

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
REPUBLICUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



جامعة قاصدي مرباح - ورقلة -
Université Kasdi Merbah – Ouargla



Faculté de Sciences de la Nature et de la Vie
THÈSE

Réf :.....

En vue de l'obtention du diplôme de
DOCTORAT ès **SCIENCES**

Spécialité: Sciences Biologiques

Option: Microbiologie Appliquée

Par

M. LAICHE Ammar Touhami

Thème :

**Production d'enzymes amylolytiques chez des souches levuriennes
isolées à partir de deux origines (sol saharien et blé) et cultivées sur
milieu à base de lactosérum**

Soutenue publiquement le : 13 /01 / 2019

Devant le jury composé de:

M. ADAMOU Abdelkader	Professeur	Université d'Ouargla	Président
Mme. SIBOUKEUR Oumelkheir	Professeure	Université d'Ouargla	Directrice de thèse
M. BOURAS Noureddine	Professeur	Université de Ghardaïa	Examineur
M. LADJAMA Ali	Professeur	Université d'Annaba	Examineur
Mme. BECILA-HIOUAL Samira	M.C.A	Université de Constantine	Examinatrice
Mme. MIMOUNI Yamina	M.C.A	Université d'Ouargla	Examinatrice

Année universitaire 2017-2018

Dédicace

Nous remercions le bon Dieu d'avoir béni cette thèse, et d'avoir exaucé mes vœux pour sa réalisation.

Ma profonde reconnaissance s'adresse à :

- ✓ *Mes chers parents*

- ✓ *Ma femme **Madiha** et à ma fille **Maram***

- ✓ *Mes frères, à mes sœurs et à toute ma famille*

- ✓ *Ma promotrice Mme. SIBOUKEUR*

- ✓ *Mes enseignants, à mes collègues et à tous mes amis*

Omar Jouhami ✍

Remerciements

Au terme de ce travail, je tiens à témoigner ma gratitude et mes plus sincères remerciements à Madame **SIBOUKEUR Oumelkheir**, Professeure à la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie ; à l'université Kasdi Merbah -Ouargla-, pour l'honneur qu'elle m'a fait en acceptant de me diriger pour la réalisation de cette thèse. Je lui suis infiniment reconnaissant pour sa disponibilité, ses conseils et ses idées malgré ses préoccupations.

Avec beaucoup de plaisir, j'exprime ma reconnaissance à Monsieur **ADAMOU Abdelkader** ; Professeur à la Faculté des Sciences de la Nature à l'université Kasdi Merbah -Ouargla-, pour avoir accepté de présider cette séance.

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

- Monsieur **BOURAS Nouredine**; Professeur à l'université de Ghardaïa.
- Monsieur **LADJAMA Ali**; Professeur à l'université d'Annaba
- Madame **BECILA-HIOUAL Samira**; Maître de conférences à l'université de Constantine.
- Madame **MIMOUNI Yamina** ; Maître de Conférences A à l'université Kasdi Merbah -Ouargla-.

Je tiens aussi à exprimer mes remerciements à Monsieur **ALOUANI B.** Propriétaire de la laiterie **ALOUANI** à **GHARDAIA**, d'avoir participé à la réalisation de ce travail par l'approvisionnement des échantillons.

L'identification des levures a été réalisée au sein du Laboratoire de recherche à l'Université des Sciences à Gafsa-Tunisie, je tiens à remercier Monsieur **ELBORJI**, chef de département de biologie, de m'avoir accueilli et pour l'intérêt qu'il a manifesté envers ce travail.

Je tiens à remercier également tout le personnel du Laboratoire Pédagogique de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie à l'université d'El-Oued, pour son aide au cours de la réalisation de ce travail.

Enfin, il me serait difficile d'omettre de remercier tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à ce travail, qu'ils trouvent dans ces quelques lignes l'expression de mes sincères remerciements.

Table des matières

<i>Table des matières</i>	
Introduction	01
I. Synthèse bibliographique	03
1.1. Les levures	03
1.1.1. Historique	03
1.1.2. Définition	03
1.1.3. Habitat	04
1.1.4. Morphologie	04
1.1.5. Organisation et composition	05
1.1.6. Reproduction	06
1.1.6.1. Multiplication asexuée	06
1.1.6.2. Multiplication sexuée	06
1.1.7. Classification	07
1.1.8. Caractères physiologiques et biochimiques	08
1.1.8.1. Besoins nutritifs	08
1.1.8.2. Métabolisme	10
1.1.8.3. Conditions physico-chimiques de croissance	12
1.1.9. Levures et leurs intérêts industriels	13
1.1.9.1. Levures en environnement	13
1.1.9.2. Utilisation des levures dans le domaine pharmaceutique	13
1.1.9.3. Utilisation des levures dans le domaine alimentaire	13
1.2. Les Amylases	14
1.2.1. Les enzymes spécifiques des liaisons α (1\rightarrow 4)	14
1.2.2. Les enzymes spécifiques des liaisons α (1\rightarrow 6)	15
1.2.3. Les enzymes spécifiques des liaisons α (1\rightarrow 6) et α(1\rightarrow 4)	15
1.2.4. L'α-Amylase	15
1.2.4.1. Structure	16
1.2.4.2. Mode d'action	17
1.2.4.3. Caractéristiques de l'α-amylase	17
1.2.4.4. Différentes origines de l'α –amylase	19
1.2.4.4.1. Origine animale	19
1.2.4.4.2. Origine végétale	19
1.2.4.4.3. Origine microbienne	19
1.2.5. Applications de l'α-amylase dans le secteur industriel	20
1.3. Définition du lactosérum	22
1.3.1. Types de lactosérum	22
1.3.2. Sources industrielles du lactosérum	23
1.3.3. Composition du lactosérum	25
1.3.3. 1. Composition minérale	26
1.3.3.2. Teneur en vitamines	27
1.3.3.3. Protéines de lactosérum	27
1.3.4. Valorisation du lactosérum	28
1.3.5. Lactosérum et pollution de l'environnement	30
1.3.6. Production de substances d'intérêt industriel par des levures cultivée sur milieu à base de lactosérum	32
II. Matériel et méthodes	34
2.1. Matériel	34
2.1.1. Echantillons de sols	34

2.1.2. Echantillons de blé dur (<i>Triticum durum</i>)	35
2.1.3. Echantillons de lactosérum	35
2.1.4. Milieux de culture et réactifs	35
2.1.5. Matériel de laboratoire	35
2.2. Méthodes analytiques	36
2.2.1. Caractérisation physico-chimique des échantillons de sol	38
2.2.1.1. Mesure du pH	38
2.2.1.2. Humidité	38
2.2.1.3. Conductivité électrique	38
2.2.1.4. Taux de matière organique	39
2.2.1.5. Teneur en azote	39
2.1.2. Caractéristiques physico-chimiques des échantillons de blé dur (<i>Triticum durum</i>)	39
2.1.2.1. Teneur en eau	39
2.1.2.2. Taux de cendres	39
2.1.2.3. pH	39
2.1.2.4. Teneur en sucres totaux	40
2.1.2.5. Teneur en sucres réducteurs	40
2.1.2.6. Dosage des protéines	40
2.1.3. Isolement des levures	40
2.1.3.1. Isolement à partir du sol	40
2.1.3.2. Isolement des levures à partir du Blé dur (<i>Triticum durum</i>)	40
2.1.3.3. Purification des souches	42
2.1.3.4. Conservation des souches isolées et purifiées	43
2.1.3.5. Criblage des souches amylolytiques	44
2.1.3.6. Identification	44
2.1.4. Lactosérum	46
2.1.4.1. Choix du lactosérum	46
2.1.4.2. Préparation du milieu de base	48
2.1.4.3. Préparation du milieu de culture des levures amylolytiques sélectionnées	49
2.1.4.4. Préparation de l'inoculum et ensemencement	49
2.1.4.5. Dénombrement des levures	49
2.1.4.6. Dosage des paramètres influençant la cinétique enzymatique	51
2.1.5. Optimisation des conditions de production de l'α-amylase	52
2.1.5.1. Essai d'optimisation du pH du milieu de culture	52
2.1.5.2. Essai d'optimisation de la température d'incubation	52
2.1.5.3. Essai d'optimisation de la concentration initiale en substrat	52
2.1.5.4. Essai d'optimisation de la concentration en extrait de levures	53
2.1.5.5. Essai d'optimisation de la concentration en inoculum	53
2.1.6. Purification partielle de l'α-amylase et étude de ses propriétés physico-chimiques	53
III: Résultats et Discussion	57
3.1. Caractérisation physico-chimique des échantillons de sol	57
3.2. Caractérisation physico-chimique de la farine de blé dur (<i>Triticum durum</i>)	59
3.3. Isolement des souches de levures	61
3.3.1. Caractérisation macroscopique des souches isolées	62
3.3.2. Caractérisation microscopique des souches isolées	63
3.3.3. Etude des caractères biochimiques et physiologiques	65

3.3.4. Sélection des souches amylolytiques	68
3.3.5: Propriétés physicochimiques et biochimiques du lactosérum	73
3.4. Production d'α-amylase	75
3.4.1. Evolution des paramètres de production de l'α-amylase	75
3.4.1.1. Evolution de pH de milieu	76
3.4.1.2. Evolution de la quantité de biomasse	79
3.4.1.3. Evolution des teneurs en glucides	82
3.4.1.4. Evolution des teneurs en protéines	85
3.4.1.5. Evolution de l'activité enzymatique	89
3.4.2. Analyse statistique des résultats	92
3.4.3. Discussion	96
3.5. Optimisation des paramètres de production de l'α-amylase	101
3.5.1. Effet du pH initial	101
3.5.2. Effet de la température d'incubation	103
3.5.3. Influence de la concentration en substrat	103
3.5.4. Influence de la concentration du milieu de culture en extrait de levure	108
3.5.5. Effet de la concentration de l'inoculum	110
3.5.6. Analyse statistique des résultats relatifs à l'optimisation	112
3.5.7. Discussion	117
3.6. Purification partielle et étude des propriétés physicochimiques de l' α-amylase	118
3.6.1. Précipitation au sulfate d'ammonium	118
3.6.2. Etude de quelques propriétés physico-chimiques de l'α-amylase semi-purifiée	120
3.6.2.1. Effet du pH sur l'activité de l'enzyme	120
3.6.2.2. Effet de la température sur l'activité de l'enzyme	122
3.6.2.3. Effet de la concentration d'enzyme sur l'activité enzymatique	125
3.6.2.4. Effet de la concentration du substrat sur l'activité de l'enzyme	126
3.6.2.5. Détermination des constantes cinétiques d'enzyme (K_m et V_{max})	128
Conclusion	131
Références bibliographiques	
Annexes	

Liste des figures		
N°	Intitulé	Page
1	Morphologie des cellules de levure et des mycéliums	05
2	Division de cellules levurières par bourgeonnement	06
3	Cycle de reproduction de la levure	07
4	Structure tridimensionnelle de l' α -amylase	17
5	Voies technologiques permettant l'obtention des principaux types de lactosérums issus de la première transformation du lait	24
6	Procédure expérimentale	37
7	Techniques d'isolement et de dénombrement des souches fongiques	42
8	Purification des levures	43
9	Préparation de l'inoculum	50
10	Evolution du pH du milieu de culture de la souche <i>Candida glabrata</i>	76
11	Evolution du pH du milieu de culture de la souche <i>Schwanniomyces occidentalis</i>	77
12	Evolution du pH du milieu de culture de la souche <i>Pichia anomala</i>	77
13	Evolution du pH du milieu de culture de la souche <i>Rhordotula mucilaginosa</i>	78
14	Evolution du pH du milieu de culture de la souche <i>Lipomyces kononenkoae</i>	78
15	Evolution de la biomasse de la souche <i>Candida glabrata</i>	79
16	Evolution de la biomasse de la souche <i>Schwanniomyces occidentalis</i>	80
17	Evolution de la biomasse de la souche <i>Pichia anomala</i>	80
18	Evolution de la biomasse de la souche <i>Rhordotula mucilaginosa</i>	81
19	Evolution de la biomasse de <i>Lipomyces kononenkoae</i>	81
20	Evolution de la teneur en glucides dans les milieux de culture de la souche <i>Candida glabrata</i>	82
21	Evolution de la teneur en glucides dans les milieux de culture de la souche <i>Schwanniomyces occidentalis</i>	83
22	Evolution de la teneur en glucides dans les milieux de culture de la souche <i>Pichia anomala</i>	83
23	Evolution de la teneur en glucides dans les milieux de culture de la souche <i>Rhordotula mucilaginosa</i>	84
24	Evolution de la teneur en glucides dans les milieux de culture de la souche <i>Lipomyces kononenkoae</i>	85
25	Evolution de la teneur en protéines dans les milieux de culture de la souche <i>Candida glabrata</i>	86
26	Evolution de la teneur en protéines dans les milieux de culture de la souche <i>Schwanniomyces occidentalis</i>	86
27	Evolution de la teneur en protéines dans les milieux de culture de la souche <i>Pichia anomala</i>	87
28	Evolution de la teneur en protéines dans les milieux de culture de la souche <i>Rhordotula mucilaginosa</i>	88
29	Evolution de la teneur en protéines dans les milieux de culture de la souche <i>Lipomyces kononenkoae</i>	88
30	Evolution de l'activité enzymatique (UI) de la souche <i>Candida glabrata</i>	89
31	Evolution de l'activité enzymatique (UI) de la souche <i>Schwanniomyces occidentalis</i>	90
32	Evolution de l'activité enzymatique (UI) de la souche <i>Pichia anomala</i>	90
33	Evolution de l'activité enzymatique (UI) de la souche <i>Rhordotula mucilaginosa</i>	91
34	Evolution de l'activité enzymatique (UI) de la souche <i>Lipomyces kononenkoae</i>	92

35	Regroupement des souches selon la production de biomasse	93
36	Regroupement des milieux selon la teneur de protéines	94
37	Regroupement des souches selon l'activité enzymatique	95
38	Regroupement des milieux selon l'activité enzymatique	96
39	Evolution de la biomasse de <i>Candida glabrata</i> en fonction du pH initial du milieu	101
40	Evolution de l'activité enzymatique de <i>Candida glabrata</i> en fonction du pH initial du milieu	102
41	Evolution de la biomasse de <i>Schwanniomyces occidentalis</i> en fonction du pH initial du milieu	102
42	Evolution de l'activité enzymatique de <i>Schwanniomyces occidentalis</i> en fonction du pH initial du milieu	103
43	Evolution de la biomasse de <i>Candida glabrata</i> en fonction de la température d'incubation	103
44	Evolution de l'activité enzymatique de <i>Candida glabrata</i> en fonction de la température d'incubation	104
45	Evolution de la biomasse de <i>Schwanniomyces occidentalis</i> en fonction de la température d'incubation	105
46	Evolution de l'activité enzymatique de <i>Schwanniomyces occidentalis</i> en fonction de la température d'incubation	105
47	Evolution de la biomasse de <i>Candida glabrata</i> en fonction de la concentration du milieu de culture en substrat	106
48	Evolution de l'activité enzymatique <i>Candida glabrata</i> en fonction de la concentration du milieu de culture en substrat	107
49	Evolution de la biomasse de <i>Schwanniomyces occidentalis</i> en fonction de la concentration du milieu de culture en substrat	107
50	Evolution de l'activité enzymatique de <i>Schwanniomyces occidentalis</i> en fonction de la concentration du milieu de culture en substrat	108
51	Evolution de la biomasse de <i>Candida glabrata</i> en fonction de la concentration du milieu en extrait de levure	108
52	Evolution de l'activité enzymatique de <i>Candida glabrata</i> en fonction de la concentration du milieu en extrait de levure	109
53	Evolution de la biomasse de <i>Schwanniomyces occidentalis</i> en fonction de la concentration du milieu en extrait de levure	109
54	Evolution de l'activité enzymatique de <i>Schwanniomyces occidentalis</i> en fonction de la concentration du milieu en extrait de levure	110
55	Evolution de la biomasse de <i>Candida glabrata</i> en fonction de la concentration de l'inoculum	111
56	Evolution de la biomasse de <i>Candida glabrata</i> en fonction de la concentration de l'inoculum	111
57	Evolution de la biomasse de <i>Schwanniomyces occidentalis</i> en fonction de la concentration de l'inoculum	102
58	Evolution de la biomasse de <i>Schwanniomyces occidentalis</i> en fonction de la concentration de l'inoculum	112
59	Variation de la production de biomasse en fonction du pH initial du milieu	113
60	Variation de l'activité enzymatique en fonction du pH initial du milieu	114
61	Variation de la production de biomasse en fonction de la température d'incubation	114
62	Variation de l'activité enzymatique en fonction de la concentration du substrat	115

63	Variation de la production de biomasse en fonction de la concentration de l'extrait de levure	116
64	Variation de l'activité enzymatique en fonction de la concentration de l'extrait de levure	116
65	Variation de la production de biomasse en fonction de la concentration de l'inoculum	117
66	Effet du pH sur l'activité spécifique de l' α amylase produite par <i>Candida glabrata</i> .	121
67	Effet du pH sur l'activité spécifique de l' α amylase produite par <i>Schwanniomyces occidentalis</i> .	123
68	Effet de la température sur l'activité spécifique de l' α amylase produite par <i>Candida glabrata</i> .	123
69	Effet de la température sur l'activité l'activité spécifique de l' α amylase produite par <i>Schwanniomyces occidentalis</i> .	123
70	Effet de la concentration en enzyme sur l'activité spécifique de l' α amylase produite par <i>Candida glabrata</i> .	126
71	Effet de la concentration d'enzyme sur l'activité l'activité spécifique de l' α amylase produite par <i>Schwanniomyces occidentalis</i> .	126
72	Effet de la concentration du substrat sur l'activité spécifique de l' α amylase produite par <i>Candida glabrata</i> .	127
73	Effet de la concentration du substrat sur l'activité spécifique de l' α amylase produite par <i>Schwanniomyces occidentalis</i> .	127
74	Cinétique enzymatique de l' α -amylase produite par <i>Candida glabrata</i> selon la représentation de Lineweaver et Burk	128
75	Cinétique enzymatique de l' α -amylase produite par <i>Schwanniomyces occidentalis</i> selon la représentation de Lineweaver et Burk	128

Liste des Photos		
N°	Intitulé	Page
1	Lac "Ayata" (Photo originale)	34
2	Photo 2 : Lac "Chott" (Photo originale)	34
3	Technique d'isolement des souches levurières	41
4	Sélection de souches amylolytiques sur PDA à 1 % d'amidon (après 48 h d'incubation à 30 °C et à pH 5).	69

Liste des tableaux		
N°	Intitulé	Page
I	Classification des levures	08
II	Éléments nutritifs nécessaires à la croissance des levures et leurs fonctions	09
III	Comparaison des deux types métaboliques	11
IV	Nomenclature de l'α-amylase	15
V	Composition moyenne du lactosérum doux et acide	25
VI	Composition anionique et cationique de deux groupes de lactosérums acides (exprimée en % de la matière sèche)	26
VII	Teneur du lactosérum en vitamines	27
VIII	Composition en acides aminés essentiels des protéines lactosériques (en g.100 g-1 de protéines)	28
IX	Caractérisation physico-chimique du sol	57
X	Types de sol en fonction de la conductivité électrique	58
XI	Caractérisation physico-chimique et biochimiques du blé dur (<i>Triticum durum</i>).	59
XII	Nombre de souches isolées et leur répartition en fonction du milieu de prélèvement	61
XIII	Observations macroscopiques des colonies isolées	62
XIV	Observations microscopiques des souches isolées	64
XV	Caractéristiques physiologiques des souches isolées	67
XVI	Sélection des souches amylolytiques et diamètres des zones de lyse	69
XVII	Identification biochimiques des souches sélectionnées	72
XVIII	Caractéristiques physico-chimiques et biochimiques du lactosérum	73
XIX	Tests simultanés de Tukey pour les différences de moyens (pH vs Souches)	93
XX	Tests simultanés de Tukey pour les différences de moyens (Protéines vs Milieux)	94
XXI	Tests simultanés de Tukey pour les différences de moyens (Activité vs Souches)	95
XXII	Tests simultanés de Tukey pour les différences de moyens (Activité vs Milieux)	95
XXIII	Bilan de la précipitation fractionnée par le sulfate d'ammonium de l'α-amylase.	119

Résumé

Le présent travail s'inscrit dans le cadre de la valorisation du lactosérum par la production d' α -amylase sécrétée par des souches levurières isolées à partir des deux biotopes (sols sahariens et blé dur) issus de la région d'El-Oued.

Quarante souches levurières ont été isolées; à savoir 17 à partir des sols et 23 à partir de Blé dur (*T. durum*). Ces dernières appartiennent à 6 genres ; *Candida*, *Pichia*, *Schwanniomyces*, *Lipomyces*, *Saccharomyces* et *Rhodotorula*. La sélection des souches amylolytiques a permis de repertorier 5 espèces à haute activité enzymatiques: *Candida glabrata*, *Pichia anomala*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Schwanniomyces occidentalis* et *Lipomyces kononenkoae*.

Les échantillons de lactosérum (bovin, caprin et camelin) issus des laiteries implantées dans la wilaya de Ghardaïa, présentent un taux de lactose autour 50 g/l, une teneur en cendres pouvant atteindre une valeur de 7g/l, avec un pH acide, favorisant le développement des levures.

Le milieu à base de lactosérum caprin semble représenter un support le plus convenable, pour la production enzymatique par rapport aux milieux à base lactosérum bovin et camelin. Parmi les 5 souches sélectionnées ; *Candida glabrata* et *Schwanniomyces occidentalis*, présentent une aptitude de production de biomasse et d'activité enzymatique plus remarquables (biomasse de 50g/l et AE de 2500 UI).

L'optimisation des conditions de production enzymatique montre que le pH optimal est de 4 à 5 et que la croissance maximale est obtenue à 40 C°. La concentration du substrat affecte l'activité enzymatique (meilleur rendement à 3,4 et 5%), ainsi, l'extrait de levure à 1% améliore le rendement de biomasse et de l'activité enzymatique ; la concentration de l'inoculum influence seulement la quantité de biomasse (meilleure production à 3 et 4% de l'inoculum).

La purification partielle de l' α -amylase de *Candida glabrata* et *Schwanniomyces occidentalis* par le sulfate d'ammonium (60 %), a donné une activité d'enzyme de 78.88 $\mu\text{mol}/\text{mn}$ avec un degré de purification de 2.73 fois. L' α -amylase partiellement purifiée, a un pH optimum de 6 et une température optimale de 55 °C. L'étude cinétique de l' α -amylase de *C. glabrata* partiellement purifiée a donné une V_{max} de (10.1617 $\mu\text{g}/\text{s}$) et un K_m de (0,27 mg/ml).

Mots clés: α -amylase, levure, purification, lactosérum, milieu extrême, Ghardaïa.

Abstract

The present work is part of the whey valorization by the production of α -amylase secreted by yeast strains isolated from different biotopes (Saharan soils and durum wheat) from the region of El-Oued.

It has been possible to isolate forty yeast strains; namely 17 from the soil and 23 from durum wheat (*T. durum*). These strains belong to 6 genera; *Candida*, *Pichia*, *Schwanniomyces*, *Lipomyces*, *Saccharomyces* and *Rhodotorula*. The selection of the amylolytic strains allowed to identify 5 species with high activity: *Candida glabrata*, *Pichia anomala*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Schwanniomyces occidentalis* and *Lipomyces kononenkoae*.

The samples of whey (cattle, goats and camels) from dairies implanted in the wilaya of Ghardaia, have a rather important biochemical composition with a lactose level around 50g / l, a ash content up to 7g / l, with an acidic pH; promoting the development of yeasts.

The goat whey medium has a more suitable support for enzymatic production compared to bovine and camel whey-based media. Of the 5 selected strains; two strains, *Candida glabrata* and *Schwanniomyces occidentalis*, have a more remarkable ability to produce biomass and enzymatic activity (biomass of 50g / l and AE of 2500 IU).

The optimization of the enzymatic production conditions shows that the optimum pH and 4 to 5 and our strains have a maximum growth at the temperature of 40C °. The concentration of the substrate affects the enzyme activity (better yield at 3.4 and 5%), thus the 1% yeast extract improves the yield of biomass and enzymatic activity; the concentration of the inoculum only influences the amount of biomass (better production at 3 and 4% of the inoculum).

Partial purification of α -amylase from *Candida glabrata* and *Schwanniomyces occidentalis* by ammonium sulfate (60%) gave an enzyme activity of 78.88 $\mu\text{mol}/\text{mn}$ with a purification degree of 2.73-fold. The partially purified α -amylase has an optimum pH of 6 and an optimum temperature of 55 ° C. The kinetic study of partially purified *C. glabrata* α -amylase yielded a V_{max} of (10.1626 $\mu\text{g}/\text{s}$) and a K_m of (0.27 mg / ml).

Key words: α -amylase, yeast, purification, whey, extreme medium. Ghardaia

ملخص

هذا العمل يندرج ضمن تئمين مصل الحليب من خلال زراعة وإنتاج انزيم ألفا أميلاز الذي تفرزه سلالات الخميرة المعزولة من أوساط حيوية (تربة صحراوية وقمح صلب) من منطقة الوادي.

تم عزل أربعين سلالة من الخميرة. وهي 17 من التربة و 23 من القمح (T. durum). هذه السلالات تنتمي إلى 6 أجناس. Pichia، Schwanniomyces، Lipomyces، Saccharomyces و Rhodotorula. عملية انتقاء السلالات الفطرية عن طريق تحليل النشا سمح بتحديد 5 أنواع ذات النشاط العالي: *Candida glabrata*، *Lipomyces Pichia anomala*، *Rhodotorula mucilaginoso*، *Schwanniomyces occidentalis* .
.kononenkoe

عينات مصل الحليب (الأبقار والماعز والجمال) المتحصل عليها من عدة ألبان متواجدة بولاية غرداية، أظهرت تكوين كيميائي حيوي كبير إلى حد ما مع مستويات اللاكتوز حول G50 / لتر، نسبة الرماد تصل إلى 7 غ / ل.

يعتبر وسط مصل حليب الماعز أكثر ملاءمة للإنتاج الأنزيمي مقارنةً بالوسائط القائمة على مصل البقر والإبل. بالإضافة إلى حصولنا على سلالتين، *Candida glabrata* و *Schwanniomyces occidentalis*، لديها القدرة على إنتاج الكتلة الحيوية ونشاط انزيم ملحوظا (الكتلة الحيوية G50 / لتر و AE 2500 IU).

يوضح تحسين ظروف الإنتاج الأنزيمية أن درجة الحموضة المثلى و 4 إلى 5 وأن سلالاتنا لها أقصى نمو عند درجة حرارة 40 درجة مئوية. كما يؤثر تركيز الركيزة على نشاط الإنزيم (الناتج الأفضل عند 3.4 و 5٪)، وبالتالي فإن خلاصة الخميرة 1٪ تحسن محصول الكتلة الحيوية والنشاط الأنزيمي. تركيز اللقاح يؤثر فقط على كمية الكتلة الحيوية (إنتاج أفضل عند 3 و 4٪ من اللقاح).

الاستخلاص الجزئي للآفا الأميليز من *Schwanniomyces occidentalis* و *Candida glabrata* بواسطة كبريتات الأمونيوم (60٪)، وقدم نشاط معين من U 78.88 انزيم / ملغ مع درجة تنقية 2.73 مرة. يحتوي ألفا أميلاز المنقى جزئياً على درجة حموضة مثالية قدرها 6 ودرجة حرارة مثالية تبلغ 55 درجة مئوية. أسفرت الدراسة الحركية عن النشا الكبريتاتي ألفا-أميلاز المنقى جزئياً من (10.1626 Vmax ميكروغرام / مل) وكمية من (0.27 ملغم / مل).

الكلمات المفتاحية: ألفا أميلاز ، خميرة ، تطهير ، مصل الحليب ، البيئة القاسية.

Introduction

INTRODUCTION

Durant les trois dernières décennies, les microorganismes ont apporté une contribution significative dans certains domaines industriels et en particulier agroalimentaires. Diverses industries dépendent en grande partie de leurs métabolites (**ABU *et al.*, 2005**).

Parallèlement, ces microorganismes ont apporté une contribution significative dans certains domaines industriels et en particulier dans le secteur agroalimentaire. En effet, diverses industries dépendent en grande partie de leurs métabolites (**ABU *et al.*, 2005**).

Dans ce contexte, les levures occupent une place primordiale dans l'industrie agroalimentaire. Ces microorganismes eucaryotes et unicellulaires ont la capacité de se multiplier rapidement car elles sont moins exigeantes en nutriments. Elles possèdent la capacité de produire des métabolites fonctionnels, mis à contribution dans l'élaboration de biomédicaments. Ils constituent ainsi un vaste réservoir de catalyseurs biologiques (**SACI, 2012**).

Parmi ces enzymes, les α -amylases sont les plus commercialisées à cause de la diversité de leur application, telles que l'industrie alimentaire humaine et animale, celle des détergents pour lessives, l'industrie des tanneries et l'industrie pharmaceutique... (**BOTTON *et al.*, 1999**). Le marché mondial des enzymes est représenté par 80% des hydrolases, particulièrement les amylases et les protéases (**MORVAN, 2010**). Les α -amylases sont parmi les plus importantes enzymes à l'échelle industrielle, ce qui les rendent l'un des outils-clés des biotechnologies (**LITTLE, 2004**).

Elles peuvent avoir une origine végétale, animale ou microbienne. Cependant les amylases d'origine microbienne sont les plus utilisées industriellement (**BURHAN *et al.*, 2003**). L'intérêt pour les amylases fongiques (moisissures et levures), a augmenté ces dernières années, où plusieurs investigations sont menées sur les enzymes amylolytiques extracellulaires secrétées par les genres *Aspergillus*, *Rhizopus* (**RAMASHANDRAN *et al.*, 2004** et **DAKHMOUCHE-DJEKRIF, 2016**). La demande des enzymes amylolytiques a augmenté suite aux crises énergétiques pétrolières. En effet, pour faire face à la raréfaction du pétrole (**RIFKIN, 2012**).

La production d' α -amylase par la voie biotechnologique, nécessite non seulement l'utilisation de microorganismes amylolytiques sélectionnés, mais aussi l'utilisation de

substrats de fermentation bon marché, disponibles et riches en éléments nutritifs nécessaires au développement des microorganismes et à la production d' α -amylase.

Dans ce contexte, un sous-produit très polluant est rejeté par les laiteries dans les cours d'eau : le lactosérum. De par sa richesse en lactose, en protéines solubles et en sels minéraux et en certaines vitamines, ce co-produit a incité plusieurs laboratoires à tenter de le valoriser en l'utilisant comme substrat de production de différents produits ; tels que la levure de boulangerie, l'acide lactique. En Algérie, pour la production fromagère, l'industrie laitière rejette quotidiennement 6000 litres/jour de lactosérum (cas de l'unité de Boudouaou), soit pour chaque kilogramme de fromage produit, un résidu de 4 à 12 kg de lactosérum est rejeté (**GANNA et TOUZI, 2001**). Depuis 2013, la production algérienne de fromage est de 1540 tonnes, ce qui se traduit par une production d'environ 14 million de litres de lactosérum (**FAO, 2017**).

Dans le même ordre d'idée, nous assistons ces dernières années à la naissance de laiteries, dans le Sud algérien (région de Ghardaïa). Ces dernières ont pour principale activité, la pasteurisation et la transformation du lait en fromage, en yaourt et en lait fermenté. Ces fabrications sont accompagnées par la production de grande quantité du lactosérum qui est rejeté dans les eaux d'assainissement.

Parallèlement, le milieu saharien représente un biotope extrême pour le développement de certains microorganismes à cause de la sécheresse et de la haute température. Ces milieux peuvent fournir des souches levurières productrices d'enzymes thermostables capables de résister à des processus industriels.

Cette étude porte sur des essais de valorisation du lactosérum produit localement, en l'utilisation comme base de milieu de culture des levures productrices d' α -amylases.

Elle comporte quatre parties essentielles:

- 1) Etude de la composition de différents types des lactosérums en provenance des laiteries implantées dans la région de Mزاب ;
- 2) Isolement et sélection, à partir de bioproduits locaux, de souches levurières productrices d' α -amylase les plus performantes ;
- 3) Optimisation des paramètres de croissance et de production ' α -amylase, sur milieu à base de lactosérum de trois origines différentes ;
- 4) Purification de l' α -amylase produites par les souches les plus performantes.

Synthèse

Bibliographique

Partie I : Synthèse Bibliographique

1.1. Les levures

Les champignons sont des organismes eucaryotes, immobiles et dépourvus de pigment assimilateur (**PRAMAYON, 2001**). Ils ont une paroi constituée de chitine, polysaccharide très résistant constitué de résidus N-acétylglucosamine (**CARLILE et WATKINSON, 1994**).

D'un point de vue structural, on trouve une grande variété de champignons. Ils sont classés en deux grandes catégories: la forme levure unicellulaire et la forme mycélienne pluricellulaire constituée d'hyphes (**REDECKER, 2002**), constituant quatre principaux groupes qui diffèrent par la structure de leur mycélium et de leur organe reproducteur : les zygomycètes, les ascomycètes, les basidiomycètes et les deutéromycètes (**DELAL, 2016**). Il existe quelques 120 000 espèces, présentant des structures et des caractéristiques biologiques extrêmement diversifiées, adaptées au mode de vie saprophyte, parasitaire ou symbiotique. Ils se reproduisent par des spores, selon un mode asexué et/ou sexué (**BOIRON, 1996; BOUCHET et al., 1999**).

1.1.1. Historique

Les levures ont été utilisées par l'Homme, depuis des millénaires, en particulier dans la fabrication de boissons alcoolisées et celle du pain. Ce n'est qu'avec les travaux de Pasteur (1866-1876) que le rôle des levures dans la fermentation alcoolique a été mis en évidence. A la même époque, la levure fut à l'origine du développement de la biochimie avec notamment les travaux de Büchner. A l'heure actuelle, les levures constituent un matériel expérimental de choix en raison de leur double état de micro-organismes et d'eucaryotes (**BOURGEOIS, 2003**).

1.1.2. Définition

Le mot levure, provient du mot latin «levare» qui signifie «lever» (**PHAFF et al. (1968)** faisant référence à la capacité de faire lever le pain en produisant du CO₂. Les levures sont des eucaryotes hétérotrophes, appartenant au groupe des champignons unicellulaires, ayant perdu la faculté de former un mycélium (au moins dans la plus grande partie de leur cycle biologique) (**GUIRAUD, 1998**). Elles présentent un grand intérêt dans l'alimentation de l'Homme. De ce fait, elles trouvent de nombreuses applications dans les industries agro-alimentaires (**LARPENT, 1990**).

1.1.3. Habitat

Les levures sont des espèces ubiquitaires, largement distribuées dans la nature. On les trouve chez les végétaux riches en sucres directement assimilables (**BOURGEOIS et LEVEAU, 1991**). Les milieux fortement concentrés en sucre tels que les sirops, le miel, les fleurs ainsi que de nombreux fruits (pommes, raisins, dattes...etc.) représentent également un de leur environnement préféré (**LECLERC, 1985 et OTENG-GYANG, 1984**). On les rencontre également à la surface ou à l'intérieur d'autres êtres vivants, dans les eaux, dans l'atmosphère et dans le sol (**LEVEAU et BOUIX, 1993**). Ce dernier constitue un large réservoir assurant leur survie dans des conditions défavorables (**LECLERC, 19785**).

1.1.4. Morphologie

Leur structure est plus complexe que celle des bactéries, notamment par la présence d'un noyau, de mitochondries, d'un appareil de Golgi et par celle d'un chromosome (*Saccharomyces cerevisiae* a 16 chromosomes) (**LABRECQUE, 2003**).

Les cellules levurières sont généralement ovoïdes ou sphériques, parfois cylindriques, allongées, apiculées ou de forme plus spécifiques : ogivale (genre *Dekkera*), en forme de bouteille (*Pityrosporum, Malassezia*), triangulaires (*Trigonopsis*) ou en forme de citron (*Hanseniaspora*) (**fig.1**). Elles se distinguent des bactéries par leur taille qui est très variable selon les espèces (de 2 à 20 µm de longueur et de 1 à 10 µm de largeur). Leur taille est donc plus grande par rapport à celle des bactéries, ce qui facilite leur observation. Leur masse cellulaire est 100 fois plus élevée que celle des bactéries (**HENCKE, 2000**).

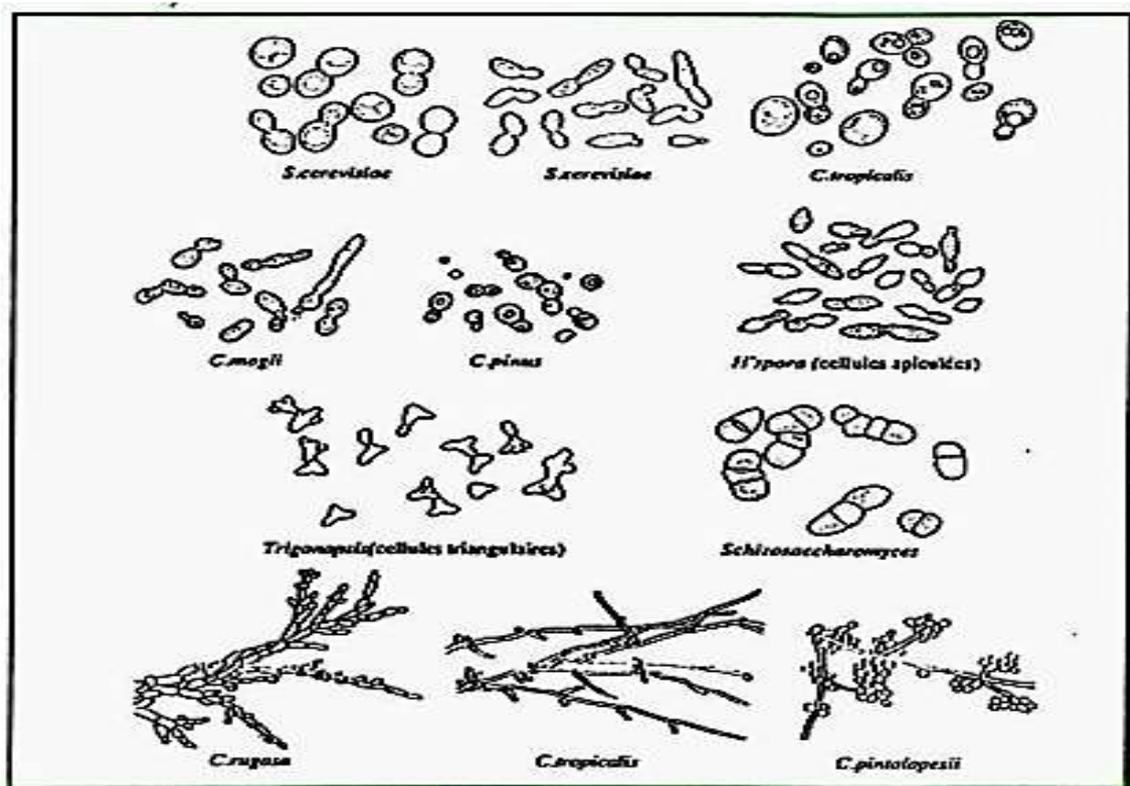


Figure 1: Morphologie des cellules de levure et des mycéliums (LEVEAU et BOUXX, 1993).

1.1.5. Organisation et composition

De type eucaryote, ces cellules présentent une paroi rigide dont l'épaisseur varie entre 15 à 230 nm. La composition de cet organite est la suivante :

- 80 % de polysaccharides antigéniques (mannanes, β -glucanes, polyosides hétérogènes) et 1 à 2 % de chitine (HENCKE, 2000);
- 7 à 10 % de lipides et 5 % de minéraux (LARPENT *et al.*, 1997).

Le noyau des cellules levurières est entouré d'une membrane qui persiste pendant la division cellulaire. Le nombre de chromosomes est variable suivant les levures. Le noyau dirige l'activité cellulaire (HENCKE, 2000).

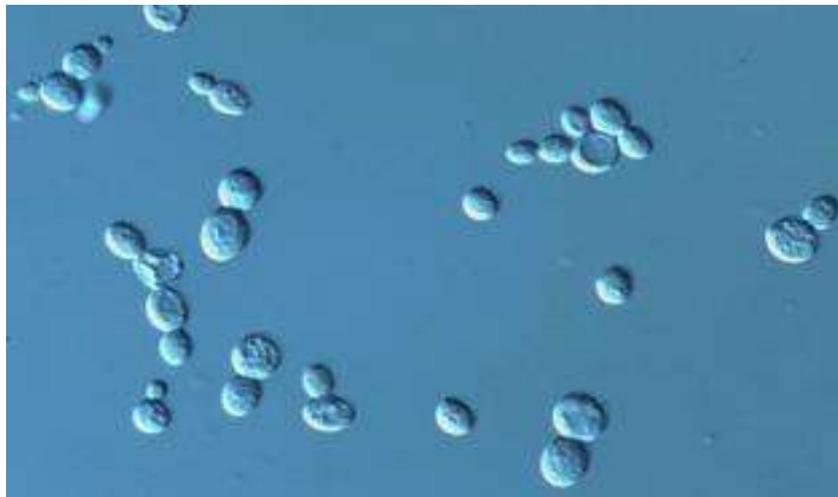
Leur cytoplasme, siège de l'activité métabolique, renferme en plus des organites cellulaires, des ribosomes, des enzymes, des polyphosphates, du glycogène et du tréhalose.

1.1.6. Reproduction

Les levures ont un mode de multiplication spécifique. Elles se reproduisent aussi bien par voie asexuée (végétative) que par voie sexuée (sporulation) en fonction des conditions favorables ou défavorables du milieu (LARPENT, 1997).

1.1.6.1. Multiplication asexuée

Le bourgeonnement représente le mode de reproduction végétatif le plus courant chez les levures (fig.02). Il s'effectue aux extrémités des grands axes des cellules si elles sont ovoïdes ou allongées ; la multiplication se faisant rarement par scissiparité. Le bourgeonnement peut être multilatéral également (caractéristique des genres *Saccharomyces* et *Debaryomyces* (HENCKE, 2000).



**Figure 2: Division de cellules levurières par bourgeonnement (Grossissement 100)
(LECLERC et al., 1995).**

1.1.6.2. Multiplication sexuée

Dans ce cas de reproduction, deux noyaux haploïdes provenant de deux spores se réunissent pour former un zygote diploïde qui à son tour se multiplie infiniment par voie végétative. Dans les conditions favorable, le zygote subit une méiose ou les quatre noyaux haploïdes forment quatre ascospores donnant plus tard des cellules haploïdes (fig.3 (BOIRON, 1996).

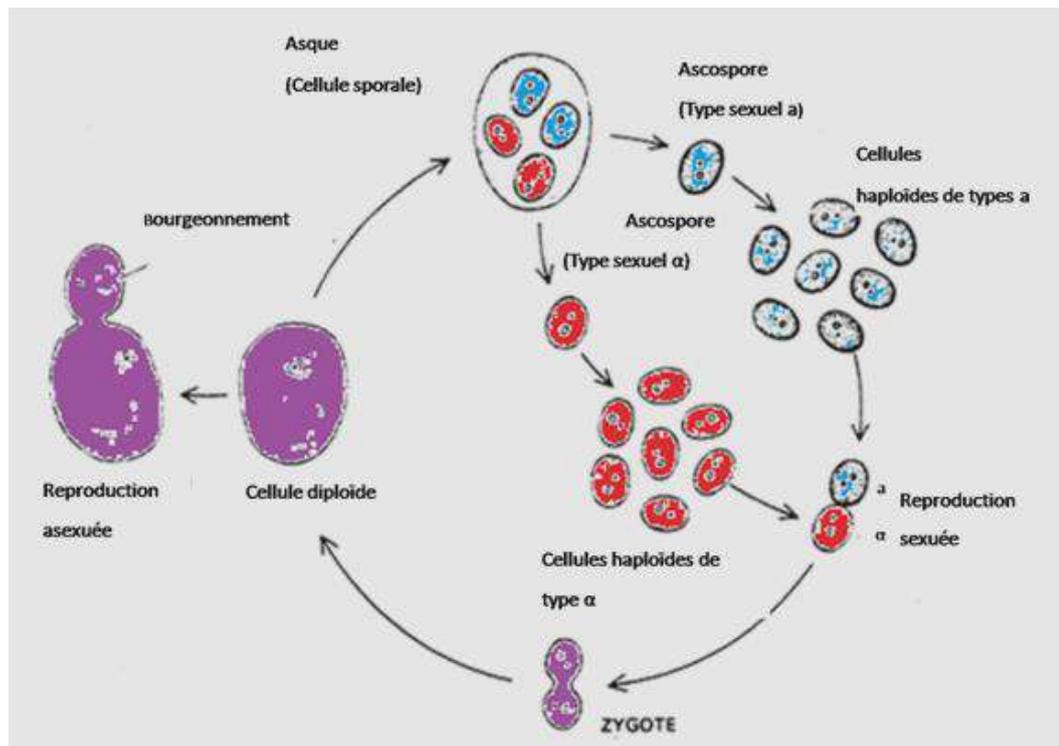


Figure 3: Cycle de reproduction de la levure (GUINET et *al.*, 1994)

I.1.7. Classification

La classification de référence est actuellement celle de **KREGER-VAN (1984)** qui présente des changements sensibles par rapport à la précédente. En particulier, de nouveaux critères taxonomiques comme la composition en bases de l'ADN, la structure de la paroi, le type de coenzyme Q est pris en compte pour permettre des études plus rigoureuses. La classification actuelle répertorie 60 genres et 500 espèces (**LODDER., 1971**). Selon leur mode de reproduction, les levures se divisent en trois grandes classes :

- **Les ascomycètes (hémi ascomycètes) :** ils se reproduisent par un processus sexué dans un asque résultant de la transformation d'une cellule après méiose (**MEYER et al., 2004**);
- **Les basidiomycètes:** ils sont parfois classés parmi les deutéromycètes. A l'issue d'une reproduction sexuée, se forment des exo-spores ou «basidiospores» portées par une baside (**HENCKE, 2000**);
- **Les deutéromycètes:** ils regroupent l'ensemble des levures ne présentant pas de mode connu de reproduction sexuée et ne se multipliant que par reproduction végétative (**HENCKE, 2000**).

Il en existe environ 500 espèces de levures regroupées en 60 genres (**tab. I**) (**LABRECQUE, 2003**)

Tableau I : Classification des levures (KREGER VAN, 1984)

Classes	Ordres	Familles	Genres
Ascomycètes	Endomycétales	Spermophthoraceae Saccharomycetaceae	Coccidiascus Metschnikowia Nematospora Schizosaccharomyces
Basidiomycètes	Ustilaginales Tremellales	Filobasidiaceae Levures à téliosporos Sirobasidiaceae Tremellaceae	Chionosphaera Filobasidiella Filobasidium Leucosporidium
Deutéromycètes	Blastomycetales	Cryptococcaceae Sporobolomycetaceae	Aciculoconidium Brettanomyces Candida Cryptococcus

1.1.8. Caractères physiologiques et biochimiques

1.1.8.1. Besoins nutritifs

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

Le carbone constitue 50 % du poids sec de la levure (**LEVEAU et al., 1993**). Les composés carbonés sont à la fois une source d'énergie, de carbone et d'hydrogène. Les levures ont besoin de glucides mais elles peuvent également en produire (tréhalose, glycogène). La capacité des levures à utiliser les sucres varie. Les plus fréquemment utilisés sont les sucres simples (glucose, galactose), les disaccharides (saccharose, maltose, lactose) et les trisaccharides (raffinose), mais aussi les pentoses tel que le fructose et les polysaccharides (**HENCKE, 2000**).

En ce qui concerne les besoins en azote, la plupart des levures sont capables d'assimiler différentes sources d'azote organiques et inorganiques pour la biosynthèse des acides aminés, des protéines, des acides nucléiques et des vitamines (**GUIRAUD, 1998 ; LARPENT, 1997**).

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

Tableau II: Eléments nutritifs nécessaires à la croissance des levures et à leurs fonctions (LARPENT, 1997).

Eléments	Fonctions
Hydrogène (H)	Constituant de l'eau et des composants de la cellule donneuse d'électrons
Carbone (C)	Constituant des composants cellulaires, donneurs d'électrons (respiration), accepteurs d'électrons (fermentation)
Azote (N)	Constituants des protéines, des enzymes et des acides nucléiques. Donneurs d'électrons (bactéries nitrifiantes) Accepteurs d'électrons (bactéries dénitrifiantes)
Soufre (S)	Constituant des protéines et du coenzyme A Donneurs et accepteurs d'électrons chez les sulfito-bactéries
Phosphore (P)	Constituant des acides nucléiques, des phospholipides et de certains coenzymes et l'ATP
Magnésium (Mg)	Cofacteur de réaction enzymatique (ATP). Liaison des enzymes aux substrats.
Fer (Fe)	Constituant des cytochromes. Cofacteur des réactions enzymatiques
Potassium (K), Zinc (Zn), cuivre (Cu), manganèse (Mn), cobalt (Co), molybdène (Mo), calcium (Ca).	Cofacteurs ou constituants d'une centaine d'enzymes

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

Comme la plupart des microorganismes, les levures ont besoin de sels minéraux et d'oligoéléments en de très faibles concentrations, indispensables pour un développement adéquat (**LARPENT et SANGLIER, 1992**). Les minéraux jouent un rôle plastique par leur participation à l'édification des cellules, et un rôle fonctionnel en tant que facteurs de croissance. Les oligo-éléments (Al, Cr, Br, Cu, Pb, Mn, Ag, Sr, Zn, Sn...), nécessaires à l'état de traces (**Tab. II**), jouent un rôle primordial dans l'activation de certaines réactions enzymatiques et rentrent parfois dans la constitution de certaines vitamines et de certains coenzymes (**HENCKE, 2000**).

Certaines espèces levurières ont besoin également d'une ou de plusieurs vitamines comme par exemple la thiamine (vitamine B₁), la biotine (vitamine B₈), l'inositol (vitamine B₇), l'acide pantothénique (vitamine B₅) et d'autres facteurs de croissance (**BRADFORD, 1976**).

1.1.8.2. Métabolisme

Les levures présentent un métabolisme diversifié lié aux voies utilisées pour la production et la consommation de l'énergie à partir du substrat dégradé.

Selon la voie empruntée, on peut diviser les levures en deux groupes:

- ✓ **Les levures « aérobic stricte »** caractérisées par un métabolisme exclusivement respiratoire exigeant la présence d'oxygène moléculaire comme accepteur d'électrons;
- ✓ **Les levures « aéro-anaérobic facultative »** regroupant la plupart des levures (**LEVEAU et BOUIX, 1993**). Cette classe comporte deux sous-catégories :

* **Les levures de « type respiratoire aérobie »** caractérisées par la capacité de réaliser l'oxydation complète du glucose en CO₂ et H₂O (**REGNAULT, 1990**). Toute l'énergie biochimique potentielle contenue dans le glucose étant libérée, la levure peut, non seulement assurer son maintien en vie, mais aussi synthétiser la matière organique donc entrer en croissance et se multiplier (**HENCKE, 2000**) ;

* **Les levures de « type fermentaire anaérobic »** qui assurent une oxydation incomplète du glucose. On parle dans ce cas de « fermentation » ou de « vie sans air » (*définition de Pasteur*). On estime à 93 - 95 %, le glucose dégradé en CO₂ et éthanol et à 5 % le glucose servant à la formation de glycérol, d'acides organiques, d'aldéhydes, d'esters et d'alcools supérieurs, ainsi que de la biomasse elle-même (**Tab. III**) (**HENCKE, 2000**).

Cette distinction entre les deux types, respiratoire et fermentaire ne s'applique qu'à la croissance en aérobiose sur glucose, fructose et mannose car les autres sucres interviennent dans des répressions enzymatiques (LEVEAU et BOUIX, 1993, 1996).

Tableau III : Comparaison des deux types métaboliques (HENCKE, 2000).

	Type respiratoire	Type fermentaire
	Levures préférant un métabolisme respiratoire en aérobiose	Levures préférant un métabolisme fermentaire même en aérobiose
Utilisation du glucose en aérobiose	< 30 %	> 90 %
Transformation totale du glucose en	CO ₂ et H ₂ O	Ethanol
Rendement énergétique	Elevé	Faible
Utilisation du glucose dans la synthèse de biomasse	Peu	Importante
Exemples	La majorité des levures	<i>Saccharomyces</i> , <i>Schiosaccharomyces</i> , <i>Brettanomyces</i> , et <i>Kloeckera</i>

Comme tous les organismes, les levures ont à leur disposition plusieurs modes de production d'énergie. Elles font appel de préférence à la respiration aérobie quand l'oxygène est disponible, car ce type de respiration est plus efficace sur le plan du rendement énergétique (REGNAULT, 1990 ; HENCKE, 2000).

