une paroi cellulaire rigide entourant une membrane plasmique, un noyau limité par une membrane nucléaire, un cytoplasme contenant divers organites dont les mitochondries et une vacuole (**Fig 01**). (**Thuriaux, 2004**).

Les levures généralement comprises entre 4 et 5µm de large sur 5 à 9µm de long, varie beaucoup dans une même espèce d'une cellule à l'autre. Les levures sont en effet très

polymorphes et capables d'affecter des formes et des dimensions sensiblement différentes, suivant le milieu où on les cultive et suivant leur âge. (Alexandre, 1912).

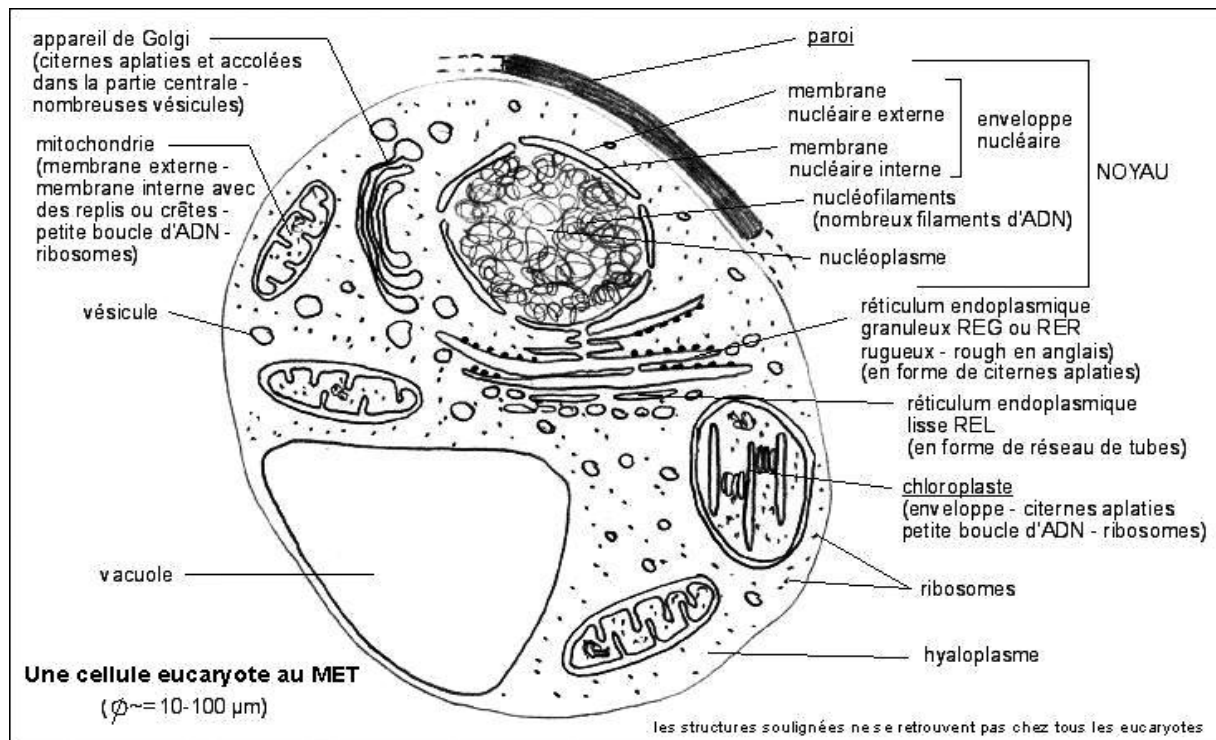


Figure 01: Structure cellulaire des levures (Thuriaux, 2004).

4. Besoins nutritionnels

Le milieu de culture doit apporter tous les éléments nécessaires à la croissance et aux besoins énergétiques de la levure. La biomasse est composée principalement d'eau et des éléments CHON (carbone, hydrogène, oxygène, azote) ; le milieu doit donc fournir ces éléments pour permettre la croissance.

Les besoins des levures pour leur croissance sont les suivants :

➤ L'eau

Constituant essentiel des organismes vivants, les levures sont constituées de 75 % d'eau et 25 % de matière sèche (Russell, 2003).

➤ Source de carbone

Le carbone représente environ 50 % du poids sec de la levure. Les glucides simples (monosaccharides, disaccharides et trisaccharides) sont fermentescibles par les levures (Leveau et Bouix, 1993).

➤ **Oxygène**

En anaérobiose strict, le milieu doit être complété avec des stérols et des acides gras insaturés, qui entrent dans la composition de la membrane et ne peuvent être synthétisés par la levure qu'en présence d'une source d'atome d'oxygène (**Kappeli et Sonnleitner, 1986 ; Russell, 2003**).

➤ **Source d'azote**

Les levures contiennent 10% environ d'azote, entrant dans la composition des acides aminés, des acides nucléiques et de certaines vitamines. Il est apporté par le milieu de culture sous la forme de sels d'ammonium (phosphate, sulfate, chlorure et nitrate) (**Leveau et Bouix, 1993**).

➤ **Vitamines**

Ce sont des régulateurs et des cofacteurs importants des voies métaboliques. Elles agissent généralement comme coenzymes ou précurseurs d'enzymes (**Rose et Harrison, 1971 ; Russell, 2003**).

➤ **Oligoéléments (ions inorganiques)**

Les oligoéléments sont nécessaires à une croissance et une fermentation optimale. Il est possible de distinguer les macroéléments : K^+ , Mg^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , Mn^{2+} , Cl^- dont la concentration nécessaire varie entre 0,1 et 1mM et les micro-éléments : Co^{2+} , B^{2+} , Cd^{2+} , Cr^+ , Cu^{2+} , I^- , Mo^+ , Ni^{2+} pour lesquels une concentration de 0,1 à 100 μ M est suffisante (**Russell, 2003**).

5. Reproduction

Les levures sont classées en deux catégories en fonction de leur mode de reproduction : les levures sporogènes et les levures esporogènes. Les levures sporogènes sont capables de se reproduire à la fois de manière sexuée et asexuée, en fonction des conditions environnementales. D'un autre côté, les levures esporogènes se reproduisent exclusivement de manière asexuée, indépendamment des conditions environnementales.

5.1. La reproduction asexuée

Les levures varient en fonction de l'espèce et peuvent se produire par bourgeonnement ou par scission. Cette multiplication végétative permet à la levure de se reproduire sans l'intervention de gamètes ou de fusion de cellules reproductrices.

5.1.1. Le processus de reproduction asexuée par bourgeonnement

Ce processus implique que le noyau de la cellule se déplace vers la paroi, étire et se divise, créant ainsi un petit bourgeon à la surface de la cellule. Le bourgeon se développe

rapidement pour former une cellule fille, qui peut rester attachée à la cellule mère ou se détacher pour commencer son propre processus de bourgeonnement (Fig 02).

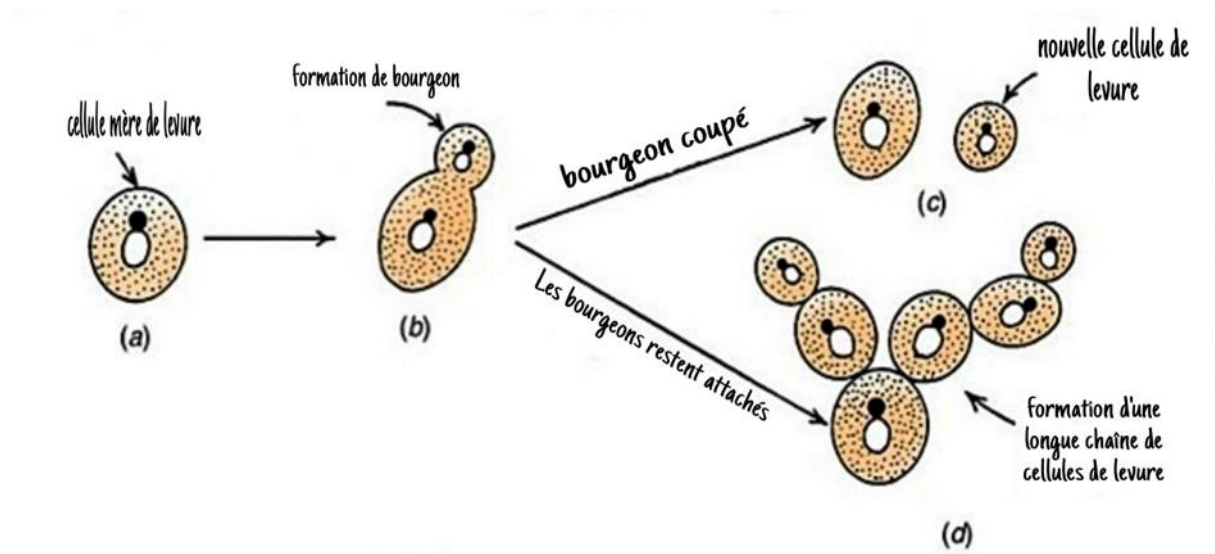


Figure 02: Reproduction des levures par bourgeonnement. (Jeffrey, C .2012).

5.1.2. La reproduction asexuée par scission

Également appelée scissiparité, implique que le noyau de la cellule s'étire et se divise en deux parties distinctes. En même temps, une séparation se produit au niveau de la paroi cellulaire, entraînant ainsi la formation de deux cellules distinctes (Fig 03).

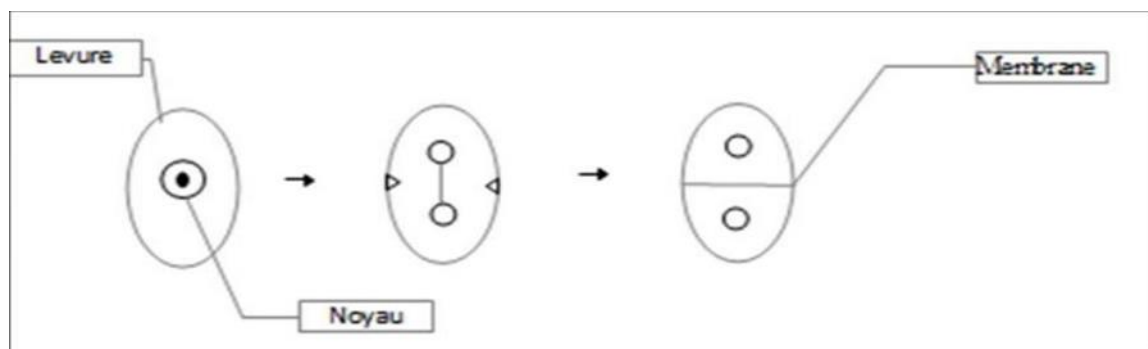


Figure 03:Schéma de la reproduction asexuée par scission d'une levure (Thuriaux, 2004).

5.2. La reproduction sexuée

Se produit lorsque les conditions environnementales deviennent défavorables, comme en cas de températures extrêmes ou d'absence d'éléments nutritifs. Dans ce cas, la levure cesse de se reproduire et commence à produire des ascospores. Le noyau de la cellule subit alors deux divisions successives, et chaque noyau fils est entouré de cytoplasme pour former une structure appelée asque. À l'intérieur de chaque asque, on peut trouver de 2 à 4 ascospores, qui sont en

état de vie ralentie et ne redeviennent actives que lorsque les conditions environnementales s'améliorent. Les ascospores sont donc un moyen pour les levures de survivre en période de mauvaises conditions environnemental (**Fig 04**).

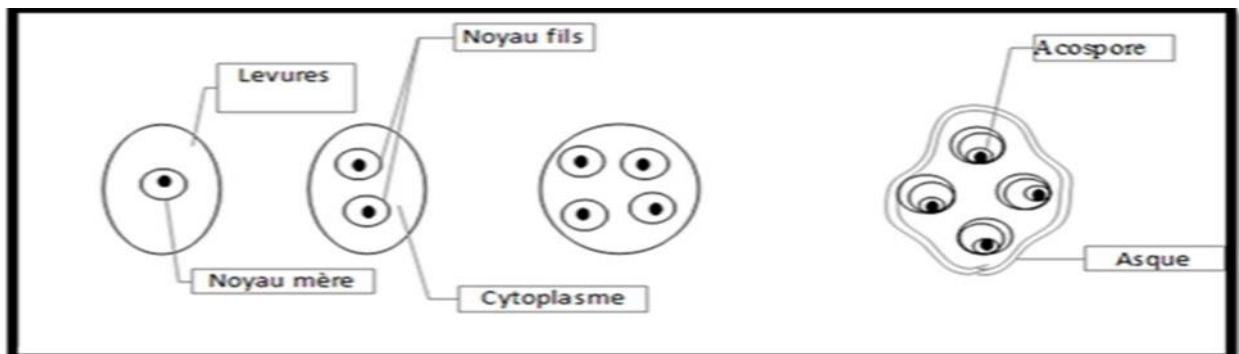


Figure 04: Schéma de la reproduction sexuée d'une levure (**Thuriaux, 2004**)

6. Classification des levures

La classification des levures est une partie essentielle de la classification des champignons, et elle repose sur des caractéristiques morphologiques ainsi que sur de nombreux traits biochimiques (**Guiraud, 2003**).

La classification référence actuelle est celle de (**kreger- ven, 1984**) qui diffère considérablement de la classification précédente de (**lodder, 1971**). La nouvelle classification intègre de nouveaux critères taxonomiques tel que la composition en base de l'ADN, la structure de la paroi, le type de coenzyme Q pour permettre des études plus rigoureuses. Les levures représentent un groupe hétérogène avec environ 60 genres et près de 500 espèces (**Bouix et Leveau, 1991**). Elles sont divisées en trois grandes classes, les Ascomycètes, les Basidiomycètes et les Deutéromycètes :

- ✓ **Les Ascomycètes** : se reproduisent sexuellement dans un asque issu d'une cellule après méiose.
- ✓ **Les Basidiomycètes** : réalisent une reproduction sexuée avec formation de basidiospores sur une baside.
- ✓ **Les Deutéromycètes** : regroupent l'ensemble des levures qui ne présente pas de mode connu de reproduction sexuée, ne se multipliant que par reproduction végétative.

7. Conditions physicochimiques de croissance des levures

➤ L'Oxygène

Les levures sont des organismes essentiellement aérobies, il n'y a pas des levures anaérobies stricts. Certaines levures sont aérobies stricts comme les *Rhodotorula*. Les autres sont aéro-

anaérobies facultatives préférant un métabolisme fermentaire (comme les *saccharomyces*) ou respiratoire (comme les *candida* ...) (**Bouis et Leveau, 1991**).

➤ **La température**

La température habituelle de culture des levures se situe entre 25 et 30°C, pour assurer la croissance adéquate de la plupart des levures (**Bourgeois et Larpent, 1996**). En effet, on trouve :

- Levures mésophiles qui poussent de 20 à 35°C.
- Levures tolérantes à la chaleur qui poussent de 38 à 42°C.
- Levures thermophiles qui poussent de 38 à 45°C (il s'enrichi de 30 à 40 des acides gras saturés).
- Levures psychrophiles qui poussent dans la gamme de -1 à 20°C, il est enrichi par 90 des acides gras insaturés et contient 50 d'acide linoléique C18 : 3

➤ **Le pH**

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

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

En règle générale, la croissance de la plupart des souches nécessite une activité de l'eau inférieur de 0,90. Cependant, les levures ont tendance à mieux résister à la pression osmotique que les bactéries, en accumulant des polyols tels que la bétaine et glycérol, qui agissent comme des osmoprotecteurs. Cela signifie que certaines espèces de levures sont capables de survivre dans des conditions osmotiquement stressantes, mais avec un métabolisme plus lent. Ces levures sont appelées xélotolérantes (**Bourgeois et Larpent, 1996**).

