



N série:.....

République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
جامعة الشهيد حمزة لخضر الوادي
Université Echahid Hamma Lakhdar -El OUED
كلية علوم الطبيعة والحياة
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
قسم البيولوجيا الخلوية والجزيئية
Département de biologie Cellulaire et Moléculaire

MEMOIRE DE FIN D'ETUDE

En vue de l'obtention du diplôme de Master Académique en Sciences
biologiques

spécialité : Biochimie appliquée

THEME

**Caractérisation des enzymes protéolytiques des
souches fongiques isolées à partir du sol saharien**

Présentés Par :

M^{elle} MAAMRA Fatma

M^{elle} MAISSA Nadjat

Devant le jury composé de:

Président: M. MADJOUR Abd Elhak

M.A.A, Université d'El-Oued

Promoteur : M. LAICHE TOUHAMI Ammar

M.A.A, Université d'El-Oued

Examineur: M.Tlili Mohamed Laid

M.A.A, Université d'El-Oued

Invitée : Dr. BEN MYA Omar

M.C.A, Université d'El-Oued

Année universitaire : 2017/2018

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ



Dedicaces

Une dédicace particulière et sincère à notre enseignant M^R TOUHAMI Laiche Ammar

Je Dédie ce modeste travail

*À ma chère mère BEN SASSI FADILA et mon cher père AHMED, pour leur endurance et
Leurs sacrifices sans limites.*

*À mes frères: TEDJENI, ABD ENNOUR, EL MOUNTACE, MOUHAMED
ELHADDI et mes sœurs; HANA et EL HADDA, en reconnaissance de leur affection
toujours constante.*

*À mon prof, CHENNA Adala et mon amies; GUEMARI Maissa,
BOUKHAZNA Wafa, LORBBBI SARA et ALLAG Noussaiba.*

À tous ces intervenants, je présente mes remerciements, mon respect et ma gratitude.

FATMA

Je Dédie ce modeste travail

*À ma chère mère CHAIB SALIMA et mon cher père MABROUK, pour leur endurance et
Leurs sacrifices sans limites*

*À mes frères: ALA EDDEN, AHMED, AMDJED, YASSIN et ma sœur;
BOUTHEINA, en reconnaissance de leur affection toujours constante*

À mon amie IMANE

À tous mes proches, mes amis, mes camarades de promotion

NADJET

REMERCIEMENTS

Avant tout chose, nous remercions « الله », l'omnipotent, pour nos avoir donné la force, la patience et le courage pour mener ce travail à son terme.

À nos présidents de jury , " M. MEDJOUR Abdelhak " , qui nous a fait l'honneur d'accepter la présidence de cette mémoire. Hommage respectueux,

À notre jury de soutenance "M. TLILI Mohammed Laid " , et Dr. Ben MYA Omar , qui nous ont fait l'honneur de juger ce travail que ce travail soit le témoignage de notre reconnaissance et de notre profond respect

À notre encadreur de mémoire M . TOUHAMI Laiche Ammar , qui est notre guide dans cette recherche. Ses compétences scientifiques , son dévouement total pour la recherche et pour avoir accepté de nous encadrer, pour son dynamisme, son aide et ses précieux conseils, nos ont permis d'avancer plus loin dans mes recherches.

Un grand merci aux notre profs, Dr. BEN MYA Omar docteur en chimie des matériaux et chercheur à préparation de poudre de perovskite et ses caractéristiques et applications & M. LAHMADI Rida chef de la division de la chimie, sur leur aide nous, tous les efforts pour nous soutenir afin d'obtenir des résultats valables.

Nos sentiments de reconnaissance et nos remerciements vont également à Mr TLIBA Ali ingénieur de laboratoire de la recherche dans l'Institut des sciences et de la technologie (VTRS) pour son aide. Nous le remercions pour sa bienveillance et ces conseils.

Nos remerciements à tous techniciens de laboratoire des produits agroalimentaire de l' institut I.N.R.A.A et l'équipe de laboratoire de contrôle de qualité de direction du commerce d'EL Oued

À tout l'ensemble des membres du laboratoire département de la science de la nature et de la vie, Université HAMMA LAKHDAR, Eloued .

Nos remerciements M^{lle} MAAMRA Oum El Hana , troisième doctorat d'informatique et programmeur de logiciels et chercheuse à structure de données complexes et distribuées .

À tous ces intervenants, nous présentons nos remerciements, nos respects et nos gratitude.

Résumé

Le but d'étude est de produire et d'étudier les propriétés de l'enzyme protéase, produite par la levure isolée du sol du désert algérien d'El Oued (Chatte). Quatre types de levures ont été isolés, et ces espèces ont été sélectionnées en utilisant un milieu de traitement lait gélosé stérile, avec 5% de caséine. Lorsque les résultats obtenus ont montré que quatre souches de levure ont la capacité de produire une protéase pour cette substance .