1.1.8.3. Conditions physico-chimiques de croissance

Comme tous les microorganismes, la croissance des levures exige certaines conditions physico-chimiques tels que la température, le pH, le CO₂, l'O₂, l'aw.

➤ **Température**

Une température comprise entre 25 et 30 °C est nécessaire, pour assurer la croissance adéquate de la plupart des levures. Toutefois, ces températures optimales ne sont pas toujours évidentes dans leurs habitats naturels (LEVEAU et BOUIX, 1993). En effet, la température

maximale de croissance peut se situer entre 35 et 45 °C. D'autres levures peuvent se développer à 0° C (**OTENG-GYANG, 1984**).

➤ **pH**

Le pH joue un rôle primordial dans la production des métabolites (**LARPENT, 1990**). Les levures présentent une tolérance élevée aux pH extrêmes. Elles tolèrent des gammes très larges allant de pH 2.4 à pH 8.6. Entre ces valeurs, le pH intracellulaire est compris entre 5.8 et 6.8 (**BOUIX et LEVEAU, 1991**). Cependant, **PHAFF** et ses collaborateurs (**1978**) ont noté que la plupart des levures connues, ont une bonne croissance à des pH proches de 3.

➤ **CO₂**

Lorsque la concentration en CO₂ du milieu atteint un taux de saturation ; la fermentation s'arrête au bout de quelques heures. La croissance des levures peut être partiellement inhibée. Dans ces conditions, on observe notamment une diminution de la teneur en esters d'acétate (**LAISNE et al., 1972**).

➤ **L'aération**

Elle a pour but d'une part d'apporter l'oxygène nécessaire à la croissance des levures et d'autre part d'homogénéiser et d'assurer la circulation du moût dans le fermenteur. Cependant, il est intéressant de rappeler que la levure boulangère s'adapte à deux modes de vie, en présence ou en absence d'oxygène (**LEVEAU et BOUIX, 1979**).

➤ **Pression osmotique et l'activité d'eau**

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

1.1.9. Levures et leurs intérêts industriels

Depuis quelques temps, une nouvelle utilisation des levures est apparue. Les levures, grâce à leur haute capacité fermentaire, peuvent assurer la bioconversion de nombreux substrats saccharosés (jus de betteraves, sirop, mélasse de sucrerie) en bioéthanol (**LEVEAU ET BOUIX, 1993**).

1.1.9.1. Levures et Environnement

La possibilité de produire des aliments par des microorganismes à partir d'hydrocarbures, a un intérêt marqué pour l'assimilation des hydrocarbures par les levures fit son apparition dans la littérature. Depuis, la majorité des études sur le bio-traitement d'effluents contaminés par des hydrocarbures a préconisé l'utilisation de microorganismes (bioremédiation) (LABRECQUE, 2003).

1.1.9.2. Utilisation des levures dans le domaine pharmaceutique

Les biotechnologies et la recherche biomédicale exploitent actuellement les levures, pour la production de molécules d'intérêt médical dans la production des protéines hétérologues, comme le vaccin de l'hépatite B à titre d'exemple (BLIN, 2002 ; MERCIER, 1997).

1.1.9.3. Utilisation des levures dans le domaine alimentaire

De par la diversification des produits issus de leur métabolisme, les levures occupent une place privilégiée dans l'alimentation de l'Homme. Elles trouvent pour ces raisons de nombreuses applications dans les industries agroalimentaires (LARPENT, 1990). Bien que les utilisations traditionnelles dans la fabrication, des boissons alcoolisées, du vinaigre, de la choucroute, des produits à base de soja (sauce de soja), du pain, des produits laitiers (fromage, kéfir) ...etc. sont connues depuis l'antiquité, de nombreuses autres utilités dans le domaine de la biotechnologie sont actuellement exploitées (PHAFF et al., 1978). Ces dernières ont permis la synthèse et la production de nombreux métabolites dont certains possèdent des activités biologiques fondamentales (vitamines), d'autres, des propriétés nutritives (protéines alimentaires, acides organiques...etc., d'autres, des propriétés fonctionnelles. Dans ce même contexte, la production de gamma-décalactone par *Yarrowia lipolytica*, un composé aromatique ayant une plaisante odeur de pêche a été rapportée par la littérature (PAGOT et al., 1997).

Elles sont par ailleurs, largement utilisées dans la valorisation des déchets agricoles, industriels (LECLERC et al., 1995; SCRIBAN, 1984). Dans ce cadre, nous pouvons citer l'utilisation du lactosérum, sous-produit des laiteries comme substrat de production d'enzymes : les amylases en l'occurrence.

I.2. Les Amylases

L' α -amylase est considérée l'une des enzymes industrielles la plus importante. C'est une macromolécule appartenant à la classe des protéines globulaires, de type endoglycanases, de la classe des hydrolases, qui agit sur les liaisons α (1 \rightarrow 4) de l'amidon (GUPTA *et al.*, 2008).

Les amylases peuvent être divisées en deux catégories, les endo-amylases et les exo-amylases. Les endo-amylases catalysent l'hydrolyse des liaisons glucosidiques internes de la chaîne d'amidon, d'une manière aléatoire. Cette action provoque la formation d'oligosaccharides linéaires et ramifiés de diverses longueurs. Les exo-amylases hydrolysent l'extrémité non réductrice, pour donner successivement des produits finaux plus courts (GUPTA *et al.*, 2003).

Ces biocatalyseurs peuvent être classés selon les liaisons coupées, en trois groupes :

1.2.1. Les enzymes spécifiques des liaisons α (1 \rightarrow 4)

Parmi ses enzymes, nous pouvons citer :

- **L' α -amylase (E.C.3.2.1.1)** dont l'action est toujours de type endomoléculaire et conduit à la formation de D-glucose, de D-maltose et d'une petite quantité de maltodextrines (SCRIBAN, 1993) ;
- **L' β -amylase (E.C.3.2.1.2)** : La β (1 \rightarrow 4)D- glucane malto-hydrolase est une exoenzyme saccharifiante. Elle hydrolyse les chaînes d' α amylose et d'amylopectine à partir de l'extrémité non réductrice en libérant du β -maltose. L'hydrolyse de l'amylopectine est bloquée au niveau des points de branchement α (1 \rightarrow 6), ce qui conduit à la production de 50% à 60% de maltose. Le reste est formé de dextrine limite (VALLIER *et al.*, 1977).
- **L' γ -amylase (glucoamylase) (E.C.3.2.1.3)** est une α (1 \rightarrow 4) glucane glucanohydrolase qui hydrolyse complètement l'amylopectine en D glucose et qui est capable également d'hydrolyser les liaisons α (1-4) pour former le maltose (SCRIBAN, 1993).

1.2.2. Les enzymes spécifiques des liaisons α (1 \rightarrow 6)

Parmi ses enzymes, figurent :

- **L'Iso amylase (E.C. 3.2.1.68)** qui est une enzyme déramifiante ; elle hydrolyse les liaisons α (1 \rightarrow 6) de l'amylopectine.

- **La pullulanase (E.C. 3.2.1.41)** est également une enzyme déramifiante spécifique des liaisons α (1→ 6) de la pullulane. Elle est incapable d'hydrolyser totalement l'amylopectine qui est beaucoup plus ramifiée que le glycogène (**SCRIBAN, 1993**).

1.2.3. Les enzymes spécifiques des liaisons α (1→ 6) et α (1→ 4)

- **L'amyloglucosidase (E.C.3.2.1.31)**, encore appelée gluco-amyrase, scinde rapidement non seulement les liaisons α (1→ 4) des extrémités non réductrices mais aussi les liaisons α (1→ 6) de l'amylopectine en libérant du β - D- glucose (**MERCIER, 1982**)

1.2.4. L' α -Amylase

Elle est considérée comme étant l'une des enzymes industrielles la plus importante (**GUPTA et al., 2008**). C'est une protéine globulaire, de type hydrolase, catalysant la rupture des liaisons α (1→ 4) de l'amidon (**SCRIBAN, 1993**).

Différentes nomenclatures lui sont affectées comme l'indique le tableau ci-après.

Tableau IV: Nomenclature de l' α -amylase (MERCIER, 1982).

Nom codifié	E.C .3.2.1.1
Nom recommandé	Alpha-amylase
Nom systématique	α (1→ 4) D-glucane glucono-hydrolase
D'autres nom (s)	Glycogénase, endoamylase, maxilase, taka-amylase A, takatherm, thermolase, amylotherm, clarase, amylopin, spitase CP1, G995, kleistase L1, THC 250, maxamy, ptyalin.

C'est une endo-enzyme catalysant l'hydrolyse aléatoire des liaisons osidiques de l' α amylose et de l'amylopectine, celles du glycogène et celles d'autres polysaccharides contenant plus de trois liaisons α (1→ 4) D-Glucose. Son action conduit à la formation de molécules d' α D-glucose, de molécules de maltose et d'une petite quantité de maltodextrines. Chez les mammifères, l' α -amylase est présente principalement dans les sécrétions salivaires et pancréatiques. Celle d'origine microbienne (bactéries, moisissures et levures) est exo-cellulaire, exceptées celles de certaines espèces comme *Bacillus subtilis* et *Pichia burtonii* (**FRANCO et al., 2000**).

- Elle est largement répartie dans le règne végétal et chez certains micro-organismes. Bien que les α -amylases de différentes origines aient très peu de séquences d'acides aminés identiques, leur structure tridimensionnelle et l'organisation de leurs sites actifs sont similaires. Leurs sites actifs sont constitués d'un ensemble de sous-sites pouvant accueillir chacun un résidu glucose dont le nombre varie selon l'origine de l'enzyme (JANECEK, 1994).

1.2.4.1. Structure

Sa structure tridimensionnelle lui permet de se lier au substrat par le biais de l'action extrêmement spécifique de son groupe catalytique, et de stimuler de ce fait, la dégradation de la liaison glycosidique. La masse moléculaire de l' α amylase humaine est égale à 57.6 kDa. Elle est composée de 512 résidus amino-acyles et renferme du calcium (SOUZA *et al.*, 2010).

L' α -amylase fongique est une glycoprotéine, comportant trois domaines globulaires (A, B et C). Sa fraction glucidique est associée chimiquement à la chaîne polypeptidique de 471 à 483 résidus d'acides aminés, avec quatre ou cinq ponts disulfures (MONTEIRO *et al.*, 2010). Le domaine central A forme un tonneau (β/α)₈ qui contient huit feuillets β plissés et qui se disposent de façon parallèle et de huit hélice α , il porte le site actif à la partie C-terminale des feuillets β . Le domaine B est formé d'une boucle de soixante-quatre résidus amino-acyles reliant A- β_3 avec A- α_3 et constitue une sorte de «couvercle» au-dessus du site actif. Le domaine C est constitué d'un tonneau de huit feuillets β antiparallèles (Fig.04) (SOUZA *et al.*, 2010).

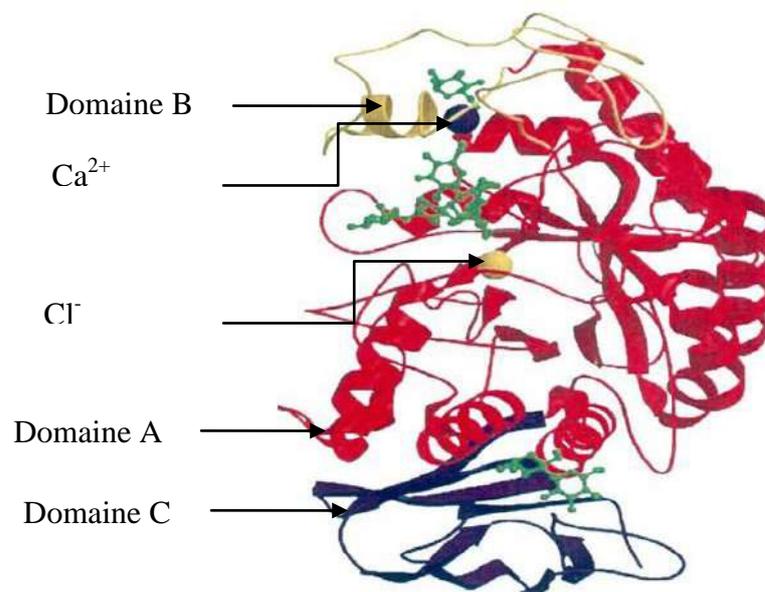


Figure 4: Structure tridimensionnelle de l' α -amylase

Domaine A en rouge, domaine B en jaune et domaine C en pourpre. Dans le centre catalytique, Ca^{2+} (sphère bleue) et Cl^- (sphère jaune). Les structures vertes sont liées au site actif et les sites de liaison de surface (SOUZA et al., 2010).

1.2.4.2. Mode d'action

Les α -amylases sont des métallo-enzymes à calcium. Ces ions sont nécessaires à l'activité enzymatique et au maintien de la stabilité de la structure en acides aminés des enzymes qui varie d'une souche à une autre (FOGARTY et al., 1990).

Le mécanisme d'action de l' α -amylase nécessite la participation de trois fonctions du site actif impliquant un attaquant nucléophile, un stabilisateur de la charge positive de l'atome attaqué et un donneur de proton au groupe déplacé; ceci signifie que la rupture de la liaison osidique fait intervenir une série d'échanges d'électrons et de protons entre certains résidus de l'enzyme et du substrat. Ce mécanisme est une caractéristique de l'enzyme selon des conditions expérimentales telles que la température, le pH, la taille et la structure du substrat (PARKC et al., 1997).

1.2.3. Caractéristiques de l' α -amylase

Une parfaite connaissance des caractéristiques d'une enzyme à intérêt industriel, l' α -amylase d'origine microbienne en l'occurrence, est une première garantie pour sa production à l'échelle industrielle. Dans ce contexte, il est important de signaler les caractéristiques citées ci-après :

➤ **La spécificité de substrat**

La production d' α -amylase par certaines souches fongiques (*Aspergillus sp.*, *Rhizopus sp.* et *Penicillium sp.*) est contrôlée par l'amidon. Il s'agit d'une induction de l'enzyme par son substrat naturel .

➤ **Le poids moléculaire**

Le poids moléculaire des α -amylases varie d'une origine à l'autre et d'une espèce à l'autre. Il est compris entre 40 et 90 KDa. La masse moléculaire des α -amylases levurières peut varier entre 40 et 70 KDa (SCHOMBURG et SALZMANN, 1991).

➤ **Température optimale d'activité**

La température optimale d'activité varie avec l'espèce et l'origine de l'enzyme. Généralement les α -amylases ont une température optimale d'activité, comprise entre 40 et 70

°C. Les α -amylases bactériennes ont une plus grande stabilité thermique par rapport aux amylases fongiques. La température optimale des α -amylases bactériennes varie entre 50 à 95 °C alors que celle des α -amylases fongiques varie entre 40 à 60 °C. L' α -amylase levurière a des températures maximales, allant de 40 à 60 °C et parfois même 70 °C pour certaines espèces comme *Lypomyces starkeyi* (SCHOMBURG et SALZMANN, 1991)..

➤ **pH optimum d'activité**

Les α -amylases sont généralement stables dans une gamme de pH de 4 à 8, avec un optimum se situant entre 4 à 5 pour les α -amylases fongiques et un optimum supérieur à la neutralité 6 à 8.5 pour les amylases bactériennes. Pour les levures, l'enzyme requiert, selon les espèces, des pH entre 4 à 6 (SCHOMBURG et SALZMANN, 1991).

➤ **Effecteurs enzymatiques**

Les amylases sont des métalloprotéines absolument dépendantes du Ca^{2+} qui est vraisemblablement un activateur allostérique. Le calcium ne participe pas directement à la formation de complexe enzyme-substrat mais il maintient l'enzyme dans une conformation optimale pour un maximum d'activité et de stabilité vis à vis de la dénaturation thermique (le maintien de sa structure tertiaire) et de la dénaturation acide vis à vis de la protéolyse (EGAS et al., 1998). .

L'activité enzymatique de l' α -amylase n'est pas modifiée par les ions K^+ , Na^+ , NH_4^+ mais elle est fortement inhibée par , l'EDTA (agent chélateur du calcium), l'urée 8 M, certains composants amides, l'acide formique, l'acide oxalique, l'acide lactique, l'acide citrique et les métaux lourds ; l'acide acétique par contre, stimule l' α -amylase (PARKC et al., 1997).

Parmi les activateurs de l' α - amylase, SCHOMBURG et SALZMANN (1991) citent les ions, Cl^- , Zn^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} et Fe^{2+} ; MERABTI, (2006) cite l'histidine, le mercaptoéthanol, le dithiothréitol (DTT).

1.2.4.4. Différentes origines de l' α –amylase

Elle est largement représentée chez les animaux, les végétaux et les micro-organismes. Bien que l' α -amylase de différentes origines ait très peu de séquences d'acides aminés identiques, leur structure tridimensionnelle et l'organisation de leur site actif sont similaires (PARKC et al., 1997).

1.2.4.4.1. Origine animale

L' α -amylase animale est généralement extraite de la salive humaine et du pancréas des mammifères. Cependant, la principale difficulté réside dans l'approvisionnement de la matière première (organe difficile à collecter) et le coût de l'extraction de l'enzyme (CHATTERTON *et al.*, 1996).

1.2.4.4.2. Origine végétale

Les α -amylases jouent, chez les plantes, un rôle important dans le métabolisme glucidique. Elles participent à l'hydrolyse de l'amidon en sucres réducteurs (glucose et maltose), source énergétique nécessaire à la germination, directement assimilables. Ces enzymes végétales sont généralement obtenues par extraction à partir des céréales. Elles sont souvent formées au cours de la germination des grains, qui requiert une activité enzymatique très importante pour la mobilisation des réserves et le développement de l'embryon (BRAUN *et KELLY*, 1993).

1.2.4.4.3. Origine microbienne

Au cours de la dernière décennie, des recherches considérables ont été consacrées à l' α -amylase produite par une grande variété de micro-organismes. Cette enzyme extracellulaire présente de nombreux avantages. C'est une substance d'intérêt industriel et peut de ce fait être produite à grande échelle avec les caractéristiques souhaitées (SCHOMBURG *et SALZMANN*, 1991). Il existe deux types d' α -amylases : les α -amylases bactériennes et les α -amylases fongiques.

- **Les α -amylases bactériennes** sont obtenues principalement par fermentation des bacillacées. De nombreuses amylases aux propriétés industrielles ont été découvertes chez des bactéries acidophiles, alcalinophiles et thermophiles. Ces enzymes interviennent dans la transformation de l'amidon par fragmentation rapide en clivant les liaisons α (1 \rightarrow 4) (SCHOMBURG *et SALZMANN*, 1991).
- **Les α -amylases fongiques** sont synthétisées par les genres *Aspergillus* et *Penicillium*. Cette production existe depuis longtemps du fait que la première production d' α -amylase a été réussie par TAKAMINE *en* 1894. L' α -amylase fongique est caractérisée par une thermostabilité assez faible et son optimum d'action se situe entre 50 et 55 °C. Actuellement d'autres genres de moisissures dont *Rhizopus* et *Alternaria* ont été utilisés pour la production d'une α -amylase relativement plus thermostable (AIT KAKI *et al.*, 2012).

1.2.5. Applications de l' α -amylase dans le secteur industriel

Le secteur industriel présente une très grande diversité de techniques et de produits. Il offre aux enzymes hydrolytiques un large champ d'utilisation. En raison de leur productivité et leur thermostabilité, les amylases sont actuellement largement utilisées dans les industries, alimentaire, pharmaceutique, textile, papeterie, et détergent (PANDEY *et al.*, 2000). Avec le développement de la biotechnologie, le spectre d'application des amylases s'est élargi vers d'autres domaines, comme la chimie clinique, médicale et analytique.

➤ Glucoserie

La principale industrie utilisatrice de l' α -amylase est la glucoserie qui à partir d'un substrat complexe, l'amidon, développe un nombre important de transformations faisant appel aux enzymes, parmi lesquelles les α -amylases bactériennes ou fongiques qui sont utilisées pour la dégradation de l'amidon (PANDEY *et al.*, 2000).

➤ En sucrerie

L' α -amylase est utilisée pour faciliter les opérations d'extraction et de raffinage du saccharose à partir de la betterave ou de la canne à sucre pour éliminer des traces d'amidon gênant la purification. De plus, des α -amylases fongiques sont très utilisées pour la préparation des sirops sucrés à base d'amidon de maïs et de sirops de chocolats (VAN DER MAAREL *et al.*, 2002).

➤ Biscuiterie et panification

L'usage de l' α -amylase «améliorant de panification» est devenue une pratique courante dans l'industrie panair, non seulement pour améliorer la qualité du pain mais aussi pour contrôler le processus de fabrication, ce qui conduit à un gain en temps et en énergie (PANDEY *et al.*, 2000).

➤ Industrie des boissons

Dans ce secteur l' α -amylase fongique intervient essentiellement dans la fabrication d'alcool éthylique, de boissons sucrées non alcoolisées, de jus de fruits (ZOUBIRI, 2012). En brasserie, elle permet d'obtenir des bières sans dextrans, dites bières à basses calories.

➤ **Industrie du textile et des détergents**

Ces enzymes amylolytiques sont utilisées pour le désencollage des textiles. Elles permettent ainsi d'éliminer la colle d'amidon qui enduit les fibres et les protège au cours du tissage. Elles facilitent également la dégradation des taches à base d'amidon en rendant solubles et donc détachables, les oligosaccharides et les dextrines libérés suite à leur action hydrolytique (PANDEY *et al.*, 2000).

➤ **Domaine médical et industrie pharmaceutique**

Dans le domaine médical, le taux de l' α -amylase dans les liquides biologiques peut être utilisé pour détecter certaines maladies: insuffisance cardiaque, oreillons, cancer du pancréas (PANDEY *et al.*, 2000). Les α - amylases fongiques sont utilisées comme:

- ✓ Aide digestif pour éviter les dyspepsies et les fermentations intestinales par exemple: Danilase;
- ✓ Agent anti-inflammatoire en soutenant le traitement antibiotique

La production d' α amylase par voie biotechnologique exige l'utilisation des milieux de culture disponibles et à bon marché tels que le lactosrum.

Autrefois petit lait, le lactosérum est un co-produit de l'industrie fromagère et de la préparation des caséinates (JOUAN., 2002). Le lactosérum est un produit découvert il y a plus de 3000 ans avant Jésus-Christ, par des Bédouins lors du transport de lait. L'acidification et la coagulation par la chaleur provoquaient la formation d'une phase liquide au-dessus d'un caillé de lait (DE WITT, 2001). Le lactosérum représente 90% du volume original de lait utilisé en fromagerie et en est le principal sous-produit (MOLETTA., 2002).

1.3. Définition du lactosérum

Le terme lactosérum se rapporte au liquide translucide et verdâtre qui se sépare du caillé (HESLOT, 1996), après séparation des caséines par coagulation acide ou par processus enzymatique au moyen de la présure ou de la chymosine (JOUAN, 2002). Son pH est compris entre 5 et 6.5 (MEREIO, 1980).

Le lactosérum est constitué de la phase aqueuse du lait laquelle contient l'ensemble des éléments solubles de celui-ci (JOUAN., 2002). Il est constitué de 50% de matière sèche, contient aussi une quantité importante de protéines, de lactose et des matières minérales; des vitamines hydrosolubles, il est riche aussi en vitamine B, des nucléotides, des acides aminés

libres...c'est dans cette phase hydrique que l'on trouve les protéines solubles appelées, aussi, séro-protéines (JOUAN., 2002).

1.3.1. Types des lactosérum

Le lactosérum est un produit de grande valeur nutritionnelle. On distingue généralement deux catégories de sérum, selon que son acidité est inférieure est ou supérieure à 1.8g d'acide lactique par litre (18°D) (KOSSEVA., *et al.*, 2007) .

✓ Lactosérum acide

C'est le sous-produit de la coagulation du lait par précipitation des caséines à leur pHi soit 4.6 par ajout d'un acide fort ou d'acide lactique (VIOLLEAU, 1999). Les lactosérums « acides » découlent des fabrications de pâtes fraîches, de pâtes molles (Camembert, etc.) et aussi de la fabrication de la caséine acide. Son acidité est supérieure à 18°D (ADRIAN *et al.*, 1980).

✓ Lactosérum doux

Il est obtenu après la coagulation de la caséine sous l'action de la présure sans acidification préalable. C'est un sérum pauvre en sels minéraux et riche en lactose et en protéines. En plus des protéines solubles du lait, ce type de lactosérum contient une glycoprotéine qui provient de l'hydrolyse de la caséine Kappa par la présure (SOTTIEZ, 1990). Les lactosérums « doux » sont obtenus par les autres traitements de fromageries (pâtes pressées, pâtes cuites, etc.) et résultent également de la caséine-présure. Son acidité est inférieure à 18 °D. (ADRIAN *et al.*, 1980).

1.3.2. Sources industrielles du lactosérum

Les deux principales voies industrielles de transformation du lait nature aboutissant au lactosérum, sont la beurrerie et la fromagerie (fig.5).

- **La beurrerie** : c'est l'ensemble des procédés qui conduisent à la fabrication du beurre à partir du lait mature. Après écrémage de ce dernier suivi d'une extraction de la caséine par précipitation on obtient du « lactosérum écrémé ».
- **La fromagerie** : c'est l'ensemble des procédés qui conduisent à la fabrication des fromages à partir du lait mature, ce dernier subit les processus de coagulation et de synérèse, aboutissant d'une part à une phase solide le « fromage » et d'autre part à une phase liquide «le lactosérum». (PANDEY *et al.*., 2000).

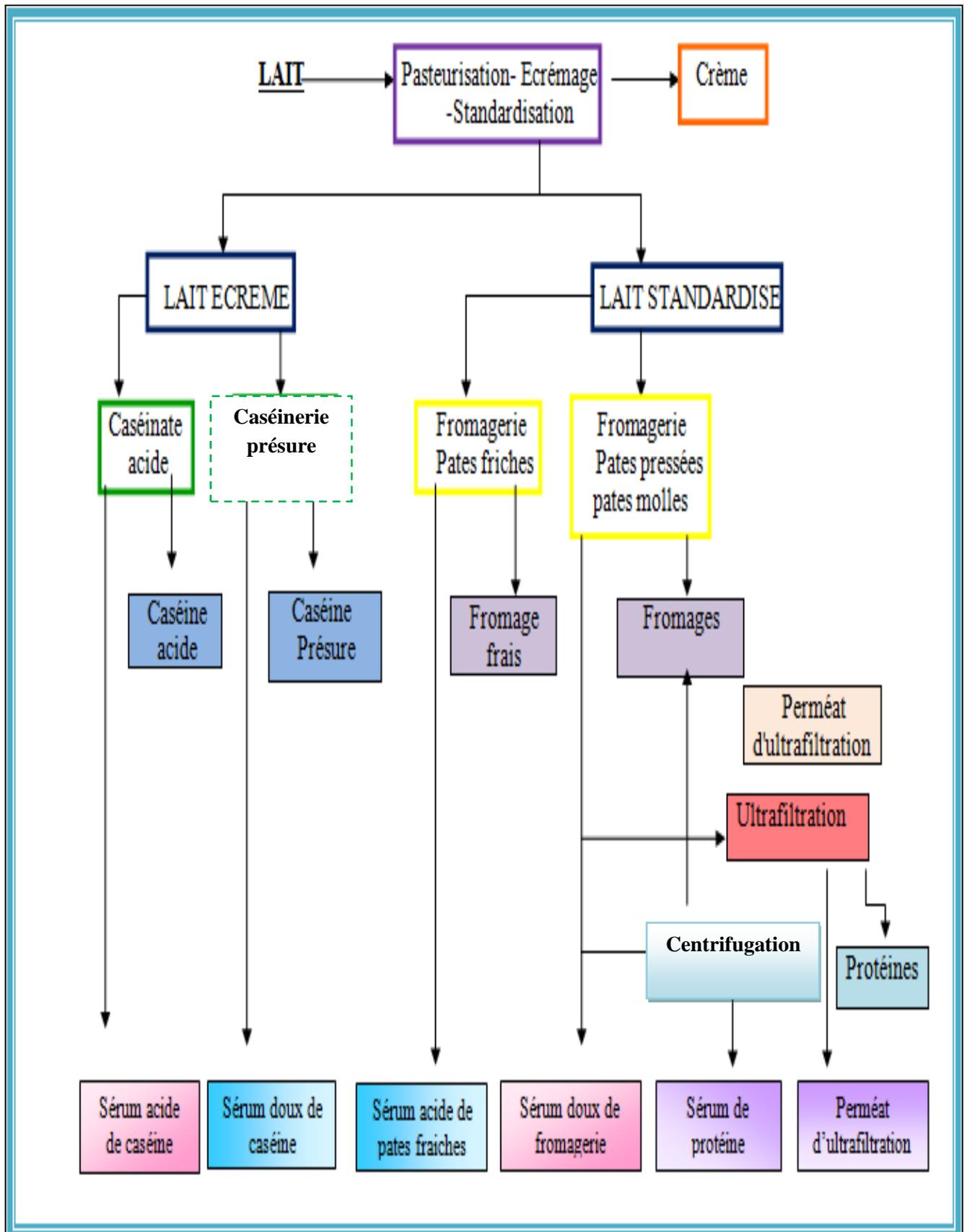


Figure 5: Voies technologiques permettant l'obtention des principaux types de lactosérums issus de la première transformation du lait (ALAIS, 1984).

1.3.3. Composition du lactosérum

Le lactosérum, constitué essentiellement d'eau, contient du lactose, des protéines, des minéraux et une petite quantité de matière grasse. La quantité et la proportion relative de ces différents constituants dépendent entre autres, des procédés d'obtention (**Tab.V**). (**SOTTIEZ, 1990**).

Tableau V: Composition moyenne du lactosérum doux et acide (FAO, 2002).

Composants	Lactosérum doux (%)	Lactosérum acide (%)
pH	6.3	4.6
Eau	93	93.5
Extrait sec (ES)	06.4	06.5
Matière grasse	0.05 - 0.07	0.04 - 0.03
Lactose	4.77 - 4.8	4.71 - 4.9
Protéines	0.82	0.75
Acide lactique	0.05 - 0.15	0.4 - 0.55
Cendres	0.53	0.69 - 0.8
Calcium	0.05	0.13
Sodium	0.07	0.06
Potassium	0.13	0.15
Phosphore	0.06	0.09

La composition du lactosérum varie en fonction de son origine. La différence majeure entre les deux types de lactosérums se situe au niveau des teneurs en lactose, le constituant le plus abondant du lactosérum, et en acide lactique, généré lors de fermentation du lactose au cours de la coagulation par voie bactérienne.

Le lactosérum de caséinerie est obtenu par la précipitation de la caséine par l'acide chlorhydrique ou l'acide sulfurique alors que le lactosérum acide est généré par une fermentation lactique d'un lait écrémé. Un lactosérum doux présente une teneur en protéines supérieure à celle d'un lactosérum acide en raison de la précipitation acide de certaines protéines (**ADRIAN, 1987**).

1.3.3.1. Composition minérale

Dans le même type de lactosérum et du fait de la diversité des technologies de fabrication fromagère, une forte hétérogénéité peut être obtenue au niveau de la composition minérale du lactosérum issu de la fabrication des fromages à « pâtes fraîches » et ceux issu de la fabrication des fromages à « pâtes molles » (SAULNIER, 1996). La composition minérale détaillée, anions et cations, déterminée par électrophorèse capillaire dans le cas des deux lactosérums acides, est donnée dans le tableau VI.

Tableau VI: Composition anionique et cationique de deux groupes de lactosérums acides (exprimée en % de la matière sèche) (SAULNIER, 1996).

Composition (% MS)	Type de lactosérum	
	Lactosérum I*	Lactosérum II**
Potassium	2,74 ± 0,29	3,10 ± 0,19
Calcium	1,29 ± 0,28	2,06 ± 0,61
Sodium	1,14 ± 0,15	1,11 ± 0,25
Magnesium	0,13 ± 0,01	0,19 ± 0,03
Ammonium	0,13 ± 0,12	0,23 ± 0,11
Chlorure	1,99 ± 0,25	2,15 ± 0,08
Phosphate	1,38 ± 0,19	3,78 ± 1,50
Sulfate	0,14 ± 0,04	0,15 ± 0,02
Citrate	2,21 ± 0,33	2,29 ± 0,62
Lactate	1,84 ± 0,39	5,82 ± 2,48
Acétate	0,16 ± 0,03	0,43 ± 0,26

*Lactosérum acide issu de la fabrication des fromages à pâtes fraîches.

**Lactosérum acide issu de la fabrication des fromages à pâtes molles.

Il existe des variations significatives au niveau des teneurs du lactosérum en potassium, en calcium, en magnésium, en phosphore, en acétate et en lactate. En outre, pour un même type de ce sous-produit de la fromagerie, d'importants coefficients de variation sont observés (COTON, 1980).

D'autres études ont montré que la composition chimique et l'acidité des lactosérums acides varient fortement, au cours de l'étape d'égouttage des fromages. Ces observations permettent de conclure qu'à chaque type de fromage et à chaque étape de fabrication est associé un lactosérum (**COTON, 1980**).

1.3.3.2. Teneur en vitamines

La composition vitaminique du lactosérum se caractérise par une quantité importante de riboflavine (vitamine B₂), ce qui lui donne sa couleur jaune verdâtre; d'acide pantothénique (vitamine B₅); de thiamine (vitamine B₁); de pyridoxine (vitamine B₆) et l'acide ascorbique (vitamine C) (**tableau VII**).

Tableau VII: Teneur du lactosérum en vitamines (LUQUET, 1984).

Vitamines	Concentrations (mg/ml)
Thiamine	0.38
Riboflavine	1.20
Acide nicotinique	0.85
Acide pantothénique	3.40
Pyridoxine	0.42
Cobalamine	0.03
Acide ascorbique	2.2

Les vitamines du lactosérum sont, en majorité, des vitamines hydrosolubles puisque la matière grasse a été presque totalement éliminée, entraînant avec elle les vitamines liposolubles (**PAQUIN, 2004**).

1.3.3.3. Protéines de lactosérum

D'après **LAPOINTE et VIGNOLA (2002)**, les protéines du lactosérum, ou protéines sériques, ont un intérêt nutritionnel important de par leur composition élevée en acides aminés essentiels (**Tab. VIII**).

Elles représentent 20% des protéines du lait. De faible poids moléculaire, elles sont présentes dans le lait sous forme de monomères et polymères.

Tableau VIII : Composition en acides aminés essentiels des protéines lactosériques (en g.100 g⁻¹ de protéines) (JEANTET *et al.*, 2008).

Acides aminés essentiels	Teneur en mg / 100 g de protéines du lactosérum
Isoleucine	6.55
Leucine	14.00
Lysine	10.90
Méthionine	2.35
Cystine	3.15
Phénylalanine	4.05
Tyrosine	4.80
Thréonine	6.70
Tryptophane	3.20
Valine	6.85

1.3.4. Valorisation du lactosérum

La production de lactosérum correspond à 9 fois le tonnage de fromages fabriqués (SOTTIEZ, 1975). En conséquence, une industrie du lactosérum s'est donc considérablement développée ces dernières décennies. Deux raisons justifient l'intérêt porté à ce sous-produit : son haut potentiel nutritif et son caractère polluant (CHAPUT, 1981).

Le lactosérum peut être également utilisé dans l'alimentation du bétail, comme engrais, comme milieu de fermentation pour la production, par voie microbienne, de l'acide lactique, des vitamines (B2, B12), d'enzymes (protéases, amylases, pectinases, galactosidases et cellulases) et de matière grasse (LUQUET ET BOUDIER, 1984).

➤ Substrat de fermentation

Le lactosérum de fromagerie, est utilisé, après déprotéinisation, comme milieu nutritif pour cultiver de façon continue et industrielle, avec insufflation de grande quantité d'air, une quantité importante de levures, de moisissures ou des espèces bactériennes comme *Streptococcus lactis* (GANA ET TOUZI, 2001).

La déprotéinisation du lactosérum avant fermentation est indispensable, car, les protéines du lactosérum sont des produits à haute valeur alimentaire. Leur récupération a un impact

économique non négligeable. En outre, leur présence est sans influence remarquable sur la croissance des levures dans le procédé de production des protéines d'organismes unicellulaires (P.O.U) (**CHAPUT, 1981**).

Pour le bon déroulement de la fermentation en utilisant des milieux à base de lactosérum, il est indispensable de contrôler le pH et la température et de régler continuellement la concentration en oxygène dissous dans la phase aqueuse du milieu de culture. L'apport contrôlé d'une source d'azote et les oligoéléments est nécessaire (**DRYER, 2001**).

A la fin du processus de fermentation, on procède à une centrifugation afin de séparer la biomasse du surnageant, un traitement de purification est alors effectué (**AÏT KAKI, 2004**).

➤ **Alimentation humaine et animale**

La qualité nutritive du lactosérum tient à la fois à la présence du lactose et des protéines sériques. La richesse en lactose en fait un auxiliaire actif dans le brunissement non enzymatique ou maillardisation apprécié en boulangerie, biscuiterie et viennoiserie.

En pathologie, il est utilisé pour l'alimentation des diabétiques ou des sujets souffrant de mal nutrition, et en alimentation de soutien, pour les sportifs, et les personnes âgées (**DRYER., 2001**).

Au cours des dernières années, les conjonctures économiques ont mis l'accent sur les possibilités d'utilisation du lactosérum dans l'alimentation animale (**ALAIS, 1984**).

Une quantité considérable de lactosérum est utilisée dans l'alimentation animale. De plus, il est utilisé pour enrichir les aliments ou les régimes pauvres en protéines. Le lactosérum et ses dérivés peuvent être incorporés en quantités importantes dans les rations des différentes espèces animales domestiques (bovine, ovine, caprine, porcine...etc.) (**BERNAL, 1985**).

Dans le rumen, le lactosérum est rapidement dégradé. Son lactose y métabolisé, est transformé en acide lactique. L'utilisation digestive du lactosérum est excellente, sa valeur énergétique est légèrement inférieure à celle de l'orge (**BERNAL, 1985**).

Le développement de l'utilisation des produits lactosés dans l'alimentation des ruminants dépend étroitement de leur technologie. Compte-tenu de son coût élevé et surtout de la possibilité qu'a le ruminant d'utiliser les formes concentrées ou liquides, la forme séchée n'est pas utilisée et. Il faut toutefois que l'approvisionnement en forme concentrée ou liquide se fasse de façon régulière, que les animaux soient situés à proximité des lieux de production

et que les conditions climatiques (température) permettent l'utilisation de ces produits, très rapidement fermentescibles (DRYER, 2001).

➤ **Valorisation des constituants lactosériques**

La valorisation des protéines de lactosérum sous forme de concentrés ou d'isolats permet de tirer profit du sous-produit de la transformation fromagère. Cette opération entraîne cependant la production de grandes quantités de perméat, essentiellement constitué de lactose et de minéraux. Le lactose, une fois extrait, sert d'ingrédient alimentaire ou pharmaceutique. On peut aussi le dériver pour modifier ses propriétés technologiques ou biologiques (LAPOINTE et VIGNOLA., 2002).

La concentration des minéraux représente une autre voie de valorisation du perméat de lactosérum. Les concentrés de minéraux d'origine laitière sont essentiellement utilisés pour satisfaire aux besoins nutritionnels en calcium (LAPOINTE et VIGNOLA., 2002).

Les protéines de lactosérum sont utilisées comme suppléments dans l'alimentation animale et exploitées pour leurs propriétés fonctionnelles et nutritionnelles dans l'industrie alimentaire (SIENKIEWICZ *et al.*, 1992).

1.3.5. Lactosérum et pollution de l'environnement

Différentes techniques peuvent être utilisées afin de minimiser les risques liées à la pollution des eaux de distribution, des rivières ou des eaux souterraines. On cite dans ce contexte :

- le rejet dans les fosses, de toute eau permettant d'obtenir, après 4 à 5 jours, un abattement de 30 % sur la DCO. L'épuration est complétée par un épandage en aval ;
- l'épandage gravitaire qui consistant à épandre, en continu et par un simple tuyau, les eaux blanches dans des terrains pentus. Le principe repose sur une épuration biologique par le sol. Cette technique permet un abattement de DCO de plus de 80 %. Afin d'éviter une saturation du sol, le tuyau doit être déplacé régulièrement et avant de pouvoir épandre une deuxième fois sur une surface, il faut respecter un long temps de repos qui peut aller jusqu'à 5 ans ;
- les cultures fixées sur lit de pouzzolane, procédé de filtration fonctionnant avec une biomasse fixée. Le temps de contact, entre les bactéries et la matière organique contenue dans les effluents, est augmenté en effectuant plusieurs recyclages. Des temps de repos sont imposés pour permettre à la biomasse épuratoire de régresser et maintenir ainsi une oxygénation du filtre. Les

rendements épuratoires sont aussi très bons et peuvent atteindre plus de 95 % d'abattement ;

En ce que concerne la pollution des effluents par le lactosérum elle constitue un problème environnemental relativement important à cause des volumes considérables générés et à cause de la teneur élevée de ce sous-produit en matière organique. Le lactosérum rejeté dans les effluents est en effet, très polluant car il impose une forte demande biologique en oxygène (DBO) à hauteur de 30000 à 50000 ppm (**MARWAHA *et al.*, 1988**).

Une fois libéré dans l'eau, par exemple, les rivières, les canaux d'irrigation, ou sur la terre, le lactosérum conduit ainsi à de sérieux problèmes environnementaux.

En effet, il met en danger la structure physique et chimique du sol, diminue le rendement des cultures (**AULIFFE *et al.*, 1982**) et réduit la vie aquatique par l'épuisement de l'oxygène dissous (**YANG *et al.*, 1980**).

Il existe toutefois un certain nombre de procédés pour l'épuration des mélanges eaux blanches et lactosérum ; la gestion du lactosérum seul permet de réduire seulement la charge polluante totale des rejets (**PAULINE et YVES, 2008**). La valorisation du petit-lait peut être une éventualité pour faciliter l'épuration avant rejet des effluents, puisque cela permet un abattement important de la concentration des rejets (**LAPLANCHE, 2004**). Toutefois, approximativement la moitié de la production mondiale demeure inexploitée et est rejetée comme effluents, ce qui constitue un important gaspillage en matière alimentaire (**MARWAHA *et al.*, 1988**). Or, de nombreuses possibilités permettent de pallier à l'action polluante de ce sous-produit. De nos jours, la valeur nutritive et les propriétés technofonctionnelles (pouvoir émulsifiant) du lactosérum sont largement exploitées dans l'industrie agro-alimentaire. Ce type d'exploitation exige toutefois le recours à des moyens de conservation de ce coproduit.

Le lactosérum est une matière première altérable et doit donc être considéré comme tel dès sa collecte à la sortie de l'égouttage. Les équipements utilisés pour le manutentionner et le traiter (circuits, pompes, réfrigérants...) doivent être en acier inoxydable, d'une part pour éviter les corrosions (d'autant plus rapide que le produit est plus acide) et d'autre part pour préserver le produit lui-même de toute altération et de toute contamination. Les précautions sanitaires doivent être observées avec le même soin que pour tout produit alimentaire (**DRYER, 2001**).

Le stockage pourra s'effectuer dans des cuves en inox ou en matériau inerte (plastique, résine...) de même que le transport.

La réfrigération doit être appliquée rapidement pour limiter l'acidification, qui est très rapide dans les conditions habituelles de température, au moment de l'égouttage. Pour maintenir les qualités du produit fini et éviter les problèmes au cours de la fabrication, il est primordial de bloquer l'acidité dès le départ (ALAIS, 1984).

Les lactosérums doux pourront sans inconvénient, être refroidis à des températures inférieures à 10 °C (voire 4 à 6°C), par contre il sera préférable de ne pas trop refroidir les sérums acides. Une température de l'ordre 15°C convient parfaitement, d'autant plus que l'évolution bactériologique, pose beaucoup moins de problèmes dans ces produits compte tenu de leur bas pH (CHAPUT, 1981).

1.3.6. Production de substances d'intérêt industriel par des levures cultivée sur milieu à base de lactosérum

En biotechnologie, le lactosérum par sa composition biochimique possède d'intéressantes propriétés comme milieu de fermentation pour plusieurs microorganismes assimilants le lactose comme source de carbone et d'énergie. Il s'agit des levures telles que *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida kefyr* et *Kluyveromyces fragilis*, cette dernière est cultivée sur le lactosérum doux déprotéiné et enrichi par des facteurs de croissance de la biomasse (GANA et TOUZI, 2001). Le lactosérum déprotéiné a servi comme milieu de base pour la production de la cellulase par la moisissure *Aspergillus niger* et pour la production aussi de l'amylase par la moisissure *Rhizopus oryzae* (AÏT KAKI, 2004).

Vu sa composition adéquate en eau, en protéine, en lactose, en minéraux, en acide lactique et en matière grasse, le lactosérum est un milieu de choix pour la culture des microorganismes (levure), qui dégradent le lactose. Plusieurs travaux ont été réalisés pour la production des vitamines et des enzymes par le biais de micro-organismes, qui utilisent comme milieu de culture le lactosérum. Nous pouvons citer à cet effet :

- *Propionibacterium shermanii* : qui produit la vitamine B12
- *Saccharomycès fragilis* : qui permet la production du lactose (bêta galactosidase) (GANA et TOUZI, 2001).

Matériel et

Méthodes

II. Matériel et méthodes

2.1. Matériel

2.1.1. Echantillons de sols

Les échantillons de sol utilisés dans cette étude proviennent de deux lacs localisés dans le Sahara Septentrional algérien : le lac « *Ayata* » situé dans la commune de Sidi Amran commune de Djamaa et le lac « *Chott* » localisé dans la commune d'El-Oued (**photos 1, 2**) Le prélèvement a été réalisé durant le mois de Mars 2014 avec une profondeur de 30cm.



Photo 1: Lac "Ayata" (Photo originale; 2014)



Photo 2 : Lac "Chott" (Photo originale; 2014)

2.1.2. Echantillons de blé dur (*Triticum durum*)

Les échantillons de blé dur stockés ont été prélevés en juillet 2014 à une température de 41 C°(commune de Reguiba) . Le choix du blé dur comme deuxième milieu d'isolement des levures, se justifie par la disponibilité de cette poacée en quantité appréciable dans la région d'El-Oued et par la composition du grain en éléments nutritifs et en eau, permettant l'implantation d'une flore fongique

2.1.3. Echantillons de lactosérum

Les échantillons de lactosérum utilisés dans la présente étude, proviennent des laiteries situées dans la Willaya de Ghardaïa (laiteries Allouani et Chihia). Ces dernières produisent le lait et ses dérivés (fromage et yaourt) avec une production journalière de 5000 l). Ainsi, des échantillons de lactosérum doux, caprin, bovin et camelin sont collectés, dans des conditions d'hygiène rigoureuses et placés dans des bouteilles (2 litres), préalablement stérilisées. Ces derniers, sont aussitôt acheminés dans une glacière contenant des blocs réfrigérants au laboratoire de chimie (Facultés des Sciences et de la Technologie, université d'El-Oued), où ils sont placés à 4°C, en vue d'y subir des analyses.

2.1.4. Milieux de culture et réactifs

- ✓ Milieu gélosé Sabouraud ;
- ✓ Milieu PDA (Potato dextrose agar) ;
- ✓ Milieu eau de levure ;
- ✓ Milieu de base YCB (Yeast Carbon Base) ;

Acide sulfurique ; hydroxy-méthylfurfural (HMF) ; l'oxyde cuivreux ; bleu de méthylène ; amidon soluble ; solution de lugol ; réactif de Folin-Ciocalteu ; acide phosphotungstomolybdique ; albumine sérique (BSA) ; ferrocyanure de zinc ; sulfate ferrique ; extrait de levure ; sulfate d'ammonium... etc.

2.1.5. Matériel de laboratoire

- Centrifugeuses max. 12 000×g (SIGMA, France) ;
- Rampe et matras de minéralisation d'azote (GERHARDT, Allemagne) ;
- Distillateur d'azote (VELP SCIENTIFICA, Italie) ;
- Lyophilisateur à plateau (CHRIST α 1-2 LD, Allemagne) ;
- Spectrophotomètre UV-Visible (SCHIMADZU, Japon) ;
- Étuve (Mettler GmbH, Allemagne) ;

- Autoclave (SANOCLAV, France) ;
- Matériel de microbiologie divers (microscope optique (Marque ZEISS) doté d'un appareil photo et connecté à un microordinateur, loupe binoculaire (Marque ZEISS), compteur de colonies (marque S.SCH TT) ;
- Agitateur basculant (STUART, UK) ;
- Agitateurs magnétiques de paillasse, chauffants et non chauffants (YELLOWLINE, Allemagne) ;

- PH mètre (210. Meterlab) ;
- Four à moufle (növe).

Un certain nombre d'accessoires et petit matériel spécifique est utilisé dans le cadre de cette étude :

Micropipettes, micro-seringues Hamilton, gants et masques pour manipulation des produits dangereux, cellule de Malassez, laine de verre et différents types de verrerie (béchers, fioles jaugées, fiole à vide, pipettes graduées, tubes à essais, burette...).

2.2. Méthodes analytiques

L'objectif assigné à ce travail vise un isolement de souches levurières productrices d' α amylases à partir de deux substrats, le sol et le blé dur. Le lactosérum de trois espèces laitières (bovine, caprine et cameline) est utilisé pour l'enrichissement du milieu de culture. Des essais d'optimisation de la production de ces substances d'intérêt industriel et leur purification sont réalisés. La procédure expérimentale adoptée est représentée par la figure 6.

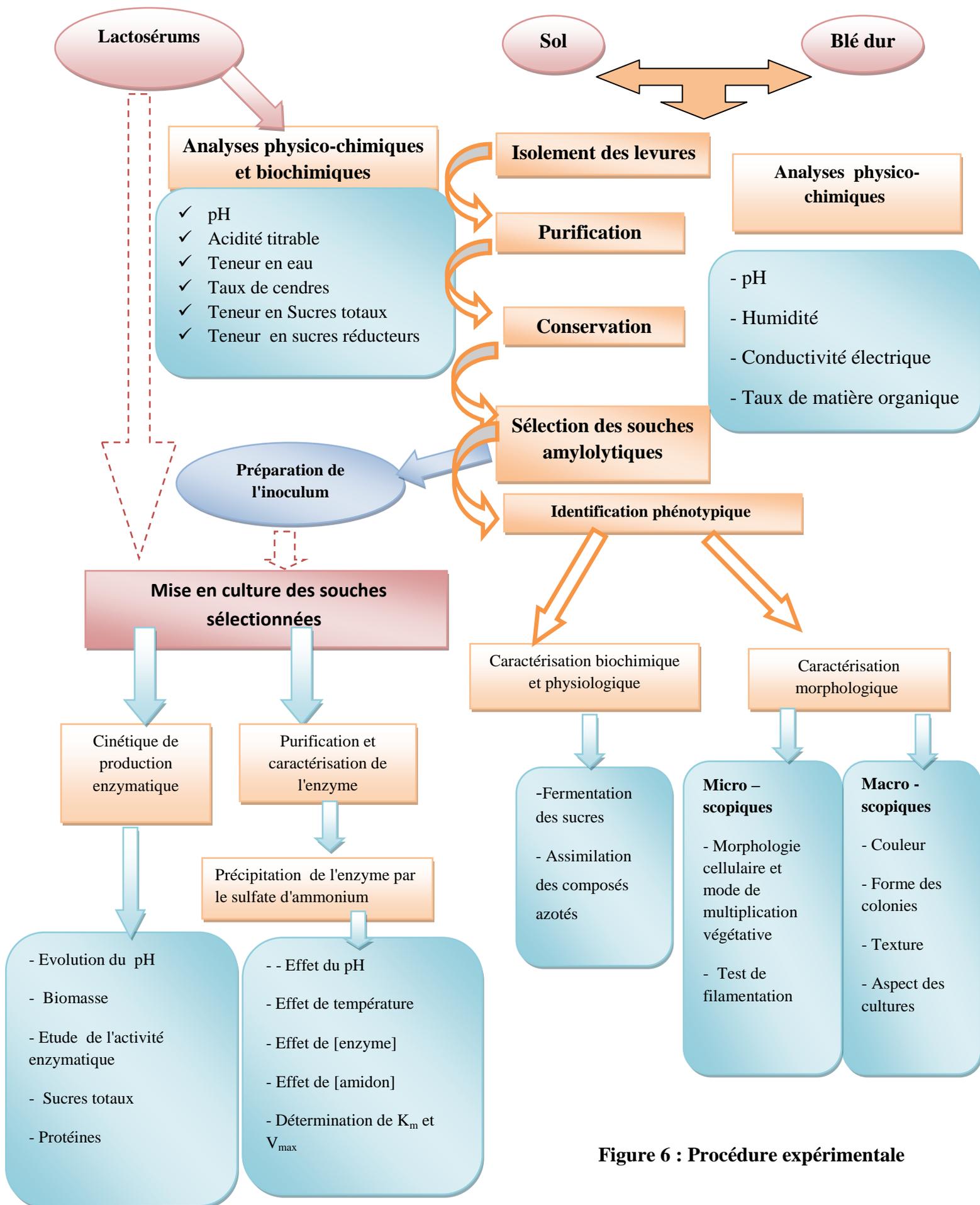


Figure 6 : Procédure expérimentale

2.2.1. Caractérisation physico-chimique des échantillons de sol

La région d'étude est caractérisée par un été chaud et un hiver sec. Les précipitations y sont très faibles et les températures y sont élevées et peuvent dépasser parfois 45°C à l'ombre. Ce qui conduit à une évaporation intense et une humidité relative plus importante en hiver qu'en été. Le sol à texture sableuse est riche en calcaire avec une salinité plus ou moins élevée (KHADRAOUI, 2006).