8. Biotechnologie des levures

Effectivement, les levures sont des microorganismes unicellulaires qui ont été utilisées par l'homme depuis des millénaires pour leurs propriétés de fermentation. Les levures ont un rôle important dans la production de nombreux produits alimentaires tels que la bière ; le vin, le pain, le fromage, les yaourts et les produits de charcuterie.

Elles sont également utilisées dans l'industrie pharmaceutique pour la production d'antibiotiques, de vitamines et d'autres médicaments.

Les levures ont une grande importance dans la recherche scientifique car elles sont un modèle de choix pour l'étude des processus cellulaires fondamentaux tels que la croissance, la

différenciation, la régulation génétiques et le métabolisme. Elles ont également été utilisées pour la production de protéines recombinantes à des fins médicales, telles que l'insuline et les facteurs de coagulation.

En agriculture, les levures sont utilisées comme additifs alimentaires pour les animaux, en particulier les ruminants, afin de favoriser la digestion des aliments et d'améliorer la production de lait et de viande. Elles sont également utilisées comme biofertilisants pour stimuler la croissance des plantes.

En résumé, les levures sont utilisées comme additifs alimentaires pour les animaux, tant fondamentaux qu'appliqués, et sont d'une grande importance pour l'industrie alimentaire, pharmaceutique et agricole (**Djekrif, 2016 ; Buzzini, 2000 ; Jacob,1997**).

Chapitre 2 : Les enzymes

1. Définition

Les enzymes sont des macromolécules biologiques, synthétisées par les organismes vivants dans le but d'effectuer des réactions biochimiques nécessaires à leurs activités métaboliques intra et/ou extracellulaires. Celles-ci sont généralement appelées « Biocatalyseurs » (Anbu *et al.*, 2013).

2. Classification

La première classification des enzymes a été proposée en 1956 par la Commission des enzymes (EC), puis suite à plusieurs révisions, une nomenclature finale a été mise en œuvre en se basant sur le type de réaction catalysée, le substrat utilisé ainsi que la présence d'éventuels cofacteurs (Combes et Monsan, 2009).

Il existe sept classes d'enzymes d'enzyme, qui sont indiquées dans le (Tab01).

Tableau 1: Les différentes classes d'enzymes.

Nome code	classification	Type de réaction catalysée
EC1	Oxydoréductase	Réaction d'oxydation-réduction ajout ou retrait d'un atome d'hydrogène
EC2	Trasnférase	Transfert un groupe fonctionnel entre un donneur et accepteur
EC3	Hydrolase	Hydrolyse (par addition d'une molécule d'eau) différentes liaisons chimiques
EC4	Lyase	Elimination d'un groupe pour former une double liaison ou addition d'une Molécule d'eau ammoniac ou dioxyde de carbone autour de la liaison double
EC5	Isomérase	Transfert d'atomes ou de groupement dans une même molécule
EC6	Ligase	Formation de lien avec l'hydrolyse de l'ATP
EC7	translocase	Transfert des protons (H ⁺) des cations et anion inorganiques, des acides aminés et des peptides, des hydrates de carbone et leur dérivés,

3. Origine des enzymes utilisés en biotechnologie

Les enzymes à intérêt biotechnologique peuvent avoir plusieurs origines dont les végétaux, les animaux et les microorganismes (**Scriban, 1993; Amaud *et al.*, 1993; Rao *et al.*, 1998 ; Meunier, 1999**).

Les microorganismes constituent la principale source d'enzymes industrielles : 50% proviennent des champignons et des levures, 35% des bactéries, alors que 15% sont d'origine végétale ou animale (**Barnabé *et al.*, 2003**). L'extraction à partir des plantes et des animaux est cependant limitée par de nombreux paramètres difficiles à contrôler. Les principaux avantages des enzymes d'origine microbienne sont les suivants :

- Une production indépendante des contraintes saisonnières et géographiques ;
- Une possibilité d'utilisation de matières premières bon marché ;
- Des rendements de production pouvant être augmentés de façon importante par l'amélioration des souches microbiennes par génie génétique et l'optimisation des conditions de production (**Amaud *et al.*, 1993; Scriban, 1993**).

3.1. Amylase (EC 3.2.1.1)

3.1.1. Définition

L' α -amylase (EC 3.2.1.1) est une enzyme faisant partie de la famille des glycosides hydrolases nommée GH13, qui comprend environ 28 000 séquences de protéines ayant diverses spécificités (**Janeček *et al.*, 2014**). Cette protéine globulaire est synthétisée dans tous les genres de la vie, ce qui en fait une enzyme ubiquitaire (**Merabti, 2006**).

3.1.2. Structure

L' α -amylase fongique est une glycoprotéine monomérique (**De Souza *et al.*, 2010**) qui se compose de trois domaines globulaires différents, nommément A, B et C (**Li *et al.*, 2014**). Le domaine A se présente sous la forme d'un tonneau (β / α)₈ et abrite le site actif à l'extrémité C-terminale des feuillets β , tandis que le domaine B, qui forme une boucle à partir du centre du domaine A, agit comme un couvercle sur le site actif (Figure 05). Enfin, le domaine C est constitué d'un tonneau de huit feuillets β antiparallèles (**Fig 05**) (**Benaouida, 2008**).

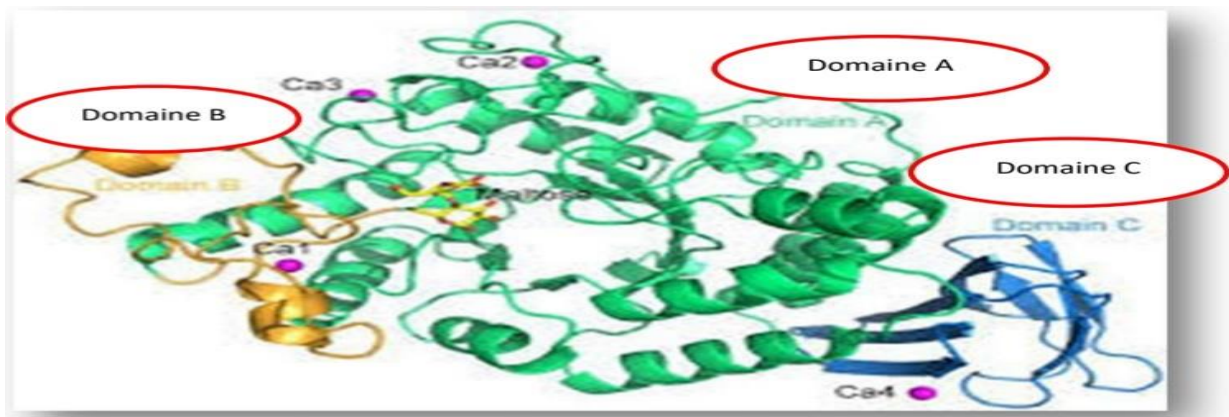


Figure 05: Structure monomérique de l'α-amylase (Li *et al.*, 2014).

3.1.3. Origine microbienne de l'α-amylase

Les α-amylases sont présentes en grande quantité dans toutes les formes de vie, mais la production à grande échelle est surtout réalisée à partir de sources microbiennes préférées (Haq *et al.*, 2003). Il existe deux catégories d'α-amylases : celles d'origine bactérienne et celles d'origine fongique.

➤ Les α-amylases bactériennes

Elles sont produites principalement par fermentation de *Bacillacées* telles que *Bacillus subtilis* et *Bacillus amyloliquefaciens* (Haq *et al.*, 2003). Des amylases ayant des propriétés industrielles ont été découvertes chez des bactéries acidophiles ; *Penicillium grisofulvum* (Ertan *et al.*, 2006), alcalinophiles ; *Thermobifida fusca* (Yang *et al.*, 2010) et thermophiles ; *Bacillus cohnii* (Panchal, 1990 et Fogarty et Kelly, 1980) et *Bacillus licheniformis* (Yihan, 2010, Cordeiro *et al.*, 2002). Ces enzymes jouent un rôle important dans la transformation de l'amidon en le fragmentant rapidement en clivant les liaisons α (1,4) (Nadirman *et al.*, 2006).

➤ Les α-amylases fongiques

L'industrie a produit des enzymes à partir de microorganismes fongiques, notamment les genres *Aspergillus* et *Penicillium*, depuis longtemps. En effet, la première production d'α-amylase a été réussie par Takamine en 1894. Les levures sont les organismes les plus couramment utilisés dans la production de biomasse à haute valeur nutritive (Leveau et Bouix, 1993). Cependant, différentes levures sont également capables de produire de l'α-amylase (tab02).

Tableau 02: Quelques levures productrices d' α amylase.

Levures	références
<i>Schwanniomyces sp</i>	Haifeng et al., 2006
<i>Lipomyces kononenkoa</i>	Boukhennane et Boudebza, 2014
<i>Pichia polymorpha</i>	Gonzalez et al., 2008
Talaromyces pinophylus	Liang et al., 2015

3.1.4. Mode d'action

L' α -amylase joue un rôle important dans de nombreuses applications industrielles en modifiant les propriétés de l'amidon. Cette enzyme permet de produire des sucres adaptés aux besoins spécifiques des utilisateurs dans l'industrie alimentaire (**Palmer, 1975**).

L' α -amylase agit sur les polysaccharides tels que l'amidon et le glycogène, ainsi que sur les oligosaccharides (**fig 06**).

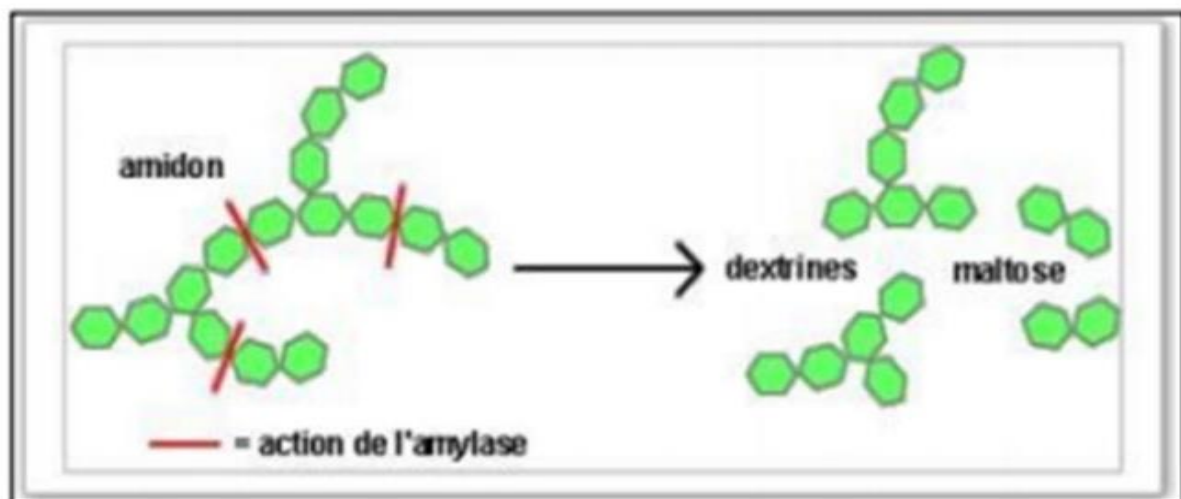


Figure 06: Mode d'action de l' α -amylase (**Florimont, 2013**).

Elle catalyse la rupture des liaisons glucosidiques (α -1,4) présentes dans l'amidon et d'autres substrats apparentés (**Heslot, 1996**).

3.1.5. Applications industrielle

Les amylases sont parmi les enzymes les plus importantes en biotechnologie (Gupta *et al.*, 2003). Elles représentent environ 25 à 33% du marché mondial des enzymes (Saxena *et al.*, 2008).

L' α amylase microbiennes sont parmi les enzymes les plus utilisés dans les procédés industriels. En effet, les amylases possèdent une gamme étendue d'applications tels que les industries de la saccharification d'amidon, le textile, les aliments, la boulangerie, le brassage et la distillation (Gupta *et al.*, 2003). En raison de l'importance industrielle de cette enzyme, un intérêt est porté à l'isolement de nouvelles amylases appropriées à des applications industrielles nouvelles (Burhan *et al.*, 2003). (Tab 03)

Tableau 03: Applications industrielles de L' α amylase

Industries	Applications	Référence
Glucoserie	Solubilisation de l'amidon, accompagnée d'une chute importante de la viscosité (liquéfaction).	
Sucrierie	Réduction de la viscosité des sirops de cannes à sucre en hydrolysant les contaminants amylicés pour réussir le processus de cristallisation	
Biscuiterie et panification	Amélioration des propriétés rhéologiques et fermentaires de la pâte, ainsi que le volume de la mie et la coloration de la croûte.	Sicard, (1983)
Industrie textile	Le désencollage textile, qui permet d'éliminer la colle d'amidon qui enduit les fibres et les protège au cours du tissage.	
Papeterie	Liquéfaction de l'amidon pour préparer des sauces de couchage, permettant d'éliminer les irrégularités superficielles de la feuille.	
Détergents	Dégradation des taches à base d'amidon. Les oligosaccharides et les dextrans libérés de l'action hydrolytique sont solubles, par conséquent, la tache est physiquement découpée.	Igarashi <i>et al.</i> , (1998) Nielsen <i>et Borchet</i> , (2000).
Industrie pharmaceutique	-Agent anti-inflammatoire. -Un aide digestif (contre les dyspepsies et les fermentations intestinales).	Nielsen <i>et Borchet</i> , (2000).

3.2. Maltase (EC 3.2.1.20)

3.2.1. Définition

Les Maltases sont des enzymes spécialisées appelées α -glucosidases, qui agissent comme des hydrolases en libérant l' α -D-glucose à partir de l'extrémité non réductrice de leurs substrats (Andriotis *et al.*, 2016). Leur substrat préféré est le maltose (Choi *et al.*, 2013).

Ces enzymes sont présentes de manière ubiquitaire dans tous les tissus (Scheen *et al.*, 2008), que ce soit chez les vertébrés, les plantes, les bactéries, les champignons, les moisissures ou les levures comme *Cordyceps brongniartii* (Sasaki *et al.*, 2015) et *Grosmanniac lavigera* (Riken *et al.*, 2016).

3.2.2. Structure de la maltase

Les maltases présentent une structure variable en fonction de leur origine :

- **Les maltases homodimériques** : Elles sont présentes chez des organismes tels que la bactérie *Geobacillus sp.* (Hung *et al.*, 2005), certaines moisissures comme *Xanthophyllomyces dendrorhous* (Gutiérrez *et al.*, 2015), et la levure *Pichia pastoris*. La masse moléculaire de cette enzyme varie selon la souche, atteignant 430 KDa chez la levure *Candida guilliermondii* (Nadeem *et al.*, 2016).
- **Les maltases monomériques** : On les retrouve chez les bactéries thermophiles telles que *Thermuscaldophilus* (Oyekanmi *et al.*, 2001), ainsi que chez certaines levures comme *Saccharomyces cerevisiae* (Katrin *et al.*, 2016) (Fig 07).