En étudiant les caractéristiques des phénotypes, il nous est apparu que les quatre types de souches de levure différentes: *Cryptococcus neoformans* pour souche 01, la souche 02 sont *Coccidioides Malbranchea* , que ce soit la souche 03 sont *Onychocola canadensis*, et la souche 04 *Neoscytalidium* . Après avoir procédé à des analyses physico-chimiques de jus dattes, obtenus par les résultats ont montré que le jus de dattes est très riche en sucres pourcentage estimé (70%), qu'il est approprié pour la culture de levure isolée à partir du sol, et est responsable de la production des caséines analysé de la protéase. On a également étudié la production de l'enzyme dans le centre d'un milieu liquide stérile, à l'intérieur d'un des flacons en verre stériles avec une capacité de 200 ml contenant chacun 50 ml du centre de l'implant, où (température 30 ° C et pH 5).

Dans ces conditions, la masse des cellules produites à 38 g / l et l'activité enzymatique ont été estimées à 1700 unités, telles qu'obtenues au cinquième jour d'incubation.. En étudiant et en comparant de production de la protéase à des degrés divers, ont été sélectionnés souche 1 *Cryptococcus neoformans*, produisant une souche meilleure par rapport au des autres espèces.

En fin de compte, les résultats obtenus ont montré par la purification de l'enzyme, en utilisant une centrifugeuse spéciale, pour séparer l'enzyme à partir des cellules de levure et le reste des composants de la centrale de l'implant, où la température de 4 ° et la rotation vitesse du cycle 9000 pendant 20 minutes, plus Dialyse technologie, que nous utilisons dans lequel une membrane spécifique du type de Spectra / Por® 3, pour séparer l'enzyme à partir des sels restants à la suite de l'utilisateur de sulfate d'ammonium au cours de l'expérience, de sorte que nous avons pu finalement et à travers ces techniques pour obtenir la protéase avec un caractère liquide du produit pure par la levure isolée de reproduction saharien algérien dans la Wilayat d'El Oued.

Mots-clés: protéase, levure, jus de dattes, purification, *Cryptococcus neoformans*, Spectra / Por® 3.

Abstract

The aim of the study is to produce and to study the properties of the protease enzyme, produced by the yeast isolated from the soil of the Algerian desert of El Oued (Chatt). Four types of yeasts were isolated, and these species were selected using sterile milk agar with 5% casein. When the results obtained showed that four yeast strains have the ability to produce a protease for this substance.

By studying the characteristics of the phenotypes, it appeared to us that the four different types of yeast strains: *Cryptococcus neoformans* for strain 01, the strain 02 are *Coccidioides Malbranchea*, that it is the strain 03 are *Onychocola canadensis*, and the strain 04 *Neoscytalidium*. After conducting physicochemical analyzes of juice dates, obtained by the results showed that the dates juice is very rich in estimated percentage (70%) sugars, that it is suitable for the yeast culture isolated from the soil, and is responsible for producing casein analyte protease. The production of the enzyme in the center of a sterile liquid medium was also studied inside one of the sterile glass vials with a capacity of 200 ml, each containing 50 ml of the center of the implant, where (temperature 30 ° C and pH 5.)

Under these conditions, the mass of the cells produced at 38 g / l and the enzymatic activity were estimated at 1700 units, as obtained at the fifth day of incubation. By studying and comparing production of the protease with various degrees, were selected strain 1 *Cryptococcus neoformans*, producing a better strain compared to the other species.

In the end, the results obtained showed by the purification of the enzyme, using a special centrifuge, to separate the enzyme from the yeast cells and the rest of the components of the implant plant, where the 4 ° temperature and 9000 cycle speed rotation for 20 minutes, plus Dialysis technology, which we use in which a specific membrane type Spectra / Por® 3, to separate the enzyme from the remaining salts as a result of the ammonium sulphate user during the experiment, so that we could finally and through these techniques to obtain the protease with a liquid character pure product by the isolated Algerian Saharan breeding yeast in the Wilayat d'El Oued.

Keywords: protease, yeast, date juice, purification, *Cryptococcus neoformans*, Spectra / Por® 3.

ملخص

الهدف من هذه الدراسة هو إنتاج و دراسة خصائص الإنزيم المحلل للكازيين (البروتياز) ، المنتج من طرف الخميرة المعزولة من التربة الجزائرية الصحراوية على مستوى ولاية الوادي ، ب (حي الشط).

حيث تم عزل أربعة أنواع من الخمائر ، ثم تم انتقاء هذه الأنواع باستعمال وسط زرع معقم lait gélosé ، مزود بمادة الكازيين بنسبة 5 % . حيث أظهرت النتائج المتحصل عليها ، أن السلالات أربعة من الخميرة لديها القدرة على انتاج انزيم البروتياز المحلل لهذه المادة .