Après élimination de la couche superficielle, 100 g environ de sol sont prélevés et introduits dans un sachet en plastique stérile, puis transportés au laboratoire dans les conditions d'asepsie rigoureuses afin d'y être analysés (MERABTI, 2006).

Les analyses physico-chimiques et biochimiques du sol sont effectuées au niveau de l'Institut National de la Recherche Agronomique d'Algérie (I.N.R.A.A.) de Sidi Mahdi Touggourt, Ouargla.

2.2.1.1. Mesure du pH

Le pH d'une suspension du sol contenant 10 g du sol dans 90 ml d'eau distillée est déterminé à l'aide d'un pH mètre (DAVET et ROUXEL (1997)).

2.2.1.2. Humidité

La teneur en eau des échantillons fraîchement prélevés de sol est déterminée par différence entre le poids de l'échantillon humide et le poids de l'échantillon séché à 105 °C jusqu'à poids constant (MULTON, 1982).

L'humidité est mesurée par la formule:

$$\text{Humidité (\%)} = [(P1 - P2)/P3]100$$

- **P1:** Poids de l'échantillon humide contenu dans un bocal fermé ;
- **P2:** Poids de l'échantillon séché contenu dans un bocal fermé ;
- **P3:** Poids de la prise d'essai.

2.2.1.3. Conductivité électrique

Dix grammes de sol sont mélangés avec 50 ml d'eau distillée. Une agitation de 30 min suivie d'une décantation, puis une centrifugation (2000 de rpm) pendant 2 min a été effectuée. La conductivité est mesurée à l'aide d'un conductimètre (MATHIEU et PIELTAIN (2009)). Les résultats obtenus s'expriment en mS/cm.

2.2.1.4. Taux de matière organique

L'échantillon est calciné à 480 °C pendant 5 heures dans un four à moufle. La perte de masse par combustion correspond à la quantité de matière organique. Les résultats obtenus s'expriment en pourcentage (%) en 100 g du sol.

2.2.1.5. Teneur en azote

L'azote total est déterminé par la méthode de KJELDHAL dont le principe repose sur la minéralisation de l'échantillon par voie humide par l'acide sulfurique, puis une distillation et une titration avec de l'acide sulfurique 0.05 N (AUDIGIE *et al.*, 1984). Les résultats obtenus s'expriment en pourcentage (%) en 100 g du sol.

2.1.2. Caractéristiques physico-chimiques des échantillons de blé dur (*Triticum durum*)

Les échantillons de blé dur récoltés en 2014 au niveau de la région d'El-Oued, sont broyés au moyen d'un broyeur électrique, placés dans des sachets en plastiques hermétiques puis conservés au laboratoire à la température ambiante. Les analyses physico-chimiques sont réalisées au niveau de l'Institut National de la Recherche Agronomique Algérien (INRAA) de Sidi Mahdi Touggourt, wilaya d'Ouargla.

2.1.2.1. Teneur en eau

La teneur en eau est la perte de masse exprimée en pourcentage effectuée pendant 2h, dans une étuve réglée de 130 à 133 °C à la pression atmosphérique jusqu'à l'obtention d'un poids constant (AFNOR,1967). Les résultats obtenus s'expriment en pourcentage (%) en 100 g du blé.

2.1.2.2. Taux de cendres

Le taux de cendres est déterminé après calcination de l'échantillon à analyser dans un four à moufle à 900 °C ± 25 °C pendant 2 heures (AFNOR,1967). Les résultats obtenus s'expriment en pourcentage (%) en 100 g du blé.

2.1.2.3. pH

Le pH est déterminé par un pH mètre après étalonnage de l'appareil avec des solutions tampons (pH de 7 et 4). Dix grammes d'échantillon sont mis en présence de 100 ml d'eau déminéralisée ; après une agitation mécanique durant 5 minutes le pH est relevé (**DIXON et al., 1964**).

2.1.2.4. Teneur en sucres totaux

La teneur en sucres totaux est déterminée par la méthode de **DUBOIS et al (1956)** dont le principe repose sur l'action de l'acide sulfurique concentré, à chaud, sur les oses. Cette action conduit à la formation d'un hydroxy-méthylfurfural (HMF) dans le cas d'hexose et d'un furfural dans le cas d'un pentose suite à une tétradéshydratation suivie d'une cyclisation. Ces composés furfuraliques se condensent alors avec le phénol pour donner des complexes colorés (jaune-orangé) suffisamment stables pour être dosés par spectrophotométrie. La longueur d'onde utilisée est égale à 488 nm. Les résultats obtenus s'expriment en g/l.

2.1.2.5. Teneur en sucres réducteurs

La méthode classique de **BERTRAND** dont le principe consiste en l'action d'une solution cupro alcaline dans des conditions bien fixées, puis en la séparation de l'oxyde cuivreux et en son traitement par une liqueur sulfurique de sulfate ferrique (**ACOURENE et TAMA, 2001**). Les résultats obtenus s'expriment en g/l. Les résultats obtenus s'expriment en g/l.

2.1.2.6. Dosage des protéines

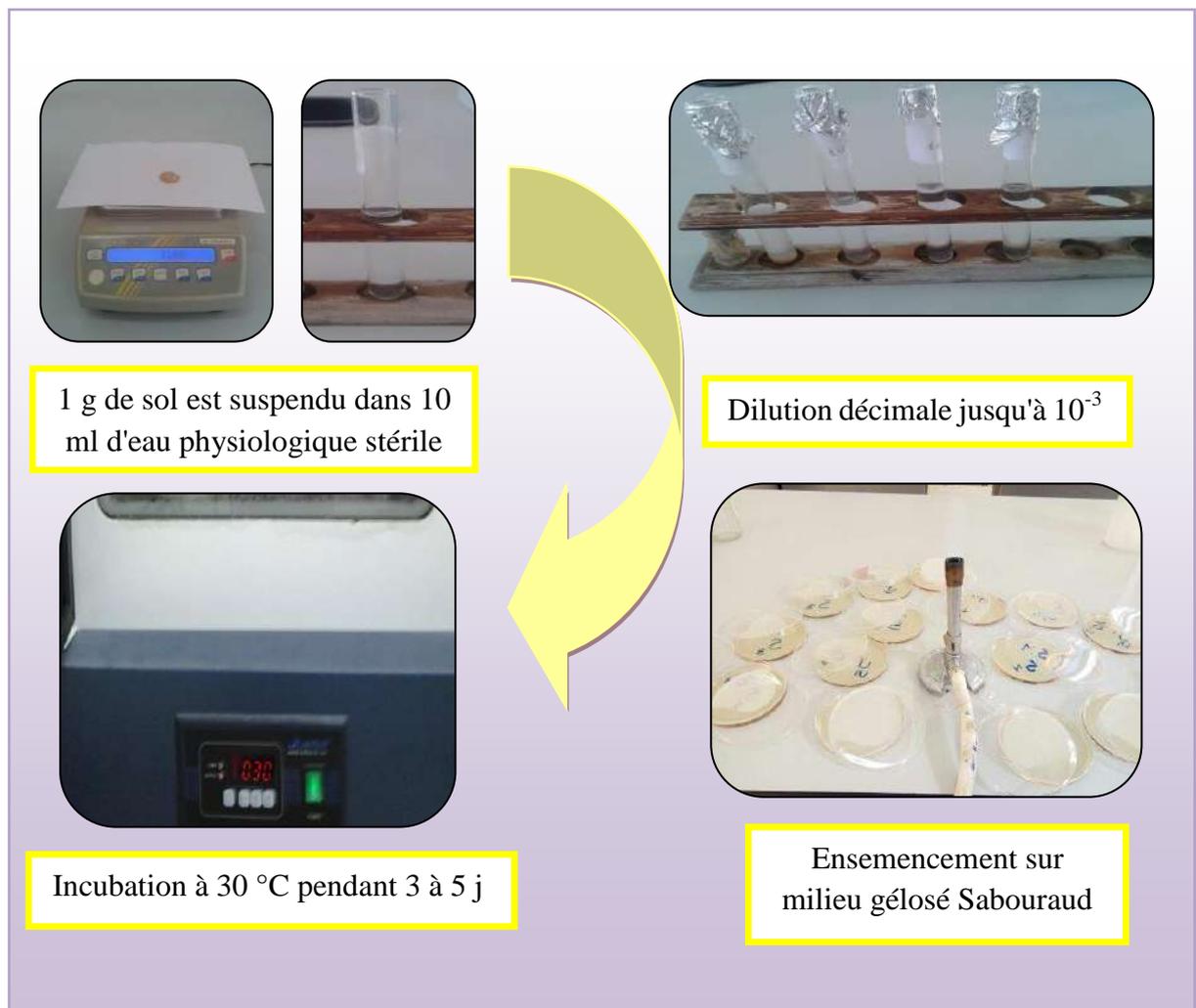
Le dosage des protéines est réalisé par la détermination de l'azote total selon méthode **KJELDHAL**, Le principe consiste en une minéralisation à chaud de la matière organique par l'acide sulfurique concentré en présence d'un catalyseur, une alcalinisation des produits de la réaction (sulfate d'ammonium) par la lessive de soude concentrée, une fixation de l'ammoniac entraîné par la vapeur par l'acide borique et une titration par l'acide sulfurique ; le coefficient de conversion de N en protéines est égale à 5,9 (**BENMOUAFFEKI, 2011**). Les résultats obtenus s'expriment en g/l.

2.1.3. Isolement des levures

Les souches levurières sont isolées à partir des sols sahariens et des grains de blé dur récoltés dans la région d'El-Oued.

2.1.3.1. Isolement à partir du sol

L'isolement des levures prélevées est réalisé sur milieu gélosé Sabouraud (ACHARYA *et al.*, 2014). Une solution mère est préparée avec 1 g de sol dans 10 ml d'eau physiologique stérile (ULACIO *et al.*, 1997). Une série de dilutions décimales est préparée jusqu'à 10^{-3} . Chaque dilution subit une homogénéisation par agitation. L'ensemencement est réalisé en surface, par étalement de 0.1 ml de suspension de sol en stries transversales. Les boîtes de Pétri sont incubées à 30 °C, pendant 3 à 5 jours (Photos 3) (HAMMER *et al.*, 1998).



Photos 3: Technique d'isolement des souches levurières

2.1.3.3. Purification des souches

En vue de l'obtention d'isolats purs permettant une pré-identification des souches, cinq repiquages successifs sont effectués (**fig.8**). Les colonies développées sont soumises à des observations macroscopiques (forme, couleur... etc.) et microscopiques. Des suspensions levurière sont alors réalisées par prélèvement d'une colonie et sa dissolution dans 1ml de l'eau physiologie. Ces suspensions de colonies sont repiquées sur milieu PDA et incubées à 30°C pendant 5 jours. Après l'incubation, d'autres examens macroscopique et microscopique des colonies (après la coloration simple au bleu de méthylène) sont faits. Les boîtes de pétri qui contiennent des moisissures (présence de mycelium) sont éliminées. Un deuxième repiquage est effectué sur milieu PDA à pH 5, additionné d'amidon soluble à 1%. Les isolats purs sont alors repiqués sur gélose PDA inclinée et incubés à 30°C pendant 5 jours pour une utilisation ultérieure.

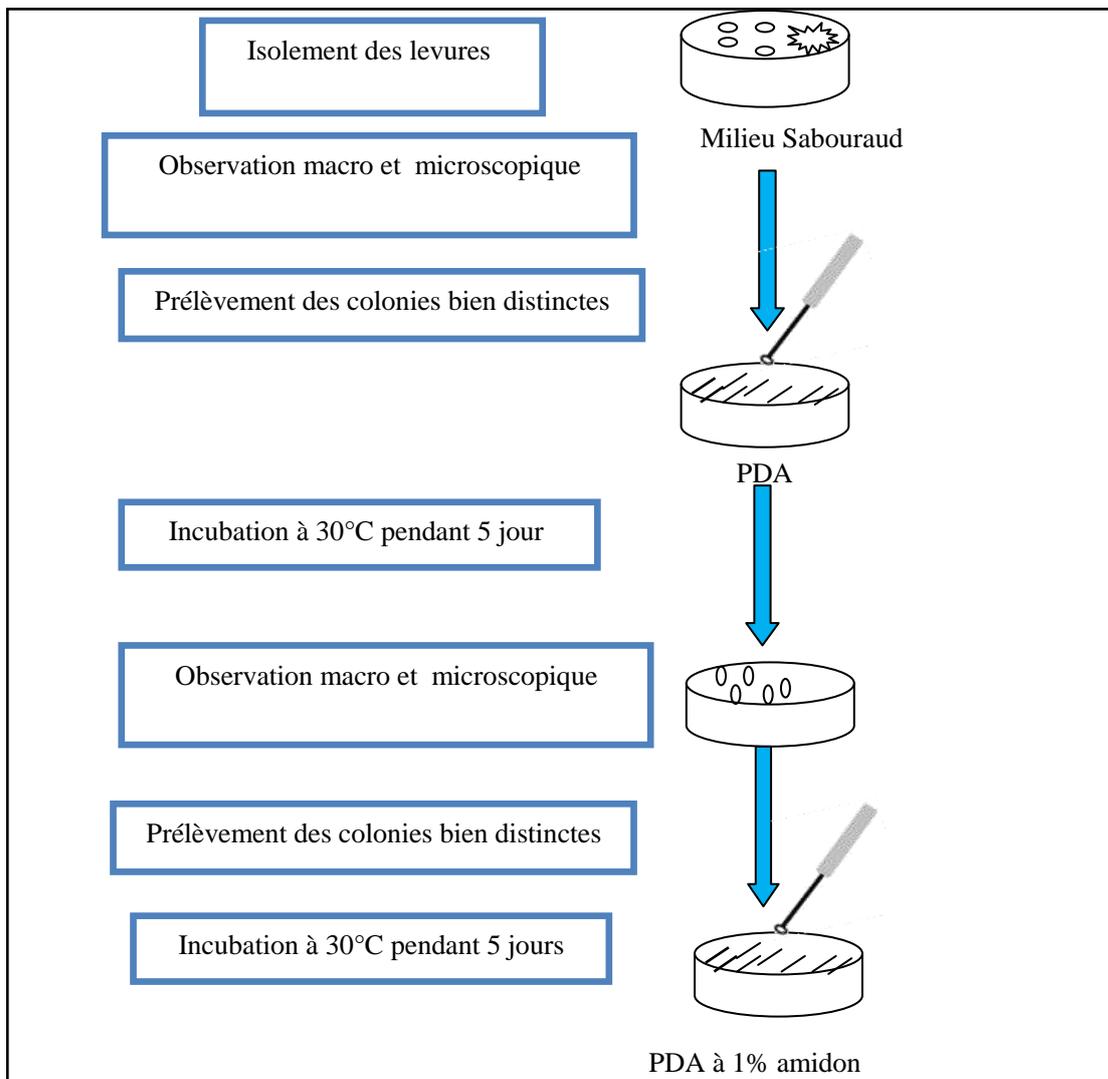


Figure 8: Purification des levures

2.1.3.4. Conservation des souches isolées et purifiées

Les jeunes colonies levurières sont aseptiquement ensemencées sur gélose Sabouraud inclinée, pendant 3 à 5 j pour permettre une croissance maximale. Ces cultures pures sont alors stockées à 4 °C pour favoriser leur viabilité et limiter les possibilités de mutations (HAQ *et al.*, 2002).

2.1.3.5. Criblage des souches amylolytiques

La recherche de souches amylolytiques est réalisée sur les souches précédemment isolées, selon la méthode décrite par TATSINKOU *et al.*, (2005). La sélection est effectuée sur milieu PDA à pH 5, additionné d'amidon soluble à 1%. Les boîtes sont incubées à 30°C pendant 5 jours. Après incubation, une solution de lugol (I₂ dans IK) est vaporisée à la surface de la boîte, afin de mettre en évidence l'activité amyliasique. Les souches présentant un halo clair sur le pourtour, sont considérées comme productrices d'amylases. Le diamètre des zones de la lyse, est pris en considération pour la sélection de la souche amylolytiques la plus performante.

2.1.3.6. Pré-identification

L'identification est effectuée sur les souches de levures précédemment isolées et considérées à activité amylolytique performante. Elle consiste en une identification phénotypique des souches sélectionnées (BARNETT, 2000).

Ces souches sont repiquées à partir de culture pure, conservée à 4 °C sur milieu solide Sabouraud et incubée à 30 °C pendant 03 à 05 j. L'identification phénotypique des isolats est basée sur les critères morphologiques (microscopiques), culturels (macroscopiques) et biochimiques.

a/ Etude des caractères morphologiques

a₁/ Caractères macroscopiques

Il s'agit d'une description des caractères suivants :

- la couleur ; la forme des colonies (contour régulier ou irrégulier, convexes ou concaves) ;
- la texture ;
- l'aspect des cultures (brillant ou mate).

a₂/Caractères microscopiques

Des observations à l'état frais et après coloration simple par le bleu de méthylène, sont réalisées au microscope optique (gros *X100*). Nous avons donc procédé à la détermination de

- la morphologie cellulaire et le mode de multiplication végétative : la forme, la taille, l'arrangement et le mode de division des cellules ... etc. ;
- l'aptitude à la filamentation (**Test de filamentation**). Celle-ci est observée à partir d'une culture sur lame microscopique (gros *X100*). Pour cela, le milieu PDA est déposé à la pipette sur une lame préalablement stérile dans une boîte de Pétri. Quand le milieu est solidifié, la levure à examiner estensemencée en une strie longitudinale. La lame est incubée dans la boîte de Pétri contenant un peu d'eau stérile pour éviter la dessiccation du milieu. L'observation microscopique se fait après 3 à 5 j. La bordure de la culture est examinée, si la levure est filamenteuse, la nature de mycélium (pseudomycélium ou vrai mycélium), son abondance, sa ramification sont notées (**DAKHMOCHE-DJEKRIF, 2016**).

b/ Etude des caractères biochimiques et physiologiques

Il s'agit de l'étude de la fermentation des sucres et celle de l'assimilation des composés azotés.

b₁/ Fermentation des sucres

Les tests de fermentation sont effectués avec des sucres très purs à des concentrations de 30 %. Les sucres testés sont : le D-glucose, le maltose, le D-fructose, le saccharose et le D-galactose. Un tube témoin, sans sucre constitue un contrôle négatif.

La solution de base utilisée pour la fermentation des sucres est le milieu eau de levure . Le milieu est réparti dans des tubes à essai, à raison de 9 ml par tube. Ces derniers sontensemencés avec 3 gouttes de la suspension levurière. Quelques gouttes de paraffine molle fondue et stérile qui, en refroidissant forme un bouchon est ajoutée à la surface de chaque tube. Les cultures sont incubées à 25 à 28 °C, pendant 48 h à 3 semaines. Le test d'un résultat positif se manifeste par le soulèvement plus ou moins important du bouchon de paraffine, suivant le pouvoir fermentaire de la souche étudiée (**WICKERHAM, 1951**). Les résultats obtenus s'expriment en g/l.

b₂/ Assimilation des composés azotés

L'assimilation des composés azotés s'étudie par la méthode de l'auxanogramme. L'assimilation des nitrates comme seule source d'azote est un critère taxonomique très important, beaucoup de microorganismes sont incapables de les assimiler (**BARNETT et al., 2000**).

La source d'azote testée est le nitrate de potassium. Un témoin, est effectué avec du sulfate d'ammonium. Une suspension de 1 ml de la levure à tester est introduite en masse dans une boîte de pétri avec le milieu de base YCB (**DAKHMOUCHE-DJEKRIF, 2016**).

Lorsque le milieu a pris masse, les sources d'azote sont déposées à la surface. Après 3 j d'incubation à 28 °C, on observe la croissance de la levure autour du composé azoté dans le cas d'une assimilation des composés azotés. Les résultats obtenus s'expriment en g/l.

2.1.4. Lactosérum

De par sa composition biochimique, ce sous-produit des laiteries est utilisé dans le domaine de la biotechnologie. Il possède d'intéressantes propriétés lui conférant des aptitudes à une utilisation comme milieu de fermentation, pour de nombreux microorganismes assimilateurs de lactose comme source de carbone et d'énergie (**GANNA et TOUZI, 2001**).

2.1.4.1. Choix du lactosérum

Les échantillons du lactosérum, caprin, bovin et camelin ayant fait l'objet de la présente étude, sont soumis à des analyses physico-chimiques permettant leur caractérisation.

a/Caractérisation physico-chimique et biochimique

La détermination des caractéristiques physico-chimiques et biochimiques du lactosérum fraîchement collecté sert à vérifier sa conformité par rapport aux normes réglementaires d'utilisation.

a₁/ Mesure du pH

La mesure du pH permet d'estimer le niveau de biomasse microbienne. Un développement microbien entraîne fréquemment une variation du pH du milieu qui est liée à une production d'acides ou de produits alcalins, ou aux échanges ioniques (**GUIRAUD, 1998**).

Le pH est déterminé à l'aide d'un pH-mètre. Le principe repose sur la mesure directe du pH à l'aide d'électrode, préalablement étalonné dans un bécher contenant 100 ml de lactosérum à 25°C, plongée dans le liquide, la valeur est lue directement (**GUIRAUD, 1998**).

a₂/ Détermination de l'acidité titrable

La mesure de l'acidité titrable du lactosérum est réalisée selon la méthode décrite par **AFNOR(1980)**.

Il s'agit de l'acidité dosée par une solution de NaOH (N/9) en présence de phénolphtaléine comme indicateur coloré. L'acidité proviendrait de la fermentation du lactose du lactosérum par les microorganismes.

a₃/ Densité

La densité nous renseigne sur le taux des matières solides et sur la viscosité de la solution. La viscosité dépend des constituants du produit. Elle varie avec le taux butyreux et la teneur en matière sèche dégraissée (**MATHIEU, 2009**).

Elle est déterminée à l'aide d'un thermolactodensimètre sur le lactosérum maintenu au repos (Annexe 1.3). La méthode consiste à plonger un thermolactodensimètre dans une éprouvette de 250 ml, remplie de l'échantillon à analyser ; lorsqu'il se stabilise, une lecture directe donne le résultat(**GUIRAUD, 1998**). Les résultats obtenus s'expriment en g/l.

a₄/ Taux de matière sèche

L'ensemble des composants du lactosérum, à l'exception de l'eau et des gaz dissous, constitue la matière sèche totale (**MATHIEU, 2009**). Le principe repose sur la dessiccation de 500 mg de lactosérum à 103C^o pendant 3 h. Les résultat est exprimé en g/l.

a₅/ Teneur en cendres

Le taux de cendres est déterminé après incinération de la matière sèche obtenue à une température de 530C^o durant 3 h. Le résultat obtenu correspond à la teneur en cendres exprimé en g/l **GUIRAUD, 1998**). Les résultats obtenus s'expriment en g/l.

a₆/ Teneur en matière grasse

La teneur en matière grasse est déterminée par la méthode de Gerber **GUIRAUD, 1998**). Son principe est basé sur la dissolution des protéines par l'addition de 10 ml d'acide sulfurique à 11ml de lactosérum qui est introduit dans un butyromètre. La matière grasse du

lactosérum est séparée après une centrifugation de 3000 tours/mn pendant 5 minutes à l'aide de 1ml d'alcool iso-amylque. La lecture se fait d'une manière directe sur l'échelle de butyromètre. Les résultats obtenus s'expriment en g/l.

Expression des résultats :

Teneur en matière grasse (g/l) = B - A

D'où : A : la lecture faite à l'extrémité inférieure de la colonne.

B : la lecture faite à l'extrémité supérieure de la colonne. Le résultats obtenus s'expriment en g/l.

a₇/ Teneur en protéines

La teneur en protéines (protéines totales, protéines sériques et caséines) est déterminée par la méthode de LOWRY, son principe repose sur le développement d'une coloration bleue foncée suite à l'addition à la solution protéique d'un sel de cuivre en milieu alcalin, puis du réactif de Folin-Ciocalteu. La coloration résulte de la réaction du cuivre avec les liaisons peptidiques et la réduction de l'acide phospho-tungstomolybdique par la tyrosine, le tryptophane et la cystéine.

Les espèces réduites absorbent la lumière à 750 nm, la concentration en protéines de l'échantillon analysé est déterminée en se référant à une courbe d'étalonnage établie en employant de l'albumine sérique (BSA) (AUDIGIE et al, 1984). Le résultats obtenus s'expriment en g/l.

a₈/ Teneur en lactose

Le dosage du lactose s'effectue selon la méthode de BERTRAND (1988) (AUDIGIE et al, 1984). C'est un dosage d'oxydoréduction par manganimétrie. Le lactose, sucre réducteur du lactosérum, car il contient une fonction pseudo aldéhydrique libre.

La détermination de la teneur moyenne en lactose est réalisée sur le filtrat, après défection au ferrocyanure de zinc ; une solution cupro-alcaline est réduite à chaud par le filtrat obtenu. Le précipité d'oxyde cuivreux formé est oxydé par une solution de sulfate ferrique et le sulfate ferreux formé est dosé par manganimétrie en présence d'orthophénantroline ferreuse comme Indicateur. Le résultats obtenus s'expriment en g/l.

2.1.4.2. Préparation du milieu de base

Le milieu de culture des souches d'intérêt sélectionnées est à base de lactosérum déprotéiné par précipitation des protéines obtenue par ajustement du pH à 4.6 suivie d'un

traitement thermique à 100°C pendant 2 h dans un bain-marie , puis d'une décantation , d'une filtration et enfin d'une centrifugation du filtrat à 3000 rpm/min pendant 15 min.

2.1.4.3. Préparation du milieu de culture des levures amylolytiques sélectionnées

Le milieu précédemment décrit est enrichi par addition d'extrait de levure (4 g/l), et de Fer d'ammonium sulfate hexahydrate ($\text{FeN}_2\text{O}_{14}\text{S}_2$) (4 g/l). Il est ensuite additionné d'amidon à 1% (substrat inducteur). Le pH est ensuite ajusté à 5 par addition de NaOH. Une stérilisation à l'autoclave (121°C pendant 15min) est effectuée avant sa conservation à 4°C.

2.1.4.4. Préparation de l'inoculum et ensemencement

Les souches de levure conservées à 4 °C, sont repiquées sur milieu Sabouraud, puis mises à incuber à 30 °C pendant 72 h. Une suspension des souches dans de l'eau physiologique est ensuite préparée à raison de 10^3 colonies dans 1 ml d'eau.

Cinquante millilitre (50ml) de chaque milieu de culture sont ensemencés par 1ml de suspension levurière. Les flacons hermétiquement fermés sont incubés à 30° C pendant 5Jours. Des prélèvements quotidiens sont effectués pour les dosages. Tous les essais sont effectués en trois répétitions (**Fig. 09**).

2.1.4.5. Dénombrement des levures

Le nombre des levures est établi par comptage des cellules contenues dans 1ml de suspension levurière à l'aide d'une cellule de Malassez (gros X 100).

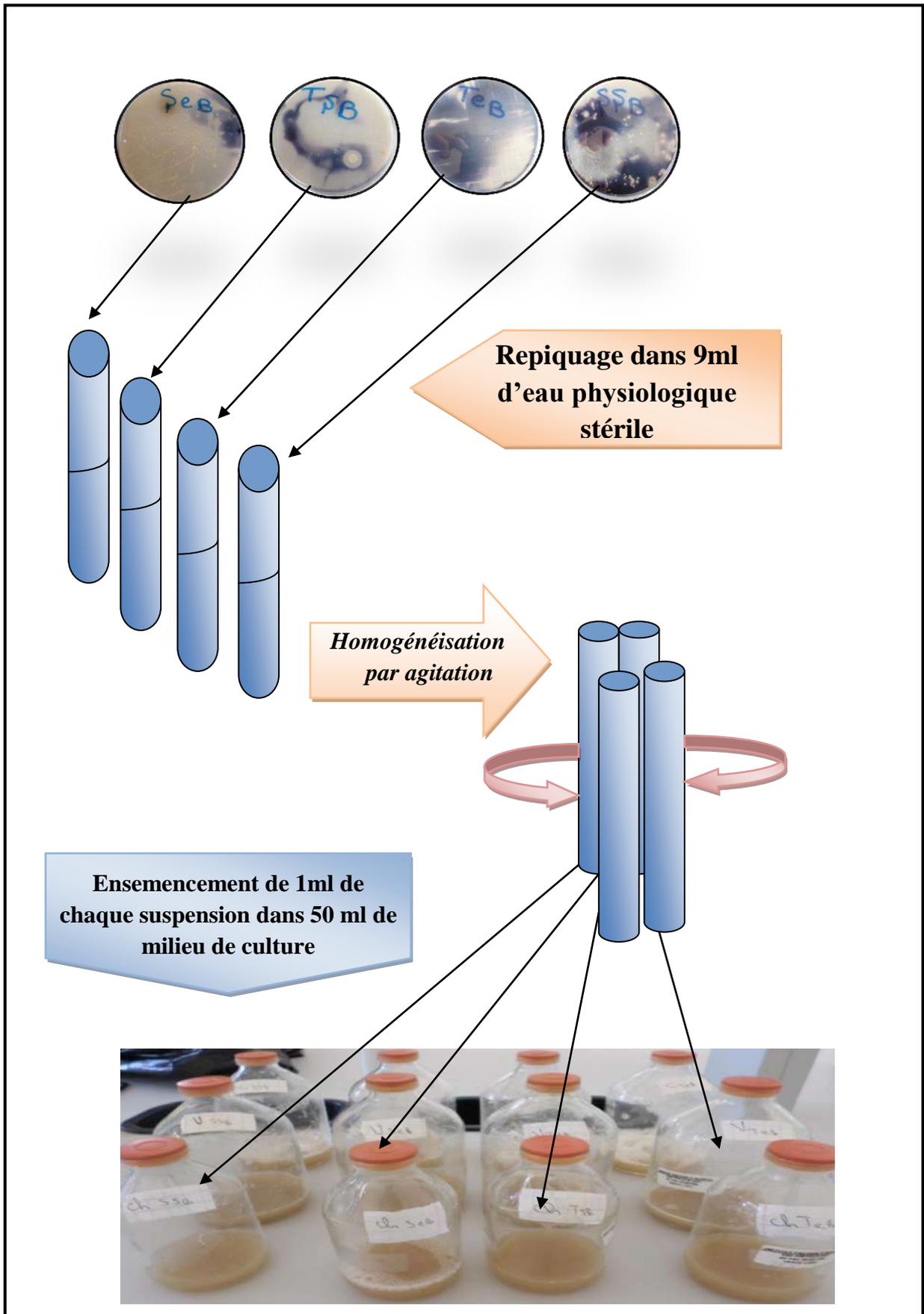


Figure 9: Préparation de l'inoculum

2.1.4.6. Mesure des paramètres influençant la cinétique enzymatique

Des prélèvements sont effectués régulièrement toutes les 24 h, pour la détermination :

- du pH;
- des sucres totaux ;
- des protéines ;
- de la biomasse produite;
- de l'activité amylasique pour les souches cultivées.

a/Mesure du pH

Le pH de l'extrait enzymatique est mesuré à l'aide d'un pH-mètre (PHM210. Meterlab).

b/ Dosage des sucres totaux

A 1 ml d'extrait enzymatique, on ajoute 10 ml d'eau distillée puis 1 ml de phénol à 5 % et 5 ml d'acide sulfurique concentré. Après agitation du tube, on laisse refroidir à obscurité pendant 30 min. à la température ambiante.

L'apparition du complexe jaune- orange permet de mesurer la densité optique à 490 nm dont la valeur est proportionnelle à la teneur en sucres. Ce dernier est calculé par référence à une courbe d'étalonnage préalablement établie avec une solution mère de glucose à 100 µg/ml (**DUBOIS et al., 1956**).

c/ Dosage des protéines

Les protéines sont dosées par la méthode de **BRADFORD (1976)**, où le bleu de coomassie forme avec les protéines un complexe coloré présentant un maximum d'absorption à 595 nm. La coloration très sensible peut être effectuée très rapidement et reste stable pendant 30 min. Le sérum albumine bovine (SAB) est utilisé comme standard.

d/ Mesure de la biomasse

Le poids sec de biomasse produite est déterminé toutes les 24 h jusqu'à la fin de la fermentation. Après centrifugation à 3000 trs/min. pendant 15 min et rinçage du culot avec de l'eau distillée, la biomasse est séchée dans une étuve réglée à 105 °C jusqu'à poids constant (**MAHNAAZ et al., 2010**). Les résultats obtenus s'expriment en g/l.

e/ Dosage de l'activité α -amylasique

L'activité α -amylasique est la quantités d'enzymes qui transforme une μ Moles de maltoses par minute dans les conditions de pH et de température. . elle est est mesurée selon la méthode de **BERNFELD (1955)**, dont le principe est basé sur la mesure du pouvoir réducteur lors de l'hydrolyse de l'amidon.

A 1 ml de l'extrait enzymatique tamponnée à pH 7 avec du tampon phosphate 0.1 M, on ajoute 1 ml de substrat (solution d'amidon 2g/l). Le mélange est incubé à 50 °C pendant 30 min. La réaction est arrêtée par addition de 0,5 ml HCl 1 N suivie de 2,5 ml du réactif de l'iode. L'absorbance est lue à 580 nm contre le blanc préparé à partir de l'extrait enzymatique dénaturé à 100 °C (**SACI, 2012**). Le résultats obtenus s'expriment en UI.

2.1.5. Optimisation des conditions de production de l' α -amylase

Après la sélection des souches les plus performantes en matière de production enzymatique et la détermination du milieu de culture à base du lactosérum optimal , et dans le but d'optimiser les conditions de culture des levures et de la production de l' α -amylase, nous avons procédé à la modification de certains paramètres physico- chimiques du milieu de culture.

2.1.5.1. Essai d'optimisation du pH du milieu de culture

Le pH est un paramètre à prendre en considération pour optimiser la production d' α -amylase par les levures. Dans ce but précis, nous avons fait varier le pH de 3 à 7 (pH4, pH5, pH6 et pH7).

2.1.5.2. Essai d'optimisation de la température d'incubation

La croissance des levures et la production d'enzyme sont conditionnées par la température d'incubation. A cet effet, des températures d'incubations égales à 30°C, 40°C, 50°C, 60°C et 70°C ont été testées afin de déterminer celle qui convient le mieux.

2.1.5.3. Essai d'optimisation de la concentration initiale en substrat

Les levures ont besoin d'une source de carbone qu'elles tirent de l'amidon. Dans le but de rechercher la concentration optimale de ce substrat, nous avons essayé des concentrations en amidon égales à 1%, 2%, 3%, 4% et 5%) pour supplémenter le milieu de culture.

2.1.5.4. Essai d'optimisation de la concentration en extrait de levures

L'extrait de levure représente une source importante de facteurs de croissance et de vitamines. Afin de déterminer la concentration d'extrait de levure optimale pour la production α amylasique, différentes concentrations ont été ajoutées au milieu de fermentation à savoir 0%, 1%, 2%, 3%, 4%.

2.1.5.5. Essai d'optimisation de la concentration en inoculum

Afin d'explorer l'influence de la quantité d'inoculum sur la production des amylases; des concentrations d'inoculum de 0,5, 1, 1,5 et 2% sont testées. Les culturesensemencées avec les différentes concentrations de l'inoculum sont incubées à une température de 30°C durant cinq jours.

Pour une meilleure interprétation des résultats et pour comparer les résultats relatifs à l'évolution des levures, ainsi que celle de la production des amylases en fonction des paramètres du milieu de fermentation, nous avons utilisé un traitement statistique (**XLSTAT**), faisant appel au test de *Kruskal-Wallis*, une méthode descriptive multidimensionnelle (**DUBEY et al., 2000**).

2.1.6. Purification partielle de l' α -amylase et étude de ses propriétés physico-chimiques

Cette opération est effectuée dans le but de concentrer et de purifier partiellement l'extrait brut. A la suite de cette étape, nous avons procédé à une caractérisation physico-chimique de cette substance d'intérêt industriel.

Nous avons utilisé la précipitation au sulfate d'ammonium, une méthode préconisée par de nombreux auteurs.

a / Préparation de l'extrait brut

Après une durée d'incubation de 4 jours, à 30 °C, nous avons effectué une centrifugation à 5000 trs /min. à 4 °C, pendant 20 min. Le surnageant constitue l'extrait enzymatique brut (**SIDKEY et al., 2011**). Un échantillon de ce dernier est soumis à un dosage quantitatif des protéines et à une analyse de l'activité amylasique.

b/ Précipitation au sulfate d'ammonium

L'addition de sulfate d'ammonium à une solution protéique aqueuse entraîne une diminution de la constante diélectrique, donc de la stabilité des protéines, ce qui conduit à leur précipitation (OSTERLUND et JANSON, 1997).

L'extrait enzymatique brut est précipité par le sulfate d'ammonium. L'échantillon est saturé, par un gradient variant de 30 % à 80 % (DIXON et WEBB, 1964). La précipitation est effectuée dans un bain de glace, sous agitation continue, afin d'éviter la dénaturation de l'enzyme. Les protéines précipitées, sont récupérées par centrifugation pendant 15 min. à 5000 trs/min. à 4 °C. Les fractions sont suspendues dans du tampon phosphate 0.2 M pH= 6 (EL SAFEY et AMMAR, 2004).

L'activité spécifique de l'enzyme est estimée dans toutes les fractions collectées (DESMAZEAU et HERMIER, 1968). Elle est exprimée par la formule suivante :

$$\text{Activité spécifique} = \frac{\text{Activité amylasique}}{\text{Concentration en protéines totales (mg/ml)}}$$

c/ Caractérisation physico-chimique de l' α -amylase partiellement purifiée

c₁/ Détermination du pH optimal d'activité

Le pH optimal est estimé dans l'intervalle de 3 à 9 en utilisant les tampons suivants :

- Tampon acétate de sodium 0.2 M ou citrate-phosphate 0.1 M (pH 3 à pH 5.5);
- Tampon phosphate de sodium 0.1 M (pH 6 à pH 7.5);
- Tampon Tris-HCl 0.1 M (pH 8 à pH 9).

L'activité enzymatique est mesurée pour chaque tampon (EMENIKE, 2015).

c₂ / Détermination de la température optimale d'activité

L'effet de la température est étudié dans l'intervalle de 0 °C à 80 °C en mesurant l'activité enzymatique au pH optimal précédemment déterminé (ARPANA et al., 2013).

c₃/ Détermination de la concentration optimale d'enzyme

Une série des dilutions d'enzyme partiellement purifiée sont effectuées: 0.0012, 0.002, 0.005, 0.007, 0.01 et 0.012 (mg protéine/ml), l'activité enzymatique est alors mesurée aux valeurs de pH et température optimales préalablement déterminées (**PADMINI et al., 2012**).

c₄/ Détermination de la concentration optimale de substrat.

L'enzyme partiellement purifiée est incubée avec différentes concentrations de solution d'amidon (0.1 ; 0.5 ; 1.0 ; 1.5 ; 2.0 ; 2.5 ; 3.0 ; 3.5 et 4.0 mg/ml). Les vitesses initiales sont déterminées dans les conditions habituelles par le dosage de l'activité enzymatique (**EL GENDY, 2012**).

c₅/Détermination des constantes cinétiques d'enzyme (K_m et V_{max})

Les paramètres cinétiques (K_m et V_{max}) de l' α -amylase purifiée sont déterminés graphiquement par la représentation de **Lineweaver-Burk (1934)**. L'amidon soluble avec différentes concentrations (0.1 à 4.0 mg/ml) est utilisé comme substrat naturel de l'enzyme purifiée (**EMENIKE, 2015**).

Résultats et
Discussion

PARTIE III: Résultats et discussion

Avant d'entreprendre l'isolement, la pré-identification et la sélection des levures productrices d' α amylase isolées à partir des échantillons de sol des deux lacs, nous avons procédé à une caractérisation physico-chimique de ces derniers.

3.1. Caractérisation physico-chimique des échantillons de sol

La caractérisation physico-chimique des échantillons de sol des deux Lacs " Ayata" et "Chott" source d'isolement des souches de levures, est présentée dans le tableau IX.

Tableau IX: Caractérisation physico-chimique du sol des deux lacs

Paramètres	Lac "Ayata"	Lac" Chott"
pH	8.11± 0.1	8.03± 0.3
Conductivité électrique (mS/cm)	5.58± 1.4	2.79± 0.9
Humidité (%)	3.84± 0.8	3.27± 0.4
Teneur en azote (%)	0.03± 0.04	0.01± 0.005
Teneur en cendres (%)	98.93±0.04	89.97± 0.06
Teneur en matière organique (%)	0.82± 0.002	0.05± 0.007

Les résultats semblent indiquer que les échantillons de sol des deux provenances présentent des caractéristiques physico-chimiques assez comparables avec un pH tendant vers l'alcalinité (pH = 8) et une teneur en cendres assez élevée (supérieure à 90%).

Ces résultats s'éloignent ceux obtenus par **DENDOUGA (2006)** pour le sol de la Sebkhia d'El-Mghair (pH= 6.89) et ceux obtenus par **MERABTI (2006)** pour celui de la palmeraie de M'gheiar (El-Oued) (pH= 6.78). Ils se rapprochent cependant, de ceux rapportés

par **BOUCHERIT (2011)** ; **KHERRAZ et LOBRI (2015)** et **MASSAOUDI et BEKKARI (2016)** (pH 7.71- 8.11).

La légère alcalinité des sols est probablement due à la présence de gypse. Selon **BENMOUAFKEKI (2011)** et **HAMMIA (2012)**, le pH du sol serait influencé par la nature des sels ; alors que certains sels sont acidifiants (CaSO_4 , KCl , MgSO_4) d'autres sont alcalinisants (NaHCO_3 , CaCO_3 et Na_2CO_3).

Selon **ALLEN et AHEARN (1987)**, le pH neutre tendant légèrement vers l'alcalinité favorise une reproduction rapide des populations bactériennes au détriment de celle des levures, dont la croissance est optimale à des pH acides.

La conductivité électrique et le taux élevé de cendres nous donnent un aperçu sur la salinité des échantillons prélevés, Nous remarquons que la conductivité enregistrée au niveau du Lac "Ayata" est supérieure à celle enregistrée au niveau du Lac "Chott (5.58 mS/cm versus 2.79 mS/cm).

Selon **RICHARDS (1969)**, on peut définir le type de sol en fonction de sa conductivité comme l'indique le tableau X. La conductivité électrique du sol étant située dans la fourchette 2.4 et 6 mS/cm, ce sol peut être considéré comme très salé.

Tableau X: Types de sol en fonction de la conductivité électrique (RICHARDS, 1969).

Type de sol	Non salé	Peu salé	Salé	Très salé	Extrêmement salé
Conductivité (mS/cm)	<0.6	0.6 - 1.2	1.2 - 2.4	2.4 - 6	> 6

Les résultats enregistrés montrent que les deux sols sont pauvres en matière organique mais relativement riches en sels minéraux soit 98,93% et 89,97%, respectivement pour l'échantillon de sol du lac "Ayata" et celui du lac "Chott". L'action conjuguée d'un climat caractérisé par une évaporation intense et la présence d'une nappe peu profonde fait que la plupart des sols ont subi le phénomène de salinisation secondaire (**RICHARDS, 1969**). Ceci est probablement dû à la végétation au niveau du site.

L'humidité du sol semble relativement faible soit 3,84% et 3,27% respectivement pour celui du lac "Ayata" et celui du lac "Chott". Le faible taux d'azote (0,03 et 0,01% respectivement) montre que les deux sols sont très pauvres en azote.

De ce qui précède, nous pouvons caractériser le sol des deux lacs ; de " sol sec et salé à pH légèrement alcalin, riches en sels minéraux et très pauvres en azote. Le sol étudié caractérisé par une faible végétation à l'exception de certaines plantes halophile, représente donc un biotope extrême, susceptible de limiter le développement des microorganismes y compris celui des levures.

3.2. Caractérisation physico-chimique de la farine de blé dur (*Triticum durum*)

La wilaya d'El Oued a connu récemment un développement substantiel du secteur agricole. Ce développement est le résultat de l'introduction de nouvelles espèces végétales, le blé en l'occurrence. Cette poaceae est un milieu propice pour le développement de nouvelles espèces microbiennes, notamment les champignons, lors du stockage des grains.

Pour ces raisons, des analyses physico-chimiques du blé dur utilisé comme source d'isolement des levures ont été effectuées. Les résultats de ces analyses sont représentés dans le tableau **XI**.

Tableau XI: Caractérisation physico-chimique et biochimiques du blé dur (*Triticum durum*).

Teneur en eau (%)	10.1± 1.9
Teneur en cendres(%)	2.9± 0.7
pH	6.91± 1.02
Teneur en protéines (%) MS	9.97± 0.05
Teneur en sucres totaux(%) MS	29.9± 1.2
Teneur en sucres réducteurs(%) MS	18.38± 0.9

D'après ces résultats, l'humidité du blé dur est de l'ordre de 10.1 %. Cette valeur est proche à celle citée par **DOUKANI *et al* (2013)** et **ZOUAOUI (2012)** qui est de 10.73 % et 10.45.

La variation de teneur en eau peut être due à l'espèce, au stade de maturation, aux conditions pédo- climatiques et à la répartition géographique (**MOKHATARI, 2013**).

La quantité d'eau libre disponible dans l'échantillon, en relation avec l'humidité relative de l'air ambiant (activité de l'eau : aw), est responsable de plusieurs phénomènes d'altération biologique de l'aliment notamment d'ordre mycologique. La teneur en eau du blé ayant fait l'objet de la présente étude est de nature à classer nos échantillons dans la catégorie des produits peu hydratés. Cet avantage n'exclut quand même pas les possibilités de contamination par une flore fongique xérotolérante prépondérante. En effet, de nombreux produits ne contenant pas beaucoup d'eau et donc non altérables par les bactéries sont altérés par les champignons (**DURON, 1999**). Certaines espèces fongiques adoptent des structures de survie qui les protègent allant de simples cellules produites par reproduction asexuée à la formation de la «spores». Elles sont ainsi capables de survivre dans des conditions extrêmes, sur les feuilles, les semences ou encore dans le sol (**BAHOUS et al., 2008**).

L'échantillon de blé dur analysé, affiche un taux de cendres égale à 2 %. Cette valeur se situe dans l'intervalle (1.5-2.5 %) cité par **DOUKANI et al., (2013)** et est sensiblement plus élevée que celle citée par **MOKHATARI (2013)** qui est de 1.42 %. Cette valeur plus élevée comparativement à celle se rapportant à d'autres poacées " comme le riz (0.51%) et l'orge (1.93%), montre la richesse relative du blé dur en éléments minéraux favorisant le développement de la flore fongique (**BENAHMED, 2012**).

Le pH du blé dur utilisé dans cette étude égale à 6.91, est légèrement acide virant vers la neutralité. Ce résultat est similaire à celui trouvé par **DOUKANI et al., (2013)** qui est proche de la neutralité (pH 6.5) et plus élevé que celui cité par **MOKHATARI (2013)** (pH 5.21). Selon **DURON (1999)**, les champignons peuvent se développer à des pH compris entre 3 et 8 avec un optimum de croissance compris entre 5 et 6, de ce fait, nos échantillons constituent un milieu favorable pour le développement des champignons.

La teneur en protéines de l'échantillon de blé dur est de l'ordre de 9.97 % en MS. Cette valeur est inférieure que celle citée par **DOUKANI et al., (2013)** et **BARKOUTI (2012)** qui est de 17.17 % et 12.4% respectivement. La teneur de protéines du blé est influencée par de nombreux facteurs. Les plus importants sont: la variété, la fertilisation azotée, le climat, la durée et le type de stockage ...etc.(**MOKHATARI, 2013**).

Le taux de sucres totaux est égal à 29.9%. Cette valeur est par rapport aux résultats rapportés par **DOUKANI et al., (2013)** soit 71.12 %. En revanche, la teneur en sucres

réducteurs de l'ordre de 8.38% est supérieure à celle citée par **DOUKANI et al., (2013)** qui est de 1.11%.

D'après ces résultats, l'échantillon de blé dur ayant fait l'objet de ces travaux, comporte des quantités suffisantes de sucres, de protéines et de sels minéraux, susceptibles d'en faire un support idéal pour le développement et la survie des levures.

3.3. Isolement des souches de levures

L'isolement des souches levurières est effectué à partir de deux supports : sol saharien et grains de Blé dur prélevé dans la région d'El-Oued. L'étalement, réalisé sur milieu gélosé Sabouraud a permis d'isoler 40 souches. Leur répartition selon l'origine du prélèvement est indiquée dans le tableau XII.

Tableau XII: Nombre de souches isolées et leur répartition en fonction du milieu de prélèvement

Milieu de prélèvement	Lac Ayata	Lac El Chott	Blé dur (T. durum)
Nombre de souches	11(S1 à S11)	06(S12 à S17)	23(S18 à S40)

Nous remarquons que la plupart des souches sont isolées à partir du blé dur (23 souches). Ceci est probablement dû à la composition biochimique de cette poacée, favorisant le développement de ces microorganismes.

Dans l'ensemble, le taux de contamination élevé, ainsi que la biodiversité assez importante constatée dans le cas du blé peuvent être expliqués probablement par la qualité, la durée et les conditions de stockage.

Les échantillons de sol présentent donc un nombre des souches moins important par rapport au blé (11 et 6 souches pour le Lac "Ayata" et le Lac "Chott, respectivement). Ceci peut être expliqué par la forte salinité du sol et sa pauvreté en matière organique (inférieure à 2 %). **GUNDE-CIMERMAN et al., (2005)**, ont mentionné dans ce contexte, que le nombre des levures halophiles du sol est proportionnel à sa quantité en matière organique. Il est également lié à la structure du sol, qui exerce un effet sur leur distribution (**PHAFF et STARMER, 1987**). Ce faible taux peut être aussi justifié par le pH du sol, relativement neutre (6.3) favorisant plutôt une reproduction rapide des populations bactériennes (**ALLEN et AHEARN, 1987**) aux dépens de celle des levures, dont la croissance est optimale à des pH acides (pH <6) (**LARPENT et LARPENT-GAURGAUD, 199**).

Les conditions extrêmes ne permettant la résistance que de quelques souches levurières semblent être à l'origine du faible taux de développement de ces dernières. La survie de cette flore est probablement favorisée par la forme sporulante. Dans ce contexte, **GOLUBEV et al., (1984)** ont rapporté la capacité des levures sporulées appartenant aux genres *lipomyces*, *cryptococcus* et *rhodotorula*) à survivre dans des habitats pauvres en aliments et en eau.

Par ailleurs, la présence ou la croissance de certaines espèces peut être liée au dépôt des résidus d'animaux ou de plantes et à la structure du sol autrement dit son contenu organique, sa porosité ...etc.), qui exerce un effet sur leur distribution (**PHAFF et STARMER, 1987**).

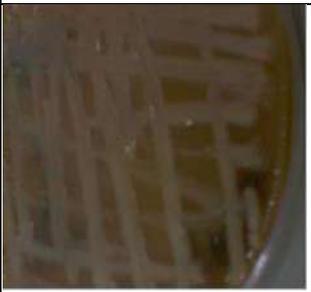
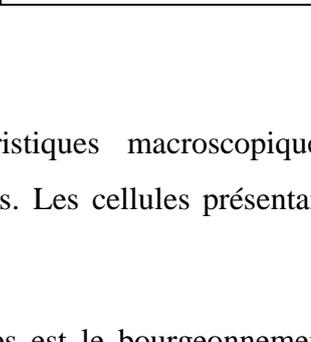
3.3.1. Caractérisation macroscopique des souches isolées

Après incubation pendant trois jours à 30 °C, les colonies isolées ont été soumises à des observations macroscopiques. Le tableau XIII récapitule leurs principales caractéristiques.

La diversité dans la forme (plate, arrondie, aspect de contour), la taille et la couleur (blanche, orange ou jaune) est constatée. Certaines souches présentant les mêmes caractéristiques macroscopiques, peuvent appartenir à des groupes différents de levures.