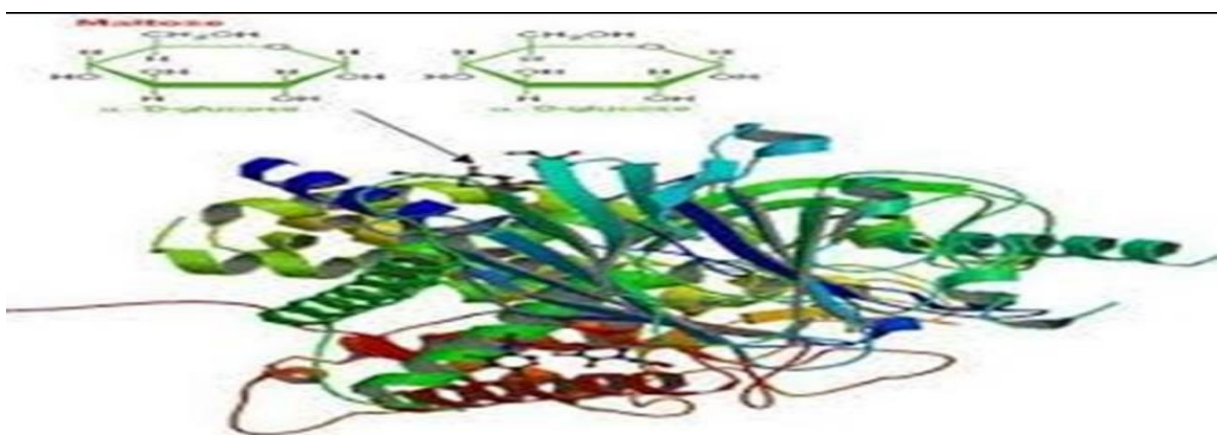


Figure 07: Structure monomérique de la maltase liée à 4-O- α -D-Glucopyranosyl-Dglucose ($C_{12}H_{22}O_{11}$), chez *Saccharomyces cerevisiae* (Barker *et al.*, 2013)

3.2.3. Mode d'action

La maltase est une enzyme qui appartient à la classe des hydrolases amylolytiques glycolytiques. Elle joue un rôle crucial dans la conversion de l'extrémité terminale non réductrice des oligosaccharides ou des polysaccharides en glucose (**Nawaz et al., 2015**). Cette enzyme réalise deux types de réactions catalytiques distinctes :

- **Réaction d'hydrolyse** : Lors de cette réaction, un résidu de glycosyle est transféré d'un oligosaccharide ou d'un polysaccharide à une molécule d'eau. Ce transfert s'accompagne de l'élimination du groupe hydroxyle hémi acétal de la forme cyclique (**Marija et al., 2014**).
- **Réaction de transglucosylation** : cette réaction implique le transfert d'un résidu glycosyle d'un oligosaccharide à une autre molécule réceptrice.

3.2.4. Applications de la maltase en industrie

Les maltases sont des enzymes présentes dans les organismes vivants, et elles agissent comme catalyseurs dans des réactions biochimiques. En biotechnologie, elles sont utilisées pour faciliter la dépolymérisation des macromolécules et la synthèse, grâce à leur spécificité et à leur efficacité (**Yapi et al., 2008**). Dans le domaine industriel, la maltase joue un rôle crucial dans plusieurs applications chez l'homme.

➤ **Industries alimentaires**

Les oligosaccharides et les monosaccharides utilisés à des fins nutritionnelles connaissent une croissance significative en raison de leur capacité à favoriser la croissance de la flore bactérienne dans l'intestin, que ce soit chez les humains ou les animaux. Ils sont largement utilisés dans la fabrication de divers produits alimentaires tels que les confiseries, les chewing-gums, les boissons et les produits laitiers. Ces sucres sont obtenus à partir de sources végétales par extraction, par hydrolyse de polysides ou par synthèse enzymatique (**Bombeck et al., 2016**).

➤ **Industrie de détergent**

Les détergents utilisent également des enzymes pour éliminer les taches tenaces lors du lavage et décomposer les lipides et les protéines présents dans les aliments (**Vanhanen et al., 2000**). De plus, de nouvelles méthodes de protection de l'environnement et contre les allergies sont ajoutées aux détergents (**Grbavčić et al., 2015**).

3.3. Protéase (EC 3.4.21-24)

3.3.1. Définition

Les protéases, également connues sous le nom de protéinases, font partie de la catégorie des hydrolases (EC 3.4.21-24.X). Ces enzymes catalysent l'hydrolyse des protéines en scindant spécifiquement la liaison peptidique qui relie deux acides aminés dans une chaîne peptidique. Elles sont produites à la fois à l'extérieur et à l'intérieur des cellules (**Hornebeck, 2009; Kumar et al., 2008**). Ce sont des enzymes multifonctionnelles qui jouent de nombreux rôles physiologiques chez les animaux et les végétaux. Elles participent notamment à des processus tels que la germination, l'apoptose et les processus inflammatoires (**Schaller, 2004**).

3.3.2. . Origine microbienne de la protéase

En raison de l'incapacité des protéases végétales et animales à répondre aux exigences de l'industrie, il y a eu un intérêt croissant pour les protéases microbiennes (**Mala et al., 1998**). Les bactéries, les moisissures et les levures produisent une grande diversité d'enzymes protéolytiques (**Devet, 1996**).

Parmi celles-ci, les genres les plus importants sont *Saccharomyces*, *Rhodotorula*, *Candida* et *Debaryomyces*. Par exemple, *Saccharomyces cerevisiae* produit trois types de protéases : une protéase aspartyl, une protéase sérine et une protéase métallo. L'activité protéolytique de ces genres est particulièrement utilisée dans l'affinage des fromages (**Boiron, 1996 et Kresze, 1991**) (Tab 04).

Tableau 04: Exemples des protéases microbiennes (**Belmessikh et al., 2011**).

Sources	Espèces	Références
Moisissures	<i>Aspergillus oryzae</i> <i>Mucor circinelloides</i> <i>Conidiobolus coronatus</i> <i>Penicillium sp.</i> <i>Aspergillus terreus</i> <i>Bauveria felina</i> <i>Aspergillus clavatus</i> ES1	García-Gómez et al., 2009 Sathya et al., 2009 Laxman et al., 2005 Germano et al., 2003 Wu et al., 2006 Agrawal et al., 2005 Hajji et al., 2007
Levures	<i>Aureobasidium pullulans</i> <i>Candida lipolytica</i>	Chi et al., 2007 Tobe et al., 1976
Bactéries	<i>Bacillus licheniformis</i> <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> <i>Bacillus subtilis</i> <i>Bacillus sp.</i> <i>Virgibacillus sp.</i> <i>SK33</i> <i>Synergistes sp</i>	Ferrero et al., 1996 George et al., 1995 Soares et al., 2005 Patel et al., 2005 Sinsuwan et al., 2008 Kumar et al., 2008)
Actinomycètes	<i>Streptomyces sp.</i> <i>Nocardiosis alkaliphila sp</i>	Mehta et al., 2006 Hozzein et al., 2004

3.3.3. Mode d'action de protéase

Différents mécanismes d'action sont impliqués dans ces protéases, ce qui permet de les regrouper en grandes familles mécanistiques en fonction de la nature des acides aminés présents dans leur site actif (Veyradier *et al.*, 2011).

- Les protéases à sérine : sont spécifiques des liaisons peptidiques contenant une lysine ou une arginine comme acide aminé en position carboxyle (Tapdiqov *et al.*, 2015). Parmi elles, on trouve la trypsine (EC 3.2.21.4) et la chymotrypsine (EC 3.4.21.1). La trypsine clive les liaisons peptidiques contenant des lysines ou des arginines, tandis que la chymotrypsine s'attaque aux liaisons peptidiques où l'acide aminé en position carboxyle est hydrophobe ou aromatique. La thrombine est une autre protéase à sérine qui intervient dans la coagulation sanguine en clivant le fibrinogène pour former de la fibrine (Matsuo *et al.*, 2012 ; Ovaere *et al.*, 2009).
- Les protéases à cystéine (ou protéases à thiol) : possèdent une cystéine dans leur site actif. Parmielles, on compte la papaine (EC 3.4.22.2), qui est spécifique des liaisons peptidiques contenant des acides aminés basiques, aromatiques ou apolaires. Les caspases sont également des protéases à cystéine et jouent un rôle dans le processus d'apoptose (Cabon *et al.*, 2013 ; Jegham *et al.*, 2009).
- Les protéases acides : agissent à pH acide et possèdent un acide aspartique dans leur site actif (Groeme *et al.*, 2015). La pepsine est un exemple de protéase acide qui est spécifique des liaisonspeptidiques contenant des acides aminés aromatiques (fonction amine) (Xuesong *et al.*, 2016).
- Les métalloprotéases : possèdent un cation métallique, généralement un atome de zinc. Parmielles, on trouve la thermolysine (Tauzin *et al.*, 2014).

3.3.4. Applications industrielles des protéases

Les protéases jouent un rôle crucial dans divers secteurs industriels, notamment les détergents (Gupta *et al.*, 2002), l'industrie alimentaire comprenant la boulangerie, la fromagerie et les transformations alimentaires (Sullivan et Calkins, 2011). Elles sont également essentielles dans le domaine pharmaceutique et médical, où elles sont utilisées pour le traitement de diverses affections telles que les troubles de la digestion, le cancer et les infections virales (Walsh, 2002), ainsi que dans de nombreux autres secteurs industriels.

➤ Industrie des détergents

Les protéases jouent un rôle essentiel dans l'industrie des détergents, représentant environ 35% du marché mondial des enzymes industrielles (Cherry et Fidantsef, 2003). Elles sont

largement utilisées non seulement dans les détergents, mais également dans d'autres produits de nettoyage destinés à des applications industrielles, ainsi que pour le nettoyage des lentilles cornéennes et des appareils dentaires. Cependant, le segment le plus important sur le marché des détergents est celui des détergents à lessive (**Kumar et al., 2008**). Une protéase détergente idéale doit présenter une large spécificité de substrat et être stable dans l'environnement hostile de la machine à laver, caractérisé par des températures élevées et un pH alcalin (**Rao et al., 1998**). La plupart des protéases ajoutées aux détergents sont produites par des souches de *Bacillus* (**Gupta et al., 2002**).

➤ Industries alimentaires

Les protéases sont couramment employées dans divers secteurs de l'industrie alimentaire, tels que la brasserie, la production de boissons, la préparation d'hydrolysats de protéines solubles et aromatisés (en utilisant des protéases de type papaine), comme complément alimentaire (**Lavalle et al., 2000**), ainsi que pour la fabrication d'émulsifiants (**Pardo et al., 2000**).

➤ Fromagerie

Les protéases jouent un rôle essentiel dans l'industrie alimentaire, principalement dans la fabrication de fromages (**Rao et al., 1998**). Cependant, en raison des fluctuations de prix et des périodes de pénurie de la caillette, cette dernière est de moins en moins utilisée et tend à être remplacée par des protéases microbiennes (**Aviron et al., 1982**). Par ailleurs, d'autres protéases d'origine végétale telles que la papaine, la bromélaïne, la ficine et les cardosines sont actuellement employées dans l'industrie fromagère (**Uhlig, 1998**).

➤ Boulangerie

Les protéases endo et exo d'*A.oryzae* sont employées pour altérer le gluten de blé par une protéolyse partielle, afin d'obtenir les caractéristiques souhaitées pour la pâte. Cette action enzymatique permet de diminuer la durée du pétrissage (**Aguilar et al., 2008 et Aviron et al., 1982**). Les protéases d'origine bactérienne sont également fréquemment utilisées pour améliorer l'élasticité et la résistance de la pâte (**Rao et al., 1998**).

3.4. Pectinase (EC 3.2.1.15)

3.4.1. Définition

Les pectinases, également connues sous le nom d'enzymes pectinolytiques, forment un groupe d'enzymes unique, complexe et varié. Elles agissent de manière spécifique sur les substrats pectinolytiques, en particulier les polymères de pectine qui constituent le principal

polysaccharide de la paroi cellulaire primaire et de la lamelle moyenne des plantes. Leur action consiste essentiellement à dégrader l'acide polygalacturonique (PGA) en acide monogalacturonique, ce qui entraîne la rupture des liaisons glycosidiques, réduisant ainsi l'adhérence entre les cellules et la rigidité des tissus (**Fogarty et Kelly, 1983**). En conséquence, cela conduit à la dégradation de la paroi cellulaire, à l'éclatement des cellules et, par conséquent, aux symptômes de macération (**Bateman et Basham, 1976**).

3.4.2. Mode d'action

Il est essentiel de souligner que les pectinases peuvent être catégorisées en fonction de différents critères, tels que la nature du substrat (pectine, acide pectique et oligogalacturonate), le mécanisme de dégradation (trans-élimination ou hydrolyse) et le type de clivage (endo ou exo) (**Favela Torres et al., 2006**). Ces enzymes sont regroupées en deux principales catégories : les pectines estérases (PE), qui agissent sur les pectines, et les dépolymérase (polygalacturonases et lyases), qui dégradent les pectines. Les propriétés et le mode d'action de ces deux groupes d'enzymes diffèrent.

3.4.3. Origine microbienne de la pectinase

Les pectinases sont synthétisées par divers micro-organismes tels que les levures, les bactéries et les moisissures. Elles se trouvent également dans les végétaux, principalement dans les fruits où elles jouent un rôle crucial dans le processus de maturation. De plus, on a découvert la présence de pectinases dans le règne animal, notamment chez les insectes tels que les pucerons qui produisent une salive gélifiante (**Guo et al., 2006**), les nématodes (**Popeijus et al., 2000**) et les escargots qui en possèdent dans leur suc digestif (**Baron et Thibault, 1985**).

Les pectinases sont des enzymes présentes dans certains animaux et insectes, tels que *Sitophilus oryzae* (**Shen et al., 2003**) et *Meloidogyne incognita* (**Jaubert et al., 2002**).

Certaines levures, telles que *Saccharomyces cerevisiae* (**Radoi et al., 2005 ; Sieiro et al., 2003 ; Blanco et al., 2002 ; Gainvors et al., 2000**), sont capables de produire des pectinases. Ces enzymes sont utilisées dans divers procédés industriels, tels que la clarification des jus, l'assouplissement des fibres dans l'industrie textile, ainsi que dans l'industrie des pâtes et papiers.

3.4.4. Applications industrielles de la pectinase

Ces enzymes sont considérées parmi les plus importantes dans l'industrie en raison de leur utilisation fréquente et variée (**Kashyap et al., 2001**). Par exemple, les pectinases acides sont utilisées pour extraire et clarifier les jus de fruits (**Rombouts et Pilnik, 1986**), tandis que les pectinases alcalines sont largement utilisées pour éliminer les gommages des fibres de ramie

(Cao *et al.*, 1992). En raison de leur utilisation intensive en biotechnologie, ces enzymes sont produites par différents organismes tels que les champignons (Aguilar et Huitron, 1990), les levures (Gainvors et Belarbi, 1995) et les bactéries (Karbassi et Vaughn, 1980 et Horikoshi, 1972).

Matériel et méthodes

Ce travail a été réalisé au niveau de laboratoire de SNV centre universitaire Abdelhafid Boussouf Mila. Le but de ce travail est la recherche d'enzymes d'intérêt biotechnologique produites par des levures locales.

1. Echantillonnage

Différentes levures ont été isolées à partir de plusieurs échantillons :

- Trois sont des denrées alimentaires :
 - Petit lait (**Fig 08**).
 - Lait caillé (**Fig 09**).
 - Lait de vache (**Fig 11**).
- Le dernier est un déchet alimentaire : Pelure de pomme de terre (**Fig 10**).



Figure 08 : Petit lait



Figure 09 : Lait caillé



Figure 10 : Pelure pomme de terre



Figure 11 : Lait de vache

2. Isolement des levures

2.1. Milieu d'isolement

Le milieu que nous avons utilisé pour isoler la levure est YPG (Yeast Peptone Glucose) (Annexe 1)

La croissance bactérienne est inhibée par l'addition d'Amoclan aux milieux de culture, avant stérilisation, à la concentration de 5 mg/l (**Botton et al. 1999**)

2.2. Préparation des solutions mère

2.2.1. Solution mère du lait

Une suspension de l'échantillon est composée de 1ml du lait et 9ml d'eau distillée. La suspension est agitée pendant 2min à l'aide d'un agitateur.

2.2.2. Solution mère du petit lait

Une suspension de l'échantillon est composée de 1ml du petit lait et 9ml d'eau distillée. La suspension est agitée pendant 2min à l'aide d'un agitateur.