من خلال دراسة الخصائص المورفولوجية ، الفيزيولوجية ، البيوكيميائية و الميكروسكوبية ، اتضح لنا أن الأنواع الأربعة من الخميرة مختلفة السلالات : *Cryptococcus neoformans* بالنسبة لسلالة 01 ، أما السلالة 02 فهي من نوع *Coccidioides Malbranchea* ، اما السلالة 03 فهي من نوع *Onychocola canadensis* ، و السلالة 04 من نوع *Neoscytalidium* .

بعد اجراء التحاليل الفيزيكيو كيميائية لعصير التمر ، أظهرت النتائج المتحصل عليها ، ان عصير التمر غني جدا بالسكريات التي تقدر نسبتها (70%) ، بحيث يعتبر وسط ملائم لزراعة الخميرة المعزولة من التربة ، و المسؤولة عن انتاج انزيم البروتياز المحلل للكازيين . كما تمت دراسة إنتاج الإنزيم في وسط زرع سائل معقم ، داخل قارورات زجاجية معقمة ذات سعة 200 مل ، تحتوي كل منها 50 مل من وسط الزرع ، حيث (درجة الحرارة 30 ° و درجة حموضة 5).

تحت هذه الظروف ، قُدرت كتلة الخلايا المنتجة ب 38 غ/ل و النشاطية الإنزيمية ب 1700 وحدة ، كاعلى نسبة متحصل عليها ، وذلك في اليوم الخامس من عملية الحضان . من خلال المتابعة الحركية لنمو الخميرة و التفاوت الملاحظ في انتاج الانزيم ، اتضح لنا ان إنتاج الانزيم مرتبط بنمو ونوع الخميرة المنتجة .

من خلال دراسة ومقارنة الأنواع الثلاثة المنتجة لانزيم البروتياز بدرجات متفاوتة ، تم انتقاء السلالة 1 *Cryptococcus neoformans* ، كأحسن سلالة منتجة للبروتياز مقارنة ببقية الانواع الاخرى .

في النهاية ، اظهرت النتائج المتحصل عليها من خلال تنقية الانزيم ، بواسطة استخدام جهاز طرد مركزي خاص ، لفصل الانزيم عن خلايا الخميرة وبقية مكونات وسط الزرع ، حيث درجة الحرارة 4° و سرعة الدوران 9000 دورة لمدة 20 دقيقة ، بالإضافة الى تقنية Dialyse ، التي استخدمنا فيها غشاء خاص من نوع Spectra/Por® 3 ، لفصل الانزيم عن الاملاح المتبقية نتيجة سلفات الامنيوم المستعمل خلال التجربة ، بحيث تمكنا في النهاية و من خلال هذه التقنيات من الحصول على إنزيم البروتياز ذو طبيعة سائلة نقية منتج من طرف خميرة معزولة من التربة الجزائرية الصحراوية بولاية الوادي بحي الشط .

الكلمات المفتاحية : البروتياز، خميرة ، عصير التمر ، تنقية، *Cryptococcus neoformans* ، Spectra/Por® 3 .