Tableau XIII: Observations macroscopiques des colonies isolées

Code	Caractéristiques macroscopiques			Observation macroscopique
	Couleur	Forme et texture	Aspect	
S1	Blanche	Colonies plates, grandes, rondes, Contour entier (régulier), crémeuses	Lisses, brillantes	
S2				
S4				
S5				
S7				
S8				
S24				
S40				
S9	Blanche ou Crème	Colonies plates, rondes, Contour entier	Lisses, brillantes	
S10				
S13				
S14				
S15				
S28				
S29				
S6	Blanche	Colonies de taille	Cireuses,	
S26				

S33	ou Jaune	moyenne, rondes, Contour entier (régulier),	brillantes	
S34				
S37				
S3	Blanche à beige clair	Colonies plates, rondes, Contour entier (régulier).	Crémeuses	
S12				
S20				
S22				
S23				
S25				
S36				
S38				
S39				
S16	Blanche ou Jaune	Colonies plates, Contour régulier ou irrégulier.	Lisse, crémeuses	
S17				
S27				
S30				
S31				
S32				
S35				
S11	Orange	Contour entier (régulier), crémeuse, bombée, rondes	Lisses, brillantes,	
S18				
S19				
S21				

3.3.2. Caractérisation microscopique des souches isolées

Globalement les souches qui présentent des caractéristiques macroscopiques similaires, possèdent des caractéristiques microscopiques similaires. Les cellules présentant des formes arrondies à ovales sont immobiles (tableau XIV).

Le mode de reproduction constaté chez les souches isolées est le bourgeonnement (mono, bi ou multilatéral), avec l'apparition des filaments mycéliens ou pseudo mycélien chez certaines. On constate aussi l'absence de mycélium chez d'autres souches.

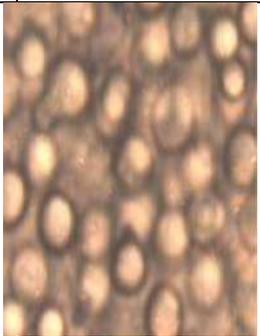
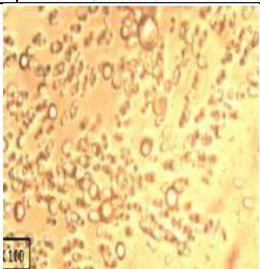
Les levures ont un appareil végétatif réduit à une seule cellule. Dans certaines conditions de culture, ces cellules s'arrangent en files, mimant le mycélium des champignons.

Les levures se reproduisent aussi bien par voie asexuée que par voie sexuée, en fonction des conditions du milieu. La reproduction végétative se fait par bourgeonnement ou par fission; dans certaines conditions de cultures les levures sporogènes peuvent se reproduire par voie sexuée (BOURGEOIS et LARPENT, 1996).

Les résultats enregistrés dans cette étude, concordent avec ceux rapportés par **BENAOUIDA (2008)**, **MERABTI (2006)** qui montrent une diversité dans la forme microscopique des levures isolées à partir de différents types de sols prélevés de diverses régions algériennes et à partir de certains bioproduits.

Tableau XIV: Observations microscopiques des souches isolées

Code	Caractéristiques microscopiques				Observation microscopique
	Forme des cellules	Mode de reproduction	Filamentation	Mobilité	
S1	Rondes à ovales, de petite taille	Bourgeonnement mono, bi et multilatéral	Présence de mycélium et de pseudo-mycélium	Mobile	 <p>(X 100)</p>
S2					
S4					
S5					
S7					
S8					
S24					
S40					
S9	Rondes, de grande taille	Bourgeonnement mono à multilatéral	Présence de pseudo-mycélium	Immobile	 <p>(X 100)</p>
S10					
S13					
S14					
S15					
S28					
S29					
S6	Ovales à rondes	Bourgeonnement unipolaire à multipolaire	Présence de pseudo-mycélium	Immobile	
S26					
S33					
S34					
S37					

					(X 100)
S3	Arrondies à ovoïdes	Bourgeonnement unipolaire ou bipolaire	Absence de pseudo-mycélium	Immoble	
S12					
S20					
S22					
S23					
S25					
S36					
S38					
S39					
					(X 100)
S16	cellules ovoïdes de grande taille	Bourgeonnement multilatéral	Présence de pseudo-mycélium	Immoble	
S17					
S27					
S30					
S31					
S32					
S35					
					(X 100)
S11	Cellules ovoïdes à sphériques	Bourgeonnement multilatéral et scissiparité	Absence de mycélium	Immoble	
S18					
S19					
S21					
					(X 100)

3.3.3. Etude des caractères biochimiques et physiologiques

Une pré-identification par le biais de tests biochimiques est recommandable à cause de la difficulté à repertorier les levures en se basant uniquement sur les caractères macroscopiques et microscopiques.

Les tests physiologiques permettent de bien nous orienter vers une identification plus précise des souches levurières isolées. Les résultats de tests réalisés sont récapitulés dans le tableau XV.

Toutes les souches testées fermentent le glucose et le fructose, alors que le maltose, le galactose et le saccharose semblent moins majoritairement assimilés.

L'étude montre également que la plupart des souches n'assimilent pas le nitrate de potassium (KNO_3) ni le sulfate d'ammonium ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) à l'exception des souches 11, 18, 19 et 21 qui réagissent positivement avec ces composés.

Selon les caractéristiques morphologiques et physiologiques de levures rapportées par **DUFRESNEET (2014)**, et les clefs de détermination de **LODDER (1971)** et de **KREGER VAN (1984)**, les souches isolées dans la présente étude, semblent appartenir aux genres *Candida*, *Pichia*, *Schwanniomyces*, *Lipomyces*, *Saccharomyces* et *Rhodotorula*. Le métabolisme fermentaire observé (en particulier la fermentation des sucres et l'assimilation des nitrates) et le processus de multiplication végétative, semblent correspondre à ceux cités par **DUFRESNEET (2014)** et **DAKHMOCHE-DJEKRIF (2016)** pour ces genres de levure.

De nombreuses études dont celles de, **FELIPE *et al.*, (2008)** ; **HAMAD (2009)** ; **LAGANE (2007)** ; **PIERQUIN (2010)** et **THIERRY (2015)**, montrent que ces genres sont plus répandus au niveau du sol et autres sources telles que l'air, l'eau, les plantes et les aliments.

DAKHMOCHE-DJEKRIF (2016) a réalisé l'isolement de ces espèces à partir des grains de blé dur stockés dans des régions arides et semi-arides.

Les travaux de **BENAOUIDA (2008)** ; **MERABTI (2006)** et **BESSEI *et al.*, (2016)** ont permis l'isolement des genres *saccharomyces*, *lipomyces* et *rhodotorula* à partir du sol des milieux extrêmes dans le Sud Algérien (Wilaya de Biskra et El-Oued).

Tableau XV: Caractéristiques physiologiques des souches isolées

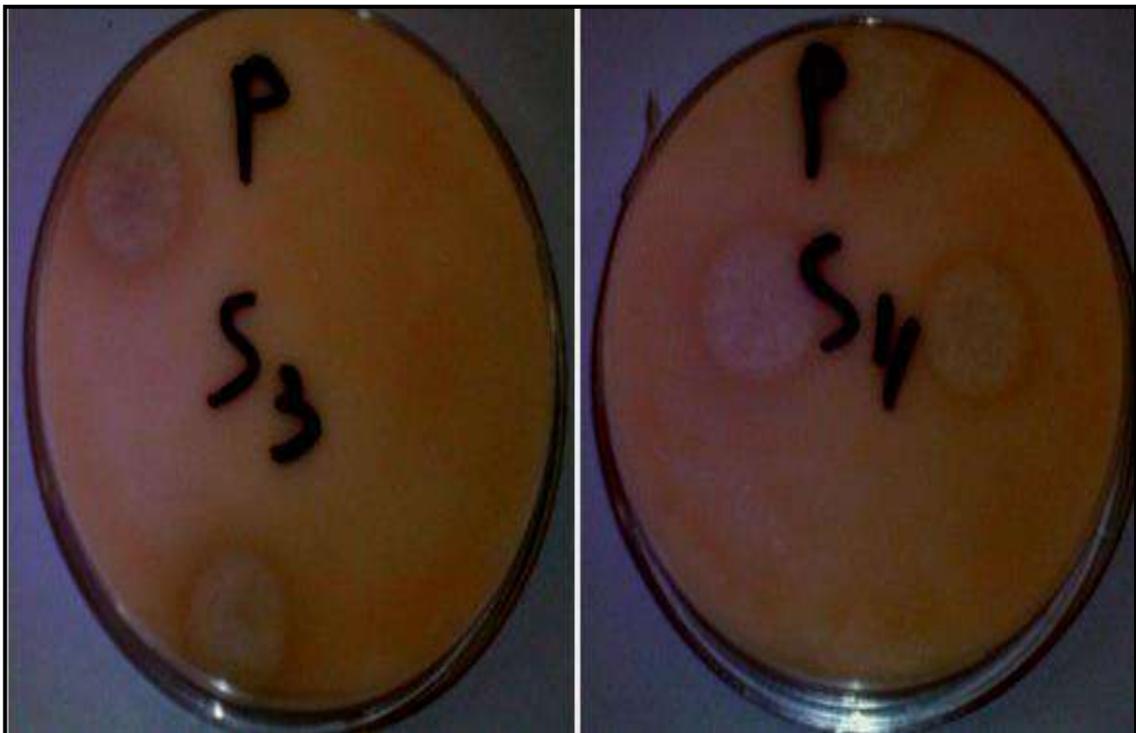
Code	Fermentation des sucres					Assimilation des composés azotés		Genre
	Glu	Fru	Mal	Gal	Sacch	(NH ₄) ₂ SO ₄	KNO ₃	
S1	+	+	-	-	-	-	-	Candida
S2								
S4								
S5								
S7								
S8								
S24								
S40								
S9	+	+	+, -	-	+	+; -	-	Pichia
S10								
S13								
S14								
S15								
S28								
S29								
S6	+	+	+, -	-	-	+; -	-	Schwanniomyces
S26								
S33								
S34								
S37								
S3	+	+	+	-	+	+; -	-	Lipomyces
S12								
S20								
S22								
S23								
S25								
S36								
S38								
S39								
S16	+	+	+, -	+, -	+, -	-	+; -	Saccharomyces
S17								
S27								
S30								
S31								
S32								
S35								
S11	+	+	-	+	-	+	+	Rhodotorula
S18								
S19								
S21								

3.3.4. Sélection des souches amylolytiques

Pour la mise en évidence de l'activité amylasique chez les souches isolées, nous avons utilisé un milieu sélectif (PDA à 1 % d'amidon). Après incubation à 30 °C pendant 48 h, nous avons observé des zones de lyse de différentes dimensions (**Tab XVI**). Les souches qui ont développé ces zones (halo clair) sont les suivantes : **1, 5, 9, 11, 14, 21, 23, 26, 29, 33 et 38**. Les autres souches n'ont pas donné de zones de lyse (**photo 4**).

Les souches isolées lors de ce travail réagissent différemment en présence de l'amidon dans le milieu de culture (PDA). En fonction de la taille de la zone de lyse, on peut les regrouper en :

- **Souches à haut potentiel d'activité** : représentées par les souches, 1, 14, 21, 26 et 38, avec une importante zone de lyse (24 à 31 mm).
- **Souches à faible potentiel d'activité** : représentées par les souches, 5, 9, 11, 23 et 29, et 33 avec une zone de lyse réduite (4 à 7 mm).
- **Souches sans potentiel d'activité** : représentées par les souches qui n'ont pas développé de zone de lyse (absence de dégradation de l'amidon).
-



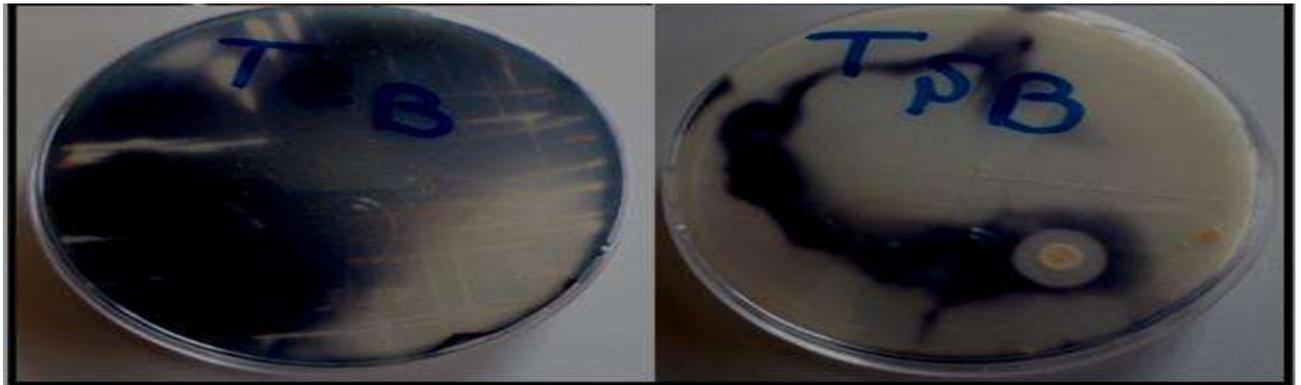


Photo 04: Sélection de souches amylolytiques sur PDA à 1 % d'amidon (après 48 h d'incubation à 30 °C et à pH 5).

Tableau XVI: Sélection des souches amylolytiques et diamètres des zones de lyse

Code	Diamètres des zones de lyse (mm)
S1	31
S2	/
S3	/
S4	/
S5	04
S6	/
S7	/
S8	/
S9	06
S10	/
S11	05
S12	/
S13	/
S14	28
S15	/
S16	/
S17	/

S18	/
S19	/
S20	/
S21	30
S22	/
S23	06
S24	/
S25	/
S26	27
S27	/
S28	/
S29	07
S30	/
S31	/
S32	/
S33	04
S34	/
S35	/
S36	/
S37	/
S38	24
S39	/
S40	/

***(/): Absence de zone de lyse**

Si les microorganismes sont "amylase négative", le milieu reste inchangé et uniformément opalescent. Une solution de Lugol, diluée, versée à la surface du milieu donne un composé bleu violacé (amidon non dégradé) tandis que la zone claire reste non colorée (amidon dégradé par l'enzyme).

Parmi les quarante souches isolées, onze seulement présentent un potentiel amylolytique. Seules les souches à haut potentiel d'activité sont retenues pour la suite des travaux. Elles sont soumises à une identification biochimique puis aux essais de production d' α -amylase par leur culture sur milieux à base de lactosérum bovin, caprin et camelin. Les résultats obtenus montrent des différences dans les caractères biochimiques de ces souches. Le tableau **XVII**, regroupe les résultats relatifs à la pré-identification des levures sélectionnées pour leur capacité de production de la substance d'intérêt recherchée. En se basant sur les clefs de détermination des levures citées par **LODDER (1971)** et **KREGER VAN (1984)**, ces souches semblent appartenir aux espèces suivantes :

- *Candida glabrata* : isolée à partir du Lac "Ayata", avec une zone de lyse de 31 mm

- *Pichia anomala* : isolée à partir du Lac "Chott", avec une zone de lyse de 28 mm
- *Rhodotorula mucilaginosa* : isolée à partir du Blé dur, avec une zone de lyse de 30 mm
- *Schwanniomyces occidentalis* : isolée à partir du Blé dur, avec une zone de lyse de 27 mm
- *Lipomyces kononenkoae* : isolée à partir du Blé dur, avec une zone de lyse de 24 mm.

ROSE et HARRISON, (1987) rapportent que le sol présente un habitat typique pour le genre *Schwanniomyces*. Dans le même ordre d'idée, trois espèces supplémentaires ont été décrites par **PHAFF et STARMER (1987)** Il s'agit de : *Schwanniomyces castellii* isolée à partir des sols de champ de vigne en Espagne ; *Schwanniomyces alluvius* isolée à partir de plusieurs sols à l'Ouest des U.S.A.

Dans le même contexte, de nombreuses études rapportent que le sol constitue un habitat typique pour le genre *lipomyces* à caractère amylolytique (**PRIETO et al., 1995 ; EKSTEEN et al., 2003**).

BEKKARI et al., (2015) et **BESSEI et al., (2016)** ont identifié les genres *Pichia*, *Rhodotula* et *Candida* isolés à partir des milieux sahariens à forte salinité. **LAMMI (2011)** a isolé des souches du genre *Candida* doué d'une activité antimicrobienne, à partir du sol provenant de la région de Biskra.

Les genres de levures contaminant le blé dépendent fortement des conditions climatiques au moment de la récolte. Les plus souvent rencontrés sont les genres *Saccharomyces*, *Candida*, *Hansenula*. Ces dernières ne donnent généralement lieu qu'à de faibles niveaux de contamination, ne dépassant que rarement quelques centaines de germes par gramme de grain. Des quantités élevées de levures sont souvent le signe d'une humidité élevée du grain (**BOURGEOIS et al., 1996**).

Les résultats concernant l'aspect macroscopique, microscopique et biochimique, ainsi que la détermination des dimensions des zones de dégradation de l'amidon sont de nature à suggérer que les cinq souches levurières retenues, présentent une aptitude amylasique appréciable et méritent d'être cultivées sur différents types de lactosérum afin de déterminer les souches les plus performantes et les conditions optimales de leur croissance et de leur activité enzymatique.

Tableau XVII: Identification biochimique des souches sélectionnées

Code	ASSIMILATION CARBONE												Fermentation des sucres						Composés azotés		Autres		Espèce			
	Érythritol	Maltose	Sucrose	Lactose	Galactose	Mélibiose	Cellobiose	Inositol	Xylose	Raffinose	Tréhalose	Dulcitol	Glucose	Maltose	Sucrose	Lactose	Galactose	Tréhalose	Cellobiose	(NH ₄) ₂ SO ₄	KNO ₃	Croissance à 37 °C		Croissance à 40 °C		
S1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	<i>Candida glabrata</i>	
S14	+	+	+	- +	-	+	-	- +	- +	+	-	-	+	- +	+	-	-	-	- +	-	-	-	-	-	-	<i>Pichia anomala</i>
S21	-	+	+	-	+	-	-	-	-	- +	- +	- +	+	- +	-	-	-	-	+	+	+	-	-	- +	- +	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>
S26	+	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	<i>Schwanniomyces occidentalis</i>
S38	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	- +	-	+	+	+	+	<i>Lipomyces kononenkoae</i>

*(+): Présence de fermentation/ assimilation/ croissance.

*(-): Absence de fermentation/ assimilation/ croissance.

*(-/+): Faible fermentation/ assimilation/ croissance.

3.3.5. Propriétés physico-chimiques et biochimiques du lactosérum

Dans cette partie, nous nous sommes intéressé à l'efficacité du lactosérum utilisé dans l'élaboration des milieux de culture des souches d'intérêt retenues. La composition chimique du lactosérum des trois origines (bovine, caprine et cameline) est portée sur le tableau XVIII.

Tableau XVIII: Caractéristiques physico-chimiques et biochimiques du lactosérum

Paramètres	Lactosérum bovin	Lactosérum caprin	Lactosérum camelin
pH	6,06±0.02	5,92± 0.03	4,57± 0.02
CE(mS/cm)	9,44± 1.02	9,1± 1.06	40,9± 3.04
Acidité Dornic (°D)	37± 2.3	45± 3.15	64± 4.15
Densité	1.025± 0.05	1.045± 0.36	1.036± 0.75
Humidité (g/l)	93.31± 1.05	91.14± 2.04	94,42± 1.07
MS (g/l)	72.08± 3.04	64.75± 2.14	53 ,58± 3.07
Cendres (g/l)	7.5± 0.39	4.15± 0.75	6.42± 1.07
Protéines (g/l)	1,071± 0.09	0,57± 0.04	1,74±1.01
Sucres réducteurs (g/l)	43,08± 2.14	42,6± 3.75	38,5± 2.08
Lactose g/l	42.05± 1.02	52.14± 3.05	45.36± 1.69
Matière grasse g/l	8.03± 0.67	2.94± 0.08	3.14± 0.54

Nous remarquons que le pH des échantillons de lactosérum tend vers l'acidité avec une valeur relativement plus acide pour le lactosérum camelin. Ces résultats sont comparables à ceux rapportés par **DENDOUGA (2006)** pour le lactosérum bovin. L'acidité du lactosérum caprin et surtout celle du lactosérum camelin serait vraisemblablement due , du moins en partie, au pHi des Cn caprines et camelines (pHi =4.3) bas par rapport à celui des Cn bovines (pHi =4.6) (MATI, 1992 ; SIBOUKEUR,2007).

La valeur de l'acidité titrable du lactosérum diffère selon l'état initial du lait (taux de contamination), le mode de coagulation utilisé et la quantité de présure ou de ferments utilisés (**ADRIAN, 1987**). Des échantillons de lactosérum fraîchement collectés, présentent une acidité titrable de l'ordre de 53°D. Cette valeur est fortement supérieure à celle du lait frais qui se situe entre 15 et 20 °D (**SAWAYA et al, 1989**).

Les teneurs en matière sèche et en cendres, nous permettent d'avoir une idée sur la composition organique et minérale des échantillons analysés. Ainsi, le lactosérum bovin ayant fait l'objet de la présente étude, renferme des teneurs en matière sèche et en cendres supérieures à celles de ses homologues caprin et camelin.

Au cours du processus de coagulation du lait, les caséines forment le coagulum ou caillet. Comme la matière grasse est récupérée sous forme de crème, le sérum présente une faible teneur en matière sèche par rapport au lait d'origine (**MOTTAR, 1989**). La matière minérale s'y trouve sous forme de sels, de chlorures, de sulfates, de citrates et de bicarbonates. On y trouve aussi quelques métaux à l'état de traces (**SCHUCK, 2003**).

Les échantillons de lactosérum analysés renferment des quantités de sucres réducteurs égales respectivement à 43,08 g/l et 42,6 g/l et 38,5 g/l, pour le lactosérum bovin, caprin et camelin. Ces valeurs sont comparables à celles citées par la littérature et qui sont de l'ordre de 44,17 g/l pour le lactosérum du lait de référence (**BOUCHERIT, 2011**).

Le lactose constituant le plus abondant du lait, constitue l'essentiel de la matière sèche de lactosérum. Il représente une importante source de carbone et d'énergie pour la croissance de nombreux micro-organismes possédant le système β - galactosidase (**LEJEUNE et BARON, 1995**). L'échantillon de lactosérum caprin plus riche en ce diholoside semble relativement mieux répondre à ce critère. Il est suivi du lactosérum camelin puis bovin (52.14 ± 3.05 ; 45.36 ± 1.69 et 42.05 g/l respectivement).

Les échantillons lactosériques analysés présentent une teneur protéique relativement faible ($1,74 \pm 1.01$; $1,071 \pm 0.09$ et $0,57 \text{ g/l} \pm 0.04$, respectivement pour les lactosérums, bovin, camelin et caprin par rapport aux valeurs citées par **ALAIS (1981)** (entre 7 et 11 g/l). De par, leur valeur nutritionnelle (acides aminés essentiels), leurs propriétés protectrices (anticorps, lactoferrine, composant 3 des protéose-peptone, lactopéroxydase...etc) et leurs propriétés techno-fonctionnelles particulières (pouvoir émulsifiant), les protéines du lactosérum revêtent une importance considérable (**SIBOUKEUR, 2007**).

Le lactosérum recèle donc une valeur alimentaire à ne pas négliger (sucres, protéines, sels minéraux). Ce sous-produit de laiterie peut donc être employé comme un milieu de fermentation notamment dans la production d' α -amylase par les levures, celles sélectionnées dans cette étude en l'occurrence.

3.4. Production d' α -amylase

Dans cette partie, nous nous sommes intéressés à la production de l' α -amylase par les souches sélectionnées pour leur aptitude de production de cette enzyme et cultivées sur milieux à base de lactosérum issu des laits, bovin, caprin et camelin. Nous avons dans un premier temps étudié l'évolution des paramètres de production enzymatique durant 5 jours d'incubation, afin de déterminer les souches les plus performantes et le milieu optimal pour le développement des microorganismes mis en jeu. Dans un deuxième temps, nous avons entrepris des essais d'optimisation des conditions de culture des levures sur le milieu retenu, en modifiant les paramètres de culture à savoir le pH, la température d'incubation, la concentration en substrat et en inoculum, puis en suivant l'évolution des paramètres cinétique de l'enzyme.

3.4.1. Evolution des paramètres de production de l' α -amylase

Le suivi de l'évolution du pH du milieu, de la biomasse, des teneurs en sucres et en protéines et de l'activité enzymatique durant 120 heures d'incubation, a permis de faire ressortir les meilleures souches du point de vue production de biomasse et activité enzymatique.

L'étude de paramètres de la production enzymatique est réalisée sur les cinq souches sélectionnées et cultivées sur milieux de culture à base de lactosérum de différentes origines, que nous avons dénommés : - milieu (**Bv**) pour le lactosérum bovin ;

- milieu (**Cp**) pour le lactosérum caprin ;

- milieu (**Cm**) pour le lactosérum camelin.

3.4.1.1. Evolution du pH du milieu

L'évolution du pH durant cinq jours d'incubation (120 heures) est caractérisée par une faible diminution en fonction de temps. Le pH de départ (à J0) égale à 5, tend vers une diminution dès les premières heures d'incubation pour toutes les souches et dans tous les milieux de culture.

La souche *Candida glabrata* cultivée sur milieu Cp, a provoqué une diminution de pH relativement importante à la fin de l'expérimentation. En effet, le pH initial (à J0) égale à 5 est passé à 4.2 à J0+120 h. Toutefois, les valeurs de ce paramètre diminuent sensiblement de J0 à J0+ 84h puisque les valeurs enregistrées tournent autour de pH5. L'abaissement du pH est plus rapide dans le cas des milieux, Bv et Cm. Les valeurs de pH atteintes à J0+120h sont respectivement égales à 3.2 et 3.11 (fig.10).

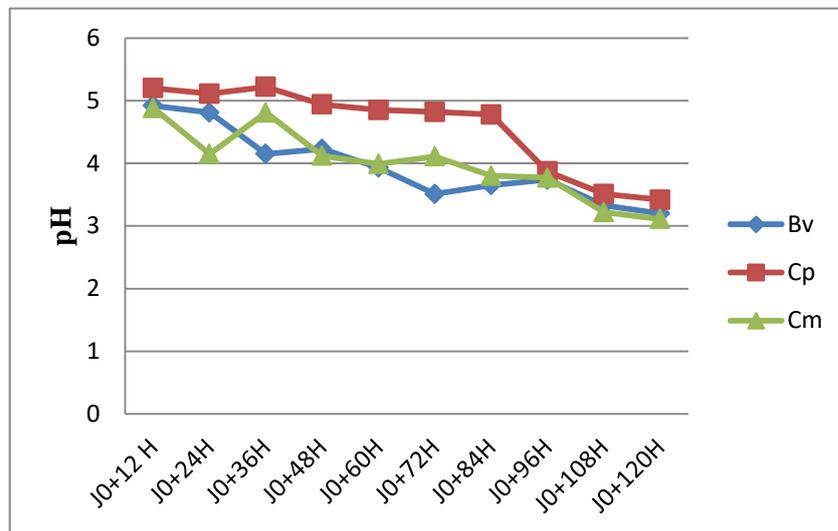


Figure 10 : Evolution du pH du milieu de culture de la souche *Candida glabrata*

Pour la souche *Schwanniomyces occidentalis*, l'évolution du pH présente globalement la même allure dans tous les milieux de culture. Le pH diminue dès les premiers heures, atteignant des valeurs égales à 3.99 (Bv et Cm) et 3.99 (Cp) oscillant autour de 3 à J0+72, puis on assiste à une augmentation à peine sensible (Cp) ou à une stabilisation (Bv et Cm) atteignant un pH de 4 (Cp) et 3,9 et 3.25 (Bv et Cm respectivement) à la fin de l'expérimentation (fig.11)

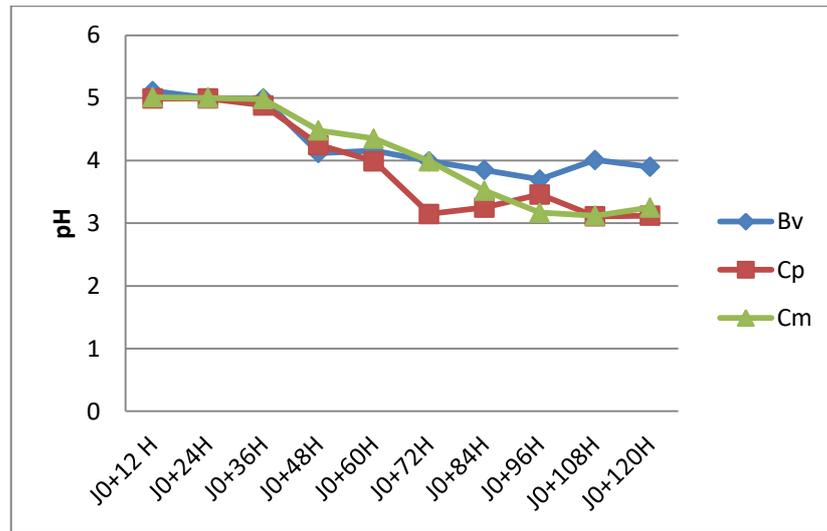


Figure 11 : Evolution du pH du milieu de culture de la souche *Schwanniomyces occidentalis*

L'évolution de pH pour la souche *Pichia anomala* est caractérisée par des fluctuations lors des premiers jours de culture. Toutefois le pH du milieu Bv diminue relativement plus rapidement par rapport aux autres milieux. Globalement tous les pH atteignent une valeur à hauteur de 3 à J0+120h. (fig.12).

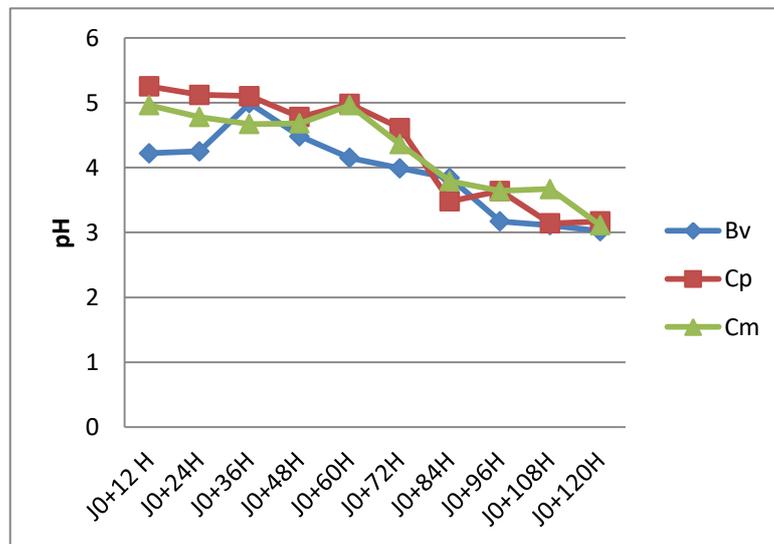


Figure 12 : Evolution du pH du milieu de culture de la souche *Pichia anomala*

La culture de la souche *Rhodotula mucilaginoso* indique un pH stable de J0 à J0+48 h (pH de 5.11 et 4.15) pour les milieux Bv et Cp, respectivement. Avec le milieu Cp, nous avons enregistré au contraire un abaissement de ce paramètre qui atteint une valeur 4.16 après une même durée d'incubation.

On assiste à J0+72 h à une légère augmentation du pH (autour de 5). A J0+ 120h, le pH chute dans tous les milieux et finit par atteindre une valeur à hauteur de pH 3 (fig. 13).

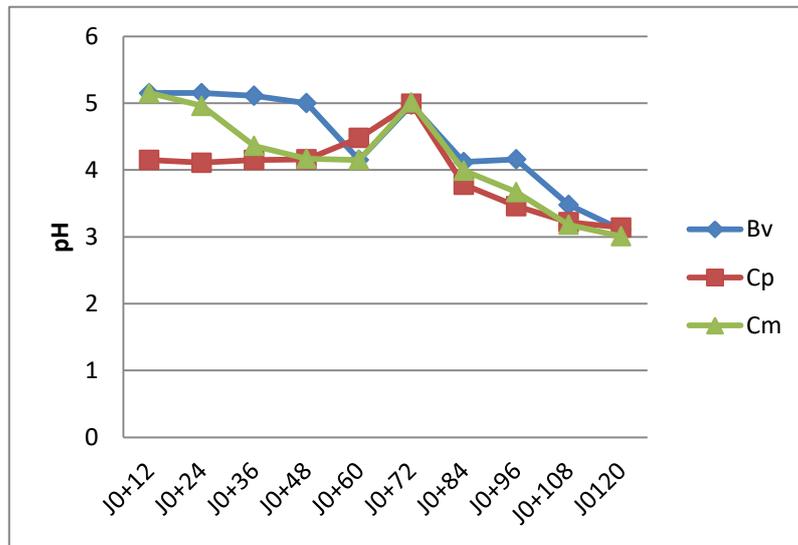


Figure 13 : Evolution du pH du milieu de culture de la souche *Rhodotula mucilaginosa*

La culture de la souche *Lipomyces kononenkoae* s'accompagne d'une chute progressive de pH dès le premier jour (J0) jusqu'à J0+96 h (pH entre 3 et 4) ou le pH augmente légèrement (4.16, 3.78, 3.19 respectivement pour Cp, Bv et Cm) (fig. 14). Après une élévation (4.69, 3.99 respectivement pour Cp et Cm, tous les pH atteignent une valeur de l'ordre de 3 à J0+120h.

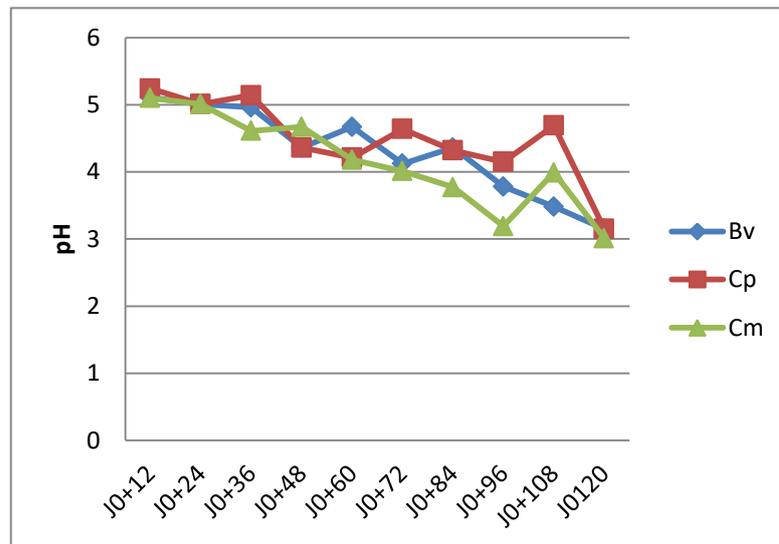


Figure 14 : Evolution du pH du milieu de culture de la souche *Lipomyces kononenkoae*

3.4.1.2. Evolution de la quantité de biomasse

Les résultats du suivi de l'évolution de la biomasse durant l'incubation sont illustrés par les figures 15, 16, 17,18 et 19. On remarque que l'allure de l'évolution de la quantité de biomasse est similaire dans tous les cas de figures. La quantité de biomasse commence par une augmentation progressive atteignant une valeur maximale aux environs de J0+ 72 h. Une chute progressive de la masse levurière est ensuite observée jusqu'à J0+120h.

Les valeurs de la biomasse pour la souche *Candida glabrata* augmente progressivement dès le premier jour (J0+24h) pour atteindre un maximum de 47.86 g/l pour le milieu Cp, puis on remarque la diminution de ces valeurs dans les deux derniers jours (J0+108h) avec des valeurs de 4.36 g/l pour le milieu Cm (fig.15).

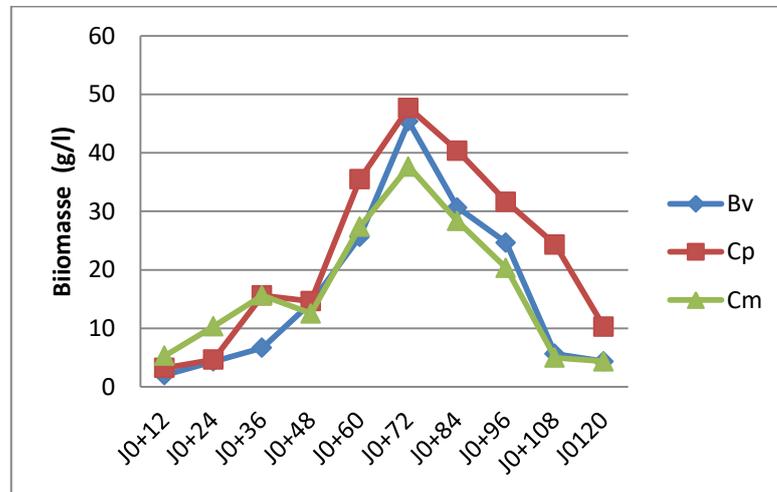


Figure 15 : Evolution de la biomasse de la souche *Candida glabrata*

Pour la souche *Schwanniomyces occidentalis*, la quantité de biomasse augmente avec la durée d'incubation. Le maximum est enregistré à J0+72h atteignant une valeur de 48.37 g/l pour le milieu Cp et de 45.36 g/l pour Cm. Le maximum de biomasse est notée à J0+60h pour Bv (44.61g/l), suivi d'un pallier jusqu'à J0+84h (43.14 g/l). On assiste au delà de cette durée d'incubation à une diminution de la quantité de biomasse qui finit par atteindre les valeurs suivantes à J0+ 120h : 15.47 g/l en milieu Cp et 4.36 g/l en milieux Bv et Cm (fig.16).

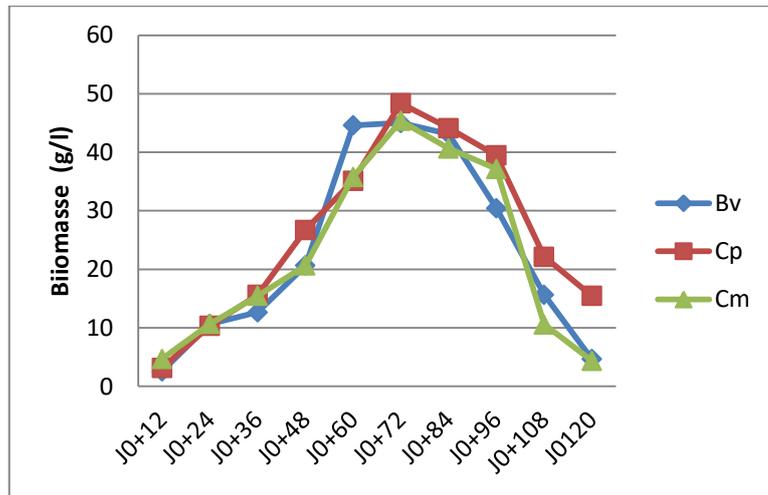


Figure 16 : Evolution de la biomasse de la souche *Schwanniomyces occidentalis*

Avec *Pichia anomala*, nous remarquons une évolution plus lente de la biomasse. Les valeurs maximales sont enregistrées à J0+72h en Cm et Bv (30.14 g/l et 28.97 g/l respectivement) et à J0+84h en Cp (28.69 g/l). Les valeurs diminuent par la suite pour atteindre des quantités à hauteur de 8 g/l en Bv et Cp et de 10.35 g/l en Cm à J0+120h (fig.17).

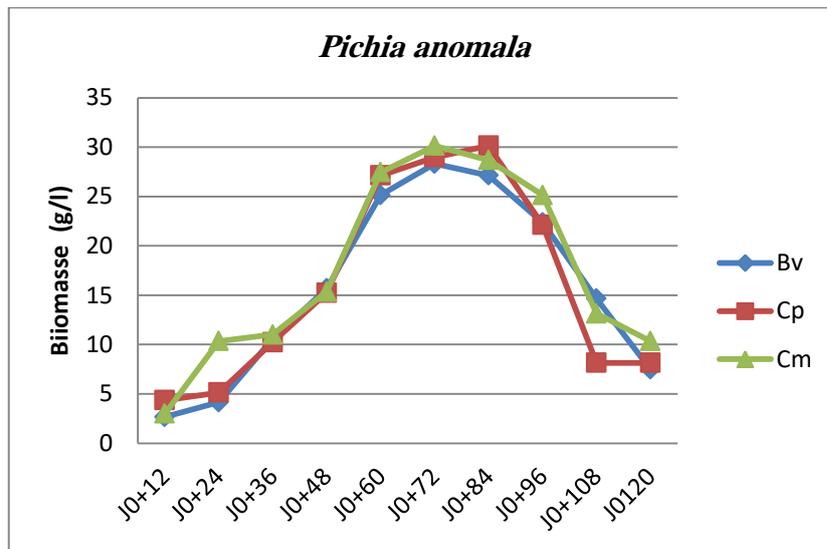


Figure 17 : Evolution de la biomasse de la souche *Pichia anomala*

L'évolution de la biomasse pour la souche *Rhordotula mucilaginosa* se caractérise par une augmentation jusqu'aux valeurs maximales suivantes : 23.67 g/l pour le milieu Cp à J0+72h ; 20.36 g/l pour le milieu Bv à J0+72h et 20.79 g/l pour le milieu Cm à J0+60h. Puis, on assiste à une diminution de la quantité de biomasse pour atteindre des valeurs minimales au bout de J0+120 (autour de 4g/l).

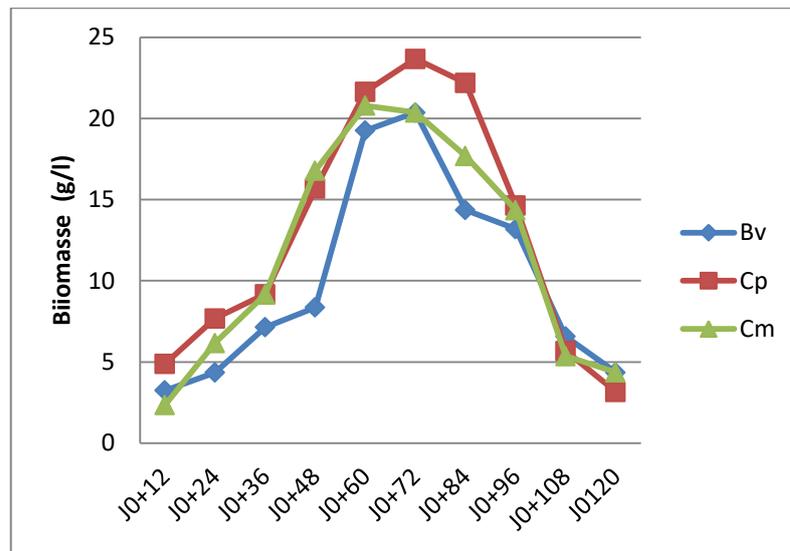


Figure 18 : Evolution de la biomasse de la souche *Rhodotula mucilaginosa*

La souche *Lipomyces kononenkoae* présente une évolution moins importante par rapport aux autres souches. Le maximum de de biomasse est atteint à Jo+72 h (29.48 g/l) en Cp. il est atteint à J0+60h en Bv et en Cm à J0+60 avec des valeurs de 22.36 et 20.68 g/l respectivement en Bv et Cm. Comme avec les autres souches, on assiste à une chute de la quantité de biomasse au delà de J0+72h qui finit par atteindre les valeurs suivantes: 6.36 ; 4.36 g/l respectivement en Bv et en Cm et Cp à J0+120h.

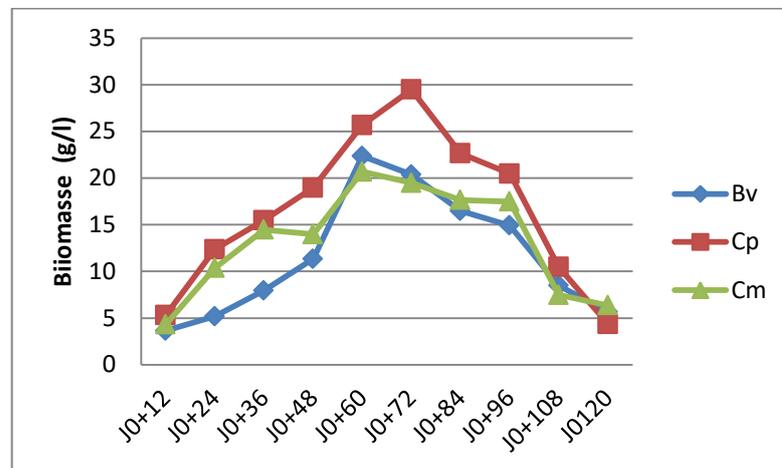


Figure 19 : Evolution de la biomasse de *Lipomyces kononenkoae*

Les résultats obtenus sont de nature à suggérer que les souches *C. glabrata* et *S. occidentalis* sont les plus performantes en matière de production de biomasse et que le milieu de culture à base de lactosérum caprin est celui qui leur convient le mieux.

3.4.1.3. Evolution des teneurs en glucides

L'évolution de la concentration en sucres dans le milieu de culture durant la période d'incubation est illustrée par les figures 20, 21, 22, 23 et 24. On constate à travers celles-ci une consommation progressive des sucres par les souches levurières.

Pour la souche *Candida glabrata*, la concentration en sucres égale à 24 g/l à J0 dans pour les trois milieux, diminue progressivement et finit par atteindre après 120 heures d'incubation, 9.64 ; 8.64 et 8.32 g/l respectivement en Cp ; en Cm et en Bv (fig.20).

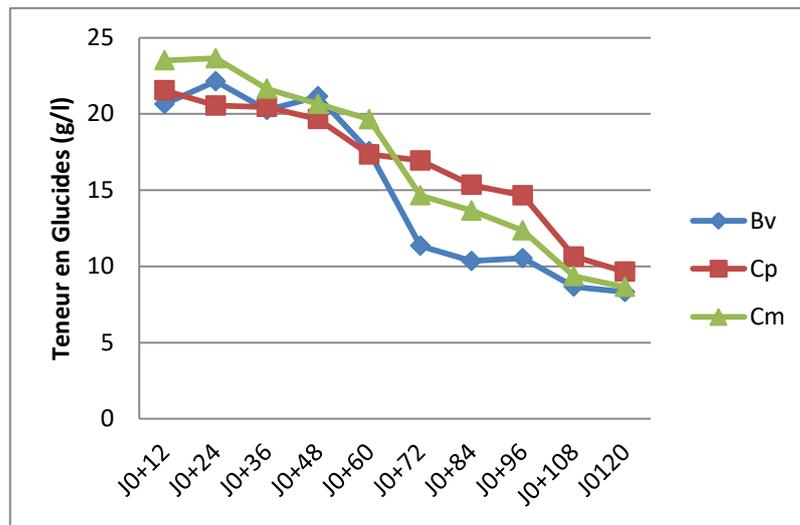


Figure 20 : Evolution de la teneur en glucides dans les milieux de culture de la souche *Candida glabrata*

Les courbes présentent une même tendance en ce sens où elles indiquent une consommation de sucres au fur et à mesure que la durée d'incubation augmente. Le taux de de glucides des milieux de culture destinés à la souche *Schwanniomyces occidentalis*, oscille autour de 20g/l à J0+12h et atteint une valeur de l'ordre de 7.5g/l à J0+120h.

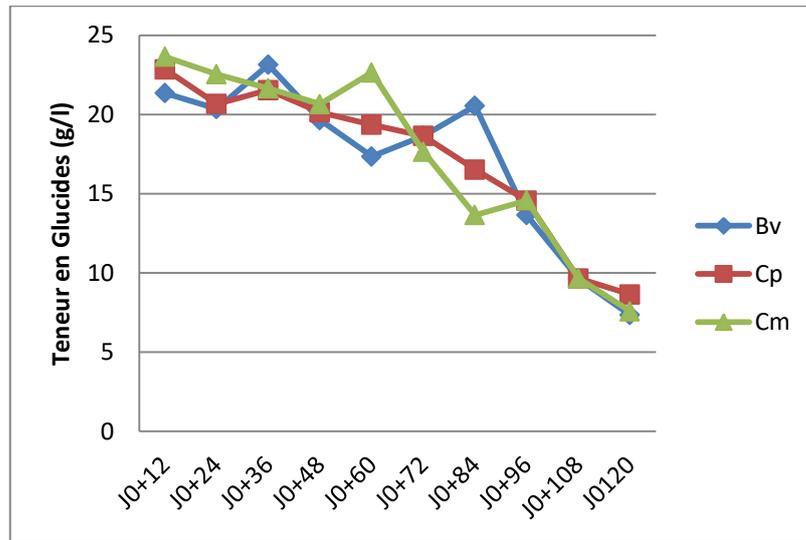


Figure 21 : Evolution de la teneur en glucides dans les milieux de culture de la souche *Schwanniomyces occidentalis*

Dans le cas de la culture de *Pichia anomala*, l'assimilation des sucres semble caractérisée par une certaine stabilité pour le milieu Cm durant les 48 h d'incubation. Une diminution de la teneur en cette source de carbone est constatée avec les trois milieux. Toutefois, cette diminution est plus brusque dans le cas du milieu Cm. La teneur en glucides finit par atteindre une valeur de 8.56 g/l à J0+120h (pour Cm) et 10.65 g/l (pour Cp et BV). Il est important de signaler que l'assimilation des sucres par *Pichia anomala* semble plus accentuée en Cp notamment entre J0+48h et J0+60h (fig.22).

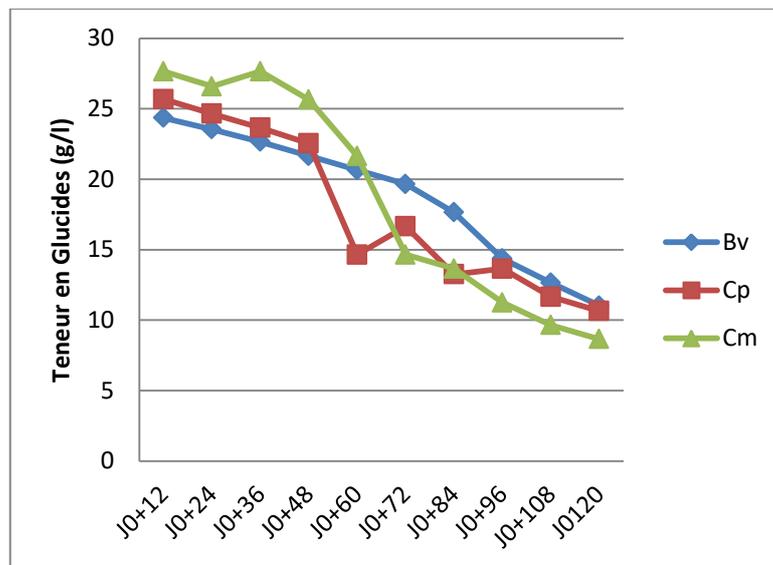


Figure 22 : Evolution de la teneur en glucides dans les milieux de culture de la souche *Pichia anomala*

Les courbes d'évolution des sucres dans les milieux de culture de *Rhordotula mucilaginosa* présentent une allure globalement similaire. On assiste à une diminution progressive des taux de glucides au fur et à mesure que la durée d'incubation augmente. On signale que le milieu au lactosérum bovin (Bv) présente à J0+120h, la concentration la plus faible à savoir 4.25g/l versus 7.14 g/l et 8.25 g/l respectivement dans le cas des milieux Bv et Cm (fig. 23).