2.2.3. Solution mère du lait caillé

Une suspension de l'échantillon est composée de 1ml du lait caillé et 9ml d'eau distillée. La suspension est agitée pendant 2min à l'aide d'un agitateur.

2.2.4. Solution mère de pelure de pomme de terre

Une suspension de l'échantillon est composée de 1g de pelures de pomme de terre (séchée et moulue) et 9ml d'eau distillée. La suspension est agitée pendant 2min à l'aide d'un agitateur.

2.3. Préparation des dilutions

Avant d'entamer le travail, il est important de créer une zone stérile, par la flamme du bec Bunsen, sur une paillasse soigneusement nettoyée. Ensuite, la suspension mère est préparée en mélangeant 1ml de chaque échantillon avec 9 ml d'eau distillée stérile. Les étapes suivantes sont :

- Homogénéiser la suspension mère par agitation du flacon de prélèvement
- Procéder tout d'abord à la numérotation des tubes en les étiquetant respectivement de 10^{-1} à 10^{-4} cellules/ml pour les différentes dilutions

- Prélever à l'aide d'une pipette graduée, 1ml d'échantillon mère, puis l'additionner à 9ml d'eau physiologique stérile dans un tube à essai, permettant ainsi d'obtenir une suspension microbienne diluée à 10^{-1} par rapport à la suspension mère.

- Prélever 1 ml de la suspension 10^{-1} , agitée à l'avance à l'aide d'un vortex, avec une pipette pasteur neuve et diluer dans un second tube à essai contenant 9ml d'eau physiologique stérile, pour arriver à une dilution de 10^{-2} et ainsi de suite à chaque dilution, pour arriver à diminuer la charge microbienne de l'échantillon mère à l'exponentiel de 10^{-4} . Changer les pipettes entre chaque prélèvement.

2.4. Méthode d'isolement

Tout en respectant les conditions d'asepsie et en manipulant toujours dans la zone stérile :

- Bien homogénéiser le contenu du tube à essai contenant la suspension diluée à 10^{-4} .
- Prélever à l'aide d'une pipette Pasteur, une goutte de cette suspension.
- L'étaler à l'aide d'un râteau, sur toute la surface de la boîte de Pétri coulée (Le râteau en verre est flambé avant et après chaque utilisation).
- Sur les boîtes ensemencées on indique le numéro de l'échantillon, la dilution ainsi que la date d'ensemencement. Il est à noter que deux répétitions sont réalisées pour chaque dilution. Les boîtes ont été incubées à 30°C et ont été observées quotidiennement pendant trois jours.

3. Purification et conservation des levures isolées

Après isolement, les isolats de levures ont été purifiés par stries d'épuisement sur milieu YPG. L'incubation a été réalisée à 30°C pendant 72h. Les aspects macroscopiques et microscopiques ont été ensuite examinés afin de vérifier la pureté de la souche. Les cultures pures ont été conservées sur le même milieu en gélose stockée à 4°C (**Haq *et al.*, 2002**).

4. Identification des levures

L'identification des levures isolées repose sur la détermination de divers caractères cultureux, morphologiques et physiologiques (**Kurtzman *et al.*, 2011a**).

4.1. Caractéristiques morphologiques

4.1.1. Aspect macroscopique (Aspects en milieu solide)

Les souches pures ont été repiquées sur YPG par la méthode des stries.

Les boîtes ont été 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 a été réalisée afin de décrire leur forme, leur aspect (brillant ou mat, visqueux) et leur couleur ...etc.

4.2. Caractéristiques microscopiques

Afin de déterminer la forme, la taille des cellules levuriennes, l'examen microscopique a été effectué pour des cultures jeunes en YPG sur une lame à l'état frais (grossissement x40, x100).

4.3. Caractéristiques physiologiques

4.3.1. Fermentation des sucres (méthode de Kluyver, 1974)

Les tests de fermentation ont été effectués avec des sucres très purs à des concentrations de 6%. Les sucres étudiés sont : le lactose, le galactose, le saccharose et le maltose. Le milieu utilisé est le milieu de base (Eau de levure) (annexe 11), le milieu a été réparti en tubes à essai, à raison de 9 ml par tube, et chaque tube reçoit une cloche de Durham. Les sucres à tester ont été mis séparément dans chaque tube, l'ensemble a été ensuite autoclavé à 120°C, pendant 20 min. Après refroidissement, les milieux ont étéensemencés et portés à l'incubation à 30°C pendant 72h. Les tubes ont été examinés chaque jour pour voir le pourcentage de gaz dégagé dans la cloche et le virage du couleur de l'indicateur coloré (Berber, 2013).

4.3.2. Assimilation de substrats azotés

Les sources d'azote testées Sont : Tryptophane, Alanine, Nitrate de potassium (KNO₃) et Acide glutamique. Le milieu utilisé dans cette étude est YCB (*Yeast Carbon Base*) (annexe 2). Pour une première étape, Nous avons préparé une solution d'azote (solution d'acides aminés) à 1 % (1 g de source d'azote dans 100 ml d'eau distillée). Puis un ensemencement du milieu de base YCB (stérile) avec 1 ml de levure a été réalisé. Une fois le milieu est solidifié, nous avons placé les disques stériles imprégnés de la solution d'azote sur le milieu dans les boites de pétri. Après une Incubation à 30°C pendant 3jours à 2 semaines une observation de la croissance de la levure autour du composé azoté a été effectuée (Une croissance de la souche autour du disque désigne une assimilation de la source azotée).

5. Mise en évidence des activités enzymatiques

Les souches levuriennes isolées et identifiées, ont subits une série des tests de l'activité enzymatique, à savoir l'enzyme protéase, amylase, pectinase, et maltase. Les tests ont été effectués sur des milieux spécifiques pour chaque enzyme.

Le principe de la mise en évidence des activités enzymatiques est l'observation de l'apparition des zones de lyse directement ou bien après l'utilisation des colorants spécifiques.

5.1. Mise en évidence de l'activité α - amylasique

Cette activité a été réalisée sur le milieu : YPSA (*Yeast Peptone Strache Agar*)(Annexe 3).

Après 5 jours d'incubation à 30°C, les boîtes ont été inondées avec une solution de Lugol 1 (Annexe 7). L'apparition d'une zone claire autour de la colonie est considérée comme un résultat positif. À l'inverse, les zones contenant de l'amidon se colorent en brun. Ainsi, les isolats présentant des zones claires d'hydrolyse sont considérés comme producteurs d' α -amylase.

5.2. Mise en évidence de l'activité protéolytique

Afin de mettre en évidence leur activité protéolytique, les souches isolées, ont été ensemencées sur le milieu sélectif (Gélose au lait) (Annexe 6) par repiquage par des stries ; la lecture des résultats a été effectuée après incubation de 2 à 7 jours à 30°C dans l'étuve. Un résultat positif est traduit par l'apparition d'un halo transparent autour des colonies, résultant de la dégradation de la gélose au lait par la protéase extracellulaire produit autour des colonies productrices (**Dendougua, 2006**).

5.3. Mise en évidence de l'activité Pectinolytique

Les souches pectinolytiques ont été sélectionnées sur le milieu YPPA (Yeast Peptone Pectin Agar). (Annexe 4). Après incubation à 30°C pendant 3 à 5 jours, les boîtes ont été recouvertes par une solution lugol 2 (Annexe 8) et laissées à température ambiante pendant 20 minutes. L'apparition d'un halo clair autour de la colonie indique une dégradation de la pectine (**Bennamoun, 2017**).

5.4. Mise en évidence de l'activité Maltasique

Cette activité a été réalisée sur le milieu : YPMA (Yeast Peptone Maltose Agar) (Annexe 5).

Afin de visualiser l'activité maltasique des souches repiquées, les boîtes ont été couvertes avec la solution de Rouge Congo (Annexe 9) à 1% pendant 20 minutes permettant au colorant de se fixer. L'excédent de colorant non fixé a été éliminé et remplacé par une solution de NaCl (Annexe 10) pendant 30 minutes. Finalement, le NaCl a été éliminé et les boîtes rincées délicatement à l'eau distillée (**Romano Mwirichia et al., 2010**).

Les zones de lyse apparaissent alors décolorées (un jaune-orange) par rapport au reste du milieu qui est rouge (**Moubasher et al., 2010**).

Résultats et Discussion

1. Isolement des levures

Les denrées alimentaires (lait (H), lait caillé (R) et petit lait (L)) ainsi que les déchets issus de l'alimentation (déchet de pomme de terre) ont permis l'isolement de 7 souches levuriennes (Fig12).

Ces souches ont donné une bonne croissance sur le milieu YPG, après incubation à 30°C pendant 2 à 7 jours.

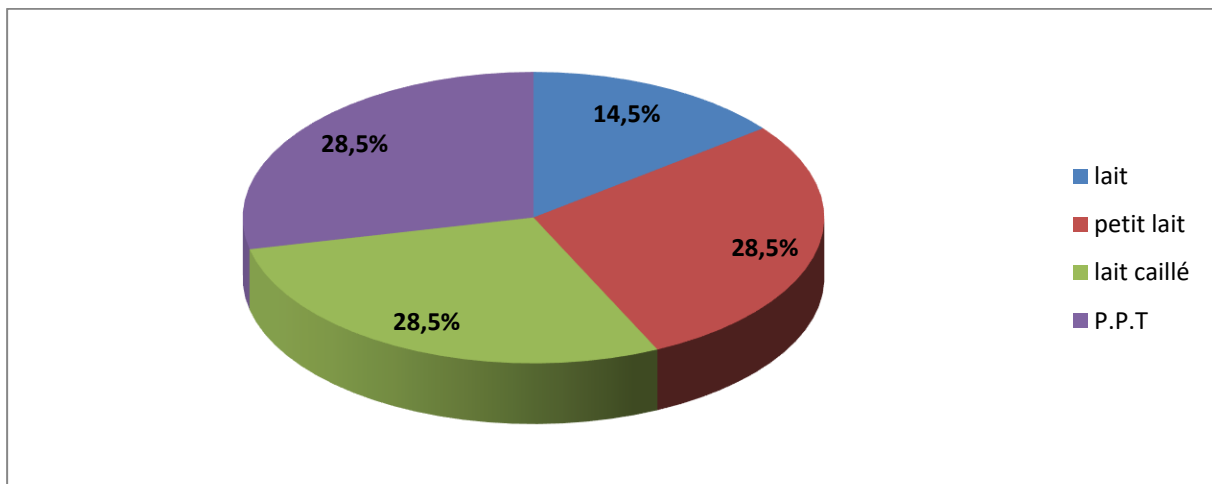


Figure 12:Fréquence des souches levuriennes.

Le nombre de levures isolées par échantillon est entre 1 et 2. Nous avons constaté que la densité des levures est presque similaire dans les 4 échantillons.

Les levures sont très largement répandues dans l'environnement. Ce sont des microorganismes eucaryotes généralement saprophytes et elles sont présentes dans des habitats terrestres, aquatiques et aériens. Les produits laitiers aussi constituent un bon environnement pour le développement des souches levuriennes à cause de leur richesse en protéine, en sucres, en lipides, en acides organiques et en sels minéraux (Gadaga *et al.*, 2000 ; Alvarez-Martina *et al.*, 2007).

Les levures préfèrent les milieux riches en glucides. Et ça montre que ces échantillons sont riches en glucides et d'autres nutriments qui sont nécessaires pour la croissance levuriennes (Ali et Khan, 2013 ; Zahida *et al.*, 2014).

L'isolement des levures à partir de produits laitiers de vache et de pelure de pomme de terre a été effectué sur milieu YPG additionné d'un antibiotique selon la méthode de dilution décimale. L'antibiotique sert comme un inhibiteur de la croissance bactérienne ; car les bactéries sont naturellement présentes en grande quantités dans les produits laitiers (Wouters *et al.*, 2002).

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

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

L'analyse des résultats obtenus montrent que les pelures de pomme de terre ; le lait caillé et le petit lait renferment plus de souche de levure (28.5%) par rapport au Lait de vache (14.5%) (Figure 12). Ce résultat s'explique probablement par la différence de composition en éléments nutritionnels (teneur en sucres, minéraux, eau, etc.) entre les échantillons étudiés ainsi que les différentes exigences nutritionnelles des souches.

Le codage des souches isolées est exprimé dans le (**tab 05**).

Tableau 05: Origine et codage des souches isolées.

origine	Code des souches
Lait	S1
Lait caillé	S3, S4
Petit lait	S5, S6
Pelures de pomme de terre	S7, S8

2. Identification des levures

Les cultures sont identifiées comme levures en se basant sur l'observation des caractères morphologiques (macroscopique et microscopique) des colonies isolées.

L'ensemble des levures isolées forment des colonies de couleur blanche-crème –orange à crevette sur milieu YPG Agar. La forme des colonies est ronde. Les résultats obtenus sont illustrés dans la (**fig 13**).

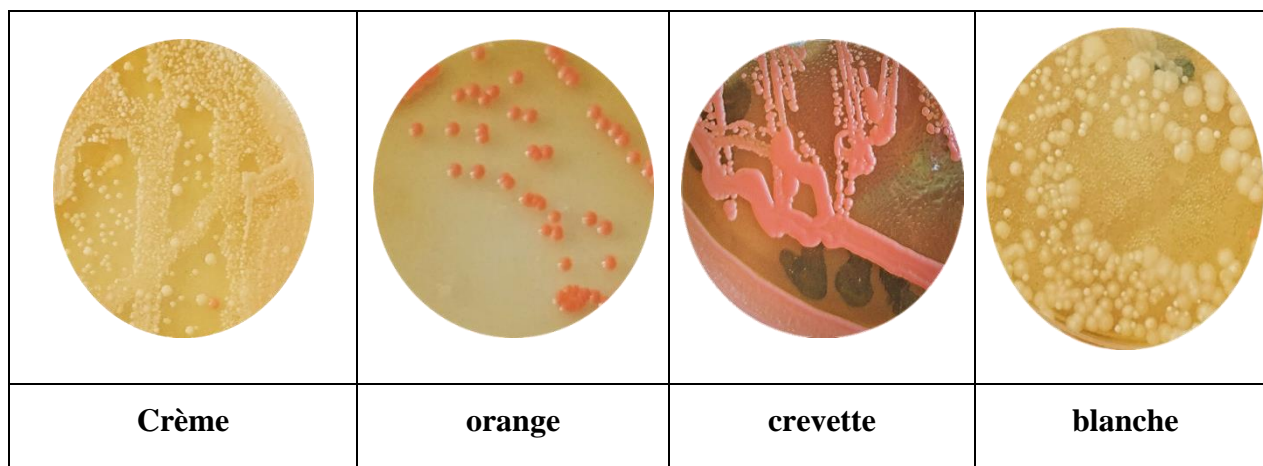


Figure 13: Couleur des isolats.


2.1. Caractéristiques morphologiques





Les observations microscopiques et macroscopiques de la morphologie des cellules en milieu solide sont variables d'une souche à une autre.



2.1.1. Aspects macroscopiques (aspects au milieu solide)

Après culture de 3 jours à 30°C sur milieu YPG, les résultats sont présentés dans le (tab 06), Il ressort que la plupart des souches possèdent en commun la forme ronde, la surface lisse et bombée à l'exception la souche 7 qui a une surface plate. Pour la couleur des souches : S1 est crevette, S3 et S6 ont une couleur orange, S4 et S7 ont une couleur crème, S5 et S8 ont une couleur blanche.

Tableau 06: Caractères cultureux des souches de levures isolées après une culture de 3 jours sur YPG à 30.