Liste des abréviations

A: Acidité titrable

°C: Degré Celsius

[C]: Concentration

CE: Conductivité électrique

Do: Doncité

Gal: Galactose

Glu: Glucose

I.N.R.A.A: Institut National de la Recherche Agronomique d'Algérie

Mal: Maltose

nm : nano mètre

POU : Protéines d'Organismes Unicellulaires

Sacc: Saccharose

SCP : Single Cell Protéins

U: Unité

MS: matière sèche

Liste des figures

Figure 1: Cycle biologique de la levure <i>S. cerevisiae</i>	6
Figure 2: Bourgeonnement de <i>S. cerevisiae</i>	7
Figure 3: Dattes entière (à gauche), et sa coupe longitudinale.....	21
Figure 4: dattes molles Ghars	22
Figure 5: Datte demi-molle Deglet-Nour.....	22
Figure 6: Dattes sèches Déгла-Beida	22
Figure 7: Technique d'isolement des souches levuriennes.....	33
Figure 8: Les étapes de préparation de jus de datte	37
Figure 9: Sélection de souches protéolytiques sur un milieu lait gélosé à 5 % de caséine (après 72 h d'incubation à 30 °C et à pH 5).....	46
Figure 10: variation du pH de milieu au cours de culture chez des souches levuriennes	52
Figure 11: variation de la biomasse au cours de la culture chez les souches levuriennes	53
Figure 12: Variation de la concentration des glucides au cours de la culture chez les souches levurèinnes.....	54
Figure 13: variation de concentration des protéines au cours de la culture chez les souches levurèinnes.....	55
Figure 14: variation de l'activité protéolytique au cours de la culture chez les souches levurèinnes.....	56
Figure 15: les étapes de préparation de milieu PDA.....	Annexe 01
Figure 16: le milieu de lait gélosé qui préparé	Annexe 01
Figure 17: les étapes de préparation de milieu d'eau de levure 0.5 %.....	Annexe 01
Figure 18: les étapes de la détermination l'humidité de datte	Annexe 03
Figure 19: la détermination du taux de cendres de datte.....	Annexe 03
Figure 20: les étapes de la détermination l'acidité titrable de datte par l'utilisation d'agitateur magnétique	Annexe 03
Figure 21: mesuré le pH de l'extrait enzymatique des souches sélectionnées par de pH mètre du marque CONSORT	Annexe 04
Figure 22: les étapes mesure de la biomasse par utilise le centrifugeuse à 3900 tours et l'étuve à 105 ° C	Annexe 04
Figure 23: détermination le dosage des sucres totaux par le spectrophotomètre UV MINI 1240.....	Annexe 04
Figure 24: détermination de dosage des protéines par le spectrophotomètre UV MINI 1240	Annexe 04
Figure 25: détermination la dosage de l'activité protéolytique par de spectrophotomètre UV MINI 1240.....	Annexe 04
Figure 26: Courbe d'étalonnage de glucose (1µg/ml) pour le dosage de sucre.....	Annexe 05
Figure 27: Courbe d'étalonnage utilisée (BSA 1µg/ml) pour le dosage des protéines	Annexe 05
Figure 28: Courbe d'étalonnage utilisée de concentration de tyrosine (1µg/ml) pour d'activité enzymatique.....	Annexe 05

Liste des Tableaux

Tableau 1: Trois grandes classes des levures	7
Tableau 2: Classification des protéases Selon la nature du site catalytique	16
Tableau 3: principales caractéristiques des trois types de dattes.....	23
Tableau 4: Composition biochimique des dattes.....	23
Tableau 5: Composition biochimique du jus de dattes	26
Tableau 6: de la caractérisation de membrane de dialyse CR.....	Error! Bookmark not defined.
Tableau 7: Analyses physicochimiques du sol étudié	44
Tableau 8: type du sol en fonction de matière organique	45
Tableau 9: Types de sol en fonction de la conductivité électrique.....	45
Tableau 10: isolement des souches de levures à partir d'échantillon de sol sur milieu gélosé PDA.....	45
Tableau 11: Les caractéristiques physicochimiques et biochimiques du sirop de datte de variété Ghars.....	47
Tableau 12: Caractères macroscopiques des quatre souches de levures sélectionnées.	49
Tableau 13: Caractères microscopiques (X100) des souches sélectionnées.....	50
Tableau 14: caractères biochimiques et physiologiques des souches sélectionnées	51
Tableau 15: Bilan de la précipitation fractionnée par le sulfate d'ammonium de la protéase produite par <i>C. neoformans</i>	58
Tableau 16: les types des études des caractères microscopiques et biochimiques et physiologique.....	Annexe02
Tableau 17: les étapes de préparation la solution tampon citrate de sodium	87 04

SOMMAIRE

Dédicaces	
Remerciements	
Résumés	
Liste des abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Introduction	01

PARTIE I: SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre I

Les souches fongiques

I.1. Les champignons	4
I.1.1. Les levures	4
I.1.1.1. Définition	4
I.1.1.2. Habitats	5
I.1.1.3. Caractères des levures	5
I.1.1.4. Morphologie des levures	5
I.1.1.5. Structure des levures	6
I.1.1.6. Reproduction	6
I.1.1.7. Classification et identification des levures	7
I.1.1.8. Facteurs de croissance des levures	7
I.1.1.9. Conditions physico-chimiques de croissance	8
I.1.1.10. Le métabolisme chez levures	9
I.1.1.11. Intérêt industrielles des levures	10
I.1.1.12. Applications des levures	11

Chapitre II

La protéase

II.1. Généralité sur les enzymes	13
II.2. Protéases	13
II.2.1. Définition	13
II.2.2. Origine des protéases	13
II.2.3. Caractères des protéases	14
II.2.4. Classification des protéases	14

II.2.4.2.Selon le mode d'attaque de la chaîne polypeptidique	15
II.2.4.3.Selon leur besoin en ATP	16
II.2.5. Mode d'action des protéases	16
II.2.6. Applications des protéases	17
II.2.6.1.Applications alimentaires	17
II.2.6.2.Industrie des détergents	18
II.2.6.3.Domaine pharmaceutique et médicale	18
II.2.6.4.Traitement des eaux usées industrielles	19
II.2.6.5. Autres applications.....	19
<u>Chapitre III</u>	<u>Les dattes</u>
III.1. Datte	21
III.1.1. Définition	21
III.1.3. Composition biochimique des dattes	23
III.1.4. Stades d'évolution de la datte.....	24
III.1.5. Valeur nutritionnelle des dattes	24
III.1.6. Usage traditionnel et effets thérapeutiques des dattes	25
III.2. Jus de datte	25
III..2.1 Définition	25
III..2.2. Composition biochimique du jus de dattes.....	25
III..2.3. Propriétés du jus de datte	27
III..2.4. Aspects bactériologiques.....	28
III.2.5. Utilisations de jus da datte	28