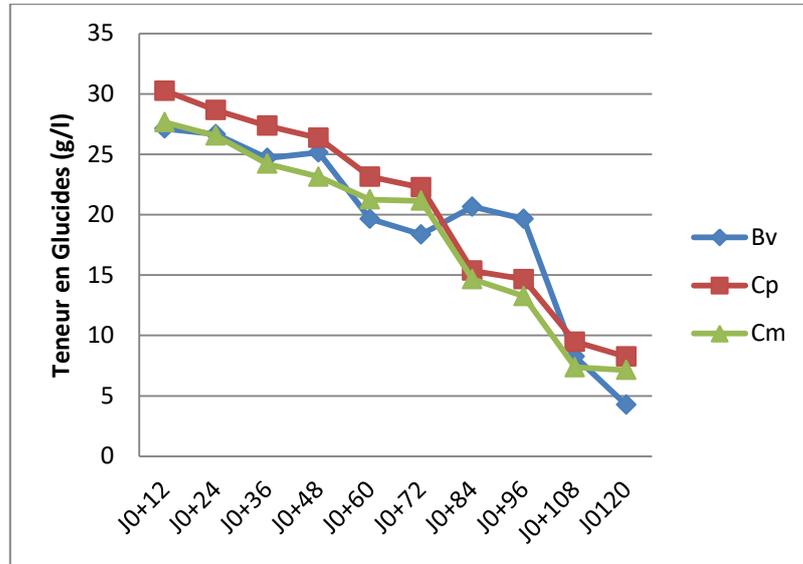


Figure 23 : Evolution de la teneur en glucides dans les milieux de culture de la souche *Rhordotula mucilaginosa*

Le milieu Cp, lors de la culture de *Lipomyces kononenkoae*, présente une faible variation de sucre jusqu'à le troisième jour (autour de 30 en 84h). Puis on assiste à diminution remarquable pour atteindre des valeurs au bout de 8 g/l pour tous les milieux. Les milieux Cm et Bv présente une diminution assez importante au cours de la fermentation

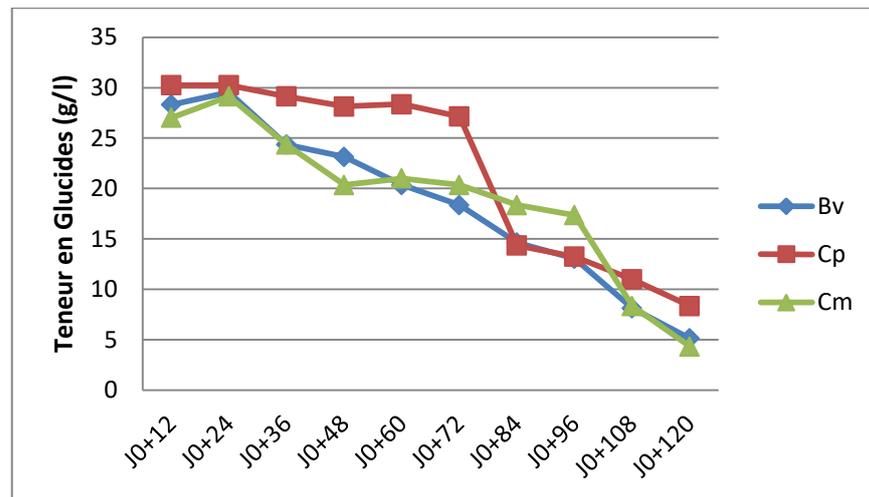


Figure 24 : Evolution de la teneur en glucides dans les milieux de culture de la souche *Lipomyces kononenkoae*

De ce qui précède, on peut dire que pour la plupart des souches, l'assimilation des sucres est relativement plus rapide dans le milieu à base de lactosérum caprin. Dans ce milieu Cp, la teneur en sucres semble diminuer d'une manière très sensible puisqu'elle passe de 30.25 g/l à J0+12 à environ 29 g/l. Au-delà de cette durée d'incubation, une chute importante de la teneur en glucides semble se produire et on se retrouve avec 8.36 g/l à J0+120h. En ce qui concerne Bv et Cm, la consommation de sucres par les levures est progressive. Elle passe de 27.01 g/l à J0+12h à 4.34g/l à J0+120h en Cm et de 28.32 g/l à 5.14 g/l à J0+120 h en Bv.

3.4.1.4. Evolution des teneurs en protéines

Les figures 25, 26, 27, 28 et 29 illustrent l'évolution des protéines des milieux de cultures des souches sélectionnées et cultivées dans différents types de lactosérum. Généralement la concentration des protéines augmente au cours du temps d'incubation car elle reflète la croissance microbienne et donc la production de biomasse.

La souche *Candida glabrata* montre une évolution des protéines différente selon l'origine du lactosérum. Avec le milieu Cp, on enregistre des concentrations plus élevées (6.87 g/l en 72 h) que celles enregistrés avec Cm et Bv (autour de 4 g/l) (fig.25). Pour tous les milieux utilisés, on assiste à une diminution de la teneur des protéines au cours de la fermentation au-delà d'une certaine période d'incubation. En effet, dans le cas du Cp, la chute de la teneur en protéine est affichée au-delà de J0+72h et finit par atteindre à J0+120h la valeur de 2.14 g/l. Dans le cas de Cm et Bv, la chute débute à J0+48h et finit à hauteur de 2.1g/l et 2.01g/l respectivement.

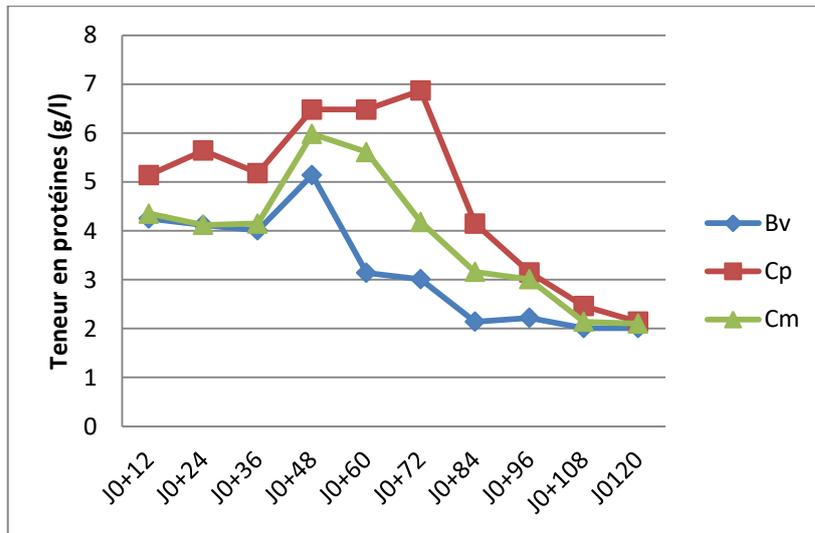


Figure 25 : Evolution de la teneur en protéines dans les milieux de culture de la souche *Candida glabrata*

L'évolution du taux de protéines dans le cas de la culture de *Schwanniomyces occidentalis* est globalement la même que celle précédemment décrite pour *Candida glabrata*. Un pic est affiché avec les trois lactosérums. Il est de l'ordre de 8.14 g/l à J0+72h dans le cas de Cp et 6.14 g/l à J0+72h et à J0+120h respectivement pour Cm et Bv. Puis on assiste à une diminution progressive de ce taux qui finit par atteindre à J0+120h une valeur de l'ordre de 2g/l (fig.26).

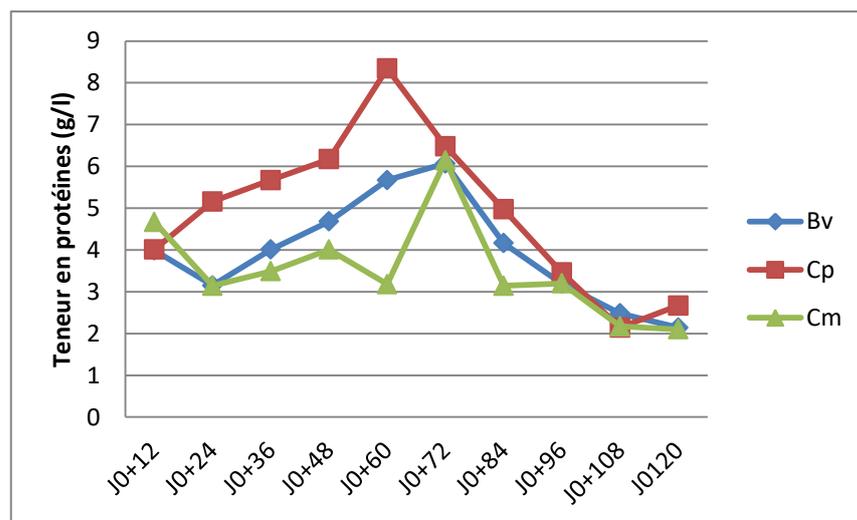


Figure 26: Evolution de la teneur en protéines dans les milieux de culture de la souche *Schwanniomyces occidentalis*

Dans le cas de la culture de la souche de *Pichia anomala* sur milieu à base de lactosérum caprin et de lactosérum camelin, nous constatons une évolution du taux protéinique comparable à celle observée avec les souches précédemment citées (fig.27). Le pic est atteint pour l'ensemble des milieux à J0+60h avec des valeurs égales à 7.01, 5.64 et 5.14 g/l respectivement pour Cp, Cm et Bv. A J0+120 h , le taux atteint des valeurs oscillant autour de 2g/l après une diminution progressive (fig.27).

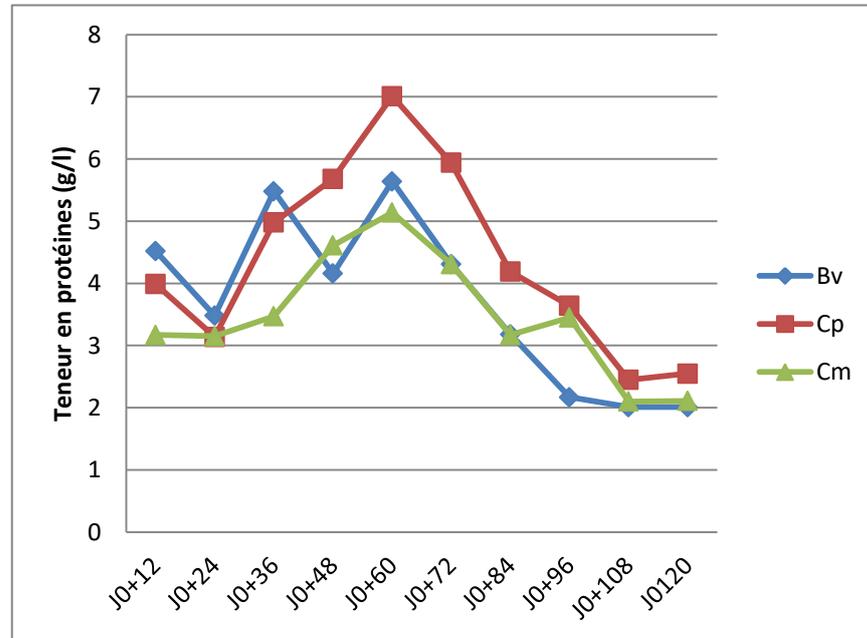


Figure 27 : Evolution de la teneur en protéines dans les milieux de culture de la souche *Pichia anomala*

En Cp, la souche *Rhordotula mucilaginosa* se comporte globalement comme dans le cas des souches précédemment citées. En effet, la teneur protéinique du milieu atteint un pic (8.14 g/l) à J0+72h. Une chute de ce taux durant le reste de l'incubation jusqu'à une valeur égale à 2.17 g/l à J0+120h. Les milieux Bv et Cm affichent des teneurs beaucoup plus faibles avec des variations comprises entre 5 et 2 g/l (fig.28).

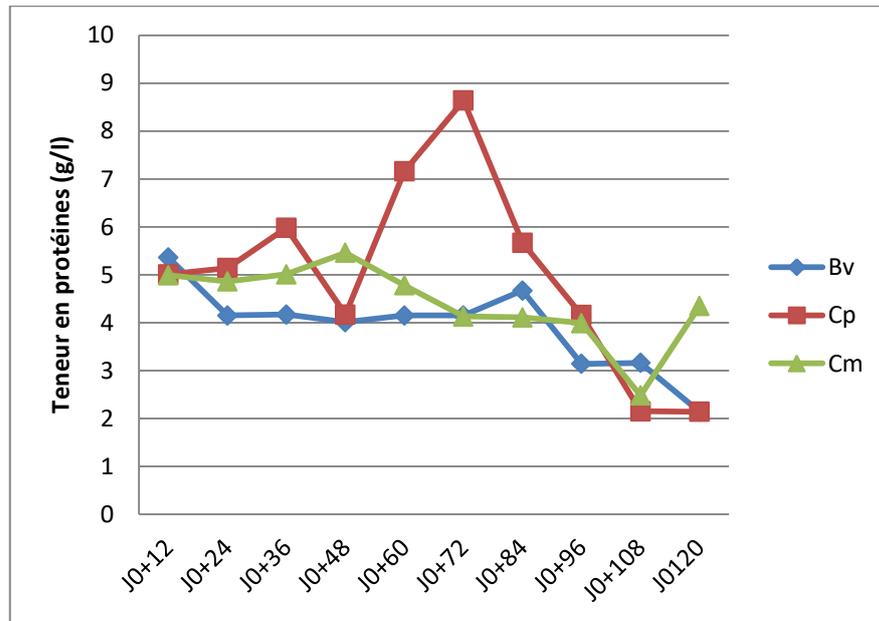


Figure 28 : Evolution de la teneur en protéines dans les milieux de culture de la souche *Rhordotula mucilaginosa*

L'évolution de la concentration en protéines dans le cas de la culture de *Lipomyces kononenkoae* montre une variation faible pour les milieux Bv et Cm avec un maximum de 6 g/l au bout de deuxième jour (J0+48h). En revanche, une concentration plus élevée soit 8.65 g/l après une durée d'incubation de trois jours (à J0+72h) est affichée avec la culture de cette souche dans le milieu à base de lactosérum caprin (Cp) (fig.29).

On constate parallèlement que les valeurs relatives à ces concentrations en protéines sont plus importantes lorsqu'il s'agit du milieu à base de lactosérum caprin (fig.29).

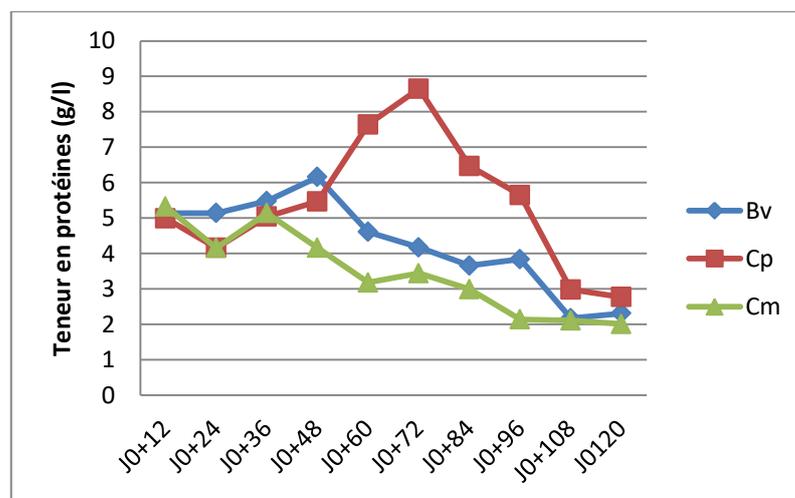


Figure 29 : Evolution de la teneur en protéines dans les milieux de culture de la souche *Lipomyces kononenkoae*

3.4.1.5. Evolution de l'activité enzymatique

Les courbes d'évolution de l'activité enzymatique durant les 120h d'incubation dans les milieux à base de lactosérum d'origine différente (fig. 30, 31, 32, 33 et 34), présentent la même allure. Globalement, on assiste à une augmentation de cette activité jusqu'à une valeur maximale atteinte à J0+72h le plus souvent, puis à une diminution progressive jusqu'à J0+120h.

Pour *Candida glabrata*, l'activité amylasique à J0+12h est égale à 900 UI/ml. Elle atteint dans le milieu Cp, une valeur maximale au bout du troisième jour (à J0+72h) à savoir 2489.14 UI/ml versus 1988.64 et 1978.61 UI/ml, respectivement en Cm et Bv (fig.30).

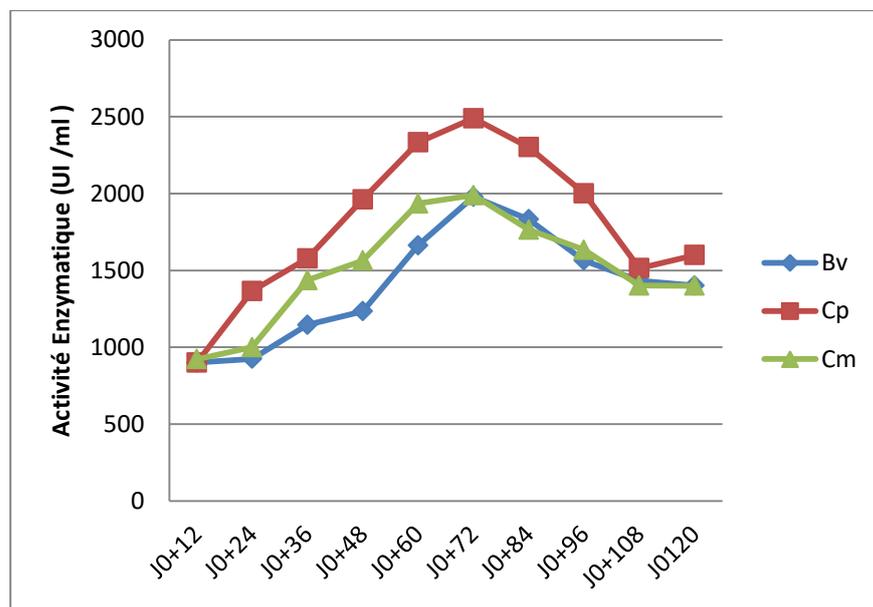


Figure 30 : Evolution de l'activité enzymatique de la souche *Candida glabrata*

La souche *Schwanniomyces occidentalis* présente une allure de variation similaire de cette activité pour les trois milieux utilisés caractérisée par un pic au troisième jour (J0+72h), avec des valeurs égales à 2236.14; 1987.65 et 1863.48 UI/ml respectivement en Cp, Cm et Bv. On assiste à une diminution progressive conduisant à la fin de la fermentation (J0+120 h) à des valeurs de 1436.87, 1432.78 et 1200.36 respectivement en Cp, Cm et Bv (fig.31). Cette activité semble par conséquent plus élevée dans le cas de la fermentation dans le milieu à base lactosérum caprin.

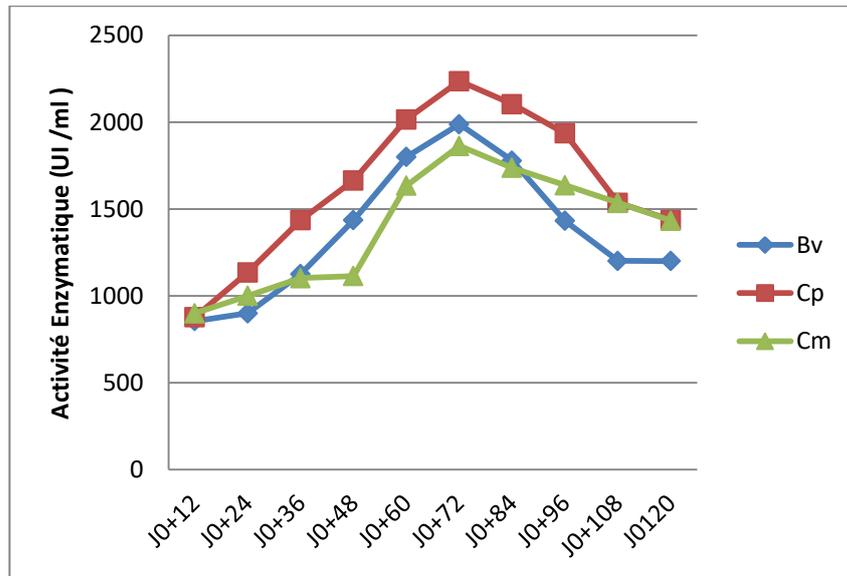


Figure 31 : Evolution de l'activité enzymatique de la souche *Schwanniomyces occidentalis*

L'allure des trois courbes relatives à l'évolution de l'activité enzymatique lors de la culture de *Pichia anomala* en Cp, Cm et Bv est comparable. Comme pour les autres souches , on enregistre une augmentation de cette activité en fonction de temps d'incubation jusqu'à une valeur maximale de 615.47 UI /ml à J0+96h en Cp, de 489.64 et 500.14 UI /ml respectivement en Cm et en Bv. On assiste au-delà de ces durées d'incubation à une régression progressive conduisant à des valeurs très basses à j0+120h à savoir 301.94, 199.64 et 255.67 UI /ml , respectivement en Cp, Cm et en Bv (fig.32).

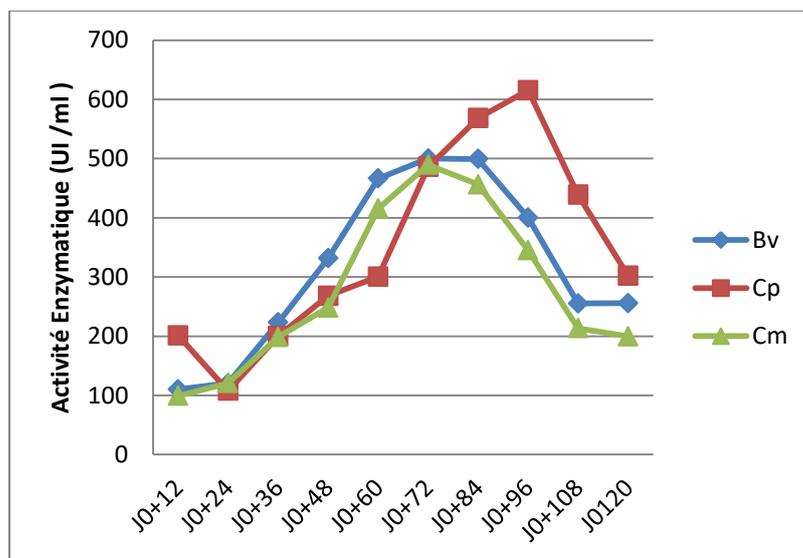


Figure 32 : Evolution de l'activité enzymatique de la souche *Pichia anomala*

La figure 33 laisse apparaître une faible activité alfa amyliasique de la souche *Rhordotula mucilaginosa* quel que soit le milieu de culture, notamment en début de la durée d'incubation (à J0+12h) où l'activité enzymatique avoisine 10 UI /ml seulement. Un pic avec de 406.84 UI /ml en Cp s'affiche à J0+84h, versus 244.98 et 299.14 UI /ml à J0+120h en Cm et Bv respectivement (fig.33).

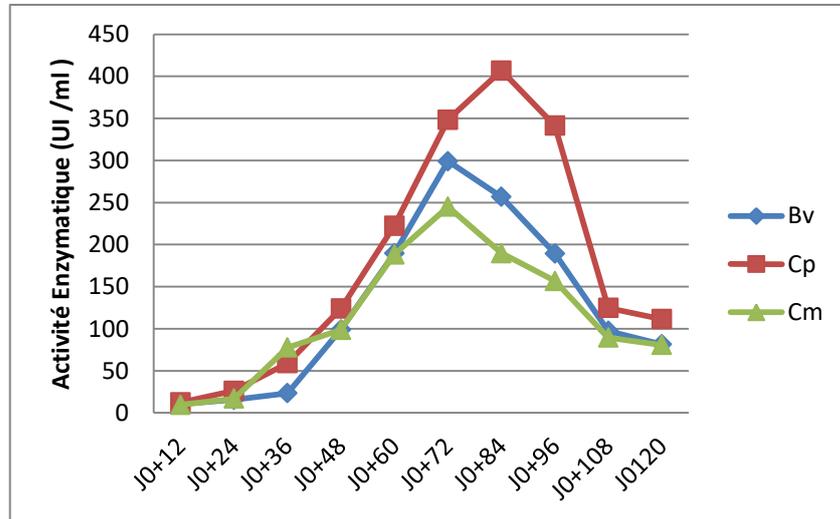


Figure 33 : Evolution de l'activité enzymatique de la souche *Rhordotula mucilaginosa*

La figure 34 laisse entrevoir une activité enzymatique à J0+12h, aussi faible (de l'ordre de 8.3 UI /ml) que celle affichée avec *Rhordotula mucilaginosa* et ce quel que soit le milieu de culture. Un pic relativement bas est observé à J0+72h à savoir 389.74, 213.75 et 255.41 UI /ml respectivement en Cp, Cm et Bv. A J0+120h, cette activité finit par atteindre des valeurs plus basses que celles observées avec *Rhordotula mucilaginosa* à savoir 89.41, 79.52 et 79. UI/ml en Cp, en Cm et en Bv , respectivement.

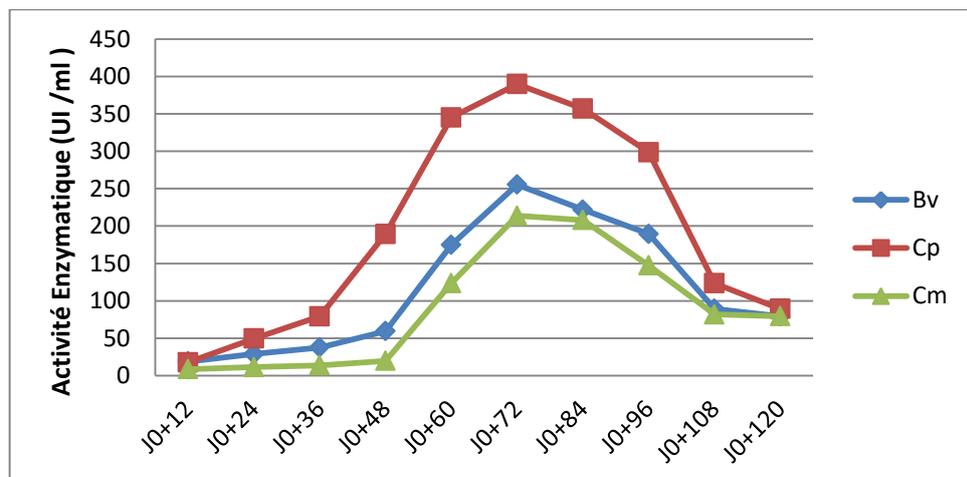


Figure 34 : Evolution de l'activité enzymatique de la souche *Lipomyces kononenkoae*

De ce qui précède, il semblerait que la souche *Candida glabrata* suivie de *Schwanniomyces occidentalis*, soient les plus performantes et que le milieu à base de lactosérum caprin soit le plus convenable pour optimiser leur activité enzymatique.

3.4.2. Analyses statistiques

Les analyses statistiques adoptées dans la présente étude se basent sur l'utilisation du test de **Kruskal-Wallis** qui permet de vérifier l'évolution des paramètres de culture (pH, quantité de biomasse ...etc.) en fonction des souches cultivées et du milieu de fermentation utilisé. Ce test permet de déterminer si des différences entre les médianes sont statistiquement significatives en calculant la valeur de P.

La valeur de P pour la variation de pH en fonction des souches est égale à 0,732 et celle en fonction des milieux de culture utilisés à 0,581. Ces deux valeurs sont supérieures au seuil de signification ($P > 0,05$) ; ceci montre que la variation du pH n'est pas significative en fonction des souches et du milieu de culture.

Le suivi de la biomasse en fonction du milieu de culture donne une valeur de P de 0,312. Les différences constatées ne sont donc pas significatives ($P > 0,05$). En revanche, l'analyse statistique a donné une valeur de 0,017 pour les variations de production de biomasse en fonction des souches sélectionnées, d'où différence significative au seuil $P \leq 0,01$.

Les essais de regroupement des souches en fonction de leur capacité à produire de la biomasse réalisés par le test de **Tukey** (tableau XIX) montrent que les souches *Schwanniomyces occidentalis*, *Pichia anomala* et *Lipomyces kononenkoae* (souches 2, 3 et 5) constituent des groupes homogènes

La figure 35 regroupe les souches selon leur production de biomasse. Cette figure montre que la souche 2 donne une forte production de biomasse (Groupe A), les souches 1 et 3 présentent une production moyenne, alors que les souches 4 et 5 sont caractérisées par une faible production de biomasse.

La valeur de P pour la variation des sucres en fonction des souches sélectionnées est de 0,078 et celle en fonction des milieux de culture utilisés est de 0,860. Ces deux valeurs sont supérieures au seuil de signification ($p > 0,05$) ; ceci montre que la variation du taux de sucres dans le milieu n'est pas significative en fonction des souches et du milieu de culture.

Tableau XIX : Tests simultanés de Tukey pour les différences de moyennes (pH vs Souches)

	Souche 1	Souche 2	Souche 3	Souche 4	Souche 5
Souche 1	1				
Souche 2	0,368	1			
Souche 3	0,941	0,08	1		
Souche 4	0,111	0,000	0,451	1	
Souche 5	0,474	0,006	0,904	0,931	1

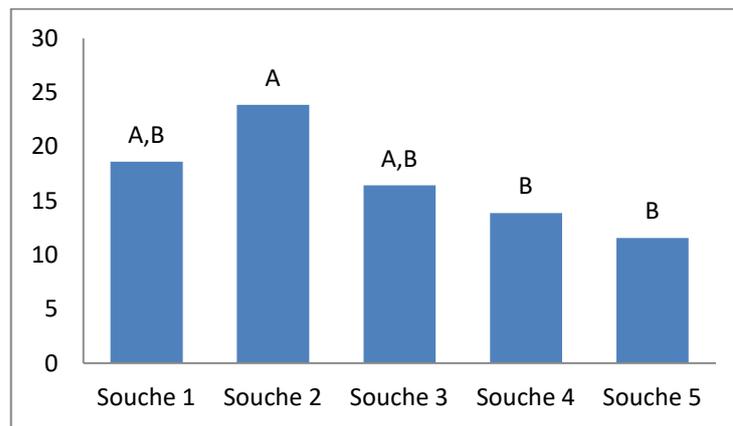


Figure 35: Regroupement des souches selon la production de biomasse

(A : production importante B : production faible. A, B : production moyenne)

Le taux de protéines dans le milieu ne varie pas significativement en fonction des souches ($P = 0,489$). Alors que la valeur de P pour la variation des protéines en fonction de milieu de culture est de 0,001 ; la différence est hautement significative.

Le test de **Tukey** montre que la variation est significative entre le milieu caprin avec le milieu bovin et camelin et aucune signification entre le milieu bovin et camelin (**Tab. XX**).

La figure 36 permet de regrouper les milieux de culture utilisés dans la production enzymatique en deux catégories ; le milieu caprin (Groupe A) est caractérisé par un taux élevé de protéines lors de la fermentation. Alors que les milieux bovin et camelin se caractérisent par des taux plus faibles.

Tableau XX : Tests simultanés de Tukey pour les différences de moyennes (Protéines vs Milieux)

	Cm	Cp	Bv
Cm	1		
Cp	0,000	1	
Bv	0,978	0,001	1

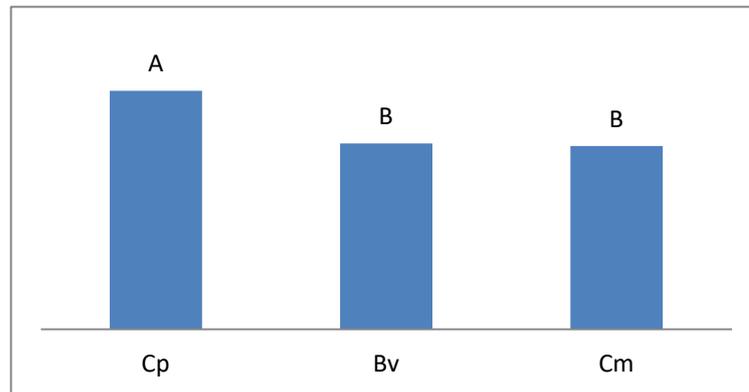


Figure 36: Regroupement des milieux selon la teneur en protéines

(A : taux élevé B : Taux faible)

La valeur de P pour la variation de l'activité amylasique en fonction des souches sélectionnées est de 0,000 et celle en fonction des milieux de culture utilisés est de 0,0298. Ces deux valeurs sont supérieures au seuil de signification ($p < 0,05$) ; ceci montre que la variation de taux des sucres dans le milieu n'est pas significative en fonction des souches et du milieu de culture.

Le test de **Tukey** montre que la variation est significative entre le milieu caprin avec le milieu bovin et camelin et entre les souches 1 et 2 avec les autres souches (**Tab. XXI, XXII**).

Les figures **37** et **38** illustrent le regroupement des milieux et des souches en fonction de l'activité enzymatique. Le milieu caprin, ainsi que les souches 1 et 2, sont regroupés dans la catégorie A (forte activité).

Tableau XXI: Tests simultanés de Tukey pour les différences de moyennes (Activité vs Souches)

	Souche 1	Souche 2	Souche 3	Souche 4	Souche 5
Souche 1	1				
Souche 2	0,573	1			
Souche 3	0,000	0,000	1		
Souche 4	0,000	0,000	0,095	1	
Souche 5	0,000	0,000	0,077	1	1

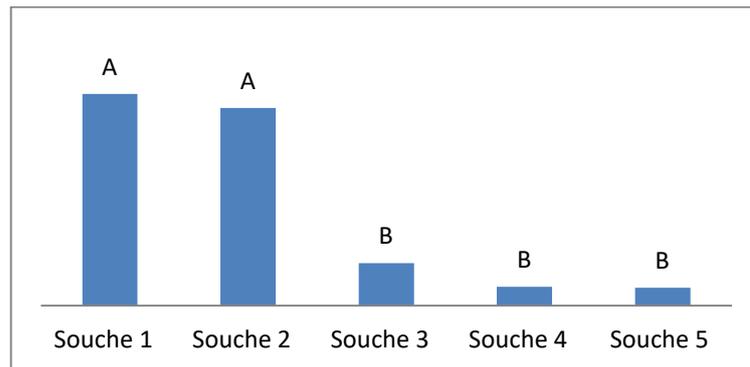


Figure 37: Regroupement des souches selon l'activité enzymatique

(A : Activité forte. B : Activité faible)

Tableau XXII: Tests simultanés de Tukey pour les différences de moyennes (Activité vs Milieux)

	Cm	Cp	Bv
Cm	1		
Cp	0,012	1	
Bv	0,979	0,007	1

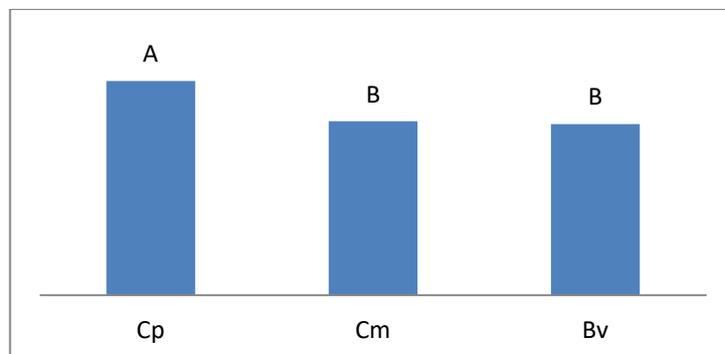


Figure 38: Regroupement des milieux selon l'activité enzymatique

(A : Activité forte. B : Activité faible)

3.4.3. Discussion

Le pH initial du milieu représente un facteur important de fermentation. Les résultats montrent son influence sur les paramètres de croissance des deux souches d'intérêt étudiées. Les résultats enregistrés dans ce contexte, sont de nature à suggérer que le pH 5 est plus convenable au développement de ces souches. Cette constatation expérimentale est confortée par les travaux de **DUBEY et al. (2000)** sur *Aspergillus niger* et *Thermobifida fusca*.

Toutefois, d'autres auteurs précisent que chaque souche de levure présente un pH optimal de production de biomasse . La variation du pH peut selon ces mêmes auteurs, affecter la perméabilité membranaire et entraîner un ralentissement de l'activité enzymatique et de la croissance des levures du fait de la sensibilité spécifique de chaque souche à ce paramètre. Le pH du milieu est affecté par les processus enzymatiques et le transport des divers composants à travers la membrane. Cependant, ces variations dépendent du type de fermentation, mais en général, la majorité des champignons peut se développer à un pH compris entre 3 et 8.

Outre la croissance microbienne, le pH joue un rôle primordial dans la production de métabolites et ses variations sont indicatrices de changements dans les activités métaboliques du microorganisme (**NOUADRI, 2011**).

Selon **LAGZOULI et al., (2007)**, le maximum de production des enzymes amylolytiques chez *Filobasidium capsuligenum* a été observé dans des milieux présentant des pH allant de 5 à 6.5.

Le pH influe sur l'activité enzymatique soit en :

- modifiant l'intégrité physique de la protéine (perte de conformation native ou dénaturation) ;
- modifiant l'affinité de l'enzyme pour le substrat (changement de la constante de Michaelis : K_m) ;
- faisant varier la vitesse de la réaction enzymatique (modification de la vitesse maximale : V_m) (**SACI, 2012**).

Quand la température du milieu se situe au-dessus ou en dessous de la température requise pour la croissance optimale, l'activité microbienne se voit réduite et le microorganisme peut éventuellement être détruit. **GUPTA et al., (2008)**., rapportent dans le même contexte que la croissance d'une souche de *Streptococcus thermophilus* cultivée sur milieu à base de lactosérum à 42°C est abaissée au-delà et en deçà de cette température.

Le résultat que nous avons obtenu est conforté par celui rapporté par **SINDHU et al. (2009)** qui indiquent qu'une meilleure production d'enzymes amylolytiques par les micromycètes est obtenue avec une gamme de température située entre 30°C et 45°C, avec une production optimale à 35°C.

En effet, dans les systèmes biologiques, la température influence, le déroulement des réactions biochimiques, l'activité des enzymes extracellulaires et le temps de génération et la production enzymatique par voie de conséquence.

L'amidon constitue une source privilégiée de carbone permettant une optimisation de la croissance des souches levurières. Ce processus fermentatif s'accompagne de la production d' α amylase. Selon **SACI (2012)**, la biomasse serait influencée par l'amidon soluble à 1%, considéré comme source adéquate de carbone, provoquant une augmentation de 53%.

Parallèlement, l'assimilation des substrats carbonés, l'amidon en l'occurrence, s'accompagne de la production de métabolites acides ou l'acide organique dont les principaux sont l'acide tartrique, l'acide malique et l'acide citrique (**BOULAL et al., 2017**). En revanche, la présence des sucres réducteurs (glucose et fructose) ainsi que celle du saccharose, dans le milieu réactionnel, bien qu'ils puissent induire la production d' α -amylase, peuvent devenir des répresseurs au-delà de certaines concentrations (**GUPTA et al., 2008**).

L'augmentation de la production de biomasse observée lors de la présente étude, serait vraisemblablement due à l'utilisation de l'amidon comme source de carbone et d'énergie par les souches sélectionnées. L'amidon est en effet considéré comme un substrat idéal de l'induction de l' α -amylase. Il a été démontré également que la présence d'amidon soluble dans les milieux de culture stabilise et protège l'enzyme vis-à-vis de la dénaturation (**SACI., 2012**).

Le suivi de l'évolution des paramètres de culture des souches levurières et de production d' α -amylase en fonction des trois types de lactosérum bovin, caprin et camelin, montre que le pH du milieu a tendance à diminuer au fur et à mesure que la durée d'incubation augmente. Sa valeur se situe dans une fourchette comprise entre pH 3.77 et pH

5.1. Ces résultats sont comparables à ceux rapportés par **KEMASSI (2015)** ; **MESSAOUDI et BEKKARI (2016)** et **ZOUBIRI (2012)** soient pH3.57 à pH4.5; pH3.81 à pH5.04 et pH3.5 à pH5 respectivement.

Dans le même contexte, **SAITO *et al.* (2003)** et **SOCOL *et al.* (1994)** ont enregistré une chute de pH de 5 à 3,8 suite à des fermentations réalisées par *Rhizopus oryzae* ATCC 34612, conduisant à la formation d'acide fumarique et d'acide lactique qui s'accumulent dans le milieu.

Cette baisse de pH est due à la libération d'acides organiques qui acidifient progressivement le milieu (**BOTTON *et al.*, 1990**). Le pH recommence à augmenter pour atteindre la valeur de 5.7. Cette remontée est due à la dégradation protéique et au catabolisme des acides aminés libérant de l'ammoniaque (**LECLERC *et al.*, 1995**).

Dans le cas des milieux où l'on a assisté à une légère élévation de la valeur du pH, au cours de la culture, il semblerait que la dégradation des protéines libérant progressivement des acides aminés hydrolysés ensuite en ammoniaque par désamination en soit à l'origine (**LECLERC *et al.*, 1995**). L'augmentation du pH peut s'expliquer également par la métabolisation des glucides qui libère du CO₂ (**GANCEDO et SENANO, 1989**).

Les variations du pH, peuvent influencer la croissance fongique, soit indirectement en agissant sur la disponibilité de certains nutriments, soit directement par action sur la membrane cellulaire, sachant que la plupart des souches fongiques peuvent ajuster le pH du milieu à leur convenance (**BOIRON, 1996**).

Globalement, la production de biomasse semble passer par trois phases. Les deux premières phases semblent correspondre à celles d'une courbe de croissance classique : la phase de latence et la phase exponentielle. La réduction de la phase de latence à une durée inférieure à 24 h, peut être expliquée par le phénomène d'adaptation et/ou de germination plus rapide de la souche levurière. L'augmentation relativement rapide de la quantité de biomasse dès le deuxième jour d'incubation (à partir de J0+24h), pour atteindre des valeurs maximales représente la phase exponentielle, qui est caractérisée par une accélération de croissance (**SCRIBAN, 1999 ; ZOUBIRI, 2012**).

La diminution de la quantité de biomasse au delà des pics correspond à la phase de déclin correspondant à un épuisement du milieu en ses nutriments et donc à une absence de production cellulaire (**BENSAMIRA, 2006**). Elle se caractérise par la présence dans le milieu, de substances ou déchets sécrétés par les microorganismes, inhibant progressivement

leur croissance jusqu'à l'arrêter (**LECLERC et al., 1995**). L'accumulation de ces substances d'excrétions, provoque donc une autodestruction des cellules microbiennes entraînant la diminution de leur quantité (**ARNAUD et GUIRAUD, 1999**).

L'allure de la variation des sucres dans le milieu montre une diminution progressive au cours de la culture pour toutes les souches sélectionnées. Ces résultats sont en accord avec ceux observés dans l'étude de la production de l' α -amylase des moisissures *Trichoderma reesei* (**MOMEIN et al., 2003**) et *Aspergillus oryzae* (**RAVIYAN et al., 2003**) avec des concentrations des sucres entre 16 et 37 g/l.

Au-delà des premiers jours et avec l'épuisement des sucres fermentescibles, les souches secrètent des enzymes extracellulaires, telles que l' α -amylase leur permettant de dégrader l'amidon pour garantir leur survie (**ZOUBIRI., 2012**).

Les courbes relatives à l'évolution de la teneur en protéines des milieux de culture à base de lactosérum des trois origines et celles de la production de biomasse présentent la même allure. A partir de J0+12h, une augmentation est constatée puis un pic à J0+72h généralement à J0+72h, suivi d'une diminution progressive jusqu'à J0+120h. Cette augmentation est probablement due à la synthèse des enzymes, l' α -amylase en particulier (**ARNAUD et GUIRAUD, 1999**). En outre, elle semble compatible avec les cinétiques de croissance et de l'activité amylasique.

Durant la phase de déclin, la concentration en protéines chute à environ 2.5 g/l suite à l'action protéolytique des protéases libérées au cours de la lyse cellulaire (**LECLERC et al., 1995**). L'activité amylasique évolue d'une manière croissante en fonction du temps d'incubation, puis on assiste à une régression de ces valeurs jusqu'au cinquième jour d'incubation.

La production d' α -amylase augmente avec la croissance cellulaire. Ce type de profil, a été rapporté par **TATSINKOU** et ses collaborateurs (**2005**) et par **KOCHER et KATYAL (2003)**, pour des levures ascomycètes cultivées respectivement, sur des milieux à base de blé et de pomme de terre. L'activité amylasique se situe dans un intervalle, selon **SACI (2012)**, allant de 1210.125 à 3469.9 $\mu\text{g/ml/j}$.

Selon **MERABTI (2006)**, l'activité amylasique est de 571 UI par la souche *lipomyces sp* isolée à partir du sol saharien et cultivée dans un milieu à base de rebut de datte.

L'augmentation de l'activité après le 3^{ème} jour d'incubation peut être expliquée par l'épuisement des sucres fermentescibles du milieu de fermentation, ce qui permet aux souches de sécréter des enzymes extracellulaires, telles que l' α -amylase leur permettant de dégrader l'amidon pour garantir leur survie (ZOUBIRI, 2012). Elle peut être aussi expliquée par le fait que, ces levures sont en phase exponentielle de croissance (RAMACHANDRAN *et al.*, 2004).

De même l'abaissement de cette activité est due au changement des conditions de la fermentation (CHANG *et al.*, 1995), ceci qui peut causer une inactivation d' α -amylase, due à l'interaction avec d'autres métabolites (enzymes, telles que les protéases ou substances toxiques) sécrétés dans le milieu, ou aux changements de pH affectant négativement le rendement en α -amylase (HAQ *et al.*, 2002; LECLERC *et al.*, 1995).

Aussi, la diminution peut être expliquée par le fait qu'au début de fermentation, les souches utilisent les nutriments facilement assimilables, tels que les sucres fermentescibles du sirop de dattes pour leur croissance (LEVEAU et BOUIX, 1993).

Les tests statistiques montrent que l'évolution des paramètres de l'activité amylasique suit significativement le type de souche et le milieu de culture utilisés. Les souches ; *Candida glabrata* et *Schwanniomyces occidentalis* sont douées d'une forte production de biomasse et d'activité enzymatique (valeur de P). De même, le milieu caprin présente le support le plus convenable pour la production de biomasse et de l' α -amylase, par rapport au milieu camelin et bovin (regroupement des catégories et différences de moyennes).

3.5. Optimisation des paramètres de production de l' α -amylase

Les souches *Candida glabrata* et *Schwanniomyces occidentalis* semblent selon les résultats enregistrés, présenter des activités alfa amylasique plus élevées (maximum de 2500 UI) que celles des trois autres souches (maximum de 400 UI). Parallèlement, le milieu à base de lactosérum caprin semble mieux convenir pour cette activité enzymatique.

Les conditions de culture des deux souches levurières retenues, doivent être optimisées afin de maximiser leur potentiel productif. Dans cette partie, nous avons suivi l'évolution de la biomasse et de l'activité amylasique de *Candida glabrata* et *Schwanniomyces occidentalis* cultivées dans un milieu à base de lactosérum caprin, en fonction de la variation des paramètres du milieu de culture.

3.5.1. Effet du pH initial

L'évolution des paramètres de culture montre que le pH initial du milieu de culture, affecte remarquablement la biomasse et l'activité enzymatique.

On note que, pour *Candida glabrata*, la quantité de biomasse est maximale à pH 5 (36.74 g/l après J0+72 h d'incubation), et à pH 6 (26.41 g/l après J0+72 h d'incubation). Avec des pH de 3 et 7, les quantités de biomasse sont égales respectivement à 12.65 g/l pour une durée d'incubation de 60h et 10.97 g/l après 84h d'incubation.

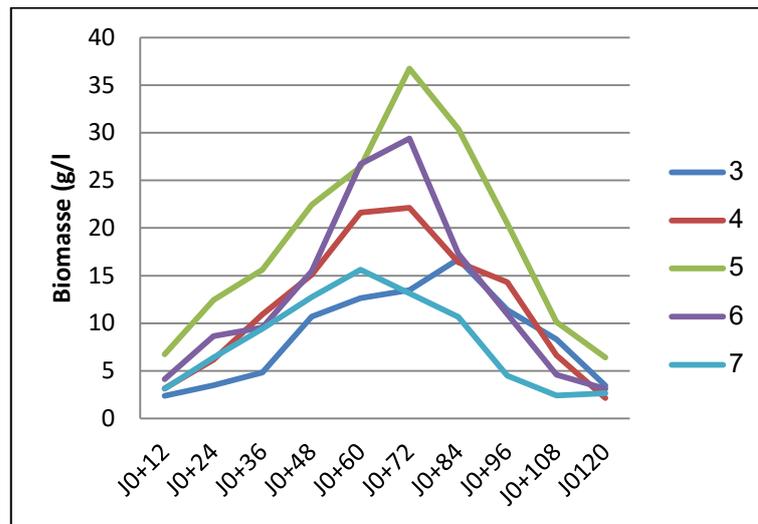


Figure 39 : Evolution de la biomasse de *Candida glabrata* en fonction du pH initial du milieu

Les courbes d'évolution de l'activité alfa amyliasique semblent suivre la même allure que celles relatives à la production de biomasse. En effet, l'optimum est atteint à pH 4 avec une activité alfa amyliasique égale à 1987 UI, après J0+ 60h d'incubation. A pH5, l'activité enzymatique atteint la valeur de 1832,16 UI après J0+72 h d'incubation. Des valeurs plus basses sont obtenues aux pH7 (1000,36 UI) et pH3 (621,3 UI).

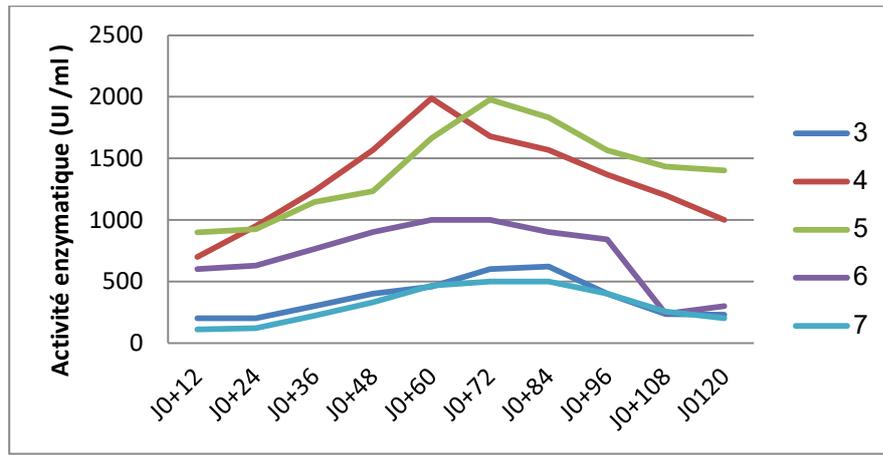


Figure 40 : Evolution de l'activité enzymatique de *Candida glabrata* en fonction du pH initial du milieu

L'évolution des paramètres de culture montre que le pH initial du milieu de culture, affecte remarquablement la biomasse et l'activité enzymatique (fig. 41 et 42). On note que pour, *Schwanniomyces occidentalis*, la quantité de biomasse est maximale à pH 5 (37.1 g/l après J0+48 h d'incubation), et à pH 4 (22.13 g/l après J0+48 h d'incubation). Avec des pH de 3, 6 et 7, les quantités de biomasse sont plus faibles et égales respectivement à 14.64 g/l pour une durée d'incubation de J0+36h, 16.41 pour une durée d'incubation de 24 h et 14.61 g/l après J0+48h d'incubation.

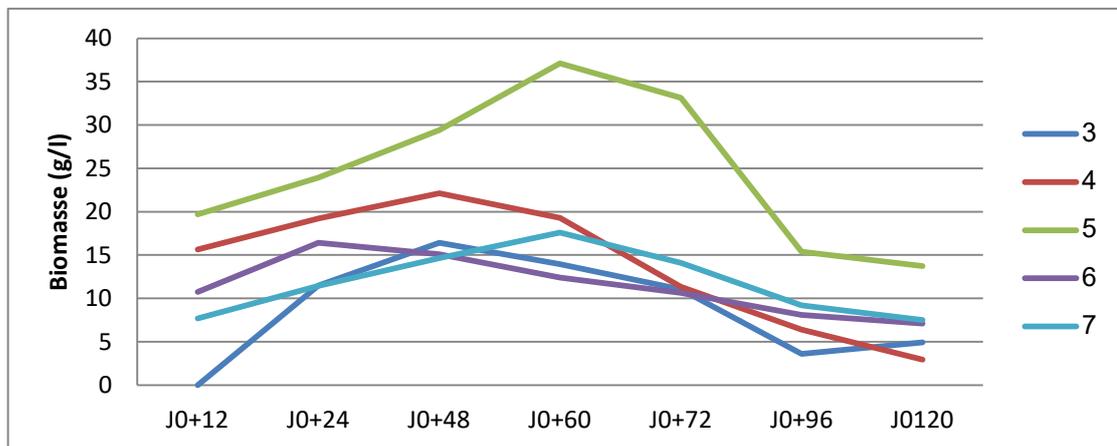


Figure 41 : Evolution de la biomasse de *Schwanniomyces occidentalis* en fonction du pH initial du milieu

Les courbes d'évolution de l'activité alfa amylasique suivent la même allure que celles relatives à la production de biomasse pour les pH 5 et 4. En effet, l'optimum est atteint à pH 4 avec une activité alfa amylasique égale à 1987 UI/ml, après J0+60h d'incubation. A pH5, l'activité enzymatique atteint la valeur de 2236.14 UI après J0+72 h d'incubation. Elle atteint

la valeur de 1799.38 UI /ml à pH4 après J0+60 h d'incubation. Des valeurs beaucoup plus basses et pratiquement stables durant l'incubation, sont obtenues avec les autres pH.