Code des souches	Caractères cultureux sur milieu solide	Aspect des souches
S1	<ul style="list-style-type: none"> - Ronde - Bombée - Surface lisse - Crevette - Brillante et crémeuse 	

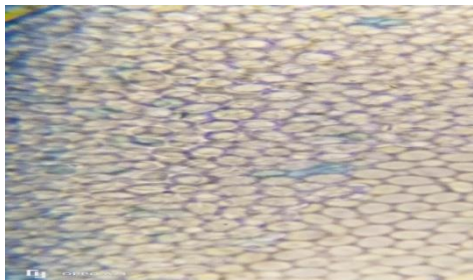
<p>S3</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Ronde - Bombée - Surface lisse - Orange - Brillante et crémeuse 	
<p>S4</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Ronde - Bombée - Surface lisse - Crème - Brillante et crémeuse 	
<p>S5</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Ronde - Bombée - Surface lisse - Blanche - Brillante et crémeuse 	
<p>S6</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Ronde - Bombée - Surface lisse - Orange - Brillante et crémeuse 	

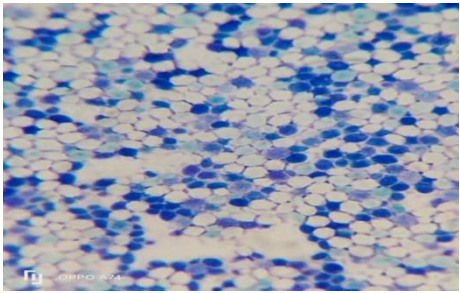
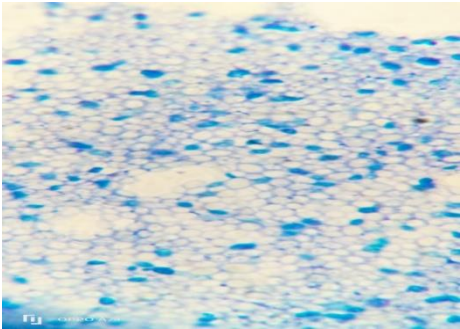
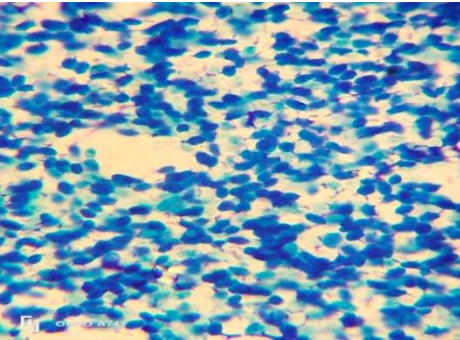
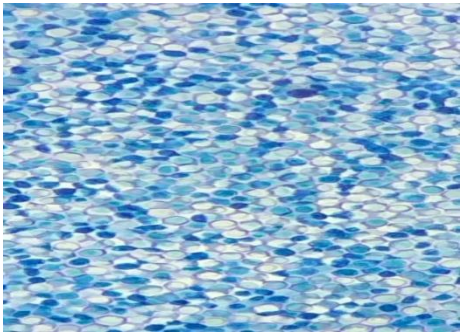
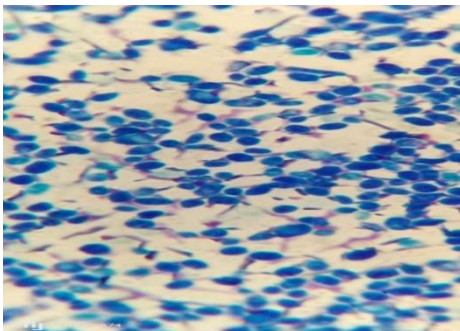
S7	<ul style="list-style-type: none"> - Ronde - Plate - Surface lisse - Crème - crémeuse 	
S8	<ul style="list-style-type: none"> - Ronde - Bombée - Surface lisse - Blanche - Brillante et crémeuse 	

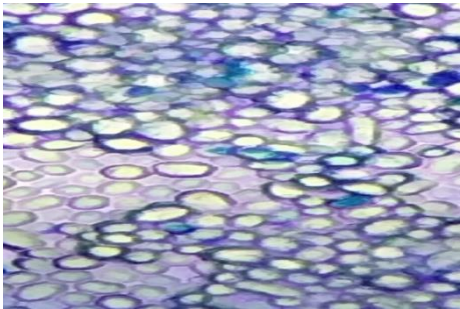
2.1.2. Caractéristiques microscopiques

L'observation microscopique permet de déterminer la forme et la taille des cellules des levures sélectionnées (**tab 07**).

Tableau 07: caractères morphologiques des souches de levures isolées cultivées pendant 2 jours à 30°C dans YPG.

Code des souches	Forme et taille des cellules	Aspect microscopique (grossissement ×100)
S1	<p style="text-align: center;">Ovale a allongée</p> <p style="text-align: center;">Grande</p>	

<p>S3</p>	<p>Ronde Petite</p>	
<p>S4</p>	<p>Ronde Petite</p>	
<p>S5</p>	<p>Ovale Grande et petite</p>	
<p>S6</p>	<p>Ronde Grande et petite</p>	
<p>S7</p>	<p>Ovale Grande et petite</p>	

S8	<p>Ovale a allongée</p> <p>Grande</p>	
----	---------------------------------------	--

2.2. Caractéristiques physiologiques

Les caractéristiques physiologiques ont été obtenus à partir des tests de fermentation et d'assimilation des substrats azotés par la méthode classique.

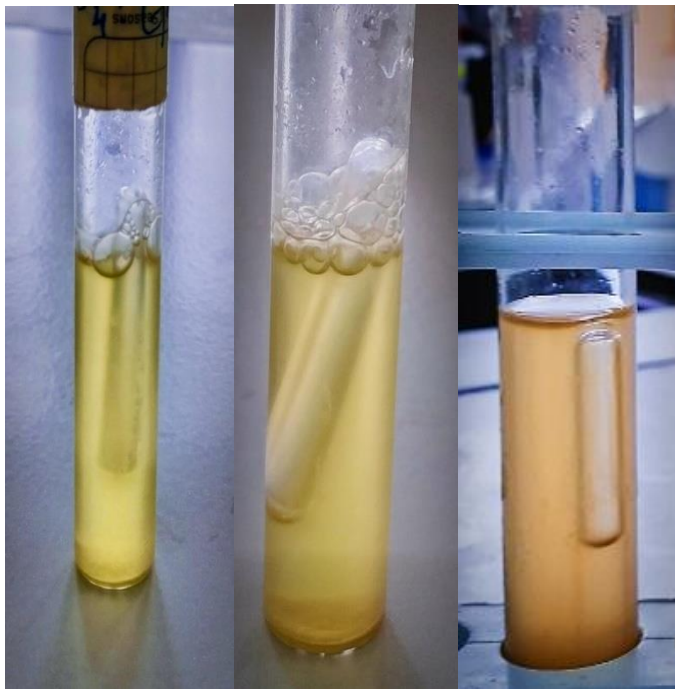
2.2.1. Fermentation des sucres

Les résultats de la fermentation des sucres par les levures sélectionnées sont regroupés dans le (tab 08). Le test positif de la fermentation est reflété par la présence du gaz dans la cloche (Fig 14).

Tableau 8: Résultats du test de fermentation de différents sucres par les isolats de levures

Code des souches	Fermentation des sucres			
	Saccharose	Maltose	lactose	Galactose
S1	-	-	++	++
S3	-	-	++	++
S4	-	-	++	++
S5	+	++	+	++
S6	-	+	+	+
S7	++	+	++	++
S8	+	++	+	+

(+ : test positif ; - : test négatif ; ++ : forte production)



+

++

-

Figure 14: Résultat du test de fermentation.

De ce tableau, il ressort que :

- Les souches S1, S3, S4 sont capables de fermenter : le lactose et le galactose.
- Les souches S5, S7 sont capables de fermenter : lactose, le saccharose, le maltose et le galactose.
- Les souches S6, S8 sont capables de fermenter : le maltose, le lactose et le galactose.

2.2.2. Assimilation des substrats azotés

La variation de l'assimilation des substrats azotés par les levures étudiées est présentée dans le (tab 09).

Un résultat positif correspond à la formation des colonies autour des disques (fig 15).

Tableau 09:Résultats du test d'assimilation des sources azotées des souches de levures isolée.

Code des souches	Assimilation des substrats azotés			
	Acide glutamique	Alanine	Tryptophane	Nitrate de potassium (KNO ₃)
S1	-	-	-	-

S3	-	-	-	-
S4	-	-	-	-
S5	-	-	-	-
S6	-	-	-	-
S7	+	-	-	-
S8	-	-	-	-

(+ : test positif ; - : test négatif)

D'après les résultats présentés dans le tableau 09, il ressort que toutes les souches isolées ont donné des résultats négatifs, sauf la souche S7 qui assimile l'acide glutamique.

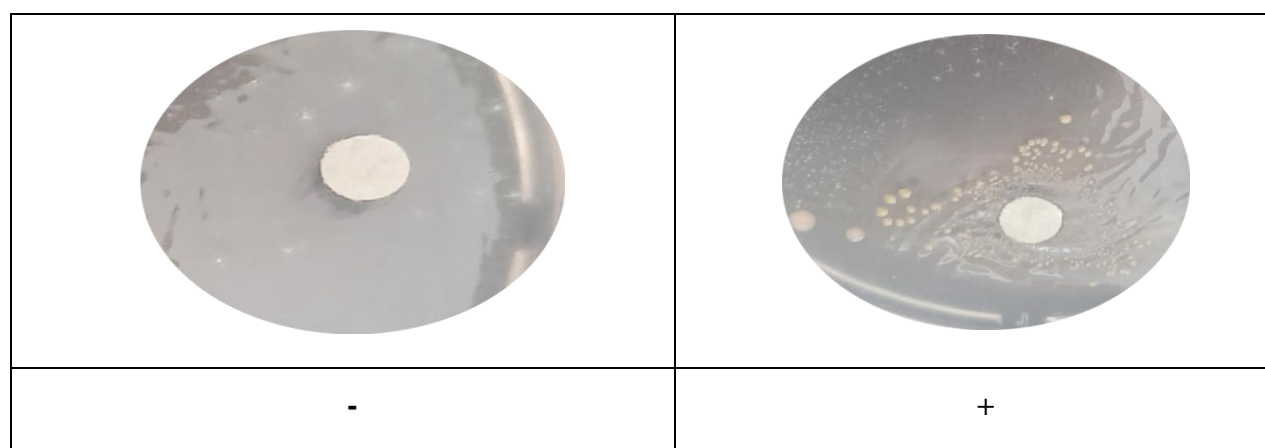


Figure 15: Résultat d'assimilation des substrats azotés.

3. Mise en évidence des activités enzymatiques

Les tests de la mise en évidence des différentes activités enzymatiques : amylolytique, maltasique, pectinolytique et protéolytique chez les souches de levures isolées révèlent que toutes les isolats de levures testés ont montré au moins une activité enzymatique (tableau 10). Selon (Gana *et al.*, 2014), les microorganismes représentent une bonne source de biomolécules telles que les enzymes qui revêtent une grande importance commerciale et industrielle, ce qui a conduit à l'isolement de microorganismes importants du point de vue biotechnologique. Ajoutant à cela que les levures se sont révélées être de bonnes sources d'enzymes. De plus, (Banakar et

Thippeswamy 2012) ont rapporté que les microorganismes sont actuellement la principale source d'enzymes industrielles, dont 50% proviennent de champignons filamenteux et de levures.

Tableau 10: Mise en évidence des activités enzymatiques des 7 souches de levures sélectionnées.

enzyme	α -amylase	maltase	protéase	pectinase
souche				
S1	+	+	+	+
S3	+	+	+	+
S4	+	+	+	+
S5	+	-	+	-
S6	+	+	+	+
S7	+	+	+	+
S8	+	+	+	+

(+ : test positif ; - : test négatif)

3.1. Screening des souches productrices de l' α -amylase

L'étude a montré que toutes les souches étudiées sont productrices de cette enzyme (tableau 10) car, elles montrent après révélation avec lugol des zones claires.

Le résultat du test de la mise en évidence de l'activité α -amylolytique chez l'ensemble des levures isolées a montré qu'après 3 jours d'incubation à 30°C sur milieu YPSA un développement d'un halo clair est observé dans les boîtesensemencées avec les toutes les souches S1, S3, S4, S5, S6, S7 et S8 (**Fig 16**).

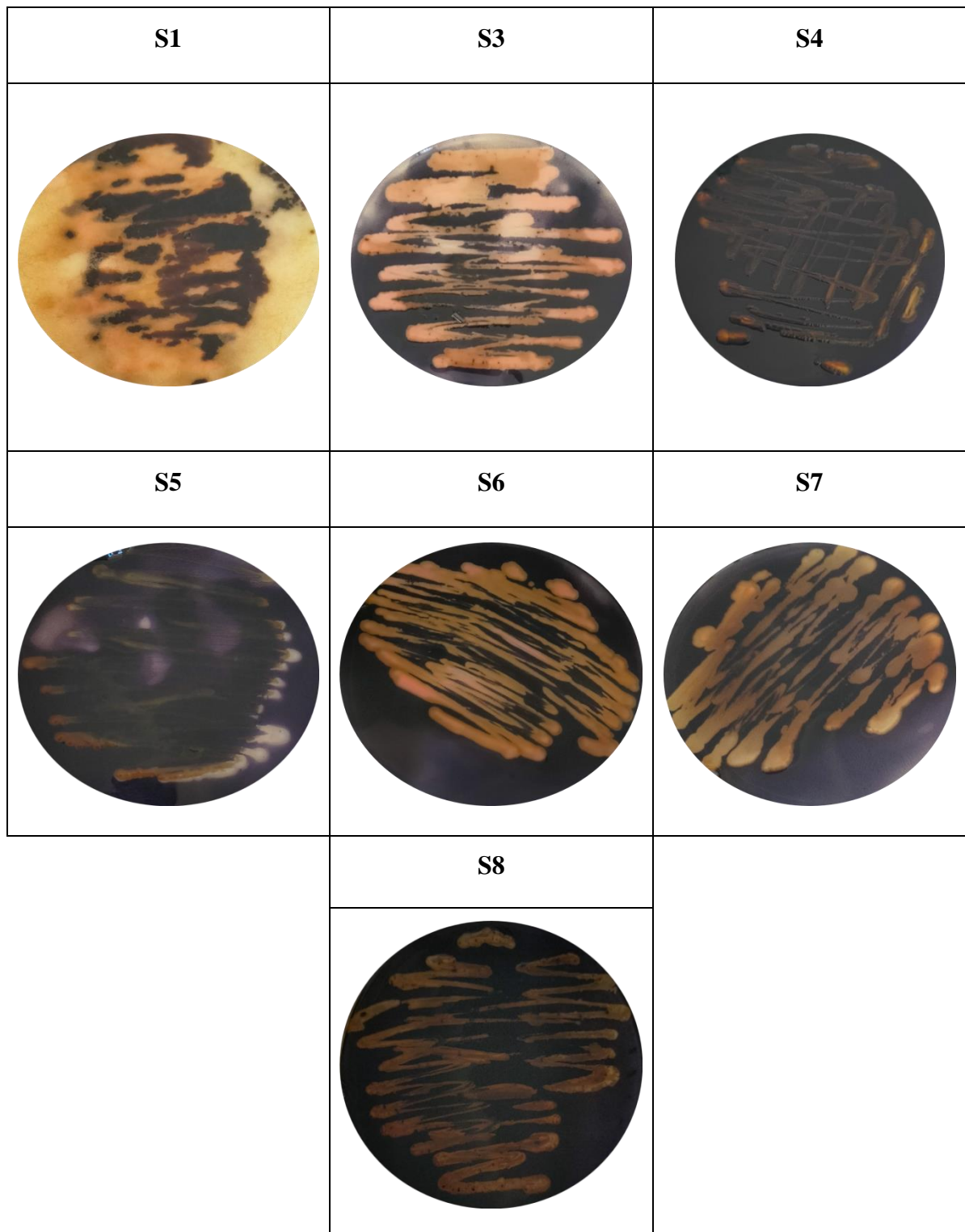


Figure 16: Mise en évidence de α -amylase

Selon la littérature, la production des amylases extracellulaires est déjà signalée chez plusieurs souches de levures appartenant aux espèces de *Arxula adenivorans*, *Candida japonica*, *Filobasidium capsuligenum*, et aux genres de *Lipomyces*, *Saccharomycopsis*, *Schwanniomyces* (Sujeeta *et al.*, 2017). D'autre part, (Merabti, 2006) a pu isoler une souche de

levure, appartenant au genre *Lipomyces sp.*, qui est capable de produire une activité amylolytique élevée sur milieu PDA à 1% d'amidon. De manière similaire, (Benaouida, 2008) a isolé à partir des échantillons de sol, une levure *Schwaniomyces sp.* qui produit une bonne activité amylolytique sur le même milieu.