Partie II Expérimentale

<u>Chapitre I</u>	<u>Matériels et méthodes</u>
I. Matériels et méthodes	31
I.1. Matériels.....	31
I.1.1. Matériel biologique	31
I.2. Méthodes	31
I.2.1. Analyse du sol.....	31
I.2.3. Purification et sélectionnée des souches.....	33
I.2.4.Conservation des souches	34
I.2.5. Identification des souches.....	34
I.2.6. Production enzymatique	36

I.2.7. Préparation de l'inoculum.....	39
I.2.8. Conduite de la fermentation.....	39
I.2.9. Cinétique de production enzymatique des souches sélectionnées.....	40
I.2.10. Purification de protéase	41

Chapitre II

Résultats et discussion

II. Résultats et discussion	44
II.1. Analyses physicochimiques du sol	44
III.2. Isolement des souches	45
II.3. Sélection des souches protéolytiques	46
II.3.1 Mise en évidence de l'activité protéolytique	46
II.4. Production de la protéase	47
II.4.1. Analyses physicochimiques et biochimiques de sirop de datte	47
II.5. Identification	49
II.5.1. Etude de caractères macroscopiques	49
II.5.2. Etude de caractères microscopiques.....	49
II.5.3. Etude des caractères biochimiques et physiologiques.....	50
II.6. Cinétique de la production de protéase	51
III.6.1. Evolution du pH	51
II.6.2. Evolution de la biomasse.....	53
II.6.3. Evolution de la concentration des glucides	54
II.6.4. Evolution de la concentration des protéines	55
II.7 Purification de la protéase à partir <i>C. neoformans</i>	57
II.7.1. Précipitation par sulfate d'ammonium et dialyse.....	58
<i>Conclusion et perspective</i>	59
<i>Référence Bibliographique</i>	60
Annexe	

Introduction

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

Les enzymes protéolytiques ou protéases sont des enzymes qui catalysent l'hydrolyse des protéines. Par la diversité de leurs applications, elles représentent l'un des plus grands groupes d'enzymes industrielles. De plus, les protéases sont ubiquistes ; elles se retrouvent aussi bien chez les plantes que chez les animaux et les microorganismes. Cependant, grâce à leur diversité biochimique extensive, les microorganismes représentent une source exceptionnelle de protéases. En effet, quarante pourcent des enzymes industrielles sont produites par les microorganismes parmi lesquels, des souches fongiques (**García & al., 2009**). Celles-ci possèdent plusieurs avantages comme leur qualité GRAS (Generally Regarded As Safe) et leur aptitude à produire une large gamme d'enzymes extracellulaires.

Les dattes à faible valeur commerciale peuvent être utilisé comme substrats carbonés par les espèces microbiennes (levures, bactéries,...etc.) afin de produire la biomasse. Les levures sont les premiers micro-organismes à avoir été observés au microscope par Antoine Van Leeuwenhoek qui les a dessinées vers 1680. Elles constituent une source précieuse de protéines car elles sont le siège d'une biosynthèse protéique très active (**Bacha, 2008**).

Le but de notre travail consiste à:

- Isoler et identifier les souches fongiques qui productrice des protéases.
- Etude de la cinétique enzymatique et la purification de protéase.
- Etudier la cinétique de la production de la protéase par les souches sélectionnées sera entreprise. Elle sera suivie par une purification, afin d'étudier quelques propriétés physicochimiques nécessaires pour une éventuelle application de il y' vas enzyme, par ce qu'il y 'a protéases plus dans microorganisme utilisée. .

Partie I

Synthèse bibliographique

Chapitre I

Les souches fongiques

I.1. Champignons

Les champignons sont des organismes eucaryotes, hétérotrophe, immobile, appartenant au règne des Fungis ,caractérisés par une paroi cellulaire composée de polysaccharides azotés (chitine) , ce qui lui assure une certaine résistance aux contraintes du milieu extérieur (**Bencheikh , 2011**) , les champignons sont caractérisés par un mycélium, formé de filaments nommés hyphe .Organismes hétérotrophes, sans chlorophylle, ils tirent leur nourriture soit de matière organique morte; ce sont alors des champignons saprophytes, soit de tissus végétaux vivants, pour les parasites.

Les champions sont incapable de réaliser la photosynthèse (absence de chloroplastes) et présentent une forme végétative composée de cellules assemblées en filaments ou hyphes avec une reproduction sexuée et/ou asexuée (**Hugues, 2009**) .