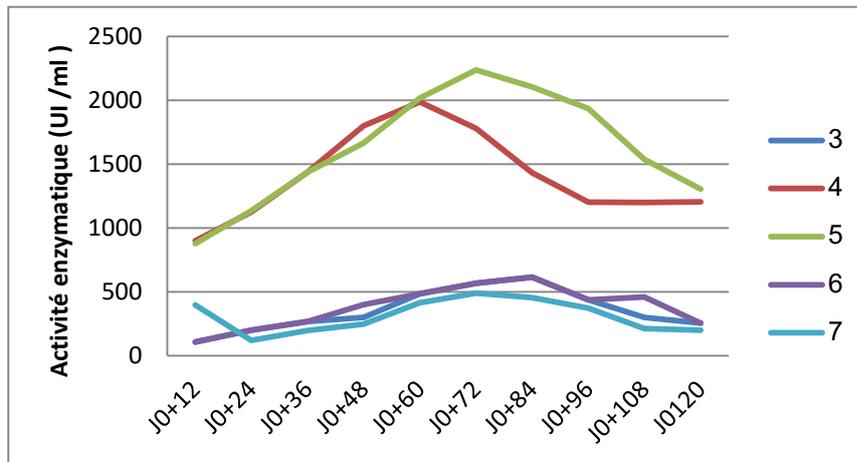


Figure 42 : Evolution de l'activité enzymatique de *Schwanniomyces occidentalis* en fonction du pH initial du milieu

3.5.2. Effet de la température d'incubation

Le suivi de la variation de la biomasse, montre que sa production est optimale quand la culture est incubée à 40°C. Cette constatation est valable pour les deux souches d'intérêt. Globalement la quantité de biomasse produite à 50, 60 et 70°C semble plus faible.

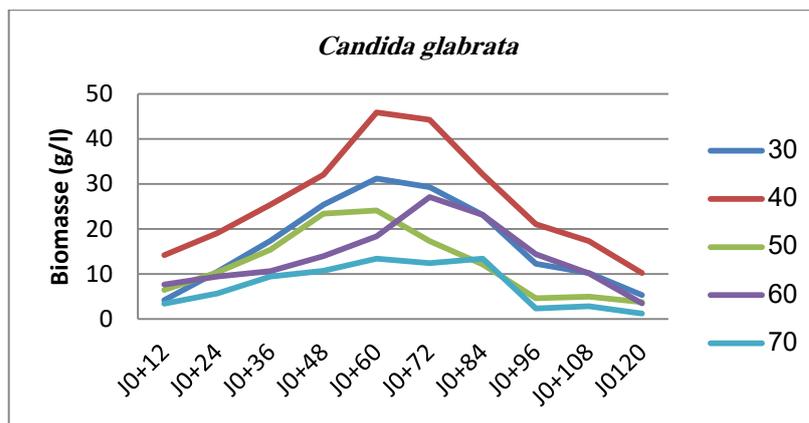


Figure 43 : Evolution de la biomasse de *Candida glabrata* en fonction de la température d'incubation

La production de *Candida glabrata* est en effet plus importante après J0+60h d'incubation (45.9 g/l) à 40°C (fig.43). En revanche, elle est plus faible à 70°C puisqu'elle atteint le maximum après J0+84 h d'incubation avec une valeur de 12.13 g/l.

L'activité alfa enzymatique semble être également dépendante de la température d'incubation (fig.44). Toutefois, il semblerait qu'une température d'incubation égale à 50°C conviendrait mieux à l'activité de l'enzyme puisque la valeur optimale atteinte après J0+84 h d'incubation est égale à 2134.04 UI/ml . En ce qui concerne la température d'incubation qui favorise la production de biomasse (40°C) (fig.43), l'activité enzymatique est tout aussi importante puisque le maximum atteint après une durée d'incubation de seulement J0+60h, est égale à 2000.31 UI. On note parallèlement qu'à 30°C, l'activité maximale (1674.31 UI/ml) est obtenue après une durée d'incubation relativement faible, soit 36 h.

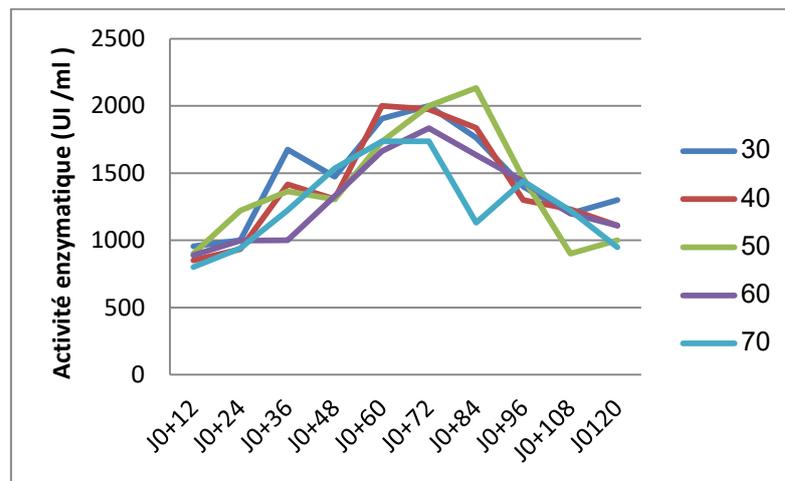


Figure 44 : Evolution de l'activité enzymatique de *Candida glabrata* en fonction de la température d'incubation

La production de biomasse de *Schwanniomyces occidentalis* est également plus importante à 40°C, mais après J0+72h d'incubation (44.1 g/l) (fig.45). A 70°C, elle est comme dans le cas de la première souche, la plus faible puisqu'elle atteint le maximum après J0+72 h d'incubation avec une valeur de 10.763 g/l (fig. 45).

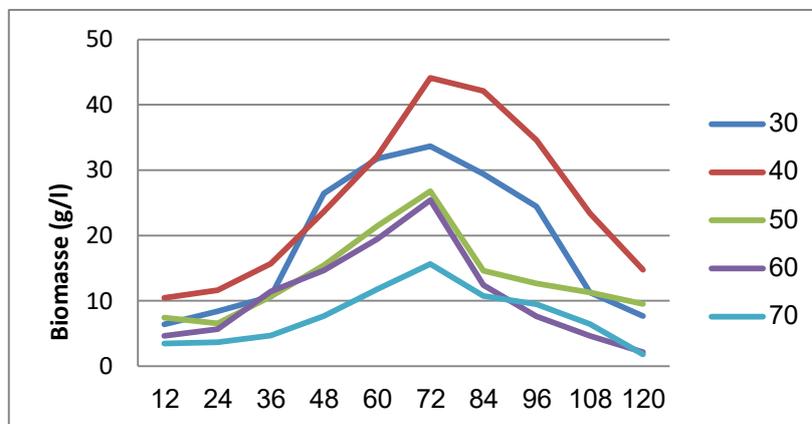


Figure 45: Evolution de la biomasse de *Schwanniomyces occidentalis* en fonction de la température d'incubation

L'activité alfa enzymatique semble également dépendre de la température d'incubation (fig.46). Toutefois, il semblerait qu'une température d'incubation de 40°C conviendrait mieux à l'activité de l'enzyme puisque la valeur maximale atteinte après J0+60 h d'incubation est égale à 2254 UI/ml, donc plus intéressante par rapport à 2000.31 UI/ml enregistrée pour *Candida glabrata* à la même température. L'activité enzymatique de l'α amylase produite par *Schwanniomyces occidentalis* ne semble pas être affectée avec les autres températures d'incubation comme dans le cas de *Candida glabrata*. En effet toutes les courbes présentent une même allure. Le maximum d'activité enregistré entre J0+48h et J0+72 h, est affiché autour de 2000 UI/ml.

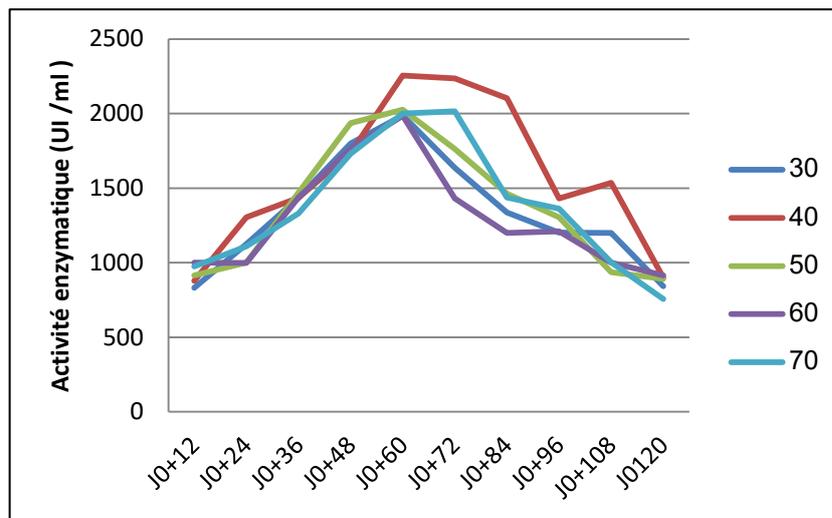


Figure 46 : Evolution de l'activité enzymatique de *Schwanniomyces occidentalis* en fonction de la température d'incubation

3.5.3. Influence de la concentration en substrat

La production de biomasse ainsi que l'activité enzymatique sont dans le cas des deux souches d'intérêt, affectées par la concentration en substrat (fig. 47, 48, 49 et 50).

A travers la figure 47, il semblerait que les concentrations d'amidon de l'ordre de 3, 4 ou 5%, permettent une production optimale de biomasse. La valeur maximale de 45.36 g/l est, dans les trois cas, atteinte après une durée d'incubation de J0+72 h. Toutefois, avec une concentration de 4 %, une quantité de biomasse égale à 44.61g/l est obtenue après J0+60h d'incubation.

La culture en milieu à base de lactosérum caprin à une concentration de substrat de 1 et 2% semble affecter la production de *Candida glabrata*. En effet, le maximum de biomasse

(28.31 et 28.69 g/l respectivement) est obtenu dans ces deux cas comme avec les autres concentrations en substrat, après une durée d'incubation de J0+72h.

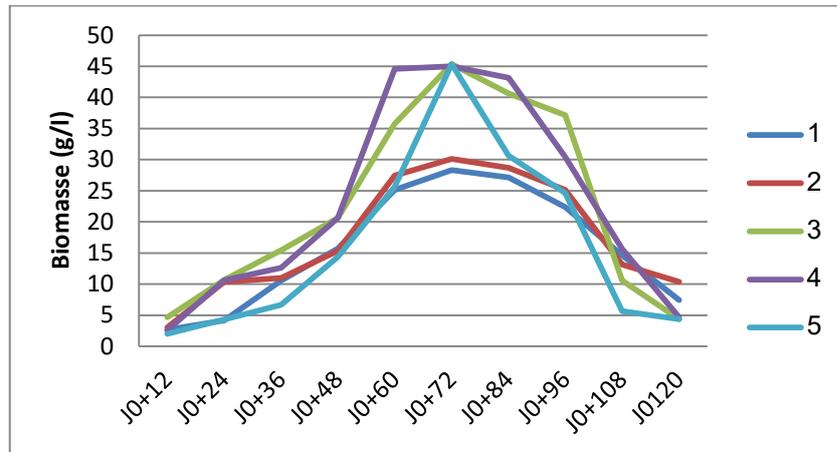


Figure 47: Evolution de la biomasse de *Candida glabrata* en fonction de la concentration du milieu de culture en substrat

Concernant l'activité enzymatique, le meilleur résultat est obtenu avec une concentration en substrat égale à 3% (2796 UI/ml après J0+60h d'incubation). Il est suivi par celui obtenu avec une concentration du milieu de culture en amidon égale à 4 puis 5% (2674 UI/ml environ après respectivement 60 et 72h d'incubation). Les concentrations de 2 et 1% ont donné des valeurs d'activité enzymatique plus faibles, soient respectivement 1834.1 et 2222.3 après J+72 et J0+108 h d'incubation (fig.48).

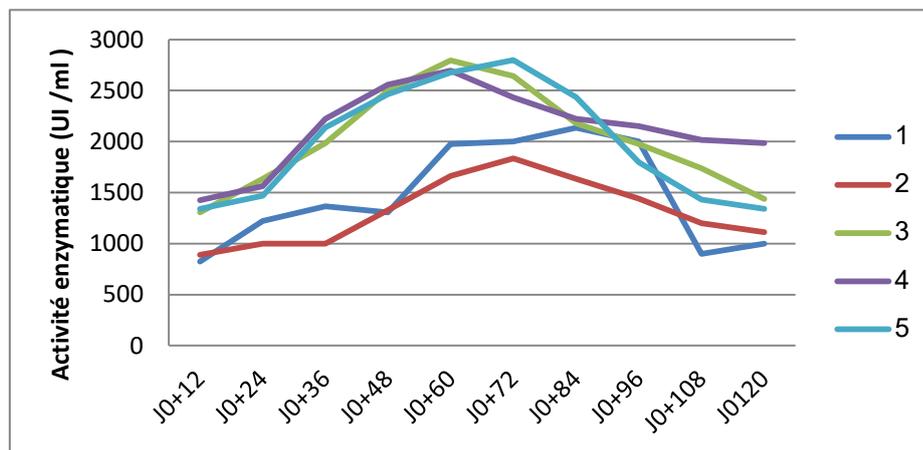


Figure 48 : Evolution de l'activité enzymatique de *Candida glabrata* en fonction de la concentration du milieu de culture en substrat

L'évolution de la biomasse, pour la souche *Schwanniomyces occidentalis*, est caractérisée par une augmentation progressive jusqu'à J0+72h et J0+60 pour donner des valeurs maximales (47.68 g/l avec 1% et 44.61g/l avec 2% de substrat) (fig.49). Les

concentrations à 3,4 et 5% donnent des valeurs de biomasse plus faible, avec un maximum de 26.45g/l après J0+72 d'incubation.

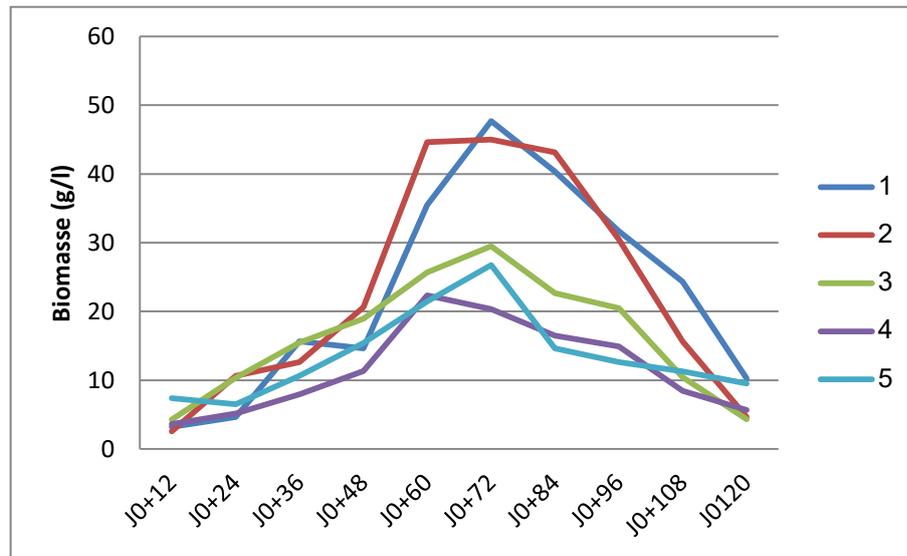


Figure 49: Evolution de la biomasse de *Schwanniomyces occidentalis* en fonction de la concentration du milieu de culture en substrat

Le suivi de l'évolution de l'activité enzymatique, montre que des valeurs maximales égales à 2674.3 UI /ml à J0+60h ont été enregistrées avec des concentration de substrat égales à 3, 4 et 5%.. Des valeurs plus faibles ont été enregistrées (1985.6 UI /ml à J0+60h) en utilisant des concentrations en substrat égales à 1 et 2% (Fig.50).

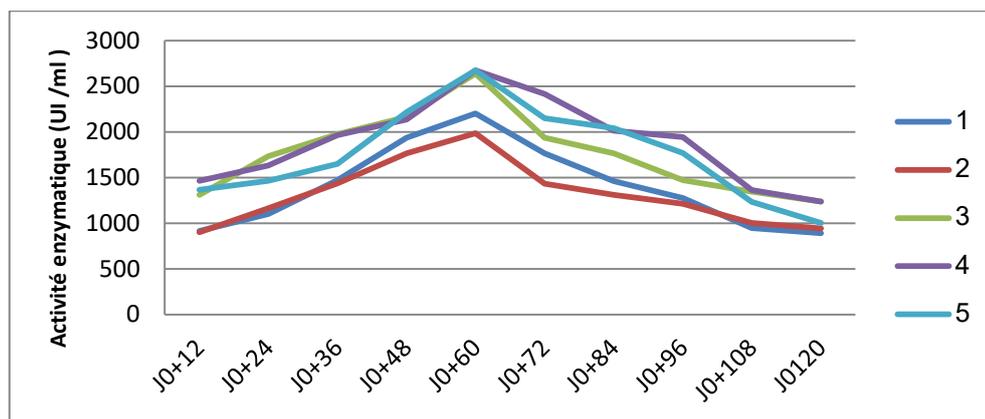


Figure 50: Evolution de l'activité enzymatique de *Schwanniomyces occidentalis* en fonction de la concentration du milieu de culture en substrat

3.5.4. Influence de la concentration du milieu de culture en extrait de levure

La concentration en extrait de levure du milieu de culture semble affecter beaucoup plus l'activité enzymatique que la biomasse levurière. On note, pour les deux souches

cultivées, que la biomasse est très faible en concentration d'extrait de levures de 0 et 1% .De même les concentrations de 2, 3 et 4% donnent des courbes de biomasse assez proches.

La culture de *Candida glabrata* dans un milieu à base lactosérum caprin, non enrichi et celui enrichi avec de l'extrait de levure % en, donne une quantité de biomasse assez faible avec un maximum de 17.58g/l à J0+48h. A la fin de fermentation on assiste à des quantités de biomasses très faibles atteignant des taux proches de 2 g/l à J0+120h).Les concentrations de 2, 3 et 4% en extrait de levure, donnent en revanche, des quantités de biomasse plus élevées, à savoir une quantité de 36.57 g/l à J0+72.

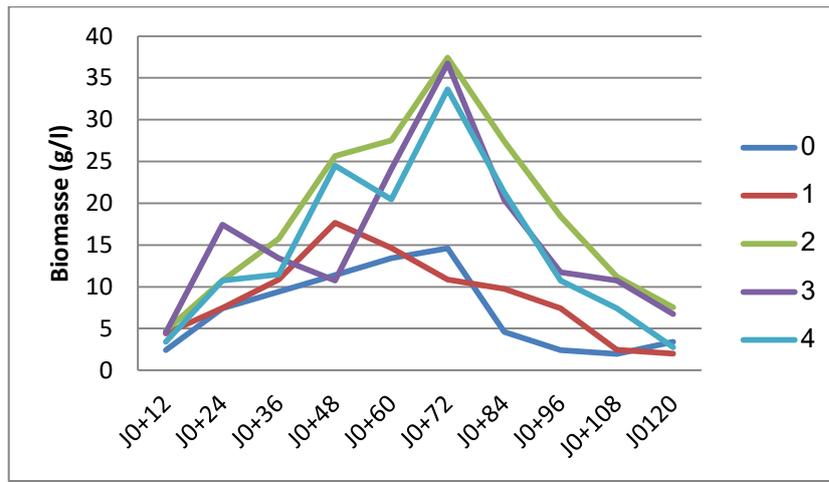


Figure 51: Evolution de la biomasse de *Candida glabrata* en fonction de la concentration du milieu en extrait de levure

Parallèlement, les résultats indiquent que l'activité enzymatique est affectée en l'absence d'extrait de levure (maximum 207.96 UI /ml à J0+72h). Par contre, l'addition d'extrait de levure à raison de 1, 2, 3 et 4% aux milieux de culture entraîne une amélioration de cette activité (maximum de 2134.75 UI /ml à J0+84h) (Fig.52).

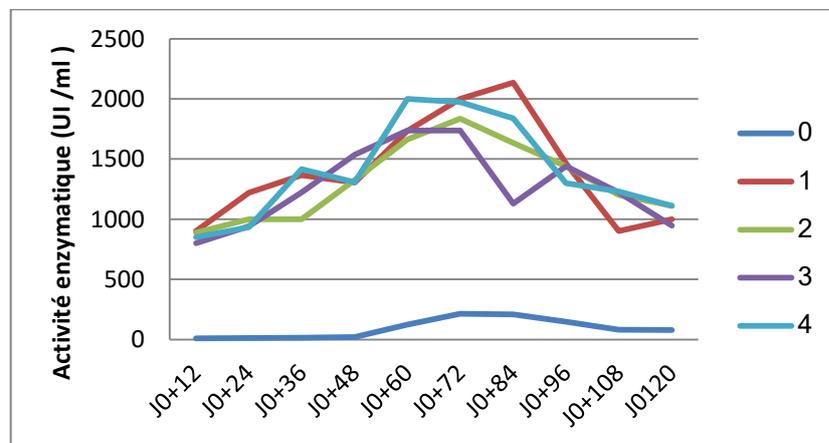


Figure 52: Evolution de l'activité enzymatique de *Candida glabrata* en fonction de la concentration du milieu en extrait de levure

L'évolution de la biomasse de *Schwanniomyces occidentalis* présente une fluctuation en fonction de la concentration de l'extrait de levure et du temps d'incubation. Généralement on note que les milieux non enrichis et ceux additionnés de 1% d'extrait de levure, permettent l'obtention de quantité de biomasse plus faibles puisque situées autour de 17 g/l à J0+84h. Les additions de 2, 3 et 4% semblent améliorer la production de biomasse puisque les quantités enregistrées arrivent à atteindre une valeur maximale de 39.75 g/l à J0+84h avec 3% d'extrait de levure(Fig.53).

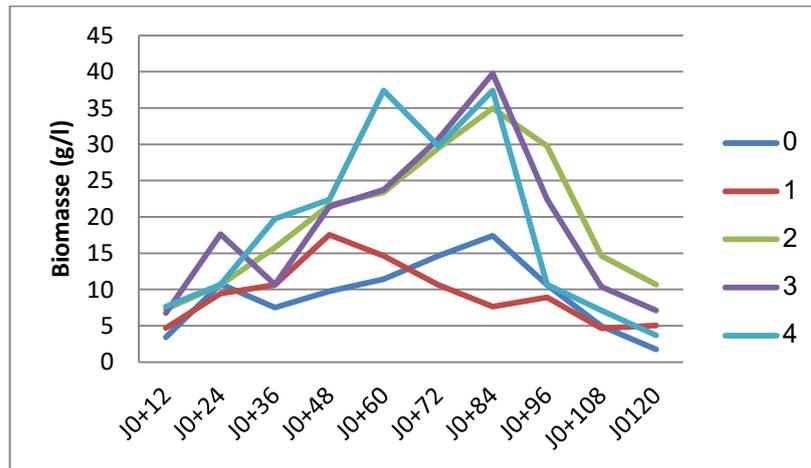


Figure 53: Evolution de la biomasse de *Schwanniomyces occidentalis* en fonction de la concentration du milieu en extrait de levure

L'évolution de l'activité présente la même allure que celle de *Candida glabrata*. L'absence d'addition d'extrait de levure donne des valeurs très faibles avec un maximum de 390.47 UI/ml à J0+72h. Les concentrations 1, 2, 3 et 4% améliorent les valeurs enregistrées en donnant à J0+84h des valeurs autour de 2236.41 UI/ml (Fig.54).

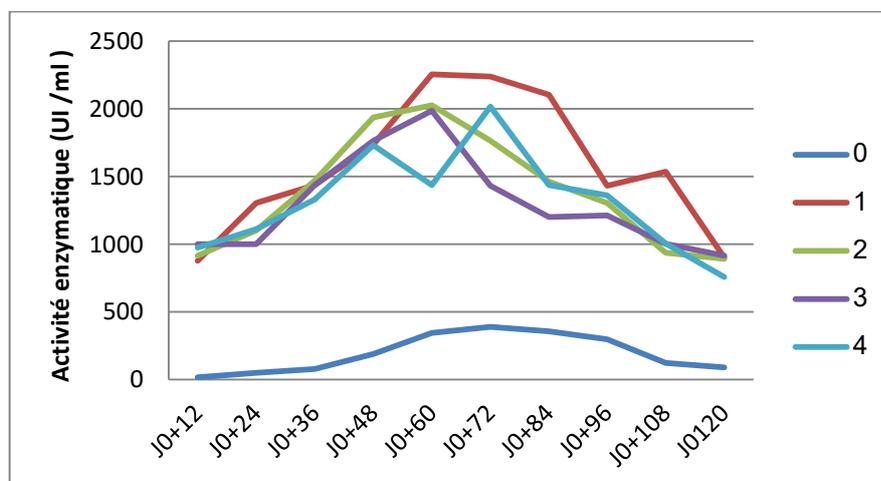


Figure 54: Evolution de l'activité enzymatique de *Schwanniomyces occidentalis* en fonction de la concentration du milieu en extrait de levure

3.5.5. Effet de la concentration de l'inoculum

La production de biomasse et l'activité enzymatique des deux souches, en fonction de la concentration de l'inoculum, semblent être affectées par la concentration en inoculum mais de façon différente. On note que l'activité amylasique présente la même allure pour tous les milieux utilisés et que la concentration de l'inoculum n'affecte pas cette dernière. La production de dans le cas de *Candida glabrata*, augmente avec la concentration utilisée de l'inoculum.

Des valeurs plus élevées sont enregistrées avec des inocula à raison de 3 et 4%, à savoir 50.37 g/l à J0+72h. Les concentrations de 1 et 2% donnent une évolution de biomasse plus lente avec un maximum de 45.75 g/l à J0+96h. En outre, la quantité de biomasse nettement plus faible en utilisant une quantité de 0.5% d'inoculum (17.6 g/l à J0+60h) (Fig.55).

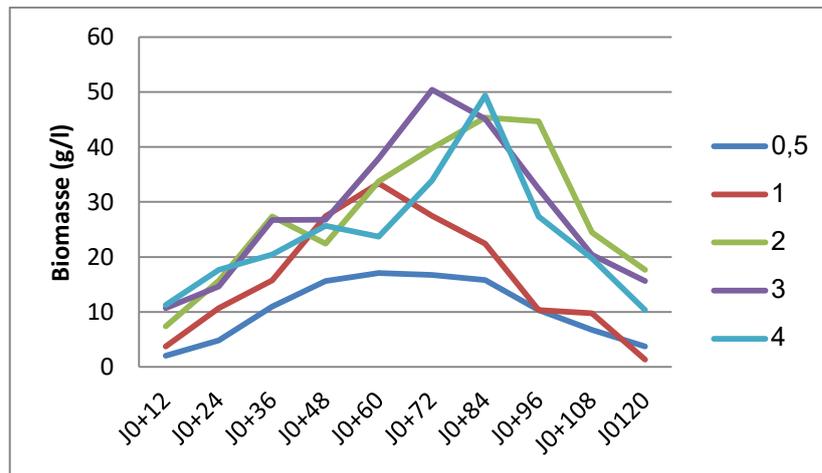


Figure 55: Evolution de la biomasse de *Candida glabrata* en fonction de la concentration de l'inoculum

La figure 56, illustrant l'évolution de l'activité enzymatique, montre des allures similaires des courbes avec quelques fluctuations et ce pour toutes les concentrations utilisées. Toutefois, avec une activité maximale de 2134.04 UI est enregistrée à J0+84h avec 2% d'inoculum.

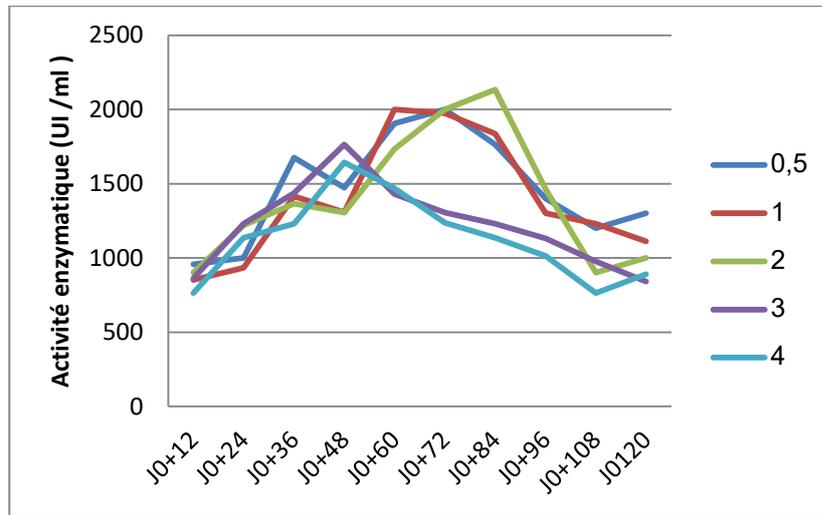


Figure 56: Evolution de la biomasse de *Candida glabrata* en fonction de la concentration de l'inoculum

La culture de *Schwanniomyces occidentalis* dans les milieux à différentes concentration d'inoculum, donne la quantité de biomasse la plus élevée avec concentration de 3 et 4%, avec un maximum de 45.61g/l à J0+72h (Fig.57). La concentration de 0.5% donne des valeurs plus faibles, à savoir 16.79 g/l à J0+72h.

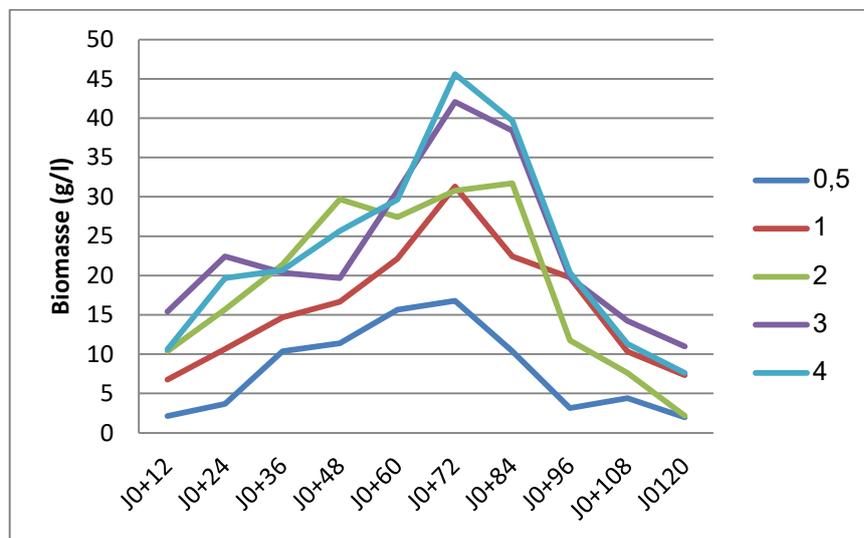


Figure 57: Evolution de la biomasse de *Schwanniomyces occidentalis* en fonction de la concentration de l'inoculum

L'allure de l'évolution de l'activité enzymatique illustrée dans la figure 58, est similaire à celle de *Candida glabrata*. Pour toutes les concentrations (0.5, 1, 2, 3 et 4%) on assiste à une augmentation de cette activité pour atteindre une valeur maximale de 2254 UI à J0+60h. Une diminution des ces valeurs jusqu'à 763UI est constatée à J0+120h (fig.58).

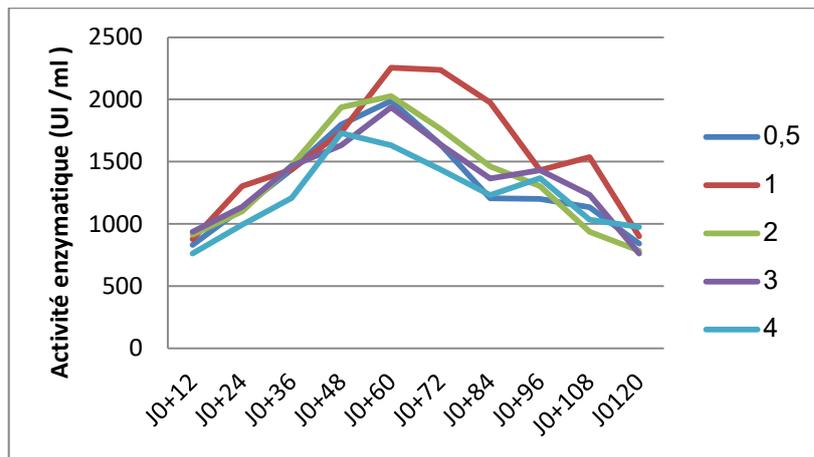


Figure 58: Evolution de la biomasse de *Schwanniomyces occidentalis* en fonction de la concentration de l'inoculum

3.5.6. Analyse statistique des résultats relatifs à l'optimisation

Pour les deux souches sélectionnées, l'utilisation du test de **Kruskal-Wallis** permet de vérifier l'évolution des paramètres de culture (biomasse et activité enzymatique) en fonction des conditions du milieu de fermentation adoptés (effet de pH, de la température, concentration de substrat, concentration de l'inoculum). Ce test permet de déterminer si les différences entre les médianes sont statistiquement significatives en calculant la valeur de P.

La valeur de P pour la variation de la biomasse en fonction du pH initial de milieu est égale à 0,024. La variation de la biomasse en fonction de pH est significative ($P < 0,05$).

La variation de la quantité de biomasse en g/l en fonction du pH initial du milieu indique que le pH 5 permet l'obtention d'une meilleure production. Les pH 4 et 5 permettent une production moyenne. La production faible a été enregistrée avec les pH 3 et 7 (fig. 59).

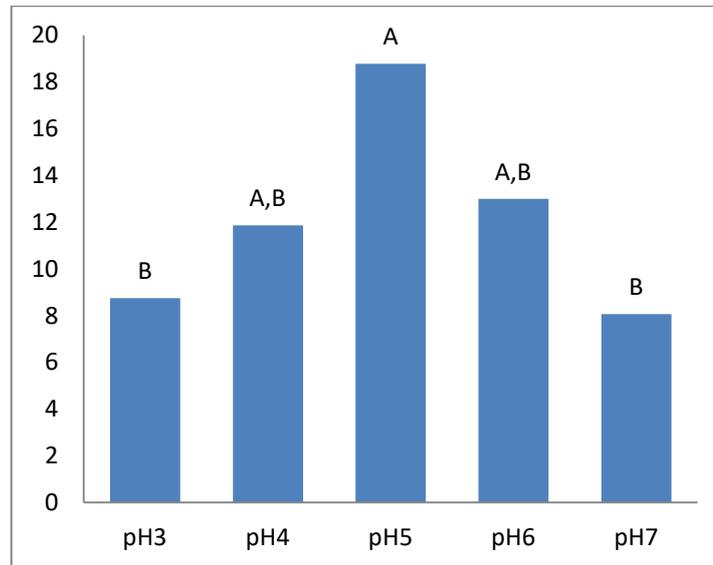


Figure 59: Variation de la production de biomasse en fonction du pH initial du milieu

(A : production importante B : production faible. A, B : production moyenne)

La variation de l'activité enzymatique en fonction du pH initial de milieu est significative puisque P est égale à 0.004 ($P < 0,05$). On note que le pH 4 et 5 donnent une activité amylasique forte (Groupe A) et que les autres milieux (à pH 3,6 et 7) donnent des valeurs plus faibles (Fig.60).

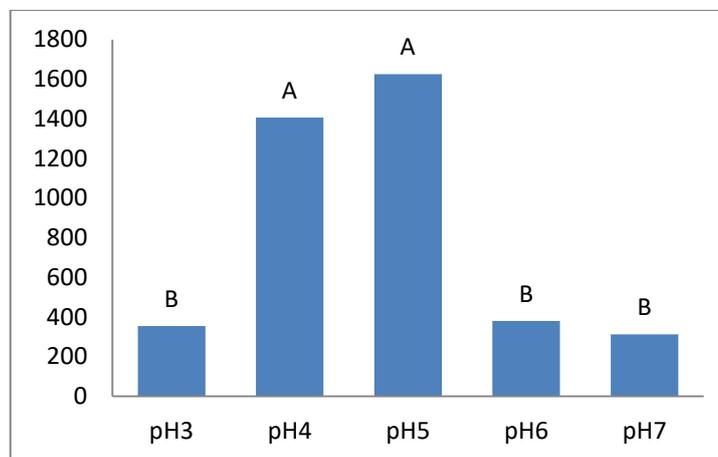


Figure 60: Variation de l'activité enzymatique en fonction du pH initial du milieu

(A : Activité forte B : Activité faible)

Pour les deux souches sélectionnées, la variation de l'activité enzymatique en fonction de la température d'incubation n'est pas significative puisque de P égale à 0.783 est supérieur au seuil de signification.

En revanche, la variation de la biomasse en fonction de la température d'incubation est significative ($P = 0.003$). La figure 61 indique que la température de 40°C donne une production de biomasse importante (Groupe A) et que l'incubation à 50, 60 et 70°C affecte cette production.

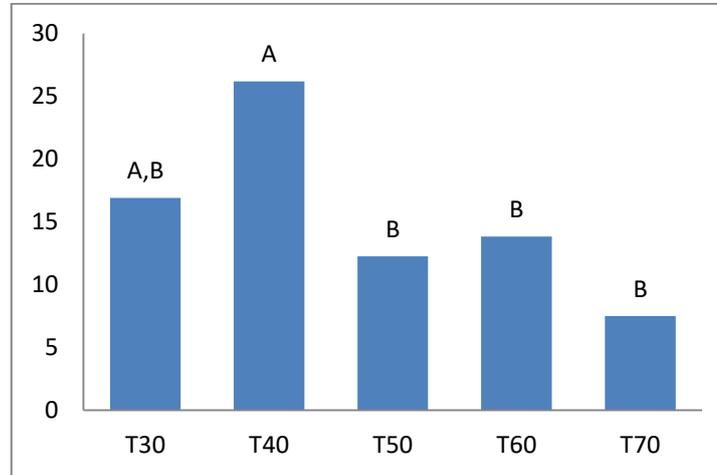


Figure 61: Variation de la production de biomasse en fonction de la température d'incubation

(A : production importante B : production faible. A, B : production moyenne)

La variation de la biomasse en fonction de la concentration en amidon ($P = 0.717$) n'est pas significative ($P > 0.05$). Par contre la variation de l'activité amylasique en fonction de la concentration de du substrat est selon l'analyse de la variance, très hautement significative au seuil $P \leq 0.001$.

Les concentrations en substrat de 1 et 2% donnent une activité moyenne (Groupe A, B). Les concentrations de 3, 4 et 5% donnent des valeurs plus élevées (Activité forte). Il est à signaler que cette activité s'améliore en augmentant la concentration du substrat dans le milieu de fermentation (fig.62).

Le suivi de la variation de la biomasse en fonction de la concentration en extrait de levure dans le milieu de culture, montre que la valeur de P est de 0.001, ce qui permet de conclure que la biomasse varie très significativement en fonction de la concentration d'extrait de levure.

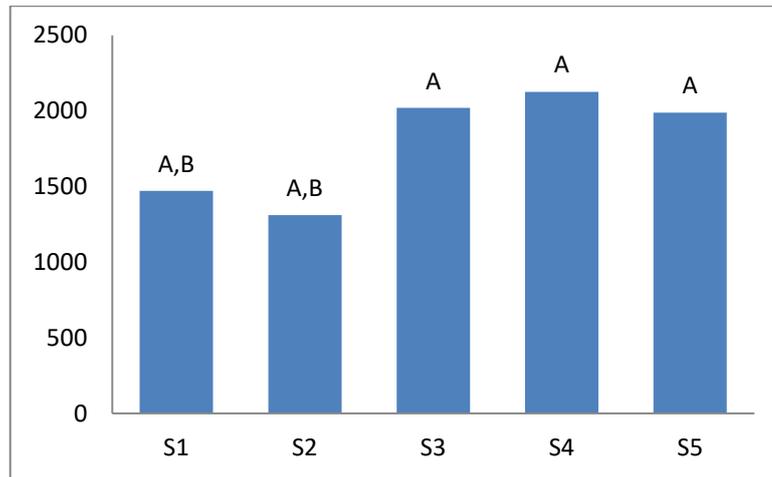


Figure 62: Variation de l'activité enzymatique en fonction de la concentration du substrat

(A : Activité forte. A, B : Activité moyenne)

La figure 63 représente la variation de biomasse en fonction de la concentration de l'extrait de levure. On note que la quantité importante de biomasse a été obtenue avec l'addition de l'extrait de levure à raison de 2% (Groupe A). Les milieux non supplémentés en extrait de levure donnent des quantités de biomasse très faibles.

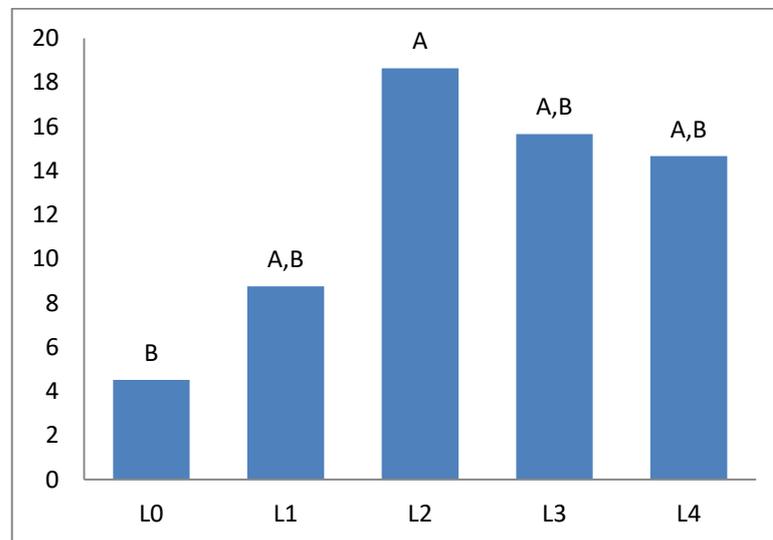


Figure 63: Variation de la production de biomasse en fonction de la concentration de l'extrait de levure

(A : production importante. A, B : production moyenne)

Par ailleurs, la valeur de P pour la variation de l'activité enzymatique en fonction de la concentration de l'extrait de levure est de 0.000, ceci montre que cette variation

est très hautement significative. La figure 64 montre que la concentration de levure de 0% affecte significativement cette activité en enregistrant des valeurs très faibles (Groupe B), alors que les autres concentrations (1, 2,3 et 4) donnent une activité importante (Groupe A)

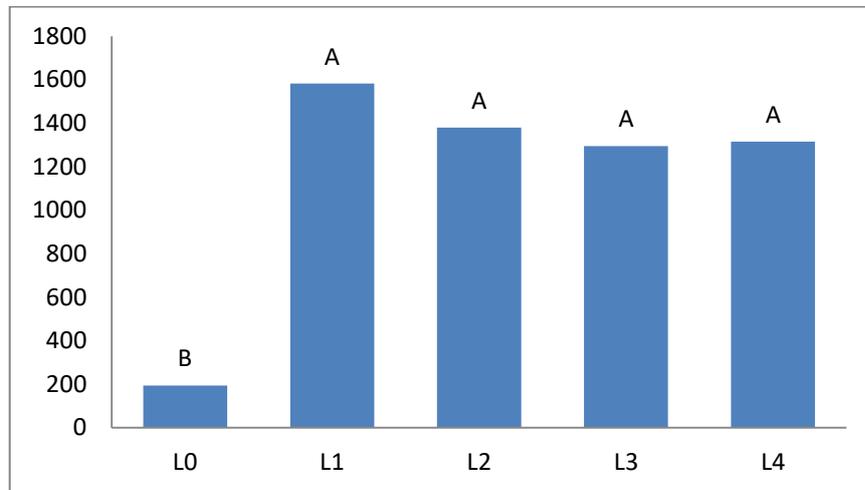


Figure 64: Variation de l'activité enzymatique en fonction de la concentration de l'extrait de levure

(A : Activité forte. B : Activité faible)

La valeur de P pour la variation de l'activité enzymatique en fonction de la concentration de l'inoculum est de 0.45. Cette valeur supérieure au seuil de signification (0.05), montre que cette activité ne varie pas significativement en fonction de la concentration de l'inoculum.

L'analyse statistique indique une variation significative de la quantité de biomasse en fonction de la concentration de l'inoculum ($P= 0.005$). La concentration de l'inoculum de 0.5% donne une faible production de biomasse (Groupe B), alors que les concentrations de 1, 2, 3 et 4 % donnent des quantités de biomasse moyenne et importante (Groupe A et A, B) (fig. 64).

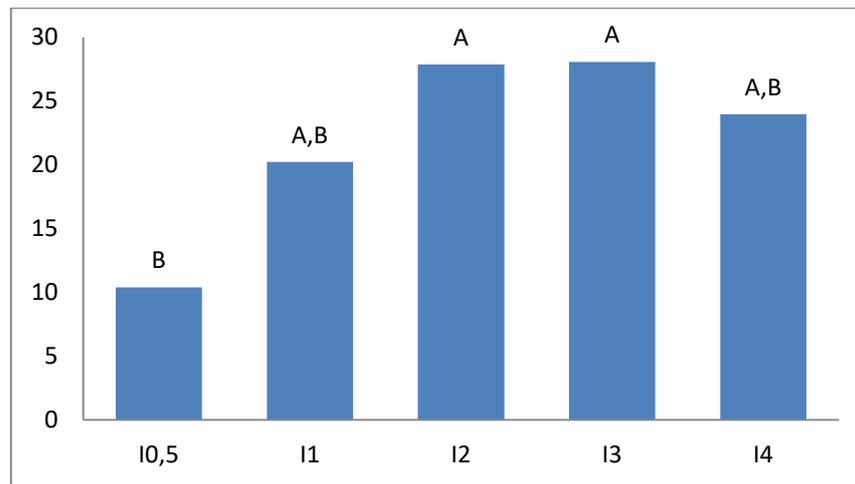


Figure 65: Variation de la production de biomasse en fonction de la concentration de l'inoculum.

(A : production importante B : production faible. A, B : production moyenne)

3.5.7. Discussion

La meilleure activité α amylasique est obtenue avec une concentration en substrat égale à 3% (2796 UI après J0+60h d'incubation). La meilleure quantité de biomasse de *Schwanniomyces occidentalis* est obtenue à J0+72h (47.68 g/l), avec le milieu à 1% de substrat (fig.48).

L'inhibition de la croissance et la production enzymatique à des concentrations d'extrait de levure au-dessus de 10g/l. Ce ralentissement du taux de croissance ainsi que le taux de production peut être attribué à une inhibition par un excès de supplément (extrait de levure). Il est à signaler qu'à des concentrations élevées en extrait de levure, la concentration cellulaire diminue sous l'effet d'une forte toxicité. Selon ADAMBERG *et al.* (2003), le rendement en croissance et en production d'acide lactique, obtenu en milieu à base de lactosérum supplémenté par de l'extrait de levure est amélioré car cette source azotée constitue parallèlement une source de vitamines et de facteurs de croissance

Parmi les différentes propriétés physiologiques de l'inoculum, sa taille peut jouer un rôle important dans le développement du champignon (GLAZEBROOK *et al.* 1992). Un inoculum adéquat permet une initiation rapide de la croissance du mycélium et de la formation de métabolites, ceci par la colonisation totale du milieu par le champignon tout en réduisant l'envahissement des contaminants (RAMACHANDRAN *et al.* 2005).

Nos résultats semblent en accord avec ceux indiqués par **ROUSSOS et RAIMBAULT(1982)** pour la production de la cellulase par *Trichoderma harzianum*. Selon l'auteur, il n'existerait pas de différences significatives entre les activités enzymatiques et les concentrations d'inoculum. Par contre, **DOMINGUES et al, (2000)** rapportent que des concentrations élevées en protéines et en activité enzymatique sont obtenues avec les taux d'inoculum les plus élevés.

Les tests statistiques montrent que l'évolution des paramètres de culture (l'activité amylasique et la biomasse) suit significativement les conditions du milieu de culture utilisés. Les deux souches sélectionnées; *Candida glabrata* et *Schwanniomyces occidentalis* présentent leur meilleure production de biomasse et d'activité à pH 5, à une température d'incubation de 40, à une concentration de substrat supérieurs à 1%, à une concentration de levure de 2% et à une concentration de l'inoculum supérieurs à 1%.

3.6. Purification partielle et étude des propriétés physico-chimiques de l' α -amylase

La caractérisation préliminaire de l'enzyme produite par les souches d'intérêt isolées est réalisée sur le surnageant de culture sur milieu à base de lactosérum caprin, pendant 4 jours à 30°C et conservés à 4°C.

3.6.1. Précipitation au sulfate d'ammonium

Beaucoup de sels sont utilisés pour effectuer la précipitation des protéines telles que les enzymes, par le phénomène de relargage (Salting out). Cependant, le sulfate d'ammonium est le produit le plus largement répandu de par sa forte solubilité, son faible coût et son pouvoir non dénaturant (**NAM SUN WANG, 2001**).

Les résultats de la précipitation par le sulfate d'ammonium sont présentés dans le tableau XXIII.

La cristallisation de l' α -amylase par le sulfate d'ammonium a permis de retenir la fraction saturée à 60 % car elle a donné une activité spécifique maximale de l'enzyme, à savoir 78.88 U/mg pour *Candida glabrata* et 65.2 U/mg pour *Schwanniomyces occidentalis*, avec un degré de purification de 2.73 et de 3.15 respectivement.

SIDKEY et al. (2011) rapportent une activité spécifique deux fois plus élevée pour une α -amylase produite par *Aspergillus flavus* (F₂Mbb) soit 202.05 (U/mg).

Cependant les résultats que nous avons enregistrés semblent assez comparables à ceux trouvés par **NOUADRI (2011)**, qui a travaillé sur l' α -amylase de *Penicillium camemberti* (PL21) , soit une activité spécifique maximale d'enzyme égale à 55.4 U/mg. Cette activité est obtenue par l'auteur, également avec la fraction saturée à 60 %, mais avec un degré de purification plus élevé puisqu'il est égal à 13.8.

Tableau XXIII: Caractérisation des produits issus de la précipitation de l' α -amylase par le sulfate d'ammonium à différentes concentrations

<i>Candida glabrata</i>					
Nature du produit	Volume (ml)	Activité totale (U)	Protéines totales (mg)	Activité spécifique (U/mg)	Degré de purification
Extrait brut	135	84.06	2.91	28.89	1
Précipité à 30 %	25	456	11.27	40.46	1.4
Précipité à 60 %	15	953.62	12.09	78.88	2.73
Précipité à 80 %	15	703.19	20.81	33.79	1.17
<i>Schwanniomyces occidentalis</i>					
Nature du produit	Volume (ml)	Activité totale (U)	Protéines totales (mg)	Activité spécifique (U/mg)	Degré de purification
Extrait brut	127	75,34	3,64	20,69	1
Précipité à 30 %	30	364,14	13,51	26,96	1,3
Précipité à 60 %	12	871,79	13,37	65,2	3,15
Précipité à 80 %	9	715,37	22,34	32,02	1,54

DE MOT et VERACHTERT (1985) ont obtenu pour l' α -amylase de la levure *Filobasidium capsuligenum*, un taux de purification de 2, avec une saturation de 80 %.

RAMACHANDRAN et al., (2004) rapportent que l'enzyme produite par *Aspergillus oryzae* est précipitée à 70 %, avec un taux de purification de 2.08. **MERABTI (2006)** a trouvé pour un degré de purification de 4 et une activité spécifique de 32.2 U/mg pour l' α -amylase produite par *Lipomyces sp.* obtenue avec une saturation de 50 %.

Ces différences peuvent avoir pour origine l'existence d'isoenzymes et donc l'espèce microbienne impliquée.

Cette semi -purification reste toutefois insuffisante pour caractériser les enzymes. Il est donc nécessaire de procéder à l'application des techniques de purification plus affinées telles

que celles décrites par **CHAO-HSUN *et al.* (2004)**, **DAMODARA *et al.*, (2005)** et **EL SAFEY et AMMAR (2004)**, particulièrement si l'enzyme est destinée pour une exploitation alimentaire ou médicale.

Les faibles valeurs des activités enzymatiques et spécifiques des surnageants produits après précipitation au sulfate d'ammonium peuvent être dues en grande partie à l'absence de la dialyse. Cette technique permet en effet, une meilleure séparation de la substance d'intérêt par élimination des sels de sulfate d'ammonium, du milieu.

De ce qui précède, il en ressort que le précipité à 60 % est le plus intéressant. Il a été à cet effet retenu pour la suite des investigations à savoir les essais de caractérisation de l' α amylase produite par les deux souches levuriennes dont les performances ont été mises en évidence.

3.6.2. Etude de quelques propriétés physico-chimiques de l' α -amylase semi- purifiée

La caractérisation physico-chimique de l' α -amylase semi- purifiée est réalisée à travers l'étude des effets, du pH, de la température, de la concentration en enzyme et de celle en substrat, sur l'activité spécifique de l' α -amylase produite par *Candida glabrata* et de *Schwanniomyces occidentalis*.