3.2. Screening des souches productrices de maltase

Six souches ont produit la maltase (S1, S3, S4, S6, S7). Seulement la souche S5 qui n'a pas produit cette enzyme, après révélation avec rouge congo, les souches productrices montrent des zones claires de forme d'anneau (Fig 17).

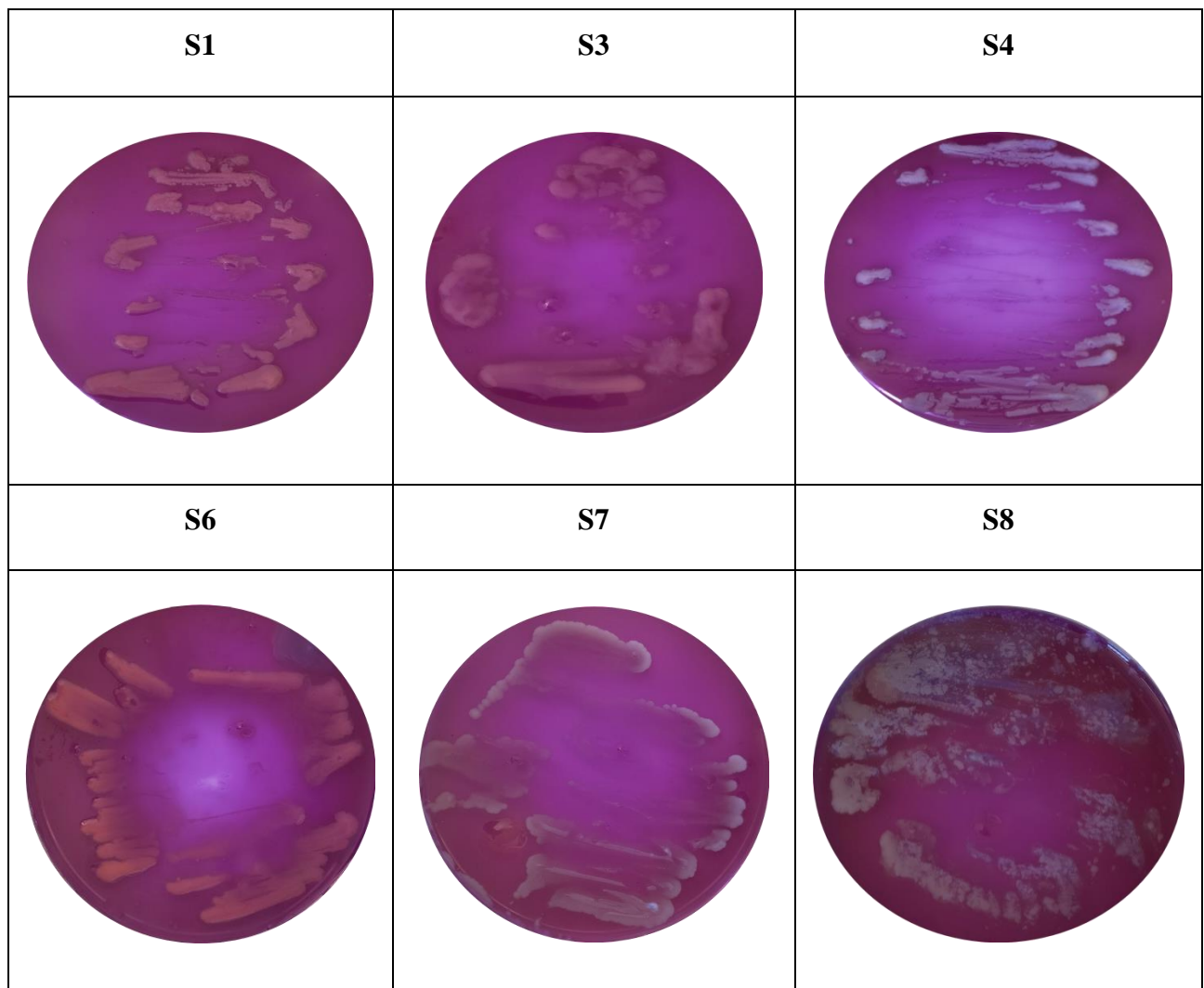


Figure 17: Mise en évidence de la maltase

En effet, nos résultats sont en accord avec ceux présentés par (Temim et Hmaidia, 2018) qui ont étudié l'activité de maltase, chez des 32 souches levuriennes isolées à partir de déchets de pommes de terre et une souche de levure à partir du yaourt et 5 souches à partir du miel.

Ces résultats sont confirmés par une autre comparaison dans les études de (Ouédraogo, 2012), où il a montré que parmi des souches levuriennes isolées à partir des pelures de pomme

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

3.3. Screening des souches productrices de la protéase

Le résultat du test de la mise en évidence de la production de la protéase chez l'ensemble des levures isolées a montré qu'après 3 jours d'incubation à 30°C sur milieu lait gélosé un développement d'un halo clair est observé dans toutes les boîtes ensemencées avec les différentes souches testées (Fig 18).

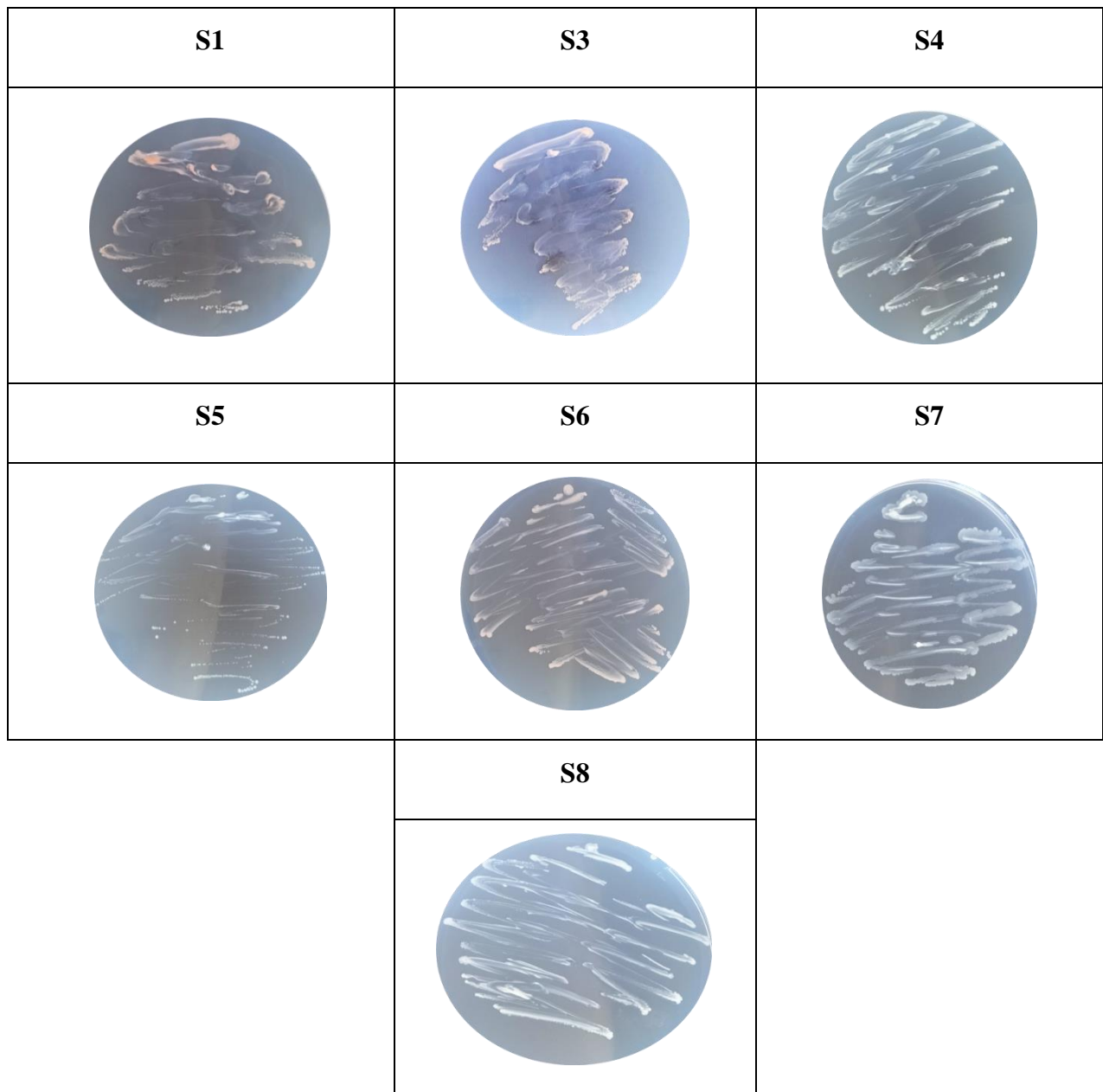


Figure 18: Mise en évidence de la protéase.

Les protéases produites par les souches de levures peuvent probablement libérer des acides aminés et des peptides à partir des protéines présentes dans les échantillons biologiques étudiés. En effet, Certaines levures appartenant essentiellement aux genres *Saccharomyces*, *Rhodotorula*, *Candida*, *Debaryomyces*. L'activité protéolytique de ces levures est utilisée particulièrement pour l'affinage des fromages (**Kresze, 1991 ; Boiron, 1996**).

La présence des levures protéolytique dans le lait pourraient favoriser la croissance d'autres espèces des levures, car les petites quantités d'acide amines et d'acides gras libres provenant de leur activité enzymatique pourrait contribuer à la croissance importante d'autres levures (**Roostit et Fleet, 1996**).

La prédominance des espèces de levures connues leur forte activité lipolytique et protéolytique suggère leur contribution dans le développement de la saveur caractéristique du lait (**Gaborit et al., 2001**).

En effet, 40% des enzymes industrielles sont produites par les microorganismes parmi lesquels, on trouve des souches fongiques (**García-Gómez et al., 2009**). Aussi, il a été démontré que les protéases fongiques ont de nombreuses applications pratiques dans la production des détergents, le traitement de cuir, le domaine alimentaire, le domaine médical, l'industrie chimique et dans le traitement des déchets (**Bessadok et al., 2015**)

3.4. Screening des souches productrices de la pectinase

Parmi les sept souches testées ; six qui ont produit la pectinase (S1, S3, S4, S6 et S7). En revanche, aucune activité pectinolytique n'a été détectée chez la souche S5. Après révélation avec lugol 2, Les souches productrices montrent des zones claires de forme d'anneau (**Fig 19**).

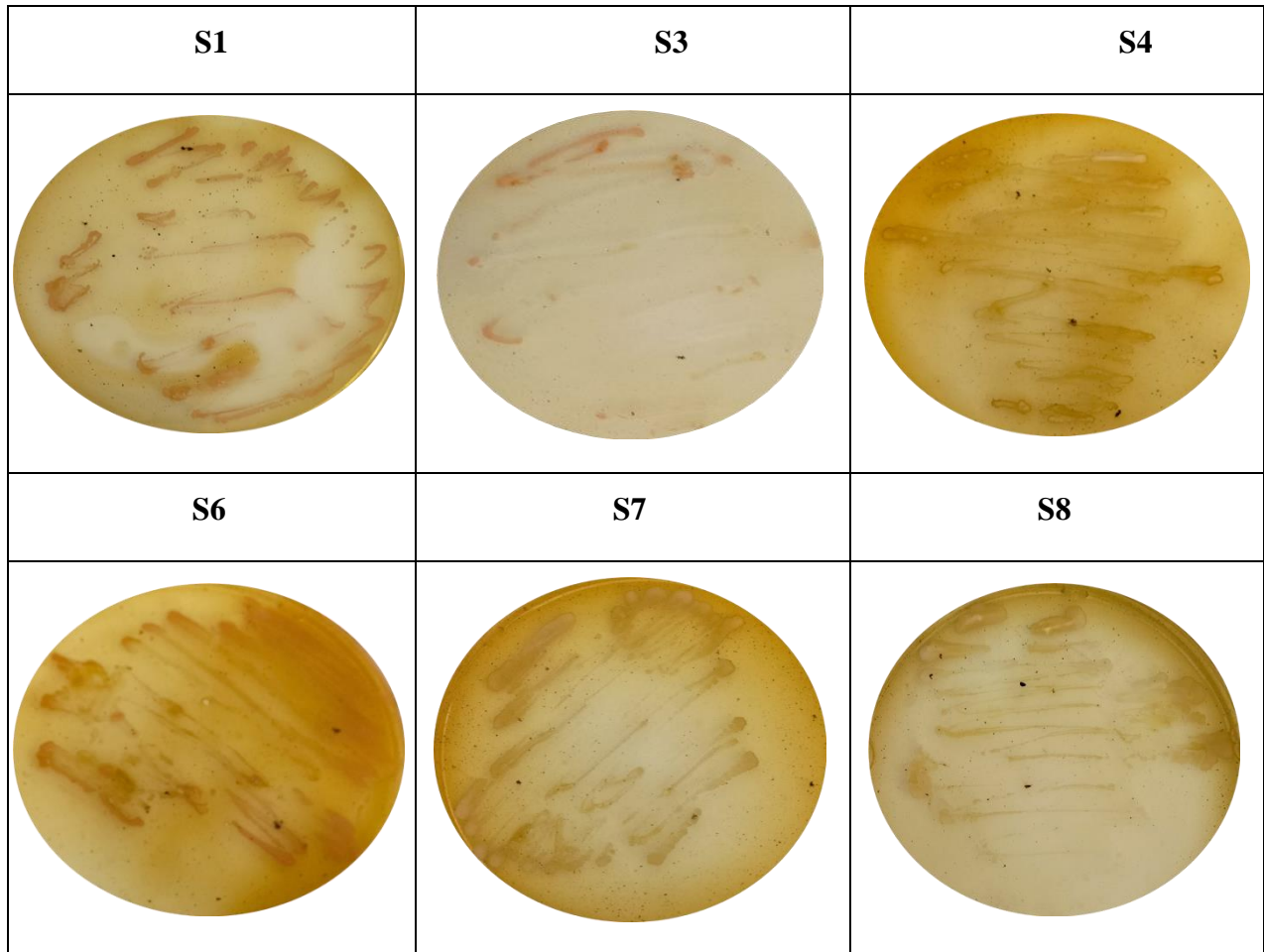


Figure 19: Mise en évidence de la pectinase.

La production des pectinases utilisées dans l'industrie a été rapportée chez les microorganismes, notamment les bactéries, les actinomycètes, les champignons filamenteux, et chez certaines levures (**Oskay et Yalçin, 2015**).