Leur nombre est évalué à ce jour à environ 80.000 espèces fongiques dans le monde entier (**Purves & al.,1994**) . Ces champignons peuvent être subdivisés en champignons inférieurs et champignons supérieurs. Les champignons inférieurs sont unicellulaires et constituent un groupe hétérogène. Les champignons supérieurs sont divisés en trois groupes: les Ascomycètes, les Basidiomycètes et les Deutéromycètes (**Hugues, 2009**).

I.1.1.Levures

I.1.1.1. Définition

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

Les levures sont des micro-organismes eucaryotes (noyau délimité), non photosynthétiques, chimio-hétérotrophes ; c'est - à dire qu'elles sont capables de tirer leur énergie à partir de réactions d 'oxydo- réduction ou de fermentation de composés chimique tels que le sucres (**Guiraud & Galzy , 1998**) . Elles sont ubiquitaires , on les rencontre fréquemment dans l'eau , le sol , les feuilles des végétaux , les mouts de fruits à la surface ou à l'intérieur d'autre être vivants etc ., (**Bouix & Leveau , 1991 ; Scriban & 1993 ; Bouix & Leveau 1993 & Pol ,1996**) .

Les levures sont des champignons unicellulaires sur une partie ou sur l'ensemble de leur cycle végétatif. Certaines peuvent former des associations cellulaires, ou se présenter sous forme filamenteuse à certains stades de leur vie (**Bouix & Leveau, 1991**).

I.1.1.2. Habitats

Dans la nature, les levures se trouvent principalement sur les végétaux riches en sucres directement assimilables (**Bouix & Leveau, 1991**). D'autres, se développent au niveau des eaux douces et profondes (**Leveau & Bouix, 1993 & Pol, 1996**). Par ailleurs, une large variété de levures vit dans le sol, plus ou moins représentative de la flore levuriennes associée aux plantes, champignons et animaux vivants à la surface (**Leclerc, 1975**). Néanmoins, pour d'autres espèces, le sol demeure leur seul habitat (**Phaff & Starmer, 1987**).

I.1.1.3. Caractères des levures

- Les levures peuvent être définies comme des eucaryotes microscopiques.
- Elles sont des hétérotrophes faisant partie du groupe des champignons dont on les distingue par leur caractère unicellulaire (**Tibor, 2007**).
- Elles sont absences de vrai mycélium (au moins dans la plus grande partie de leur cycle biologique) (**Guiraud, 1998**).
- Elles sont développent, soit en surface, soit en profondeur des aliments (milieux solides ou liquides) (**Fao, 2007**).

Certaines levures sont cultivées industriellement et commercialisées pour leurs propriétés particulières de fermentation des sucres et de transformations partielle de ceux-ci en alcool et en gaz (production de bière et d'autres boissons alcoolisées fermentées, production de pain en utilisant la levure de boulangerie). En général, les levures ne provoquent pas de dangers pour la santé, même si certaines altèrent les aliments en les rendant impropres à la consommation (**Fao, 2007**).

I.1.1.4. Morphologie des levures

C'est la plus simple, il s'agit de cellule uniques, libres ou associées deux à deux ayant une morphologie caractéristiques : sphériques, ovoïdes parfois cylindriques, allongées, apicules, des formes plus spécifiques sont parfois distinguées comme la forme : apicules (*Hanseniaspora* et *Kloeckera*), en bouteille (*Pityrosporum*), en forme triangulaires (*Trigonopsis*) ainsi que en forme pyramidale et ogivales (*Dekkera*), (**Walker & White, 2005**).

Sous cette forme unicellulaire, les dimensions sont 2,5 à 10,5 µm de large et de 4,5 à 21 µm de longue. cette longueur peut dépasser, chez certain espèces le 30 µm. Ces dimensions ainsi que, leur aspect dépendent fréquemment de l'âge des cellules et des conditions de culture (**Scherr & Weaver, 1953**).

I.1.1.5. Structure des levures

- La cellule
- La paroi
- La membrane plasmique
- Le cytoplasme et les organites

I.1.1.6. Reproduction

Les levures ont un mode de multiplication bien spécial. Elles se reproduisent aussi bien par un cycle asexué (végétatif) que par un cycle sexué (sporulation) en fonction des conditions favorables ou défavorables du milieu (**Larpent & Larpent-Gourgaud , 1997**).