3.6.2.1. Effet du pH

Il est établi que les réactions enzymatiques sont sensibles au pH du milieu car ce facteur influence le degré d'ionisation du substrat et de la molécule enzymatique, l'effet du pH dépend des groupements ionisables participant à la fixation du substrat, à l'action catalytique et rapport avec l'intégrité de la structure second-tertio-quaternaire de la protéine enzymatique. La variation de pH peut de ce fait, être favorable ou défavorable à l'activité enzymatique (**NOUADRI (2011)**).

L'étude relative à la détermination de l'activité spécifique de la substance d'intérêt faisant l'objet du présent travail en fonction des différentes valeurs de pH a donné les résultats suivants :

Globalement, l'allure des courbes est en forme de cloche. L'activité enzymatique est très faible à pH 3, puis croit progressivement jusqu'à pH 6.0. Au-delà ce pH, l'activité décroît jusqu'à pH 9 où elle atteint une valeur minimale (668.99 $\mu\text{g/ml}$)

- l'enzyme produite par *Candida glabrata* affiche une valeur maximale de l'activité (1242.32 $\mu\text{mol/mn}$) à pH 6.0 (fig.66) ;

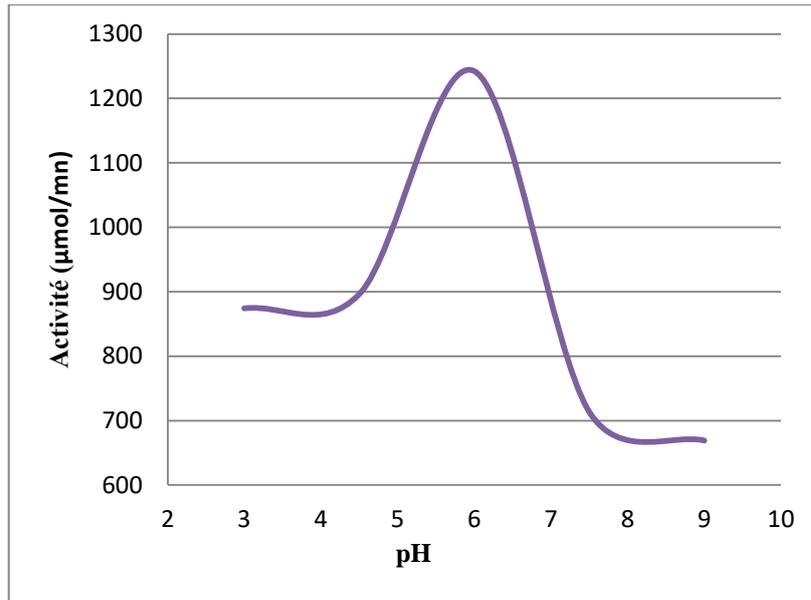


Figure 66: Effet du pH sur l'activité de l'enzyme produite par *Candida glabrata*.

- l'enzyme produite par *Schwanniomyces occidentalis* affiche une valeur maximale de l'activité (1037.39 µmol/mn) à pH 6.0 également (fig.67) ;

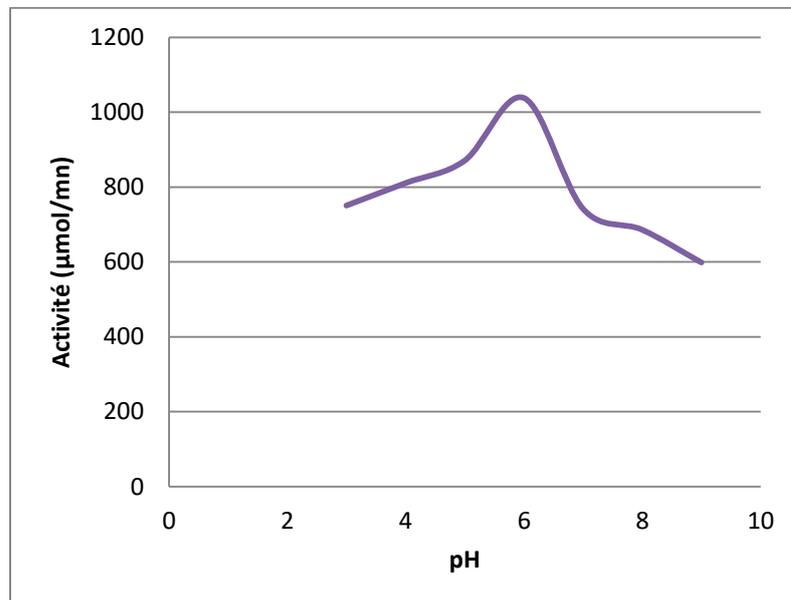


Figure 67: Effet du pH sur l'activité de l'enzyme produite par *Schwanniomyces occidentalis*.

L' α -amylase étudiée est active à des pH compris entre 5.5 et 6.5 et avec un maximum à pH 6. Ces résultats sont confortés par ceux rapportés par **PADMINI *et al.* (2012)** et **SIDKEY *et al.* (2011)** pour l' α -amylase d'*Aspergillus flavus* avec une activité spécifique de 900.00 µg/ml et 52.48 µg/ml respectivement.

En outre, d'autres résultats obtenus avec d'autres espèces fongiques telles que *Penicillium janthinellum* (NCIM 4960) (KUNAMNENI *et al.*, 2005) ; *Thermomyces lanuginosus* (SINDHU *et al.*, 2009) et *Aspergillus niger* (KUMARI *et al.*, 2012), évoquant des valeurs maximales d'activité spécifique de l' α amylase à pH compris entre 5.0-6.0, viennent corroborer les résultats que nous avons obtenus.

Néanmoins, les résultats obtenus diffèrent quelque peu de ceux trouvés par ABOU-ZEID (1997), qui a observé une activité maximale à pH 7.0. De plus, CHESSA *et al.* (1999) ont rapportés que le pH 7.5 était optimal. MALHOTRA *et al.* (2002) ont conclu que l' α -amylase purifiée présente une activité maximale à pH 8.0.

3.6.2.2. Effet de la température sur l'activité de l'enzyme

L'influence de la température sur l'activité spécifique de l' α -amylase, est déterminée en fonction de la température que nous avons fait varier entre 0 et 80 °C. L'enzyme produite par *Candida glabrata* présente une activité maximale (937. 91 $\mu\text{g/ml}$) à 50°C (Fig.68). Une faible activité est enregistrée en deçà et au-delà de 60C°. Elle est égale à 545.51 $\mu\text{mol/mn}$ à 0°C et à 684.64 $\mu\text{mol/mn}$ à 80°C.

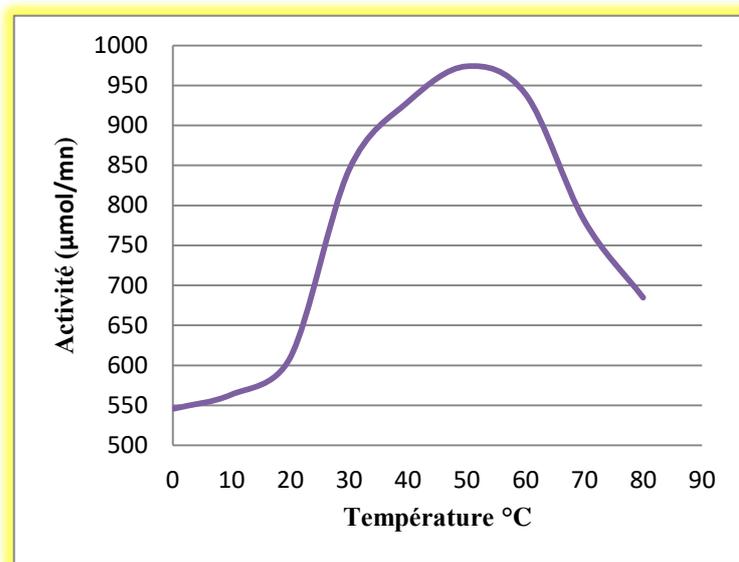


Figure 68: Effet de la température sur l'activité de l'enzyme produite par *Candida glabrata*.

Concernant la souche *Schwanniomyces occidentalis*, la meilleure activité est enregistrée à 50C° (980.71 $\mu\text{mol/mn}$) (fig.69). En plus, on note une certaine stabilité de cette activité à des températures plus élevées (957.51 $\mu\text{mol/mn}$ à 80C°). Il semblerait par conséquent que cette enzyme soit stable.

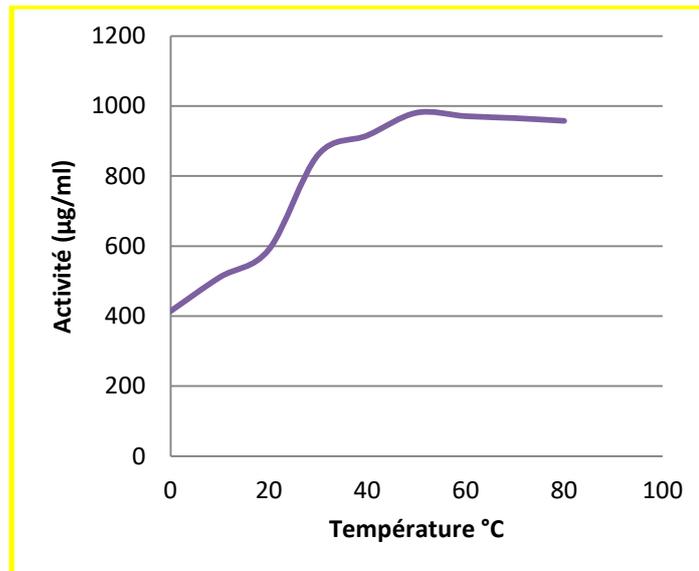


Figure 69: Effet de la température sur l'activité de l'enzyme produite par *Schwanniomyces occidentalis*.

DE MOT et VERACHTERT (1987) ont obtenu le même résultat pour une α amylase produite par *Candida antarctica* (CBS 6678). **KHOO et al. (1994)** ont trouvé que la température optimale pour une α -amylase pure était de 55 °C. **CHAKRABORTY et al. (2000)** ont trouvé que l'activité maximale d'une α -amylase thermostable était observée à 50 °C.

Ce résultat est proche de celui rapporté par **MERABTI (2006)** pour une α -amylase produite par *Lipomyces sp.*

De plus, la température optimale d'activité de l' α -amylase de *Candida glabrata*, faisant l'objet de cette étude est comparable à celle d'autres levures telles que *Cryptococcus flavus* (**WANDERLEY et al., 2004**), *Filobasidium capsuligenum* (**DE MOT et VERACHTERT, 1985**) et *Schwanniomyces alluvius* (**MORANELLI et al., 1987**), dont les activités optimales se manifestent également à 50 °C.

D'autres études menées sur *Lipomyces kononenkoae* et *Lipomyces starkeyi*, montrent que leurs α -amylases ont des températures optimales d'activité se situant respectivement entre 60 et 70 °C (**KELLY et al., 1985 ; PRIETO et al., 1995 et EKSTEEN et al., 2003**).

Récemment, **NOUADRI (2011)** et **PADMINI *et al.* (2012)** ont trouvé un maximum d'activité à 30 °C pour *Penicillium camemberti* (PL21 (70 µg/ml environ) et *Aspergillus flavus* (685.00 µg/ml).

La température optimale des activités enzymatiques spécifiques, varie en fonction de l'espèce microbienne et de son biotope. D'après **TONG *et al.* (1980)**, les amylases ont des températures optimales élevées en comparaison avec d'autres systèmes enzymatiques. **ANDO *et al.* (2002)** rapportent par contre que la température optimale des cellulases fongiques varie entre 40 et 70°C, alors que celle des bactéries varie entre 50 et 100°C.

L' α -amylase produite par *Schwanniomyces occidentalis*, souche sélectionnée lors de la présente étude se caractérise par une stabilité particulière dépassant largement les valeurs rapportées par la littérature. En effet, l'activité spécifique de son α amylase reste importante même à 80°C (957.51 µg/ml).

Cette stabilité s'explique vraisemblablement par l'emplacement géothermique constituant le site d'isolement de cette souche, car, ces Sebkhas thermophiles et halophiles favorisent le développement d'un système enzymatique assez résistant par un renforcement des liens peptidiques en structure secondaire ou des résidus aromatiques dans la structure tertiaire (**SANDGREN, 2004**).

Il est important de rappeler l'importance économique des enzymes thermostables qui se manifeste par leur large application dans les processus industriels telles que l'industrie alimentaire, l'industrie de textile et la bioconversion (**BHAT, 1997 ; MURRAY *et al.*, 2004**)

Généralement, la stabilité des enzymes s'explique également par la présence de certaines liaisons dans leurs structures secondaires et tertiaires (liaisons hydrogènes, liaisons hydrophobes, interactions ioniques, forces de Van Der Waals, liaisons métalliques et ponts dissulfures) déterminées par des séquences particulières en acides aminés situés à des sites spécifiques pour permettre aux enzymes de résister à la dénaturation thermique (**SCRIBAN, 1999**).

Néanmoins, comparativement aux amylases fongiques, celles des bactéries sont plus thermorésistantes. Dans ce contexte, **ANDO *et al.*, (2002)** décrivent une amylase hyper thermostable produite par l'archaebactérie *Pyrococcus horikoshii*, stable à 97 °C avec une activité résiduelle de 80% après 3 heures d'incubation. Il en est de même pour la amylase de *Thermotoga neapolitana* qui garde 73% de son activité à 100°C pendant 4 heures (**BOK *et al.*, 1998 ; XU *et al.*, (2000)**).

Les résultats que nous avons obtenus laissent suggérer que les souches sélectionnées sont productrices d'une substance d'intérêt industriel susceptible de trouver des applications industrielles intéressantes, notamment à cause de son caractère thermostable.

3.6.2.3. Effet de la concentration en enzyme sur l'activité spécifique de l' α amylase

Les résultats relatifs à l'effet de la concentration en enzyme sur la valeur de son activité spécifique sont représentés dans les figures 70 et 71. Il en ressort que l'activité enzymatique de l' α -amylase, produite par les deux souches sélectionnées, semble augmenter avec l'augmentation de la concentration en enzyme. Ces résultats sont confortés par l'observation de **WEST et al. (1967)** qui rapportent que dans une large gamme, la vitesse de l'activité enzymatique est directement proportionnelle à la concentration en enzyme. De nombreux auteurs ont rapporté la même observation qui est en fait en accord avec le comportement général de la plupart des enzymes (**ABD EL-RAHMAN (1990)** ; **EL-SAFEY (1994)** ; **EL-SAFEY et AMMAR (2004)**).

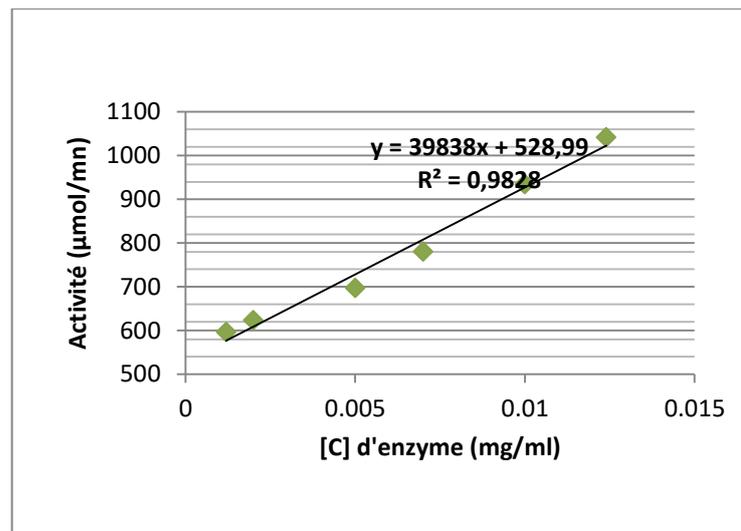


Figure 70: Effet de la concentration en enzyme sur l'activité de l'enzyme produite par *Candida glabrata*.

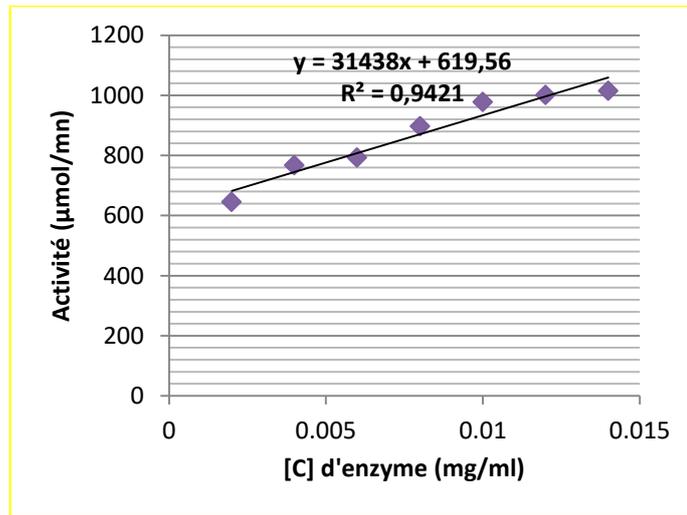


Figure 71: Effet de la concentration d'enzyme sur l'activité de l'enzyme produite par *Schwanniomyces occidentalis*.

3.6.2.4. Effet de la concentration du substrat sur l'activité de l'enzyme

L'activité spécifique assimilée à la vitesse initiale est mesurée à différentes concentrations d'amidon soluble. La figure 72 et 73 indiquent que l'activité maximale est obtenue pour une concentration en substrat de 4 mg/ml avec une activité de 955.94 µmol/mn et 1074.25 µmol/mn pour *Candida glabrata* et *Chwanniomyces occidentalis*, respectivement. Elle fait apparaître une courbe rappelant une hyperbole suggérant que la cinétique est de type Michaélien.

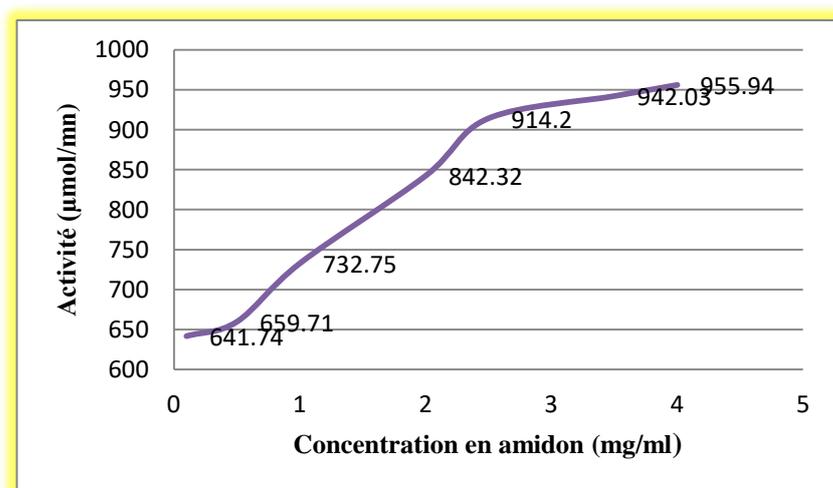


Figure 72: Effet de la concentration du substrat sur l'activité de l'enzyme produite par *Candida glabrata*.

EL-SAFEY et AMMAR (2004) rapportent que l'activité amylasique ou vitesse initiale de la réaction atteint une valeur maximale soit 50.118 $\mu\text{mol}/\text{mn}$ avec une concentration d'amidon soluble égale à 0.2 %. Alors que KUIPER *et al.* (1978) avaient rapporté que l'activité maximale de l' α -amylase été atteinte avec une concentration en substrat égale à 1.67 %. ABD EL-RAHMAN (1990) avait conclu que la concentration d'amidon optimale pour une activité maximale d'enzyme se situait entre 2-3 %.

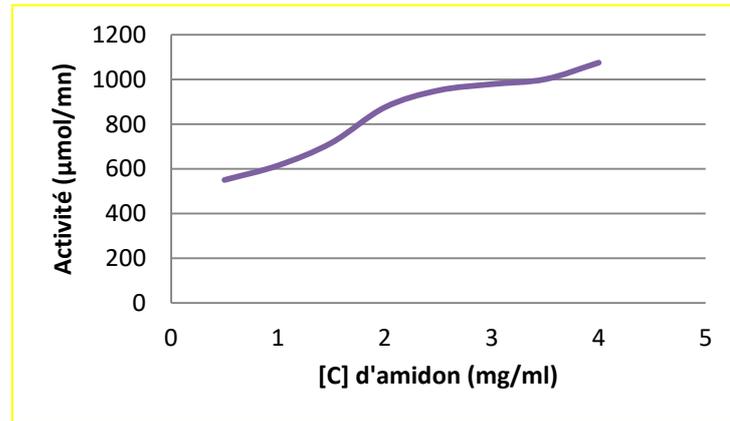


Figure 73: Effet de la concentration du substrat sur l'activité de l'enzyme de l'enzyme produite par *Schwanniomyces occidentalis*.

3.6.2.5. Détermination des constantes cinétiques de l'enzyme

La représentation de Lineweaver et Burk (1934) a permis de déterminer les constantes cinétiques de l'enzyme à savoir la constante de Michaelis (K_m) et la vitesse maximale (V_{max}) en présence d'amidon soluble à des concentrations variant entre 0.1 et 4.0 mg/ml (fig. 74 et 75). Ces constantes sont déterminées à 50 °C et à pH 6 (un tampon phosphate 0.1 M) conditions optimales.

Les droites: $1/\text{activité spécifique}$ en fonction de $1/\text{concentration en substrat}$ répondent à l'équation de la forme $y=ax+b$, une droite qui coupe les deux axes (fig. 74 et 75). Le point d'intersection de la droite avec l'axe des ordonnées représente $1/V_{\text{max}}$ et celui avec l'axe des abscisses $-1/K_m$.

Les constantes cinétiques déduites à partir de $1/V_{\text{max}}$ et $-1/K_m$ sont dans le cas de la souche *Candida glabrata* les suivantes : $V_{\text{max}}= 10.1617 \mu\text{g}/\text{s}$ et $K_m=0.27 \text{ mg}/\text{ml}$.

Dans le cas de *Schwanniomyces occidentalis*, les constantes cinétiques déterminées sont les suivantes : ($K_m= 0.35 \text{ mg}/\text{ml}$) et ($V_{\text{max}}= 11.5647 \mu\text{g}/\text{s}$).

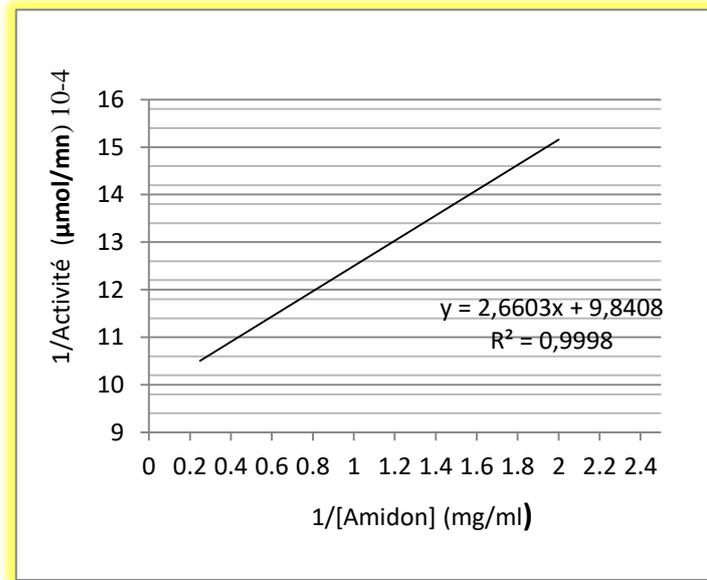


Figure 74: Cinétique enzymatique de l' α -amylase produite par *Candida glabrata* selon la représentation de Lineweaver et Burk

Une vitesse maximale (V_{max}) importante et une faible constante de Michaelis-Menten (K_m) sont des indicateurs d'une bonne efficacité pour diverses applications industrielles (SIDKEY *et al.* 2011), L'enzyme dans ces cas, présente une bonne affinité pour le substrat en permettant l'obtention du produit en un temps relativement court.

NOUADRI (2011) rapporte des valeurs de K_m et V_{max} respectivement égales à 0.92 mg/ml et 30.5 µg/s à 30 °C et à un pH optimal de 5.5. SIDKEY *et al.* (2011) ont trouvé 0.5 mg/ml et 17.78 µg/s à 30 °C et un pH optimal de 6.4.

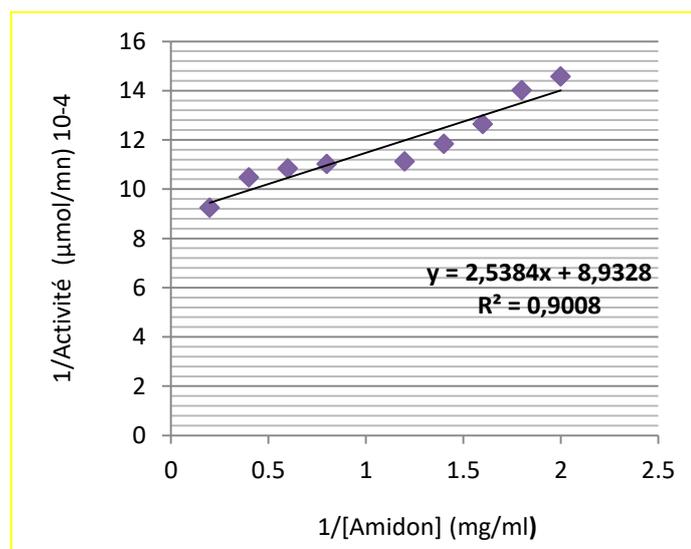


Figure 75: Cinétique enzymatique de l' α -amylase produite par *Schwanniomyces occidentalis* selon la représentation de Lineweaver et Burk

Donc, la précipitation de l' α -amylase produite par *Candida glabrata* et *Schwanniomyces occidentalis* par le sulfate d'ammonium $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, montre que cette enzyme a été purifiée à un degré non négligeable (2.73 et 3.15 fois) avec une activité importante (78.88 et 65.2U/mg). La température optimale de l' α -amylase de deux souches est de 50 °C, à pH optimal de 6.

Les constantes cinétiques déduites à partir de $1/V_{\text{max}}$ et $-1/K_m$ sont dans le cas de la souche *Candida glabrata* les suivantes : $V_{\text{max}}= 10.1617 \mu\text{g/s}$ et $K_m=0.27 \text{ mg/ml}$.

Conclusion

CONCLUSION

L' α -amylase est l'une des plus importantes hydrolases actives sur l'amidon dont les domaines d'application s'élargissent de plus en plus. La production de cette enzyme est réalisable par certaines espèces bactériennes, certaines espèces levurières et certains genres de moisissures, sur milieux à base de divers sous produits des industries alimentaires tels que les dattes de faible valeur marchande et leur rebuts, les écorces d'agrumes, le lactosérum...etc.

Les régions Sud du pays, Ghardaia particulièrement, ont connu l'installation de laiteries ayant permis un dynamisme industriel intéressant. Ces industries génèrent de grandes quantités de lactosérum, sous produit très polluant, rejeté dans les eaux d'assainissement et les cours d'eau. Riche en éléments nutritifs, il offre de nombreuses possibilités de valorisation par voie technologique (incorporation dans des aliments en vue d'une amélioration de la qualité nutritionnelle et/ ou technologique) et par voie biotechnologique (production de substance d'intérêt industriel telles que les enzymes).

La présente étude s'inscrit dans le cadre de cette deuxième possibilité. Elle vise un triple objectif à savoir :

- recherche de souches levurières, à potentiel de production d'alfa amylase intéressant, isolées à partir de biotopes locaux.
- valorisation du lactosérum produit localement par la production d'alfa amylase : substance à forte valeur ajoutée
- contribution à la protection de l'environnement contre ce polluant.

Ce travail a comporté deux volets d'investigation complémentaires. Le premier a consisté en un isolement, une sélection et une pré-identification de souches levurières amylolytiques isolées à partir des sols sahariens (milieux extrêmes) (lac « *Ayata* » et lac « *Chott* » situés dans la wilaya El-Oued) et du blé dur (*Triticum durum*), cultivées sur milieux à base de 3 types de lactosérum (camelin, caprin et bovin). Le second volet a été consacré à la production de biomasse, à l'optimisation des conditions de culture, à la purification et à la caractérisation de l' α -amylase produite par les souches retenues;

Les résultats enregistrés montrent que les échantillons de sols, source d'isolement des souches de levures sont caractérisés par un pH légèrement alcalin (autour de 8), une salinité prononcée (conductivité de 2.4 à 6 *mS/cm*) et une faible teneur en matière protéique (inférieure à 1%).

La caractérisation physico-chimique des échantillons de blé issus de la commune de Reguiba (El-Oued), révèle une composition biochimique intéressante avec des teneurs en glucides égales à 29.9 %, en protéines égales à 9.97 %, en eau et en cendres lui permettant de constituer un milieu convenable pour le développement des microorganismes.

Quarante souches levurières ont été isolées sur milieu Sabouraud soit 17 à partir des sols et 23 à partir du Blé dur (*T. durum*). La caractérisation macroscopique, microscopique et biochimique de ces souches a permis de répertorier 6 genres, à savoir : *Candida*, *Pichia*, *Schwanniomyces*, *Lipomyces*, *Saccharomyces* et *Rhodotorula*.

La sélection des souches amylolytiques par culture sur milieu PDA à 1 % d'amidon a permis d'obtenir des zones de lyse de diamètres différents avec 11 souches. Cinq d'entre elles sont caractérisées comme étant à haute performance amylolytique (zone de lyse supérieure à 24 mm). Les tests biochimiques montrent qu'elles appartiennent aux espèces suivantes : *Candida glabrata*, *Pichia anomala*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Schwanniomyces occidentalis* et *Lipomyces kononenkoae*.

Les échantillons de lactosérum bovin, caprin et camelin présentent une composition biochimique assez similaires avec un taux de lactose de 50g/l, une teneur en cendres de l'ordre de 7g/l et un pH acide susceptible de favoriser le développement des levures.

Les résultats relatifs à la production d' α -amylase par les souches isolées et identifiées, montrent que le milieu à base de lactosérum caprin convient mieux à la production enzymatique par rapport aux milieux à base de lactosérums, bovin et camelin. Parmi les 5 souches sélectionnées ; *Candida glabrata* et *Schwanniomyces occidentalis*, paraissent plus intéressantes (quantité de biomasse de 50g/l environ et (activité enzymatique de 2500 UI) sont retenues pour la suite des investigations.

Les résultats relatifs aux essais d'optimisation des conditions de fermentation et de production de l'enzyme d'intérêt sont de nature à suggérer que pour les deux souches cultivées sur milieu à base de lactosérum caprin, les pH de 4 à 5 et une température de 40C° sont les plus intéressants.

Quant à la concentration en amidon substrat de l'alfa amylase, les meilleurs résultats en matière de production de biomasse et d'activité enzymatique sont obtenus avec des concentrations en amidon égales à 3,4 et 5%).

Parallèlement, l'extrait de levure à 1% améliore, selon les résultats obtenus, le rendement en biomasse et l'activité enzymatique, les meilleurs résultats étant obtenus avec des quantités d'inoculum égales à 3 et 4%.

La purification partielle par précipitation au sulfate d'ammonium à 60 % de l'enzyme produite par *Candida glabrata* et *Schwanniomyces occidentalis* a permis l'obtention d'une activité de 78.88 $\mu\text{mol}/\text{mn}$ et un degré de purification de 3,15.

Une caractérisation de l'enzyme dans le but de prévoir les éventuelles applications a permis d'évaluer les constantes cinétiques K_m et V_{max} pour l'hydrolyse de l'amidon soluble à respectivement 0.27 mg/ml et 10.1617 $\mu\text{g}/\text{s}$. La température optimale de l'activité de l'enzyme partiellement purifiée est égale à 50 °C et le pH optimum de 6.0. Parallèlement, les résultats ont montré que l' α -amylase produite par *Schwanniomyces occidentalis* était stable et possédait une activité de 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ au bout de 80C°. Les constantes cinétique de l'enzyme semi-purifiée sont très encourageantes à savoir $V_{\text{max}}= 11.5647 \mu\text{g}/\text{s}$ et $K_m= 0.35 \text{ mg}/\text{ml}$.

De tout ce qui précède, il semblerait que les sols sahariens représentent un biotope d'un grand intérêt, encore mal exploité en vue de la flore levurière d'intérêt industriel qu'ils recèlent. Parallèlement cette flore s'avère performante même cultivée sur milieu à bon marché tels que ceux à base de lactosérum, sous-produit de l'industrie laitière très polluant qui a tendance à s'amplifier dans les zones Sud- Est du pays

Ces résultats ouvrent d'autres perspectives qui nécessitant des travaux complémentaires, tels que :

- l'identification des souches isolées par les techniques de la biologie moléculaire ;
- la purification de l'enzyme par des méthodes électrophorétique , chromatographiques ... etc. ;
- l'amélioration de la stabilité thermique de l'enzyme par des techniques d'immobilisation ;
- la recherche d'autres espèces levurières d'intérêt industriel.

Références

Bibliographiques

Références bibliographiques

ABD EL-RAHMAN, E. M., (1990). *Studies on some thermophilic bacterial strains.* These de Doctorate, université Al-Azhar, Cairo, Egypt, 201-214.

ABOU-ZEID, A. M. (1997). Production, purification and characterization of an extracellular α -amylase enzyme isolated from *Aspergillus flavus*. *Microbios.*, 89 (358), 55-66.

ABU, E. A., ADO, S. A. AND JAMES, D. B. (2005). Raw starch degrading amylase production by mixed culture of *Aspergillus niger* and *Saccharomyces cerevisiae* grown on sorghum pomace. *African Journal of Biotechnology*, 4 (8), 785-790.

ACHARYA, D. K., SHUKLA, R. M., GAMI, P. N. AND SHAH, I. J. (2014). Optimization for α -amylase production by *Aspergillus oryzae* using submerged fermentation technology. *Basic Research Journal of Microbiology*, 1 (4), 01-10. En ligne: <http://www.basicresearchjournals.org>, 2304-2319

ACOURENE, S. ET TAMA, M. (2001). Utilisation des dattes de faible valeur marchande (Rebut de deglet-nour, tinissine et tantboucht) comme substrat pour la fabrication de la levure boulangère. *Revue des Energies Renouvelables.*, 1-10.

ADRIAN J ., BOURLIER G., ET SABEL A., 1980-Composition minérale du lactosérum. Influence des facteurs technologiques, saisonniers et géographiques. Ed. C.N.A.M, Paris. 457p.

ADRIAN J. (1987). Les vitamines. In : CEPIL. Le lait matière première de l'industrie laitière. CEPIL –INRA, paris, 113-119.

AFNOR 1969. Préparation de l'échantillon en vue de l'analyse physique et chimique. Ed. Association Française de normalisation (AFNOR). Paris

AFNOR (NFV), (1974). *Recueil de normes françaises des produits dérivés des fruits et légumes, Détermination de l'acidité titrable.* Ed. Association Française de Normalisation (AFNOR).

AÏT KAKI, A. (2004). *Isolement de la moisissure Rhizopus oryzae et optimisation d'un milieu à base de lactosérum pour la production de l' α -amylase.* Thèse de magistère, université Mentouri, Constantine, 116.

AIT KAKI, A., LEGHLIMI, H., DAKHMOUCHE, S., BENNAMOUN, L. ET MERAIHI, Z., (2012). Utilisation de la planification expérimentale pour l'optimisation de la

production de l' α -amylase par *Rhizopus oryzae*. *Microbiologie Industrielle Sanitaire et Environnementale*, 6 (1), 1-17.

ALAIS C., 1984-Sciences du lait. Principes des Techniques Laitières. Ed. SEPAIC (4ed) , Paris. In SCHUCK P *et al* ., 2004.

AL-FARSI, M. (2002). Clarification of date juice. *International Journal of Food Science and Technology*, 38, 241–245. DOI: 10.1046/j.1365-2621.2003.00669.x

AL-FARSI, M., ALASALVAR, C., AL-ABID, M., AL-SHOAILY, K., AL-AMRY, M. AND AL-RAWAHY, F. (2007). Compositional and functional characteristics of dates, syrups, and their by-products. *Food Chemistry*, 104, 943–947. DOI: 10.1016/j.foodchem.2006.12.051

AL-HOOTI, S. N., SIDHU, J. S., AL-SAQER, J. M. ET AL-THMAN, A. (2002). Chemical composition and quality of date syrup as affected by pectinase cellulase enzyme treatment. *Food Chemistry*, 79, 215–220.

ALKHATEEB, A. (2008). Comparison effects of sucrose and data palm syrup on somatic embryogenesis of date palm (*phoenix dactylifera L*). *American journal of biotectchnology and biochemistry*, 4 (1), 19-23.

ALAIS C. (1984). Sciences du lait. Principes des Techniques Laitières, SEPAIC, Paris, 4^e édition.

ALLEN, N. H. AND AHEARN, D. G. (1987). Ecology of Aquatic Yeasts In: Rose, A. H. and Harisson, J. S. (eds). *The yeasts*, Vol. 1, *Biology of yeast*, 2nd Ed. London: Academic Press.

AMELLAL NEE CHIBANE, H. (2008). *Aptitude technologiques de quelques variétés communes de dattes: Formulation d'un yaourt naturellement sucré et aromatisé*. Mémoire de doctorat en génie alimentaires, université M'hamed Bougara, Boumerdes, 186p.

ARNAUD, A. ET GUIRAUD, J. P. (1999). *Le métabolisme microbien*. In: Scriban, R. *Biotechnologie*, 5^{ème} Ed. Paris: Edition Techniques et Documentation Lavoisier.

ARPANA, M., NEERAJ, K. A., VARUN, G., GULAB, S. AND ANITA, Y. (2013). Purification and characterization of amyloglucosidase produced by *Aspergillus awamori* NA21 under solid state fermentation using tapioca powder. *Octa Journal of Biosciences*, 1 (2), 122-131.

AUDIGIE, C. L., FAGERELLA, J. ET ZONZAIN, F. (1984). *Manipulation d'analyse biochimique*. Paris: Techniques et documentation-Lavoisier.

AULIFFE M-K. W., SCOTTER D-R., MACGREGOR A-N., EARL K-W., 1982-Casein whey waste water effects on soil permeability. *Journal of Environmental Quality*, 11 : 31 -34.

BAANGOOD, S. M. AND SHAMSHAD, M. A. (1984). Chemical composition of major dates cultivars in the United Arab Emirates. *Journal in date palm*, 3 (2), 381-394.

BACHA, A. (2008). *Production et étude de l'activité de l'invertase produite par la levure saccharomyces cerevisiae sur substrat a base de datte*. Mémoire de magister en technologie alimentaire, université El-hadj Lakhdar, Batna, 98p.

BAHOUS M., OUAZZANI TOUHAMI A., DOUIRA A., 2008- Survie de quelques pathogènes fongiques sur les feuilles de riz conservées au laboratoire. Bulletin de l'Institut Scientifique, Rabat, section Sciences de la Vie. 30.13-18.

BAKRI, Y., JACQUES, P. H. ET THONART, P. H. (2003). Xylanase production by *Penicillium canescens* 10 10c in solidstate fermentation. *Applied Biochemistry Biotechnology*, (108), 737-748.

BARKOUTI A., 2012- agglomération humide de poudres à réactivité de surface - Approche mécanistique de la morphogénèse de structures alimentaires agglomérées. Thèse doctorat. Génie des Procédés. UNIVERSITE MONTPELLIER II SCIENCES ET TECHNIQUES DU LANGUEDOC.189p.

BARNETT, J. A., PAYNE, R. W. AND YARROW, D. (2000). *Yeast: Characteristics and identification*, 3rd Ed. Cambridge University Press.

BARNY, J. B. AND HANSEN, M. (1990). The debate between traditional management theory and organizational economics: Sustantive differences or inter-group conflict? *Academy of Management Review*, 15, 382-93.

BEDAIDA, I. (2014). *Optimisation séquentielle de production du glutamate à partir de Corynebacterium glutamicum 2262 sur jus de datte: Utilisation de deux modèles statistiques (PlackettBurman et Box-Behnken)*. Thèse magister en microbiologie, université Ferhat Abbas, Setif, 110 p.

BELGUEDJ, N. (2015). *Préparations alimentaires à base de dattes en Algérie: Description et diagrammes de fabrication.* Mémoire magister en biotechnologie alimentaire, université Mentouri, Constantine, 243 p.

BEN ABBES, F. (2011). *Etude de quelques propriétés chimiques et biologiques d'extraits de dattes «Phoenix dactylifera L.».* Mémoire magister en génie des procédés pharmaceutiques, université Ferhat Abbas, Setif, 110 p.

BENAHMED, D. A. (2007). *Etude et optimisation d'un processus de fabrication traditionnelle de vinaigre à partir de deux variétés de dattes communes cultivées dans le sud algérien.* Mémoire de magister en génie alimentaire, université M'Hamed Bougara, Boumerdès, 110 p.

BENAHMED, D. A. (2012). *Analyse d'aptitude technologique de poudres de datte (phoenix dactylifera .L) améliorées par la spiruline: Etude des propriétés théologiques nutritionnelles et antibactériennes.* Thèse de doctorat en Technologie Alimentaire, université M'hamed Bougara, Boumerdes, 188 p.

BENAOUIDA, K. (2008). *Etude de l'alpha amylase de levure isolées d'un écosystème extrême (sol environnant des sources thermales) et cultivées sur un milieu à base de lactosérum.* Thèse de magister en Biotechnologie microbiennes, université Mentouri, Constantine, 104 p.

BENCHABANE, A., KECHIDA, F., BELALOU, D., AOUDJIT, R. ET OULD EL HADJ, M. (2012). Valorisation de la datte par la formulation d'une boisson à base de lait et de jus d'orange. *Algerian Journal of Arid And Environment (AJAE)*, 2 (1), 1-5.

BENCHELAH, A. C. ET MAKHA, M. (2006). Les dattes, de la préhistoire à nos jours. *Phytothérapie (ethnobotanique) Springer*, (1), 43 - 47.

BENSAMIRA, S. (2006). *Isolement et caractérisation de souches fongiques de milieux extrêmes (sol et sebkha de la région de Biskra) productrices de cellulase thermostable à intérêt industriel.* Mémoire du Magistère en Biochimie-microbiologie appliquée, université Mentouri, Constantine, 104 p.

BENSMAIL, S. (2012). *Optimisation de la production de la protéase acide par Aspergillus niger sur milieu solide: Purification et caractérisation.* Mémoire de magister en Sciences, université M'Hamed Bougara, Boumerdès, 113 p.

- BERNAL V. (1985).** Thermal stability of whey proteins- A calorimetric study, *J. Dairy Sci*, 68.
- BERNFELD, P. (1955).** *Amylases* In: Clowck, S. P. and Kaplan, N. O. (eds.). *Methods in enzymology. 1*, 149-157. Academic press, New York.
- BLIN, C. P. (2002).** *Etude comparative du catabolisme de l'acide ricinoléique chez les levures du genre Sporidiobolus: mise en évidence et caractérisation du système béta-oxydase impliqué.* Thèse de doctorat en Ecole nationale supérieure de biologie appliquée à la nutrition et à l'alimentation, université de Bourgogne, France., 221 p.
- BOIRON, P. (1996).** *Organisation et biologie des champignons.* Paris: Edition Nathan.
- BOUIJ, I., PIONBO, G., RISTERUCCI, J. M., COUPE, M., THOMAS, D. ET FERRY, M., (1992).** Etude de la composition chimique de dattes à différents stades de maturité pour la caractérisation variétale de divers cultivar de palmier dattier (*Phoenix dactylifera L.*). *Journal Fruits*, 47 (6), 667-677.
- BOTTON, B. (1991).** *La physiologie des levures.* In: Larpent J. P. (ed.), *Biotechnologie des levures.* Paris: Edition Masson.
- BOTTON, B., BRETON, A., FEVRE, M., GAUTHIER, S., GUY, P. H., LARPENT, J. P., REYMOND, P., SANGLIER, J. J., VAYSSIER, Y ET VEAU, P. (1999).** *Moisissures utiles et nuisibles d'importance industrielle (2^{ème} édition).* Paris: Edition Masson.
- BOUCHERIT, Z. (2011).** *Production et étude des propriétés de la protéase acide d'une moisissure isolée de sebkhah.* Mémoire de magister en Microbiologie appliquée, université Mentouri, Constantine, 102 p.
- BOUCHET, P. H., GUIGNARD, J. L. ET VILLARD, J. (1999).** *Les champignons: Mycologie fondamentales et appliquée.* Paris: Edition Masson.
- BOUIX, M. ET LEVEAU, J. Y. (1991).** *Les levures (vol: 2).* Paris: Edition Techniques et documentation-Lavoisier.
- BOUIX, M. ET LEVEAU, J. Y. (1999).** *Production des enzymes.* In: Scriban, R. (Ed), *Biotechnologies.* Paris: Edition Lavoisier.

- BOULAL, A., KIHAL, M. AND KHELIFI, C. (2017).** Fermentative strength of yeasts strain, Naturally isolated using common date in south-west of Algeria. *International Journal of Chemical Technology Research*, 10 (1), 180-188.
- BOURGEOIS, C. (2003).** *Les vitamines dans les industries agroalimentaires*. Paris: Edition Techniques et Documentations-Lavoisier
- BOURGEOIS, C. M. ET LEVEAU, J. Y. (1991).** *Techniques d'analyse et de contrôle dans les industries agroalimentaires* (vol: 2). Paris: Edition Techniques et documentation-Lavoisier.
- BRADFORD, M. (1976).** A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.
- BRAWN, S. H. AND KELLY, R. M., (1993).** Characterization of amylolytic enzymes having both (alpha)-1,4 and (alpha)-1,6 hydrolytic activity from the thermophilic archea *Pyrococcus furiosus* and *Thermococcus litoralis*. *Applied and Environmental Microbiology*; 59 (8), 2614-2621, DOI: 0099-2240/93/082614-08\$02.00/0
- BRZOZOWSKI, A. M. ET DAVIES, G.J. (1997).** Structure of the *Aspergillus oryzae* alpha amylase complexed with the inhibitor acarbose at 2.0 Å resolution. *Biochemistry*, 36 (36), 10837-10845, DOI: 10.1021/bi970539i
- BURHAN et al .(2003).** Enzymatic properties of a novel thermophilic, alkaline and chelator resistant amylase from an alkalophilic *Bacillus* sp. Isolate ANT- 6. *Proc. Biochem.* 38:1397-1403.
- CARLILE, M. J. ET WATKINSON, S. C. (1994).** *The Fungi*. New York: Academic Press.
- CHAKRABORTY, K., BHATTACHARYYA, B. K. AND SEN, S. K. (2000).** Purification and characterization of a thermostable α -amylase from *Bacillus stearothermophilus*. *Folia Microbiol (Praha)*, 45 (3), 207-210.
- CHANG, K., YOU-LIANG, P. AND CHONG-YAO, S. (1995).** Purification and properties of a thermostable alpha amylase from the thermophilic fungus. *Acta Microbiologica Sinica*, (37), 102-110.

CHAO-HSUN, Y. AND WEN-HSIUNG, L. (2004). Purification and properties of a maltotriose-producing Alpha amylase from *Thermobifida fusca*. *Enzyme and Microbial Technology*, (35), 254-59.

CHAPUT G. (1981). Problèmes techniques et économiques posés par le stockage, le transport, la concentration et le séchage du lactosérum, *Tech. Lait*. 25–28.

CHARLILE, M. J. ET WATKINSON, S. C. (1994). *The Fungi*. New York: Academic Press.

CHATTERTON, J. R., VOGELSONG, K. M., LU, Y. C., ELLMAN, A. B. AND HUDGENS, G.A. (1996). Salivary α -amylase as a measure of endogenous adrenergic activity. *Clinical Physiology Journal*, 16 (4), 344 - 348.

CHERIF, A. (1993). *Essai d'isolement et d'identifications de levures sauvages à partir substrats naturels pour utilisation boulangère*. Mémoire d'ingénieur, institue d'agronomie, Elharrach, Alger,98 p.

CHESSA, J. P., FELLER, G. AND GERDAY, C. (1999). Purification and characterization of heatstable α -amylase secreted by the *psychrophilic bacterium* TAC 240B. *Canadian Journal of Microbiology*, 45 (6), 452-457.

CORDEIRO, C. A., LEAL, M. L. AND LUCIANO, A. B. (2002). Production and proprieties of α - amylase from thermophilic *Bacillus sp.* *Brazilian journal of microbiology*, 33 (1), São Paulo.

COTON S G. (1980). The utilization of permeates from the ultrafiltration of whey and skim milk, *J. Soc. DairyTechnol.* 33 89 :94.

DAAS AMIOUR, S. (2009). *Etude quantitative des composés phénoliques des extraits de trois variétés de dattes (Phoenix dactylifera L.) et évaluation in vitro de leur activité biologique*. Mémoire de Magister en Biochimie appliquée, université El Hadj Lakhdar, Batna, 160 p.

DAKHMOCHE-DJEKRIF, S. (2016). *Production et caractérisation de l'amylopullulanase de la levure Clavispora lusitaniae ABS7 isolée de blé cultivé et stocké en zones arides*. Thèse de doctorat en Sciences, université Mentouri, Constantine, 211 p.

DAMODARA, R., MENDU, B. V., RATNAM, A., PURNIMA, C. AND AYYANN, A. (2005). *Affinity chromatography of α -amylase from Bacillus licheniformis*. Département de

pédiatrie, Division des maladies infectieuses, Faculté de médecine de l'université Johns Hopkins: 201-222.

DAVET, P., AND ROUXEL, F. (1997). Detection et isolation des champignons du sol. Paris: INRA.

DE MOT, R. AND VERACHTERT, H. (1987). Purification and characterization of extracellular amylolytic enzymes from the yeast *Filobasidium capsuligenum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 1474-1482.

DE MOT, R. AND VERACHTERT, H. (1987). Purification and characterization of extracellular α -amylase and glucoamylase from the yeast *Candida antarctica* CBS 6678. *European Journal of Biochemistry*, 164,643-654.

DE SOUZA, C. E AND MARTINS, M. L. (2000). Culture conditions for the production of thermostable amylase by *Bacillus sp.* *Martins Brazilian Journal of Microbiology*, 31, 298-302

DELAL, H. (2016). *Évaluation et modélisation de la dynamique des populations microbiennes en relation avec les caractères édaphiques des sols de carrière de Terga (Ain Témouchent) en vue de leur revégétalisation.* Mémoire de Doctorat, université Ahmed Ben Bella, Oran, 161 p.

DENDOUGA, W. (2006). *Isolement et identification de moisissures productrices de protéases à partir de milieux extrêmes. Extraction et étude des propriétés de la protéase produite.* Mémoire de Magister en Biochimie-Microbiologie appliquées, université Mentouri, Constantine, 84 p.

DESMAZEAUD, M. ET HERMIER, J. (1968). Isolement, purification et propriétés d'une protéase exocellulaire de *Micrococcus caseolyticus*. *Annales De Biologie Animale, Biochimie, Biophysique*, 8 (4), 565-577.

DE WITT J.N., 2001-Manuel de l'Enseignant sur le Lactosérum et les Produits de Lactosérum, 1^{ère} édition. European Whey Products Association, Bruxelles, Belgique.

DIXON, M. AND WEBB, E. G. (1964). *Enzymes*, 2nd Ed. New York: Academic Press.

DJOUAB, A. (2007). *Préparation et incorporation dans la margarine d'un extrait de dattes des variétés sèches.* Mémoire de magister en génie alimentaire, université M'Hamed Bougara, Boumerdès, 184 p.

DJOUDI, I. (2013). *Contribution à l'identification et à la caractérisation de quelques accessions du palmier dattier (Phoenix Dactylifera.l) dans la région de Biskra.* Thèse magister en sciences agronomiques, université Mohamed Kheider, Biskra, 141.

DOLLE, V. ET TOUTAIN, G. (EDS). (1990). *Note technique: Valorisation de la datte.* France: Estanove Pierre.

DOUKANI K., TABAK S., GOURCHALA F., MIHOUB F., OUNES M., BENBAGUARA M., 2013- Caractérisation physico-chimique du blé fermenté par Stockage Souterrain (Matmora). *Revue Ecologie-Environnement* (9) : ISSN : 1112-5888. 1-9p.

DRYER J. (2001). La grande diversité du lactosérum. *Dairyfoods.* , 35.

DUBEY, A. K., SURESH, C., KAVITHA, R., KARANTH, N. G., AND UMESH-KUMAR, S. (2000). Evidence that the glucoamylases and α -amylase secreted by *Aspergillus niger* are proteolytically processed products of a precursor enzyme. *FEBS Letters*, 471 (2), 251-255.

DUBOIS, M., GILLS, K. A., HAMILTON, J. K., REBERS, P. S AND SMITH, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 28, 350-356.