Les levures présentent des avantages par rapport aux champignons filamenteux dans la production de pectinases, car elles sont des unicellulaires, leur croissance est relativement simple dans des milieux de culture économiques et relativement plus facile à réaliser à grande échelle (**Combina et al., 2012 ; Martos et al., 2013 ; Oskay et Yalçin, 2015**). Ainsi, (**Banakar et Thippeswamy, 2012**) ont rapporté que la levure appartenant à l'espèce *S. cerevisiae* est parmi les microorganismes les plus étudiés pour la production de pectinases dans les 15 dernières années.

Conclusion et perspectives

Les microorganismes sont une bonne source de biomolécules telles que les enzymes qui revêtent une grande importance commerciale et industrielle, ce qui a conduit à l'isolement de microorganismes importants du point de vue biotechnologique. Les levures, par exemple, se sont révélées être de bonnes sources d'enzymes.

Dans ce contexte, le présent mémoire a pour objectif l'isolement et le criblage de souches alevuriennes productrices d'enzymes à intérêt biotechnologique, à savoir : l' α -amylase, la maltase, la protéase et la pectinase.

Sept souches de levures ont été isolées à partir de pelure de pomme de terre, lait de vache, lait caillé et petit lait sur milieu YPG. Environ 28% des isolats sont obtenus à partir des pelures de pomme de terre, 14,5% à partir du lait, 28,5% à partir du lait caillé et 28,5% à partir du petit lait.

Les cultures sont identifiées comme levures en se basant sur l'observation des caractères macroscopique et microscopique des colonies isolées,

Pour l'identification physiologique différentes sources de carbone ont été utilisées pour la fermentation : galactose, saccharose, maltose et lactose. Les résultats ont montré que les souches S1, S3 et S4 fermentent le lactose et le galactose, Les souches S5 et S7 fermentent le lactose, le maltose, le saccharose et le galactose et les souches S6 et S8 fermentent le maltose, lactose et galactose.

Pour l'assimilation des substrats azotés, les résultats ont montré que presque toutes les souches isolées ne sont pas capables d'assimiler les substrats azotés sauf la souche S7, elle assimile l'acide glutamique.

Ensuite, un screening a été réalisé sur milieu solide pour la mise en évidence de 4 enzymes à savoir : maltase, α -amylase, protéase et pectinase. Les souches testées ont été cultivées sur un milieu à base de substrat inductible pour chaque enzyme, ces milieux solides ont été incubés à 30°C pendant 3 à 5 jours. Les résultats ont montré que la majorité des isolats étudiés sont producteurs des enzymes : Six souches (S1, S3, S4, S6, S7 et S7) se sont révélées productrices de l' α -amylase, maltase, protéase et pectinase et une souche (S5) présente une activité amylase et protéase.

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

- Identification des souches sélectionnées productrices d'enzymes par des techniques de biologie moléculaire
- Etude de la production quantitative des enzymes révélées par les levures isolées.

- Optimisation du milieu de production à base de déchets alimentaires et industriels meilleur rendement et un faible coût :
- Purification des enzymes produits, pour un usage alimentaires ou pharmaceutique.
- Rechercher chez ces levures d'autres enzymes d'intérêt, pouvant ouvrir à d'autres applications industrielles.

Références bibliographiques

A

Aguilar C. N., Gutiérrez-Sánchez G., Rado-Barragán PA., Rodríguez-Herrera R., MartínezHernandez J. L et Contreras-Esquivel J. C. (2008). Perspectives of solid state fermentation for production of food enzymes. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*, 4: 354-366.

Aichour Nour El Houda.(2017). Etude des hydrolases chez les levures. Purification et caractérisation de l' α -amylase chez *Clavispora lusitaniae* ABS7. Mémoire de Master Département : Biochimie et Biologie Moléculaire et Cellulaire.

Alexandre.G. (1912). Les levures. Octave Doin et Fils, Editeurs, Paris, 12-13P.

Amaud A., Berset C., Bocquet J., Bouix M., Cerisie Y., Cuvelier EG.F., De Nettancourt D., Engasser J.M., GaW P., Goursaud J., Cnrenini M., Guiraud J.P., Richard, H., Steenbrugge, H., Teoule, E., Thomas, D. et Vandecasteele, J.P. (1993). *Biotechnologies*. Ed., Scriban R. (éd), Technique et Documentation Lavoisier Paris, France, 904 p.

Anbu P., Gobinath S .C .B., Cihan A C et Chaulagain B P. (2013). *Microbial Enzymes and Their Applications in Industries and Medicine*. BioMedResearch international, 204014.

Andriotis Vasilios M. E. Gerhard S., Robbie W., Robert A. Field., Alison M et Smith. (2016). The maltase involved in starch metabolism in barley endosperm is encoded by a single gene, 11: 151-642.

Aviron-Violet, P., J.L. Baret, C. Bertrand B., Blazy F., Bouvier M., Comtat P.R., Coulet P. Dupuy J.F. , Hervagault A., Joyeau4 J., Laurent P., Monsaq D., Thomas P. Sicard G.M.A. et Van B. (1982). *Les enzymes. Production et utilisation industrielles*. Durand G. et P. Monsan (eds), Bordas, Paris, France, 349P.

B

Bakker J., Smant G. (2000). Degradation of plant cell walls by a nematode. *Nature*, 406: 36-37.

Banakar S., Thippeswamy B. (2012). Isolation, production and partial purification of fungal extracellular pectinolytic enzymes from the forest soils of Bhadra Wildlife Sanctuary, Western Ghats of Southern India. *Journal of Biochemical Technology*, 3:138-143.

- Barker Megan. K., David. R, Rose. (2013).** Specificity of processing α -glucosidase is guided by the substrate conformation crystallographic and in silico studies. *Journal of biological chemistry*, 288: 13563–13574.
- Barnabé S., Sasseville J. L., Tyagi R. D. et Valéro J. R. (2003).** Eaux usées et résidus Industriels, matières tertiaires ou matières premières ? *VECTEUR environnement*, 36: 50-62.
- Baron A., Thibault J.F. (1985).** Les enzymes pectinolytiques dans:Hydrolases et dépolymérasés, enzymes d'intérêt industriel. Mouranche A., Costes C., GauthierVillars, 143-164P.
- Bataiche I. (2014).** Recherche de nouvelles potentialités de *Yarrowia lipolytica*, isolé de différents milieux naturels pour des applications biologiques. Thèse de doctorat , Bioprocédés et biotechnologies, applications mycologiques , Université Constantine1
- Bateman D.F., Basham H.G.(1976).** Degradation of plant cell walls and membranes by microbial enzymes. *Physiology of Plant-Pathogen Interactions*, 4: 316-35.
- Benaouida K. (2008).** Etude de l'alpha amylase de levures isolées d'un écosystème extrême (sol environnant des sources thermales) et cultivées sur un milieu à base de lactosérum. Mémoire Magistère. Département de Biotechnologie Alimentaire. Université Mentouri. Constantine, 104P.
- Berber N. (2013).** Essai D'identification Moléculaire (PCR-ITS-RFLP) et Caractérisation Biotechnologique des levures indigènes dans les vignobles de la Plaine de Ghriss, El Keurt (Mascara) Cépage de raisin : Cinsault, mémoire de Master En biotechnologie Alimentaire. Ed. Université Abd El Hamid Ibn Badis de Mostaganem.
- Blanco P. Thow G., Simpson C. G., Villa T. G. et Williamson B. (2002).** Mutagenesis of key amino acids alters activity of a *Saccharomyces cerevisiae* endopolygalacturonase expressed in *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiology Letters*, 210: 187-191.
- Bombeck P.L., Aurore R et Jacques H. (2016).** L'utilisation de l'hydrolyse enzymatique pour la production de nanocellulose dans une stratégie de bioraffinage forestier intégré (synthèse bibliographique). *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*, 20: 310-31.
- Botton B., Breton A., Fever M., Gauthier S., Guy P., Larpent J. P., Reymond P., Sanglier J J.,Vayssier Y et Veau P. (1999).** Moisissures utiles et nuisibles importance industrielle, Masson, 2ème édition. Paris.
- Boiron P. (1996).** Organisation et biologie des champignons. Nathan. Paris, 19-79P.

Bouix M., Leveau J.Y. (1991). Les levures *Ds* : Bourgeois C.M., Leveau Y.J. Techniques d'analyse et de contrôle dans les industries agroalimentaires, édition 21. Lavoisier-Tec&Doc, France,206-229P.

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

Bourgeois C.M., Larpent J.P. (1996). Microbiologie alimentaire, aliments fermentés et fermentations alimentaires. Tome 2. Ed. France, 35-130P.

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

Burhan A., Unaldi N., Coral G., Colak O., Aygan A et Gülnaz O. (2003). Enzymatic Properties of a novel thermostable, thermophilic, alkaline and chelatorresistant amylase from An alkaliphilic *Bacillus sp.* Isolate ANT-6. ProcessBiochem,38 : 1397-1403.

C

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

Cao J. Zheng L. et Chen S. (1992). Screening of pectinase producer from alkalophilic bacteria and study on its potential application in degumming of rammie. Enzmologie . Microbiologie. Technologie, 14 : 1013-1016.

Cherry J.R., Fidantsef A. L. (2003). Directed evolution of industrial enzymes: An update. Current Opinion in Biotechnology, 14: 438-443.

Choi H. M. A., Donati R., Parini D., Melis R., Gatti N., Bresolin G., Scarlato et Comi G. P. (2013). Molecular characterisation of Gsd III subjects and identification of six novel mutations in AGL. Human mutation, 20 : 480–480.

Combes D., Monsan P. (2009). Biocatalyse ou catalyse enzymatique. Chimie verte, 1, Réf : BIO590

D

De Souza PM. De Oliveira Magalhães P. (2010). Application of microbial α -amylase in industry. A review Braz J. microbiology, 41 : 850-61.

Djekrif D.S. (2016). Production et caractérisation de l'amylopullulanase de la levure *Clavispora lusitaniae* ABS7 isolée de blé cultivé et stocké en zones arides. Thèse de Doctorat. Département de Biochimie et Biologie Moléculaire et Cellulaire / Laboratoire de GMA. Université Mentouri Constantine.

E

Eman M.M. (2021). Botany & Microbiology Department, Faculty of Science, Assiut University. Egypt, 50 : 20-43.

Ertan F., Yagar H., and Balkan B. (2006). Some Properties of free and immobilized alpha-amylase from *Penicillium Griseofulvum* by Solid state fermentation. Preparative biochemistry & biotechnology, 36: 81-91.

F

Favela-Torres E. Volke-Sepúlveda T. et Vniegra-Gonzalez G. (2006). Production of hydrolytic and polymerizing pectinases. Food Technology and Biotechnology, 44: 221-227.

Fogarty W.M., Kelly C.T. (1980). Amylase, amyloglucosidase and related glucanases. In Rose (A.H.) Ed. Economic microbiology, microbial enzymes and bioconversion. London: Academic Press, 5 : 115-170P.

Fogarty M.V., Kelly, C.T. (1983) In Microbial Enzymes and Biotechnology. ed. Fogarty, M.W. London & New York: Elsevier Applied Science Publishers, 131-182P.

G

Gainvors A., Nedjaoum N., Gognies S., Muzart M., Nedjma M. et Belarbi A. (2000). Purification and characterization of acidic endo-polygalacturonase encoded by the PGL1- 1 gene from *Saccharomyces cerevisiae*. FEMS Microbiology Letters, 183: 131- 135.

Gana S. K., Gana M.L. (2014). Algerian Yeast Strains: Isolation, Identification and Production of Single Cell Protein from Whey with Strain *Candida kefyr*, *International Journal of Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics*, 4 : 160-165.

García-Gómez M.J., Huerta-Ochoa S., Loera-Corral O et Prado-Barragán L.A. (2009). Advantages of a proteolytic extract by *Aspergillus oryzae* from fish flour over a commercial proteolytic preparation. *Food Chem*, 112 : 604–608.

Grbavčić S., Darka M., Mirjana R-S., Mirjana A., Marina Š., Ivanka K., et Zorica KJ. (2015). Development of an environmentally acceptable detergent formulation for *Référence bibliographique 82* fatty soils based on the lipase from the indigenous extremophile *Pseudomonas Aeruginosa* Strain. *Journal of Surfactants and Detergents*, 18 : 383-95.

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

Gonzalez C.F., Farina J. I. et de Figueroa L. I. C. (2008). Optimized amylolytic enzymes production in *Sacchromycopsis fibuligera* DSM-70554: An approach to efficient cassava starch utilization. *Enzyme and microbiol technology*, 42: 272-277.

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

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

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

Gutiérrez A., Patricia., M . G. P., Mercedes R.E. , FranciscoJ.P., Sanz-A.J et Fernández M. (2015). Molecular characterization and heterologous expression of *aRéférencebibliographique 83* *Xanthophyllomyces dendrorhous* α -glucosidase with potential for prebiotics production. *Applied microbiology and biotechnology*, 15: 1–11

H

Haifeng L. Zhenming C., Xiaohong W., Xiaohui D., Liyan M. et Lingmei G. (2006). Purification and characterization of extracellular amylase from the marine yeast *Aureobasidium*

pullulans N13d and its raw potato starch digestion. Enzymatic and microbiology and technology, 40 :1006-1012.

Haq U.I., Ahsraf H ., Iabal J. et Qadeer M.A. (2003). Production of α -amylase by *Bacillus licheniformis* using an economical medium, in: Behal A, Singh J, Sharama M.K., Pur P and Batra N., Characterisation of alkaline amylase from *Bacillus sp* AB 04. International Journal of Agriculture & Biology, 8: 80-83.

Heslot H. (1996). L'ingenierie des proteines et ses applications. Lavoisier Technique et Documentation, 424- 432P.

Horikoshi K. (1972) Production of alkaline enzymes by alkalophilic microorganisms Part III. Alkaline pectinase of *Bacillus* No P-4-N. Agricultural and Biological Chemistry ,36: 285-293.

Hornebeck W. (2009). Cascades protéolytiques. Médecine and longévité, 1 : 38–43.

Hung V.S., Hatada Y., Goda S., Lu J., Hidaka Y., Li Z., Akita, M., Ohta Y., Watanabe K., Matsui H., Ito S. et Horikoshi K. (2005). Alpha-Glucosidase from a strain of deepsea *Geobacillus*: a potential enzyme for the biosynthesis of complex carbohydrates. Application Microbiology and Biotechnology, 68 :757-765.

J

Jacob A., Rendleman Jr.(1997). Enhancement of cyclodextrin production through use of debranching enzymes. Biotechnology and applied biochemistry, 26 : 51-61.

Janecek S. Svensson B. et MacGregor E.A. (2014). α -Amylase - an enzyme specificity found in various families of Cellular and Molecular Life Science, 71: 1149-1170.

Jaubert S., Laffaire J.B., Abad P., et Rosso.M.N. (2002).A polygalacturonase of animal origin isolated from the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. Federation of European Biochemical Societies letters, 522: 109-112.

Jean Ph., Marc P., Ludovic G., Bernard, C et Dominique C.(2010). Formation Biologie Médical, 5P.

Jegham H. (2009). Etude de l'activite biologique et du mécanisme d'action de dérivés stéroïdiens à potentiel anticancéreux. Science et Vie, 12 : 123-632.

K

- Kappeli O., Sonnleitner.** (1986). Regulation of Sugar Metabolism in Saccharomyces-Types Yeast : Experimental and Conceptual Considerations., CRC Critical Reviews in Biothecnology, 4 : 299.
- Karbassi A. Vaughn R.H.** (1980). Purification and properties of polygalacturonic acid trans-eliminase from *Bacillus stearothermophilus* Canadian Journal of Microbiology 26 :377-384.
- Kashyap D .R., Vohra P. K., Chopra S.et Tewari R.** (2001). Applications of pectinase sin the commercial sector: areview. Bioresource Technology, 77 : 215-227.
- Katrin V., Triinu V., Karin M., Anneli A et Tiina A.** (2016). Maltase protein of ogataea (hansenula) polymorpha is a counterpart to resurrected ancestor protein ancMALS of yeast maltases and isomaltases. Yeast (Chichester, England), 5 : 250-530.
- Kresze G. B.** (1991). Proteases during purification. Bioprocess-technol, 12 :85-120.
- Kumar GA., NageshN., Prabhakart T,G.et Sekran G.** (2008). Purification of extracellular acid protease, an analysis of fermentation metabolites by Synergistes sp. utilising protein aceous solid waste from tanneries.Bioresource Technology, 99: 2364-2372.
- Kurtzman, Cletus, J. W. Fell, et Teun Boekhout.** (2011). The Yeasts : A Taxonomic Study. Elsevier.London, 623P.