A. Reproduction sexuée

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

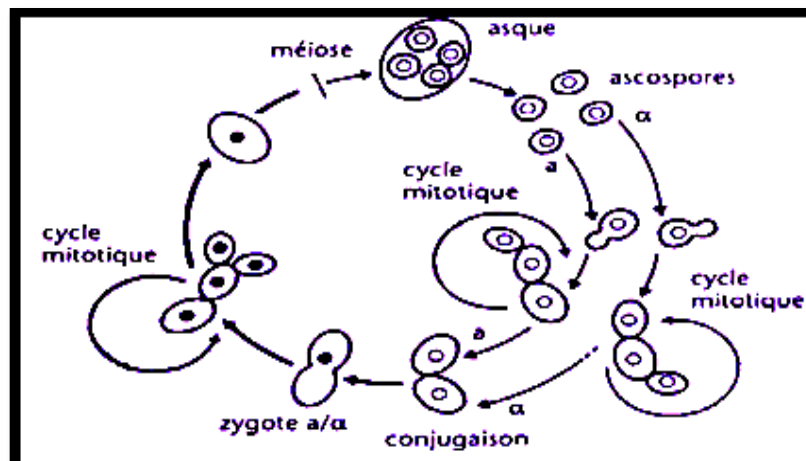


Figure 1: Cycle biologique de la levure *S. cerevisiae* (**Bourgeois et Larpent, 1996**)

B. Reproduction végétative (asexuée)

Pour la plupart des levures, la reproduction asexuée est la forme majeure de multiplication (**Bonaly, 1991**). Elle s'effectue par bourgeonnement ou par fission (scissiparité) à partir d'une cellule mère.

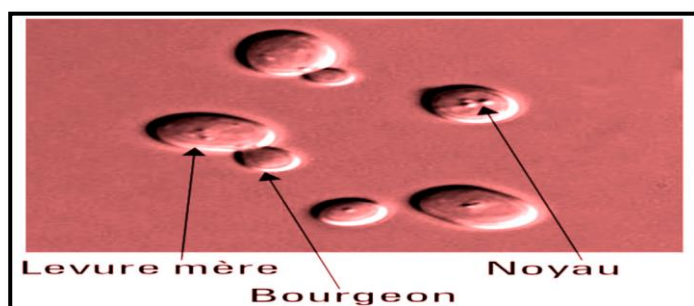


Figure 2: Bourgeonnement de *S. cerevisiae* (Kreger , 1984)

I.1.1.7. Classification et identification des levures

A. Classification

La classification de référence est actuellement celle de (**Kreger ,1984**) qui présente des changements sensibles par rapport à la précédente classification de (**Lodder, 1971**) . En particulier, de nouveaux critères taxonomiques sont pris en considération pour permettre des études plus rigoureuses.

Tableau 1: Trois grandes classes des levures (**Kreger , 1984**)

Les classes	Les genres
Les ascomycètes	➤ genres sexués, où les produits de la méiose ou ascospores sont endogènes et enfermés dans une structure issue du zygote : l'asque.
Les basidiomycètes	➤ genres sexués, où les produits de la méiose ou basidiospores chez les levures sont souvent appelés <i>ballistospores</i> sont exogènes et émis à l'extérieur du zygote.
Les deutéromycètes ou levures imparfaites	➤ genres asexués ne se multipliant que par reproduction végétative.

I.1.1.8. Facteurs de croissance des levures

A. Facteur nutritionnels

Ces facteurs se rapportent au milieu de culture et sont de la levure. En effet comme tout levure à besoin d'une source nutritive croissance et éventuellement sa floculation liés aux exigences microorganisme (**Mohand, 1994**).

A.1. Carbone

Sont d'une grande importance pour les levures puisqu'elles fournissent, le carbone nécessaire pour la biosynthèse de constituants cellulaires et l'énergie nécessaire à son fonctionnement (**Waldron, 2010**). La *Saccharomyces cerevisiae* est une espèce hétérotrophe. Elle exige pour sa croissance une source de carbone qui est également leur source d'énergie (**Larpent, 1990**).

A.2. L'azote

La plupart des levures sont capables d'utiliser l'azote sous forme d'ion ammonium (chlorure, nitrate, phosphate, mais surtout sulfate qui est le composé idéal puis qu'il apporte également du soufre nécessaire à la synthèse de certains acides aminés) (**Hencke, 2000**), mais aussi des composés organiques divers, tels que les acides aminés et les peptides (**Larpent, 1990**).

A.3. Oligo-éléments

Ils sont nécessaires à l'état de trace. Mais sont indispensables pour la croissance et la multiplication des levures, aussi joue un rôle dans l'activation de certaines réactions enzymatiques ainsi dans la construction de certaines vitamines et coenzymes (**Bourgeois & Larpent, 1996**). Ils sont essentiels tant sur le plan structural que catalytique (**Marlene, 2006**).

A.4. Vitamines

Le développement de la levure boulangère nécessite la présence de certaines vitamines, en particulier, la biotine, l'inositol, panthénate de Ca, la thiamine. Elles sont nécessaires à l'état de traces de l'ordre de milligramme par litre du milieu de culture (**Khellil & BenHadj, 1998**).