DUFRESNE, P. ET GUY, S. G. (2014). *Identification des champignons d'importance médicale: Stage de laboratoire.* Institut national de santé publique, Québec.

DURAND, G. ET MONSAN, P. (1982). Les enzymes. Production et utilisations industrielles. Eds. Gauthier-Villars.

EGAS, M. C., DA COTA, M. S., COWAN, D. A, AND PIRES, E.M. (1998). Extracellular α -amylase from *Thermus filiformis* ork A2: Purification and biochemical characterisation. *Extremophiles*, 2 (1), 23-32.

EKSTEEN, J. M., STEYN, A. J., VAN RENSBURG, P., CORDERO, R. R. AND PRETORIUS, I. S.

(2003). Cloning and characterization of a second alpha-amylase gene (LKA₂) from *Lipomyces kononenkoae* IGC4052B and its expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *InterScience*, 1, 69-78.

- EL GENDY, M. M. A. (2012).** Production of glucoamylase by marine endophytic *Aspergillus sp.* JAN-25 under optimized solid-state fermentation conditions on agro residues. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 6 (4), 41-54.
- EL SAFEY, E. M. ET AMMAR, M.S. (2004).** Purification and characterization of α -amylase isolated from *Aspergillus flavus var. columnaris*. *Assiut university bulletin for environmental researches*, 7 (1); 1005-1022.
- EL-SAFEY, E. M, (1994).** *Production of microbial α -amylases under solid-state incubation conditions in the open air*. These de Doctorate, université Al-Azhar, Cairo, Egypt, 145 p.
- EMENIKE, O. B., CHIBUZO, C. F. AND SABINUS, O. E. (2015).** Characterization of partially purified α -amylase from germinating African breadfruit (*Treculia africana*) Seeds. *International Journal of Pharmacy and Medical Sciences*, 5 (1), 15-21. DOI: 10.5829/idosi.ijpms.2015.5.1.1111
- ESPIARD, E. (2002).** *Introduction à la transformation industrielle des fruits*. Paris: Techniques et documentation-Lavoisier.
- FAO-ONU (2017).** Production alimentaire : fromage (Algérie).
- FAVIER, J., IRELAND-RIPERT, J., LAUSSUICQ, C. ET FEINBERG, M. (1993).** *Répertoire générale des aliments: Table de composition des fruits exotiques, fruits de cueillette d'Afrique*. Paris: Corlel SA.
- FELIPE, F. T. AND SILVIA F. C. (2008).** Rhodotorula infection. A systematic review of 128 cases from literature. *Revista iberoamericana de micología*, 25, 135-140.
- FERHAT HAMIDA, S. ET LAKLOUKA, N. (2015).** *Contribution à l'étude de l' α -amylase levurienne: Optimisation des conditions de production*. Mémoire de Master en Biochimie appliquée, université Echahid Hamma Lakhdar, El-Oued, 97 p.
- FETHI, H. A. ET EL KOUHTANI, M. N. (1979).** *Production de dattes dans le monde arabe et Islamique*. Université Ain Chems.
- FOGARTY, W. M. ET KELLY, C. T. (1990).** *Microbial Enzymes and Biotechnology* (2^{ème} Ed). London: Elsvier applied science.
- FRANCO, O. L., RIGDEN, D. J., MELO, F. R., BLOCH, C., SILVA, J. C. P. AND CROSSI DE SA, M. F. (2000).** Activity of wheat amylase inhibitors towards bruchid α -

amylase and structural explanation of observed specificities. *European Journal of Biochemistry*, 267, 2166-2173.

GALZY, P., MOULIN, G. ET ADRIAN, L. (1996). Présence et utilisation des levures en alimentation humaine. *Industries alimentaires et agricoles*, 113 (2), 656-662.

GANA S. et TOUZI A. (2001). Valorisation du lactosérum pour la production de levures lactiques avec les procédés de fermentation discontinue et continue. CDER, Rev. Energ. Ren, 51-58.

GANCEDO, C. AND SENANO, R. (1989). Energy-Yielding Metabolism. In: Rose, A. H. and Harrison, J. S. (eds). *The yeast, Metabolism and physiology of yeast*, (2nd Ed) London: Academic Press.

GILLES, P. (2000). *Cultiver le palmier dattier*. France: Cirad.

Golubev, W. I., Manukyan, A. R and Lazarev, P. I. (1984). *Zhurnal Obshchei Biologii. Journal of General Biology, in Russian*, 45, 507.

GUINET, R. ET GODON, B. (EDS.). (1994). *La panification Française*. Paris: Edition Techniques et documentation-Lavoisier.

GUIRAUD, J. P. (1998). *Microbiologie alimentaire*. Paris: Edition Dunod.

GUNDE-CIMERMAN, N., OREN, A. AND PLEMENITAŠ, A. (2005). *Adaptation to life at high salt concentrations in archaea, bacteria, and eukarya*. Netherlands: Springer.

GUPTA, A., GUPTA, V. K., MODI, D. R. ET YADAVA, L. P. (2008). Production and characterization of α - amylase from *Aspergillus niger*. *Biotechnologie*, 7 (3), 551-556. ISSN 1686-296X.

HAGIHARA, H., IGARASHI, K., HAYASHI, Y., ENDO, K., IKAWA-KITAYAMA, K., OZAKIK, K., KAWAI, S. AND ITO, S. (2001). Novel α -amylase that is highly resistant to chelating reagents and chemical oxidants from the *Alkaliphilic Bacillus* isolates KSM-K38. *Applied and Environmental Microbiology*. 67 (4), 1744-1750.

HALWYN, M. A., LERCTERC, J. M., KING, N., BELONGER, M., LEGRIS, M. ET FRENETT, Y. (2002). *Les risques à la santé associés à la présence de moisissure en milieu interieur, Rapport scientifique*. ISBN Quebec, Canada.

HAMAD, B. (2009). *Contribution à l'étude de la contamination superficielle bactérienne et fongique des carcasses camelines au niveau de l'abattoir d'El-Oued.* Mémoire de Magister en médecine vétérinaire, université Mentouri, Constantine, 120 p.

HAMMER, E., KROWAS, D., SCHAFFER, A., SPECHT, M., FRANCKE, W. AND SCHAUER F. (1998). Isolation and characterisation of a Dibenzofuran-Degrading Yeast: Identification of Oxidation and Ring Cleavage Products. *Applied Environmental Microbiology*, 64, 2215-2219.

HAQ, I. U., RANI, S., ASHRAF, H. AND QADEER, M.A. (2002). Biosynthesis of alpha amylase by chemically treated mutant of *Bacillus subtilis*. *Journal of Biological Sciences*, 2 (2), 73-75.

HENCKE, S. (2000). *Utilisation alimentaire des levures.* Mémoire de Docteur en Pharmacie, université Henri Poincaré, Nancy i.

HESLOT H ., 1996-L'ingénierie des protéines et ses applications . Lavoisier Tec et Doc : 424- 432.

HYUN, H. H., ZEIKUS, J. G. (1985). Simultaneous and enhanced production of thermostable amylases and ethanol from starch by cocultures of *Clostridium thermosulfurogenes* and *Clostridium thermohydro sulfuricum*. *Applied Environmental Microbiology*, 9 (5), 1174-1181.

IBUKUN, E. O. AND AKINDUMILA, F. (1998). Extracellular amylase production by isolates of Bacilli micro-organism cultured on different starchy food broths. *The Nigerian Society of Biochemistry and Molecular Biology*, 13, 91-95.

JACKARD, A. (2008). *Composition des milieux de culture.* In: Development of an Industrial Biotechnology Process: Metabolic basis of product formation and development of medium, HES-SO Valais.

JANECEK, S. (1994). Sequence similarities and evolutionary relationships of microbial, plant and animal α -amylases. *European Journal Biochemistry*, 224, 519–524.

JEANTET R., CROGUENNEC T., MAHAUT M., SCHUCK P., et BRULE G., 2008- Les produits laitiers. Ed : Lavoisier (2^{ème} ed), Paris. 200 p.

JOUAN P., 2002-Lactoprotéines et lactopeptides: propriétés biologiques. Ed. Quae. INA. p.127

KELLY, C. T., MORIARTY, M. E. AND FOGARTY, W. M. (1985). *Thermostable extracellular α -amylase and α -glucosidase of *Lipomyces starkeyi*. Applied Microbiology and Biotechnology Publisher, 22 (5), 352 – 358.*

Khadraoui, A. (2006). Eaux et Sols en Algérie (Gestion et impact sur l'environnement).Ed. EMPAC, Constantine, Algérie, 392 p.

KHERRAZ, Z. ET LOBRI, S. (2015). *Contribution à l'étude de l'influence des paramètres physico-chimiques sur l'activité amylolytiques des levures.* Mémoire de Master en Biochimie appliquée, université Echahid Hamma Lakhdar, El-Oued, 89 p.

KHOO, S. L., AMIRUL, A. A., KAMARUZAMAN, M., NAZALAN, M. AND AZIZAN, M. N. (1994). Purification and characterization of alpha-amylase from *Aspergillus flavus*. *Folia Microbiol (Praha)*, 39 (5), 392-398.

KOCHER, G. S ET KATYAL, P. (2003). *Use of potato starch for extracellular amylase production by a yeast isolate.* India: Ludhana.

KOMAGATA, K., NAKASE, T. AND KATSUYA, N. (1964). Assimilation of hydrocarbons by yeasts: I. Preliminary screening. *Journal of Genetic Applied Microbiology*, 10, 313-321.

KOSSEVA M-R., FATMAWATI A., PALATOVA M., et KENT C-A., 2007- Modelling hermophilic cheese whey bioremediation in a one-stage process. *Biochemical Engineering Journal*. Vol(35) : 281-288.

KREGER VAN, N. J. (1984). *The yeast, a Taxonomic Study* (Ed: 3). Amsterdam: Cletus P. Kurtzman et Jack W. Fell.

KUIPER, J., ROELS, J. A. AND ZUIDWEDG, M. H. J. (1978). Flow through viscometer for use in the automated determination of hydrolytic enzyme activities: Application in protease, amylase, and pectinase assays. *GistBrocades N. V. research and development, Delft, the Netherlands Analytical biochemistry*, 90, 192-203.

KUMARI, S. BHATTACHARYA, S. AND DAS, A. (2012). High-yield chemical synthesis of hexagonal ZnO nanoparticles and nanorods with excellent optical properties. *Journal of Chemical, Biological and Physical Sciences*, 2 (2), 836- 846.

KUNAMNENI, A., PERUMAL, K. AND SINGH, S. (2005). Optimization of process parameters for α -amylase production using Artificial Neural Network (ANN) on agricultural wastes. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2, 168-171.

- LABRECQUE, M. H. (2003).** *Étude de la capacité de deux souches de levures à dégrader le xylène.* Mémoire de maîtresses sciences, université Laval.
- LAGANE, C. (2007).** *Rôle de l'IL-3 et des ligands de PPAR. γ dans la réponse anti-infectieuse des macrophages murins et des monocytes humains vis-à-vis de Candida albicans, Implication de PPAR. γ .* Thèse de Doctorat en Immunopathologie, oncogénèse et signalisation cellulaire, université Toulouse III, Paul Sabatier, France, 221 p.
- LAGZOULI, M., EL KETTANI, Y., AITOUNEJJAR, A., ELYACHIOUI, M. AND JADAL, M. (2017).** Optimization of biomass and glucoamylase production by *Candida famata* using response surface methodology. *African Journal of Biotechnology*, 16(5), 238-246. DOI: 10.5897/AJB2016.15774
- LAISNE, G. AND BROWN, M. (1972).** Compatible solutes and extreme water stress in eukaryotic microorganisms. *Advances in Microbial Physiology*, 101-242.
- LAMBIOTE, B. (1983).** *Some aspect of the role of dates in humain nutrition, The first symposium on dates palm.* King Faysal university, El Hassa Kingdom of Saudi Arabia.
- LAPLANCHE J. (2004).** Systhème d'épuration du lactosérum d'alpage par culture fixée sur lit de compost. *Revue suisse Agric.*, 220-224.
- LAPOINTE C., VIGNOLA., 2002-** Science et technologie du lait: transformation du lait. Ed. Presses inter Polytechnique. Fondation de technologie laitière, Québec. 600 p.
- LARPENT, G. M AND SANGLIER, J. J. (1992).** *Biotechnologies: Principes et méthodes.*
- LARPENT, J. P. (1990).** *Biotechnologie des levures.* Paris: Edition Masson.
- LARPENT, L. P. ET LARPENT-GOURGAUD, M. (1993).** *Mémento technique de microbiologie*, 3^{ème} éd. Paris: Edition Techniques et documentation-Lavoisier.
- LARPENT, L. P. ET LARPENT-GOURGAUD, M. (1997).** *Mémento technique de microbiologie*, 8^{ème} éd. Paris: Edition Techniques et documentation-Lavoisier.
- LECLERC, H., MEYER, A. ET DEIANA, J. (1995).** *Cours de microbiologie générale: Nouveau programme, Biosciences et Techniques.* Paris: Doin Editeurs.
- LEJEUNE R. et BARON GV. (1995).** Effet of agitation on growth and enzyme production of *Trichoderma reesei* in batch fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol* 249-258.
- LEVEAU, I. V. ET BOUX, M. (ED). (1993).** *Microbiologie industrielle: les micro-organismes d'intérêt industriel.* Paris: Edition Techniques et documentation-Lavoisier.

LEVEAU, J. Y. ET BOUIX, M. (1993). *Microbiologie industrielle. Les micro-organismes d'intérêt industriel* (8^{ème} éd). Paris: Edition Techniques et documentation-Lavoisier.

LITTLE, A. D. (2004). Comité Biotechnologies de LEEM.

LODDER, J. (1971). *The yeasts, a taxonomic study*, 2^{ème} Ed. North Holland, Amsterdam: Londres.

LUQUET F M. et BOUDIER J F. (1984). Utilisation des lactosérums en alimentation humaine et animale. *Apria*, 1-7, 66, 83-90.

MAHNAAZ, K., SHAUKAT, S. K., ZAFAR, A. AND ARSHIYA, T. (2010). Production of Single Cell Protein from *Saccharomyces cerevisiae* by utilizing Fruit Wastes. *Nanobiotechnica Universale*, 1 (2), 127-132.

MALHOTRA, R., NOORWEZ, S. M. AND SATYANARAYANA, T. (2002). Production and partial characterization of thermostable and calcium-independent alpha-amylase of an extreme thermophile *Bacillus thermooleovorans* NP54. *Letters in Applied Microbiology*, 31 (5), 378-384

MALLOCH, D. (1997). *Moulds: their isolation, cultivation and identification*. Department of botany, university of Toronto.

MAMO, G. AND GESSESSE, A. (1999). Purification and characterization of two raw-starch-digesting thermostable a-amylase from a thermophilic Bacillus. *Enzyme and Microbial Technology*, 25.

MARWAHA S-S., KENNED J-F., 1988-Whey pollution problem and potential utilization. *International Journal of Food Science and Technology*. Vol (23) : 323 - 336.

MATHIEU, C. ET PIELTAIN, F. (2009). *Analyse chimique des sols*. Paris: Ed. Techniques et documentations Lavoisier.

MAZUR, A. K. ET NAKATANI, H. (1993). Multiple attack mechanism in the porcine pancreatic amylase hydrolysis of amylose and amylopectine. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 306 (1), 29-38.

MERABTI, R. (2006). *Isolement et caractérisation de souches levuriennes amylolytiques à partir de sol saharien algérien*. Thèse magister en Biochimie et microbiologie appliquées, université Mentouri, Constantine, 85 p.

MERCIER, C. (1997). *Transgénèse et modification quantitative et/ou qualitative de la composition de lait à de fins nutritionnelles.* Nord-France: Frened G.

MEREO J., 1980 -Les utilisations industrielles du sérum, fromagerie. Paris, revue française (365). 401p.

MESSAOUDI, Z. ET BEKKARI, H. (2016). *Contribution à l'étude de la production enzymatique de quelques espèces fongiques isolées à partir des milieux extrêmes.* Mémoire de Master en Biochimie appliquée, université Echahid Hamma Lakhdar, El-Oued, 109 p.

MEYER, A., DEIANA, J. ET BERNARD, A. (2004). *Cours de microbiologie générale avec problèmes et exercices corrigé.* Paris: Doin Editeurs.

MIMOUNI, Y. ET SIBOUKEUR, O. (2011). Etude des propriétés nutritives et diététiques des sirops de dattes extraits par diffusion, en comparaison avec les sirops à haute teneur en fructose (isoglucoses), issus de l'industrie de l'amidon. *Annales des Sciences et Technologie*, 3 (1), 1-11.

MIMOUNI, Y., SIBOUKEUR, O. AND BAYOUSSEF, Z. (2014). Fructose-rich syrup from Ghars cultivar dates (*Phoenix dactylifera* L.). *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 26 (11), 963-969. DOI: 10.9755/ejfa.v26i11.16755.

MOLETTA R., 2002- Gestion des problèmes environnementaux dans les IAA. Ed. Tech et Doc, Paris .600p.

MOMEIN, H., AHMED, M., GEHAN, M. AND HESHAM, M. (2003). Improvement of Cell Wall Degrading Enzymes Production by Alginate Encapsulated *Trichoderma sp.* *Food Technology Biotechnology*, 41 (3), 219-225.

MOKHATARI S., 2013- Effet protecteur de certaines bactéries lactiques isolées a partir de blé fermenté type haumoum. Thèse magister. Phtisiologie de la nutrition et de sécurité alimentaire. Université d'Oran. 165p.

MORANELLI, F., YAGUCHI, M., CALLEJA, G. B AND NASIM, A. (1987). Purification and characterization of the extracellular alpha-amylase activity of the yeast *Schwanniomyces alluvius*. *Biochemistry and Cell Biology*, 65(10), 899-908.

MORVAN, J. (2010). Marché européen des enzymes dans les applications alimentaires. M55B. <http://www.frost.com>.

MOTTAR J., BASSIER A., JONIAU M; BAERT J. (1989).Effect of heat-induced association of whey proteins and casein micelles on yogurt texture. *J Dairy* ,72.

- MULTON, J. L. (1992).** *Le sucre, les sucres, les édulcorants et les glucides dans les I.A.A.* Paris: Techniques et documentation-Lavoisier.
- MULTON, J. L. ET DE REYNAL, B. (1984).** Additifs et auxiliaires de fabrication dans les industries agroalimentaires (4^{ème} Ed). Paris: Techniques et documentation-Lavoisier.
- MULTON, J. L., (1982).** *Conservation et stockage des grains et graines et produits dérivés-céréales, oléagineux, protéagineux, aliments pour animaux*, Vol. 2. Paris: Technique & Documentation Lavoisier.
- MUNIER, P. (1973).** *Le palmier dattier. Techniques agricoles et productions tropicales* (5^{ème} Ed). Paris: Maisonneuve et Larose.
- NAHAR, S., HOSSAIN, F., FERAZAL, B. ET HALIM, M. A. (2008).** Production of glucoamylase by *Rhizopus sp.* in liquid culture. *Pakistan Journal of Botany*, 40 (4), 1693-1698.
- NIXON, R. W. ET CARPENTER, B. (1978).** *Dates in united sates.* United states department of agriculture information, Bulletin Prepared by Science and Education Administration.
- NOUADRI, T. (2011).** *L'α-amylase de Penicillium camemberti PL21: Production, Purification, Caractérisation et immobilisation.* Thèse de Doctorat d'Etat, Option Biochimie-Biotechnologies, université Mentouri, Constantine, 160 p.
- OSTERLUND, B. AND JANSON, J. C. (1997).** A strategic Approach to protein purification. *Pharmacia. Biotechnol.*, 2 (3), 8-10.
- OTENG-GYANG, K. (1984).** *Introduction à la microbiologie alimentaire dans les pays chauds.* Paris: Technique & Documentation Lavoisier.
- PADMINI, N. D., BHATTACHARYA, S., DAS, A. AND RAJAN, S. S. (2012).** Solid-state fermentation and characterization of α-Amylase from a Rhizospheric Isolate of *Aspergillus flavus* associated with *Mangifera indica*. *Annals of Biological Research*, 3 (8), 4082-4090.
- PAGOT, Y., ENDRIZZI, A., NICAUD, J. M. AND BERLIN, J. M. (1997).** Utilization of an auxotrophic strain of the yeast *Yarrowia lipolitica* to improve gamma-decalactone production yields. *Letters in Applied Microbiology*, 25 (2): 113-116.

- PAQUIN P. (2004).** Etude de potentiel de marché des ingrédients laitiers protéiques au Canada, Rapport final, STELA, Université Laval, 63.
- PAULINE C., et YVES L.** Essai de traitement du lactosérum pur issu de la fromagerie pilote de la ferme caprine du Pradel par la méthanisation. Ed. Institut National Polytechnique .École d'Ingénieurs de Purpan et Institut de l'élevage. 8p.
- PHAFF, H. G., MILLER, M. W AND MRAK, E. K. (1968).** *The life of yeasts.* Harvard University Cambridge, Massachsetts.
- PANCHAL, C. J. (1990).** *Yeats strain selection.* United States of America (USA): Marcel Dekker.
- PANDEY, A., NIGAM, P., SOCCOL, C. R., SOCCOL, V. T., SINGH, D. AND MOHAN, R. (2000).** Advances In: Microbial amylases. *Biotechnology Applied Biochemistry (31)*, 135-152.
- PARK, C. S., CHANG, C. C., KIM, J. Y., OGRYDZIAK, D. M., RYUI, D. D. Y. (1997).** Expression, secretion, and processing of rice Alpha-amylase in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Journal of Biological Chemistry*, 272 (11), 6876-6881.
- PHAFF, H. J AND STARMER, W. T. (1987).** *Yeast associated with Plants, Insects and Soil.* In: Rose, A. H., Harrison, J. S. (Eds.). *The yeast*, (Vol. 1, 2nd Ed.). Biology of yeast. London: Edition Academic Press.
- PIERQUIN, A. L. (2010).** *Mycoses opportunistes et immunodépression.* Thèse pour obtenir le Diplôme d'état de docteur en Pharmacie, université Henri Poincaré, Nancy 1.
- PRAMAYON, S. (2001).** *Les Candidoses systémiques en réanimation: Difficultés diagnostiques et thérapeutiques, attitude consensuelle actuelle.* Mémoire de Doctorat, université Joseph Fourier, Grenoble, 99 p.
- PRIETO, J. A., BORT, B. R., MARTINEZ, J., RANDEZ, G. F., BUESA, C AND SANZ, P. (1995).** Purification and Characterisation of new alpha- amylase of intermediate thermal stability from the yeast *Lipomyces kononenkoae*. *Biochemistry and Cell Biology*, 73 (1-2), 41-9.
- RAMACHANDRAN, S., PATEL, A. K., NAMPOOTHIRI, K. M., CHANDRAN, S., SZAKACS, G., SOCCOL, C. R AND PANDEY, A. (2004).** Alpha amylase from a fungal culture grown on oil cakes and its properties. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 47 (2).

- RAVIYAN, P., JUMING, T. AND BARBARA, A. R. (2003).** Thermal stability of α -amylase *Aspergillus oryzae* entrapped in polyacrylamide gel. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, (51), 62-69.
- REDECKER, D. (2002).** New views on fungal evolution based on DNA markers and the fossil. *Research in Microbiology*, 153, 125-130.
- REGNAULT, J. P. (1990).** *Microbiologie générale*, 1^{er} Ed. Paris: Ed. Vigot.
- RETIMA, L. (2015).** *Caractérisation morphologique et biochimique de quelque cultivar du palmier dattier (Phoenix dactylifera L.) dans la région de Foughala (Wilaya du Biskra)*. Thèse magister en sciences agronomique, université El-hadj Lakhdar, Batna, 135 p.
- RICHARD, R. (1972).** *Eléments de biologie végétale*. Paris: Edition Touchet.
- RICHARDS, L. A. (1969).** *Diagnostic and improvement of saline and alkaline soils*. Agr. Handbook.
- RIFKIN JEREMY.(2012).** La troisième révolution industrielle: comment le pouvoir latéral va transformer l'énergie, l'économie et le monde. Paris (France) : Les Liens qui Libèrent, , p. 380.
- RIVIERE, J. (1975).** *Les applications industrielles de la microbiologie*. Collection Sciences agronomiques. Masson et Cie (Ed.).
- SACI, A. (2012).** *Production d'alpha-amylase par Streptomyces sp. Optimisation d'un milieu de production à base de déchets d'orange*. Thèse magister en Ecologie, université Mentouri, Constantine, 92 p.
- SADIQ, A., ZEESHAN, K., BASHIR, A., IBRAR, K. ET JAVID, A. (2014).** Production of Single Cell Protein from Orange Peels Using *Aspergillus niger* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Global Journal of Biotechnology & Biochemistry*, 9 (1), 14-18. DOI: 10.5829/idosi.gjbb.2014.9.1.82314
- SAITO, K., KAWAMURA, Y. ET ODA, Y. (2003).** Role of the pectinolytic enzyme in the lactic acid fermentation of potato pulp by *Rhizopus oryzae*. *Id Microbiology Biotechnology*, 30 (7), 440-444.
- SAULNIER F. (1996).** Composition minérale et organique de différents lactosérums industriels, analysée par électrophorèse capillaire, Lait, 76 ,423– 432.

SAWAYA, W. N., KHALIL, J. K., KHATCHA-DOURIAN, H. A., SAFI, W., AND MASHADI, A. S. (1983). ‘Sugars, Tannins and Some Vitamins Contents of Twenty Five Date Cultivars Grown in Saudi Arabia at the Khalal (Nature Color) and Tamer (Ripe) Stages’. *The First Symposium on the Date Palm*, King Fayçal University Al Hassan, Kingdom of Saudi Arabia.

SAYAH, Z. ET OULD EL HADJ, M. D., (2010). Etude comparative des caractéristiques physicochimiques et biochimiques des dattes de la cuvette d'Ouargla. *Annales des Sciences et Technologie*, 2 (1).

SBIAI, A. (2011). *Matériaux composites à matrice époxyde chargée par des fibres de palmier dattier: Effet de l'oxydation au tempo sur les fibres*. Thèse de doctorat en matériaux polymères, Ecole doctorale matériaux, Lyon, 251 p.

SCHOMBURG, D. AND SALZMANN, M. (1991). *Enzyme Hand book 4. Classe 3: Hydrolases*. Berlin Heidelberg, Germany: Springer-Verlag.

SCRIBAN, R. (1999). *Biotechnologies*, 2^{ème} édition. Paris: Techniques et documentation-Lavoisier.

SCHUCK P. (2003). Spray drying of dairy products: state of the art, *Lait* 82 375–382.

SIBOUKEUR, O. (1997). *Qualité nutritionnelle, hygiénique et organoleptique du jus de dattes*. Thèse de magistère, INA, El Harrach, Alger.

SIBOUKEUR, O., OULD EL HADJ, M. D. ET ZARGAT, F. (2001). *Contribution à l'étude de la production d'acide citrique par Aspergillus niger cultivée sur moût de dattes de la variété Ghars*. *Revue des Energies Renouvelables*, 93-96.

SIBOUKEUR O. (2007). Etude du lait camelin collecté localement : caractéristiques physico-chimiques et microbiologiques ; aptitudes à la coagulation. Thèse de Doctorats en sciences agronomiques, Institut National Agronomique El-harrach-Alger, 131 p.

SIDKEY, N. M., ABO-SHADI, M. A., BALAHMAR, R., SABRY, R. AND BADRANY, G. (2011). Purification and characterization of α -amylase from a newly isolated *Aspergillus flavus* F₂Mbb. *International Research Journal of Microbiology*, 2 (3), 96-103. On ligne: <http://www.interestjournals.org/IRJM>

- SIDKEY, N. M., SHASH, S. M., AMMAR, M. S. (1997).** Partial purification and characterization of α -amylase biosynthesized by *A. flavus*, S-7 allowed to grow on hyacinth water homogenate. *Al-Azhar Bull Sci*, 8 (2), 545-561.
- SIENKIEWICZ T ET RIEDEL C L. (1990).** Whey and whey utilization: possibilities for utilization in agriculture and circhen-Buer, Gennany. 379.
- SINDHU, R., SUPRABHA, G. N. AND SHASHIDHAR, S. (2009).** Optimization of process parameters for the production of a-amylase from *Penicillium janthinellum* (NCIM 4960) under solid state fermentation. *African Journal of Microbiology Research*, 3, 498-500.
- SOCCOL, C. R., MARIN, B. AND RAIMBAULT, M. (1994).** Breeding and grwth of *Rhizopus* in raw cassava by solide state fermentation. *Applied Microbiology Biotechnology*, (41), 330-336.
- SOTTIEZ P. (1985).** Produits dérivés des fabrications fromagères .Tec et Doc., Lavoisier, Paris, France, 1975,357–392.
- SOUZA, P. M. ET OLIVEIRA, P. ET MAGALHÃES, S. (2010).** Application of microbial α -amylase in industry. *Brazilian Journal of Microbiology*, (41), 850-861: ISSN 1517-8382
- TAKAMINE, E. J., (1984).** Preparing and making taka-koji. *U. S. Patent*, 525-820.
- TATSINKOU, F. B., TAVEAI, F., AND NDJOUENKEUI, R. (2005).** Production and partial characterization of a thermostable amylase from ascomycetes yeast strain isolated from starchy soils. *African Journal of Biotechnology*, 4 (1), 14-18. En ligne: <http://www.academicjournals.org/AJB>
- THIERRY, N. K. (2015).** *Diversité génétique d'isolats de Cryptococcus et Candida issus des patients VIH positifs à Yaoundé et étude de leur sensibilité aux antifongiques et aux extraits de plantes.* Thèse de Doctorat en Biologie santé et Phytobiochimie, université Montpellier I, France, 282 p.
- TONELLI, N. ET GALLOUIN F. (2013).** *Des fruits et des graines comestibles du monde* (2^{ème} Ed). Paris: Lavoisier.
- TORTORA, J., FUNK, B. F. AND CASE CH. L. (2003).** *Introduction à la microbiologie.* Canada: Edition ISBN.

- ULACIO, D., PEREZ, C., AND PINEDA, Y.J. (1997).** Mycoflora in tobacco plant roots (*Nicotiana tabacum*) in portuguesa state, Venezuela. *Bioagro. Journal*, 9 (1), 3-11.
- VALLIER P., BATA J., COLABERT L., 1977-** Optimal conditions of alpha-amylase production by *Aspergillus oryzae* in liquid media .*Ann.Microbial*.128(3):359-71.
- VAN DER MAAREL, M. J., VAN DER VEEN, B., UITDEHAAG, J. C. M., LEEMHUIS, H. ET DIJKHUIZEN, L. (2002).** Properties and applications of starch converting enzymes of alpha amylase family. *Journal of Biotechnology*, 94, 155 -137, DOI: 0168-1656/02/\$
- VAN UDEN, N. AND FELL, J. W. (1968).** *Advances in Microbiology of the Sea*, 1^{er} Ed. New York: Academic Press.
- VIOLLEAU V. J. (1999).** Déminéralisation par électrodialyse en présence d'un complexant application au lactosérum. Thèse de Doctorat. 3.
- WANDERLEY, K. J., TORRES, F. A. AND MORAES, L. M. (2004).** Characterization of alpha-amylase from the yeast *Cryptococcus flavus*. *FEMS Microbiology Letters*, 231 (2), 165-
- WEST, E. S., TODD, W. R., MASON, H. S. AND VAN BURGGEN, J. T. (1967).** *Text book of biochemistry*, 4th ed. MacMillan Co, N. Y. Collier MacMillan, Ltd., London.
- WICKERHAM, L. J. (1951).** *Taxonomy of yeasts*. United States of America (USA): Department of agriculture, Washington, D.C.
- WICKERHAM, L. J. AND BURTON, K. A. (1948).** Carbon assimilation tests for the classification of yeasts. *Journal of Bacteriology*, (56), 363-371.
- YANG S-Y., JONES J-H., OLSEN F- J., PETERSON J., 1980-**Soil as a medium for dairy liquid waste disposal. *Journal of Environmental Quality*. (9) : 370 - 372.
- ZOUAOUI N., 2012-** Effet des poly phénols sur la résistance à l'infestation fongique dans le grain de blé dur. Thèse magister. Biotechnologie Alimentaire. CONSTANTINE. UNIVERSITE MENTOURI .133p.
- ZIDANI, S. (2009).** *Influence des techniques de séchage sur la solubilité des protéines de la levure Saccharomyce scerevisiae produite dans un milieu à base de datte*. Thèse magister en agronomie, université El-hadj Lakhdar, Batna, 135 p.

ZOUBIRI, L. (2012). *Production d'alpha amylase par des moisissures cultivées sur milieu à base de rebuts de dattes.* Thèse magister en Biotechnologie alimentaire, université Mentouri, Constantine, 104.

Annexes

Annexe 1: Milieux de culture**1. Potato dextrose agar (PDA) (Guiraud, 1998)****✓ Composition:**

Pomme de terre	200 g
Glucose	20 g
Agar	20 g
Eau distillée.....	1000 ml

✓ Protocole:

- Laver la pomme de terre ;
- La découper en cubes dans 500 ml d'eau distillée;
- Porter à ébullition pendant 30 – 45 min;
- D'autre part faire fondre l'agar dans 500 ml d'eau distillée;
- Écraser la pomme de terre, filtrer puis ajouter le filtrat à la solution d'agar;
- Ajouter le glucose;
- Compléter le volume à 1000 ml;
- Stériliser par autoclavage à 121° C / 15 min.

2. Milieux Yeast Carbon Base (YCB)**✓ Compositions:**

Glucose	5 g
KH ₂ PO ₄	0.25 g
MgSO ₄	0.125 g
Agar	5 g
Eau distillée	250 ml

✓ Protocole:

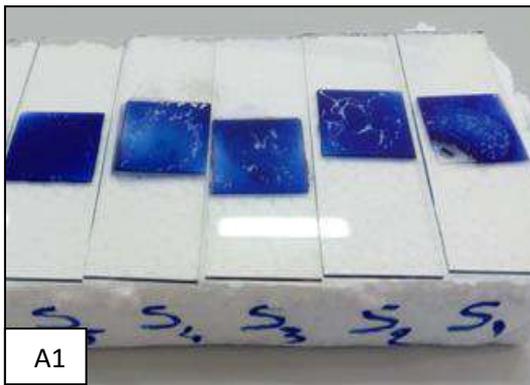
- Préparation des ingrédients;
- Ajouter l'agar dans 250 ml d'eau distillée;
- Ajouter le glucose, KH₂PO₄ et MgSO₄;
- Porter à ébullition pendant 30 à 45 min;
- Stériliser par autoclavage à 121° C / 15 min.

3. Milieu Eau de levure 0.5 %

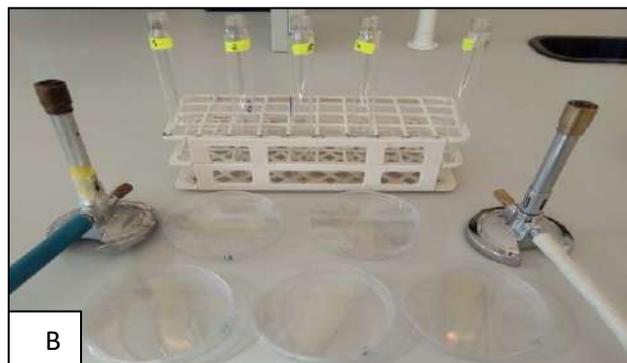
- 5 g Extrait de levure;
- 1000 ml Eau distilléE.
- Ajuster le pH à 5.0 et stériliser par autoclavage à 120 °C/ 15 min.
-

Annexe 2: Identification phénotypique des souches

1. Etude des caractères microscopiques

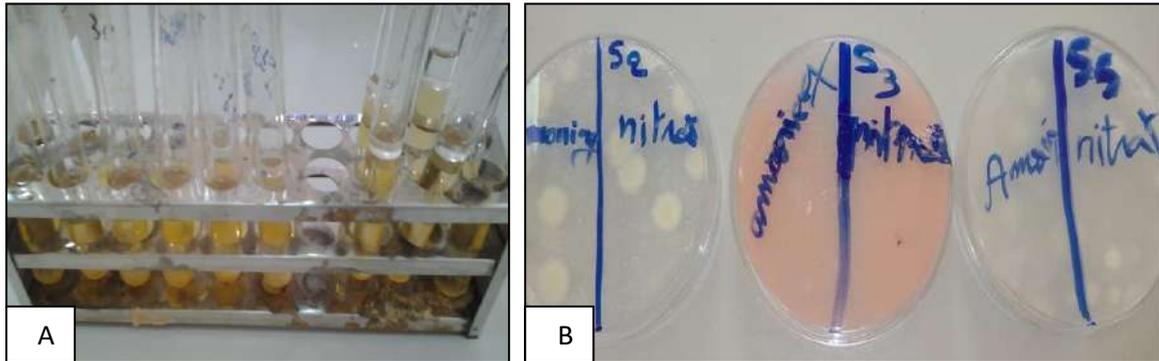


A/ Morphologie cellulaire et mode de multiplication végétative (A1: préparation des échantillons, A2: observation microscopique)



B/ Test de filamentation

2. Etude des caractères biochimiques et physiologiques



A/ Test de fermentation des sucres sur milieu Eau de levure 0.5 %

B/ Test d'assimilation des composés azotés (nitrate de potassium et sulfate d'ammonium)

Annexe 3: Dosage des sucres totaux (Dubois et al., 1956)

A 1 ml d'extrait enzymatique, on ajoute 10 ml d'eau distillé suivi par l'addition de 1 ml de phénol à 5 % et 5 ml d'acide sulfurique concentré. Après l'agitation du tube, laisser refroidir à obscurité pendant 30 min à température ambiante.

L'apparition du complexe jaune orange est suivie en mesurant la densité optique à 490 nm. Le taux de sucre est calculé par référence à une courbe d'étalonnage préalablement établie avec une solution mère de glucose à 100 µg/ml

✓ **Réactifs**

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

✓ **Protocole expérimentale**

- Ajouter à 1 ml d'échantillon, 10 ml d'eau distillé suivi par l'addition de 1 ml de phénol et 5 ml d'acide sulfurique concentré. Agiter et laisser reposer 30 min à température ambiante.
- Mesurer la coloration jaune orangé à 490 nm, les valeurs obtenues sont traduites en concentrations de glucose par référence à une courbe d'étalonnage préalablement établies.



Dosage des sucres totaux.

Annexe 4: Dosage des protéines (Bradford, 1976)

✓ Protocole

Les protéines ont été dosées par la méthode de **Bradford (1976)**, où le bleu de coomassie forme avec les protéines un complexe coloré présentant un maximum d'absorption à 595 nm. La coloration très sensible peut être effectuée très rapidement et reste stable pendant 30 min, le Sérum Albumine Bovine (SAB) est utilisé comme standard.

✓ Préparation de bleu de coomassie

- 100 mg bleu de coomassie dissous dans 50 ml éthanol à 95 %;
- On ajoute 100 ml d'acide phosphorique à 85 %;
- On complète le volume jusqu'à 1 l avec de l'eau distillée.

✓ Protocole expérimental

- 0.1 ml de l'extrait enzymatique;
- On ajoute 5 ml de bleu de coomassie;
- Le mélange est laissé à obscurité pendant 2 à 30 min à la température ambiante;
- L'absorbance est lue à 595 nm.

Annexe 5: Dosage de l'activité α -amylasique (Bernfeld, 1955)**✓ Réactifs pour le dosage de l'amidon**

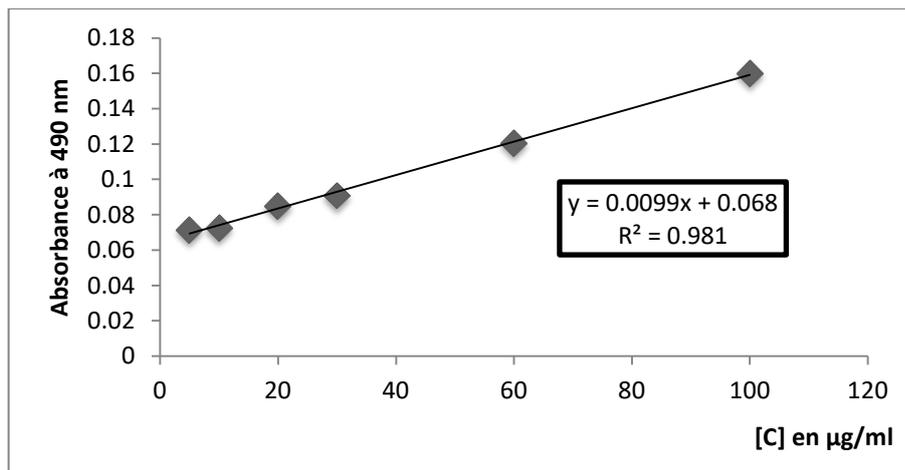
- Solution d'amidon à 2 g/l;
- Réactif de l'iode: 0.2 g d'I₂ dissous dans 100 ml de KI à 2 % dans 0.1 N HCl;
- 1 M HCl.

✓ Protocole expérimentale

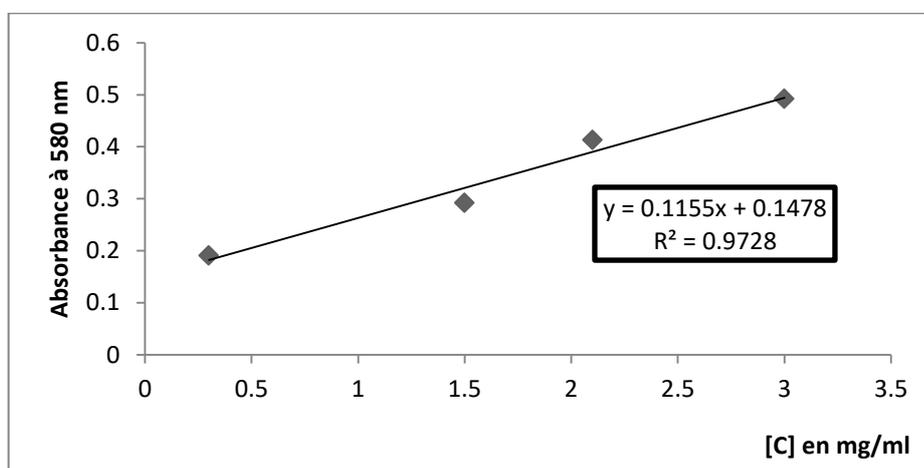
- 1 ml de l'extrait enzymatique tamponnée à pH= 7 avec du tampon phosphate 0.1 M;
- 1 ml de substrat (solution d'amidon 2g/l);
- Incuber à 50 °C pendant 30 min;
- La réaction est arrêtée par addition de 0,5 ml HCl suivie de 2,5 ml du réactif de l'iode;
- L'absorbance est lue à 580 nm contre le blanc (préparé à partir de l'extrait enzymatique dénaturé à 100 °C).

**Dosage de l'activité α -amylasique.**

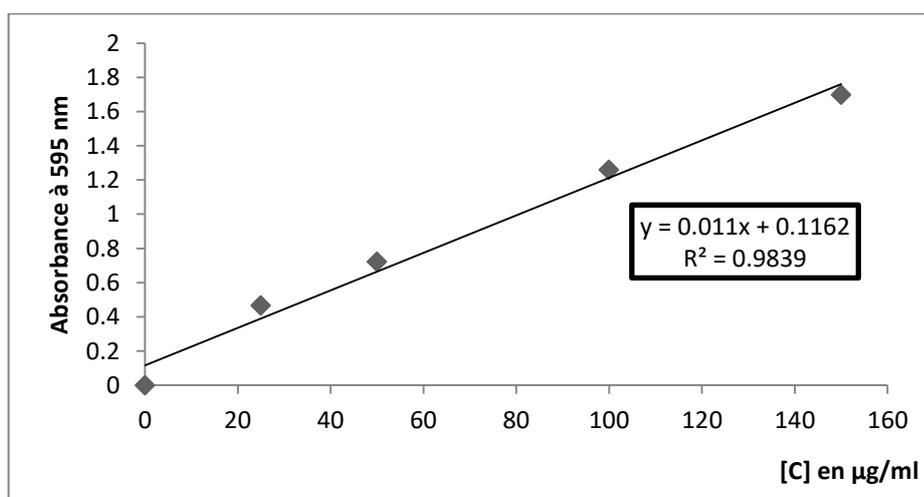
Annexe 6: Courbes d'étalonnages



Courbe d'étalonnage du glucose

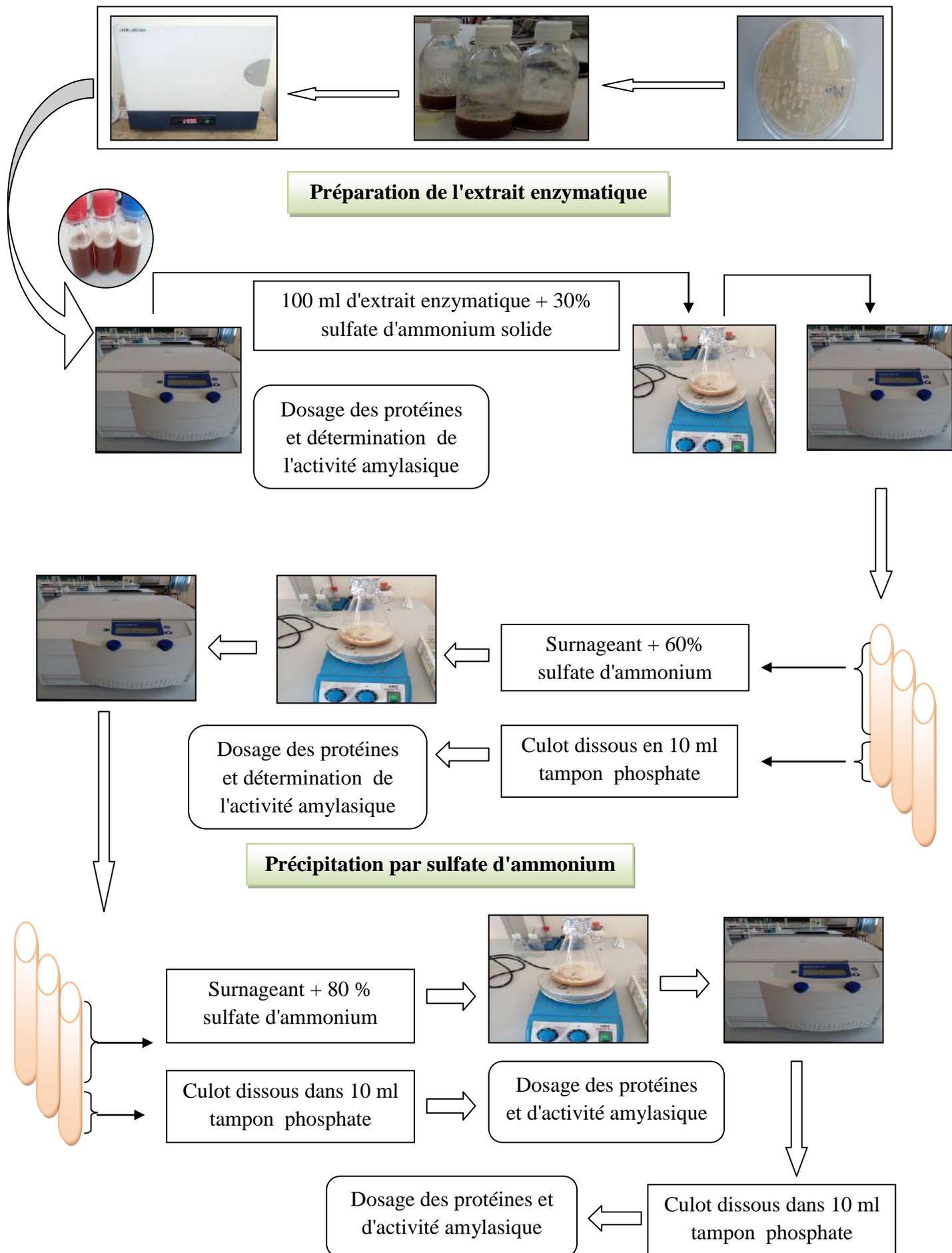


Courbe d'étalonnage de l'amidon



Courbe d'étalonnage des protéines (BSA)

Annexe 7: Purification partielle de l' α -amylase



Résumé

Le présent travail s'inscrit dans le cadre de la valorisation du lactosérum par la production d' α -amylase sécrétée par des souches levurières isolées à partir des deux biotopes (sols sahariens et blé dur) issus de la région d'El-Oued.

Quarante souches levurières ont été isolées; à savoir 17 à partir des sols et 23 à partir de Blé dur (*T. durum*). Ces dernières appartiennent à 6 genres; *Candida*, *Pichia*, *Schwanniomyces*, *Lipomyces*, *Saccharomyces* et *Rhodotorula*. La sélection des souches amylolytiques a permis de repertorier 5 espèces à haute activité enzymatique: *Candida glabrata*, *Pichia anomala*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Schwanniomyces occidentalis* et *Lipomyces kononenkoae*.

Les échantillons de lactosérum (bovin, caprin et camelin) issus des laiteries implantées dans la wilaya de Ghardaïa, présentent un taux de lactose autour 50 g/l, une teneur en cendres pouvant atteindre une valeur de 7g/l, avec un pH acide, favorisant le développement des levures. Le milieu à base de lactosérum caprin semble représenter un support le plus convenable, pour la production enzymatique par rapport aux milieux à base lactosérum bovin et camelin. Parmi les 5 souches sélectionnées; *Candida glabrata* et *Schwanniomyces occidentalis*, présentent une aptitude de production de biomasse et d'activité enzymatique plus remarquables (biomasse de 50g/l et AE de 2500 UI).

L'optimisation des conditions de production enzymatique montre que le pH optimal est de 4 à 5 et que la croissance maximale est obtenue à 40 °C. La concentration du substrat affecte l'activité enzymatique (meilleur rendement à 3,4 et 5%), ainsi, l'extrait de levure à 1% améliore le rendement de biomasse et de l'activité enzymatique; la concentration de l'inoculum influence seulement la quantité de biomasse (meilleure production à 3 et 4% de l'inoculum).

La purification partielle de l' α -amylase de *Candida glabrata* et *Schwanniomyces occidentalis* par le sulfate d'ammonium (60%), a donné une activité d'enzyme de 78.88 $\mu\text{mol}/\text{mn}$ avec un degré de purification de 2.73 fois. L' α -amylase partiellement purifiée, a un pH optimum de 6 et une température optimale de 55 °C. L'étude cinétique de l' α -amylase de *C. glabrata* partiellement purifiée a donné une V_{max} de (10.1617 $\mu\text{g}/\text{s}$) et un K_m de (0,27 mg/ml).

Mots clés: α -amylase, levure, purification, lactosérum, milieu extrême, Ghardaïa.

Abstract

The present work is part of the whey valorization by the production of α -amylase secreted by yeast strains isolated from different biotopes (Saharan soils and durum wheat) from the region of El-Oued.

It has been possible to isolate forty yeast strains; namely 17 from the soil and 23 from durum wheat (*T. durum*). These strains belong to 6 genera; *Candida*, *Pichia*, *Schwanniomyces*, *Lipomyces*, *Saccharomyces* and *Rhodotorula*. The selection of the amylolytic strains allowed to identify 5 species with high activity: *Candida glabrata*, *Pichia anomala*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Schwanniomyces occidentalis* and *Lipomyces kononenkoae*.

The samples of whey (cattle, goats and camels) from dairies implanted in the wilaya of Ghardaia, have a rather important biochemical composition with a lactose level around 50g / l, a ash content up to 7g / l, with an acidic pH; promoting the development of yeasts.

The goat whey medium has a more suitable support for enzymatic production compared to bovine and camel whey-based media. Of the 5 selected strains; two strains, *Candida glabrata* and *Schwanniomyces occidentalis*, have a more remarkable ability to produce biomass and enzymatic activity (biomass of 50g / l and AE of 2500 IU).

The optimization of the enzymatic production conditions shows that the optimum pH and 4 to 5 and our strains have a maximum growth at the temperature of 40°C. The concentration of the substrate affects the enzyme activity (better yield at 3.4 and 5%), thus the 1% yeast extract improves the yield of biomass and enzymatic activity; the concentration of the inoculum only influences the amount of biomass (better production at 3 and 4% of the inoculum).

Partial purification of α -amylase from *Candida glabrata* and *Schwanniomyces occidentalis* by ammonium sulfate (60%) gave an enzyme activity of 78.88 $\mu\text{mol}/\text{mn}$ with a purification degree of 2.73-fold. The partially purified α -amylase has an optimum pH of 6 and an optimum temperature of 55 °C. The kinetic study of partially purified *C. glabrata* α -amylase yielded a V_{max} of (10.1626 $\mu\text{g}/\text{s}$) and a K_m of (0.27 mg / ml).

Key words: α -amylase, yeast, purification, whey, extreme medium. Ghardaïa