L

- Leclerc H.** (1975). Microbiologie générale, Doin éditeurs, Paris, 28P.
- Leveau J. Y., Bouix M.** (1993). « Les levures », In « Microbiologie Industrielle, Les micro-organismes d'intérêt industriel, « Technique et Documentation- Lavoisier, J., Leveau. Y., Bouix., M.
- Li C., Du M., Cheng B., Wang L. Liu X., Yang C. et Xu P.** (2014). Close relationship of a novel Flavobacteriaceae α -amylase with archaeal α -amylases and good potentials for industrial applications. Biotechnology. Biofuels, 7: 18.
- Liang X., Fei W., Xiang L., Yu-Liang F.,et Jia-Xun F.** (2015). Purification and Characterization of a Highly Efficient Calcium-Independent α -Amylase from *Talaromyces pinophilus* PLOS One, 10: 1-95.

M

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

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

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

N

Nadeem H. Muhammad H R., Muhammad H S., Farrukh A., Saima M., Muhammad R J., Muhammad A., Ijaz R. Muhammad R. (2016). Microbial invertases : a review on kinetics, thermodynamics, physiochemical properties. Process biochemistry, 50 : 1202–1210.

Nadirman H., Yoshiyuki O. (2006). Mechanism of Hydrolysis of the Treated Starch Granules by Raw Starch Digesting Amylase from *Penicillium brunneum*, Journal Starch Starke, 7: 25- 28.

Nawaz S., Muhammad A., Asad K., Afsheen A., Roberta M., Shah A Q. et Antonio Molinaro. (2015). Continuous degradation of maltose: improvement in stability and catalytic properties of maltase (α -glucosidase) through immobilization using agar-agar gel as a support. Bioprocess and biosystems engineering, 38 : 631-38.

O

Oskay M., Yalçın H.T. (2015) Screening of Yeast Strains for Pectinolytic Activity: Effects of Different Carbon and Nitrogen Sources in Submerged Fermentations. OnLine Journal of Biological Sciences, 15: 89.96.

Ouédraogo N. Savadogo A., Zongo C., Somda K. M. A. et Traoré S. (2012). High performance amylolytic yeast strains isolation and identification for valorization of

potatoes waste available in Burkina. The International Food Research Journal J, 19: 1463-1469.

Ovaere P., Saskia L., Peter V et Wim D. (2009). The emerging roles of serine protease cascades in the epidermis. Trends in Biochemical Sciences, 34 : 453-463.

Oyekanmi N., Sukhoon K., Se-Yong L. et Dae-Sil L. (2001). Novel α -glucosidase from extreme thermophile *Thermus caldophilus* GK24. Journal of biochemistry and molecular biology, 34 : 347-354.

P

Palmer T.A. (1975). Glucose syrups in food and drink. Process Biochemistry. Fermentation en silos de laboratoire de pulpes de bettraves sucrières. Belgian Journal of Food Chemistry and Biotechnology, 98 :792-797.

Panchal C.J. (1990). Yeats strain selection. Marcel Dekker (ed) USA, 189P.

Pardo M F., López L. M. I., Canals F., Avilés F. X., Natalucci C. L et Caffini N. O. (2000). Purification of balansain I, an endopeptidase unripe fruits of *Bromelia balansae* Mez (Bromeliaceae). Journal of Agricultural and Food Chemistry, 48 : 3795–3800.

Pierre T. (2004). Les organismes modernes. La levure, édition belin, Paris,105-108P.

R

Radoi F., Kishida M. et Kawasaki H. (2005). Endo-polygalacturonase in *Saccharomyces* wine yeasts: effect of carbon source on enzyme production. FEMS Yeast Research, 5: 6-7P.

Rao M.B., Tanksale A. M., Ghatge M. S., et Deshpande VV.(1998). Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. Microbiology and Molecular Biology Reviews MMBR, Les enzymes production et utilisations industrielles, 62 : 597-635.

Rezki-Bekki M.N. (2014). Production de métabolites par les levures : caractérisation et identification des arômes et des alcools. Thèse de Doctorat, Université d’Oran.

Riken Y., Stephen A., Joseph J., Brian L. Strom S L., Douglas W., Pherson Mc., Srdan G., Acimovic, K D. et Klepzig.(2016). Effects of *grosmannia clavigera* and *leptographium longiclavatum* on western white pine seedlings and the fungicidal activity of alamo, arbotect, and tree-age, 25 : 256-652.

Rombouts F.M., Pilnik W. (1986). Pectinases and other cell-wall degrading enzymes of industrial importance. *Symbiosis*, 2:79-89.

Rose, A. H., Harrison,S. J. (1971). « The yeast vol.2 : Physiology and Biochemistry of Yeasts » In, Academic Press.

Russell, I. (2003). « Understanding Yeast Fundamental In The Alcohol Test Book 4th Edition »Nothing University Press, K. Jacques, T. P Lyons and D. R. Kelsall, 85-119P.

S

Sasaki F., Toshizumi M., Yutaka T. et Takashi Y. (2015). Note on cordyceps brongniartii Shimazu collected from the wild in Japan. *Mycoscience*, 48 : 312-315.

Schaller A. (2004). A cut above the rest: The regulatory function of plant proteases. *Planta*, 220: 183-197.

Scheen A., PaquoNicolas T., Van G. et Luc F. (2008). Inhibition des recepteurs CB1 et metabolisme du glucose : rimonabant dans le diabete de type 2. *Revue médicale suisse*, 4: 168-632.

Scriban R. (1993). *Trichoderma reesei* exhibitis true revercibility and a high exchange rate on cristalline cellulose. *Biotechnologie*. 4éme édition, 32-69P.

Sieiro C., Poza M., Vilanova M. et Villa T G. (2003). Heterologous expression of the *Saccharomyces cerevisiae* PGUI gene in *Schizosaccharomyces pombe* yields anRéférence bibliographique 94 enzyme with more desirable properties for the food industry. *Applied and Environmental Microbiology*, 69: 1861-1865.

Sieiro C., Poza M., Vilanova M. et Villa T G. (2003). Heterologous expression of the *Saccharomyces cerevisiae* PGUI gene in *Schizosaccharomyces pombe* yields anRéférence bibliographique 94 enzyme with more desirable properties for the food industry. *Applied and Environmental Microbiology*, 69: 1861-1865.

Sujeeta K.M., Shikha M et Khushboo S. (2017). Isolation and Screening of Amylase Producing Fungi. *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci*, 6: 783-788.

Sullivan GA., Calkins C. R. (2011). Ranking beef muscles for Warner-Bratzler shear force and trained sensory panel ratings from published literature. *Journal of Food Quality*, 34: 195–203.

T

Tapdiqov S Z., Nizami A Z., Dilgam B T., Saadat FH., Samira M M., Elnara F N., et Dilshad TB. (2015). Hydrogels for immobilization of trypsin based on poly-nvinylpyrrolidone and arabinogalactan graft copolymers. Journal of The Chemical Society of Pakistan, 37: 1112.

Tauzin H., Gwenaël R., Céline V., Philippe S., Philippe H. et Patrice Muret.(2014). A skin substitute based on human amniotic membrane. Cell and tissue banking, 15: 257-265.

Temim M. and Hamaidia N. (2018). Screening et identification des levures pour la mise en évidence d'activité enzymatique. Mémoire de Master. Département: Biochimie/ Biologie Cellulaire et Moléculaire. Université Mentouri Constantine.

Thuriaux, P. (2004). Les organismes modèles : «La levure ». Ed. DECLIN, 1-144P.

U

Uhlig H. (1998). Industrial Enzymes and Their Applications. John Wiley and Sons, New York, 435P.

V

Vanhanen L., Alastair B., R., Geoffrey P .S et Sue M. (2000). Effect of Cooking on the Soluble and Insoluble Oxalate Content of Some New Zealand Foods. Journal of Food Composition and Analysis, 13 : 201-206.

Veyradier A., Paul C. (2011). La protéase spécifique du clivage du facteur von Willebrand. Medecine Sciences, 27: 1097.

W

walker G.M. (2009). Yeasts. University of Abertay Dundee, Scotland. Elsevier Inc, 1147-1187P.

Walsh G. (2002). Biochemistry and Biotechnology. J.W.and Sons (Ed.) England,420P.

X

Xuesong L. I. (2016). Proteines structure et fonctions. Université de Liège, 123-356P.

Y

Yang C .H., Yu-C. H., Cheng Y.C. and Chia Y .W. (2010). Heterologous expression of Thermobifida Fusca thermostable alpha-amylase in Yarrowia Lipolytica and its application in boiling stable resistant sago starch preparation. Journal of industrial microbiology & biotechnology, 37: 953-960.

Yapi A et Russell.E. Patrice YAPI. (2008). Caractérisation biochimique et applications potentielles des glucosidases et de l' α -galactosidase du suc digestif de la larve de *Rhynchophorus Palmarum* (Curculionidae). Mémoire Online, 46: 541-46.

Annexes

Milieux de culture et solution

Annexe 1 : Milieu YPG (Yeast Pepton Glucose)

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

pH 5.4±0.2

Annexe 2 : Milieu YCB (Yeast Carbon Base)

- Glucose : 20g
- KH_2PO_4 : 1g
- MgSO_4 : 0,5g
- Agar : 20g
- Eau distillée : 1000ml

pH 5.4±0.2

Annexe 3 : Milieu YPSA (Yeast Peptone Strach Agar)

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

pH 5.4±0.2

Annexe 4 : Milieu YPPA (Yeast Peptone Pectin Agar)

- Extrait de levure :15g
- Peptone :20g
- Pectine : 20g

- Agar :20g
- Eau distillée :1000ml

pH 5.4±0.2

Annexe 5 : Milieu YPMA (Yeast Peptone Maltase Agar)

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

pH 5.4±0.2

Annexe 6 : Gélose de lait

- Caséine :100g
- Agar :20g
- Eau distillée :1000ml

pH 5.4±0.2

Annexe 7 : Lugol 1

- Eau distillée :100ml
- Iodure de potassium (KI) : 2g
- Iode métalloïde :1g

Annexe 8 : Lugol 2

- Eau distillée :330ml
- Diode (I₂) :1g
- Iodure de potassium (KI) : 5g

Annexe 9 : Rouge congo

- Rouge Congo :1g
- Eau distillée :100ml

Annexe 10 : Na Cl

- Na Cl :0,9g
- Eau distillée :100ml

Annexe 11 : Eau de levure

- Extrait de levure : 0.5g

Eau distillée:100 ml

Résumés

In this study, we focused on the isolation and selection of yeast strains that produce enzymes of biotechnological interest. Isolation was performed from four samples: cow's milk, whey curd, and potato peel. These microbial niches allowed the isolation of 7 strains on YPG. The identification of the 7 selected strains was carried out through the study of morphological and physiological characteristics.

A macroscopic study was conducted to determine the cultural characteristics of the isolated yeast strains, and a microscopic study was performed to determine their shape and size. Different carbon sources such as lactose, maltose, sucrose, and galactose were used for physiological identification through fermentation. For nitrogen assimilation, nitrogenous substrates including glutamic acid, alanine, tryptophan, and potassium nitrate (KNO₃) were used. The enzymatic potential of the studied isolates was evaluated for the production of 4 different enzymes by culturing microorganisms on different substrates. The enzymes studied were alpha-amylase, pectinase, maltase, and protease. The results showed that all selected strains produce the mentioned enzymes, except for strain S5, which does not produce maltase and pectinase.

Keywords: yeast, isolation, identification, enzyme activity.

في هذه الدراسة، اهتمنا بعزل واختيار الخمائر المنتجة للإنزيمات ذات الفائدة البيوتكنولوجية. تم العزل من أربعة عينات: حليب البقر، اللبن، الحليب المتخثر وقشرة البطاطا. هذه البؤر البكتيرية سمحت بعزل 7 سلالات في وسط YPG .

تم تحديد السلالات السبع المختارة عن طريق دراسة الخصائص المورفولوجية والفزيولوجية، حيث تم إجراء دراسة ماكروسكوبية لتحديد الخصائص الزراعية للخمائر المعزولة، بالإضافة إلى دراسة مجهرية لمعرفة الشكل والحجم. تم استخدام مصادر مختلفة للكربون لاختبارات التخمر، بما في ذلك: اللاكتوز، المالتوز، السكروز والغلاكتوز. بالنسبة لامتناس النيتروجين، تم استخدام مواد نيتروجينية مثل: الجلوتاميك الحمضي، الألانين، التريبتوفان ونترات البوتاسيوم (KN03).

تم تقييم القدرة الإنزيمية للخمائر المعزولة لإنتاج 4 إنزيمات مختلفة من خلال نمو الميكروبات على مواد غذائية مختلفة. الإنزيمات المدروسة هي: ألفا أميلاز، بكتيناز، مالتاز، وبروتياز. أظهرت النتائج أن جميع السلالات المختارة منتجة للإنزيمات المذكورة مسبقاً، باستثناء السلالة S5 التي لا تنتج المالتاز والبكتيناز.

الكلمات المفتاحية: خمائر، عزل، تحديد، نشاط انزيمي

Présenté par :

Date de Soutenance :25 /06/2023

- ZOUAGHI RANIA
- MEKIRED RIMA
- BOULEKHLALEF Widad

Thème :
Étude de la bioprospection de levures : criblage des activités enzymatiques d'intérêt biotechnologique

Mémoire de fin de cycle pour l'obtention du diplôme de :

Master en Biochimie appliquée

Résumé

Dans cette étude nous nous sommes intéressés à l'isolement et la sélection des levures productrices d'enzymes d'intérêt biotechnologique. L'isolement a été réalisé à partir de quatre échantillons : le lait de vache, petit lait, lait caillé et pelure de pomme de terre. Ces niches microbiennes ont permis l'isolement de 7 souches sur le milieu YPG.

L'identification des 7 souches sélectionnées a été réalisée par l'étude des caractères morphologiques et physiologiques, une étude macroscopique pour déterminer les caractères culturels des souches de levures isolées, ainsi qu'une étude microscopique pour connaître la forme et la taille, ont été réalisées. Pour l'identification physiologique différentes sources de carbone ont été utilisées pour la fermentation à savoir : lactose ; maltose ; saccharose et galactose. Pour l'assimilation d'azote, les substrats azotés utilisés sont : acide glutamique, alanine, tryptophane et nitrate de potassium (KNO₃).

Le potentiel enzymatique des isolats étudiés a été évalué pour produire 4 enzymes différentes par la croissance des microorganismes sur différents substrats. Les enzymes étudiées sont : α -amylase, pectinase, maltase et protéase. Les résultats ont montré que toutes les souches sélectionnées sont productrices des enzymes qu'on a déjà cités, sauf la souche S5 qui ne produit pas la maltase et la pectinase.

Mots clés : Levures, Isolement, Identification, Activité enzymatique

Devant le jury :

Présidente : RIHANI Lamia -	MCA	Centre Universitaire Mila
Examinatrice : KEDDACHE Lilia	MCA	Centre Universitaire Mila
Promoteur : BENSERRADJ Ouafa	MCA	Centre Universitaire Mila