I.1.1.9. Conditions physico-chimiques de croissance

A. Température

Les températures d'incubation, sont généralement proches de celles qui permettent la propagation des levures dans leurs environnements naturels et se situent entre 25°C et 30°C. Toutefois, ces températures ne sont pas rigoureusement les températures optimales de croissance que les levures trouvent dans certains habitats, à savoir les régions à températures constamment basses ou élevées (**Vishniac & Hempfling, 1979**).

B. pH

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

C. Aération

Les levures peuvent être classées selon leur mode de production énergétique, utilisant la respiration ou la fermentation. Il est important de noter que ces processus sont principalement réglés par des facteurs environnementaux (**Walker et al., 1997**) En effet, toutes les levures sont capables de se développer en présence d'oxygène, il n'y a pas de levures anaérobies strictes, certaines sont aérobies strictes et d'autres sont aéro-anaérobies facultatives (**Bouix & Leveau, 1991**) .

D. Pression osmotique et l'activité d'eau

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

I.1.1.10. Métabolisme chez levures

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

A. Métabolisme oxydatif

Les levures utilisant le glucose en présence d'oxygène, par conséquent, leur métabolisme est exclusivement respiratoire et le pyruvate est oxydé par le cycle de Krebs. Cette voie métabolique est très énergétique et permet aux levures une importante multiplication. En plus

des sucres simples, certaines levures utilisent d'autres glucides (mono, di ou tri saccharides et des polysaccharides comme l'amidon), mais aussi des alcools, des acides et des alcanes (**Larpent, 1991**).

B.Métabolisme fermentaire

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

I.1.1.11. Intérêt industrielles des levures

Par un métabolisme diversifié, les levures occupent une place essentielle dans l'industrie alimentaire. Elles participent à l'élaboration de nombreux produits alimentaires (panification, fromagerie, brasserie,) et dans la production des enzymes (l'invertase, lactase, lipase et les amylases) (**Simon & Meunier, 1970**), du glycérol ainsi que certaines vitamines et solvants, mais aussi à la revalorisation de déchets agricoles, industriels et à la production des protéines (**Scriban., 1984 & Lecterc et al., 1995**).

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

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

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

Enfin, les bonnes connaissances de la biologie moléculaire des levures et la mise au point de techniques de génie génétique, permettant de programmer les levures de façon qu'elles expriment des protéines humaines et animales recombinantes ; constituent une grande réussite des biotechnologies surtout d'intérêt médical (par les productions d'enzymes,

d'hormones peptidiques, de facteurs de croissance, d'hémoglobine, de ferritine, l'érythropoïétine, etc.) (Lammi , 2011) .

I.1.1.12. Applications des levures

A. Panification

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

B. Affinage des fromages

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

C. Production de protéines

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

D. Autres utilisations

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

Chapitre II

La protéase

II.1. Généralité sur les enzymes

Les enzymes sont des catalyseurs biologiques de nature protéique. Les catalyseurs augmentent la vitesse d'une réaction lente ou imperceptible sans subir aucune transformation en ce qui concerne leurs structures initiales. Le développement récent du concept des catalyseurs au dix-neuvième centenaire a évolué pas à pas avec la découverte de puissants catalyseurs de source biologique. Ceux-ci ont été appelés ENZYMES et ensuite identifiés comme protéines (**Mamo G ,1999**).

Les enzymes sont des protéines fabriquées par l'organisme (**Burhan et al., 2002**) . Elles sont constituées des milliers d'acides aminés liés en une chaîne linéaire. Ces acides aminés diffèrent dans leur nature chimique, sont liés entre eux par des liens covalents appelés liens peptidiques. L' enzyme permet l'activation ou l'accélération de réactions chimiques. Il en existerait environ 15.000 protéines chez l'homme (**Mamo G ,1999**).

Ces enzymes jouent un rôle dans toutes les fonctions, comme la digestion avec des enzymes intervenant dès le stade buccal comme les amylases (**Burhan & al., 2002**). Il existe plusieurs types des enzymes tel que ; lipase, protéase... etc.

II.2. Protéases

II.2.1. Définition

Les enzymes protéolytiques sont des hydrolases. Elles catalysent le clivage des liaisons peptidiques des protéines en fragments polypeptidiques, qui seront par la suite, les acides aminés, offrant une multitude de structures (**Barrett, 1994**). Ces enzymes sont produites aussi bien par les animaux que les végétaux et les microorganismes, leur rôle essentiel dans la croissance cellulaire et dans la différenciation (**Gupta et al., 2002; Sandhya et al., 2005**).

II.2.2. Origine des protéases

Les enzymes industrielles sont d'origine végétale, animale ou microbienne (**Coultouly, 1991 , Rao et al., 1998; Meunier, 1999**). L'extraction à partir des plantes et des animaux est cependant limitée par des paramètres difficiles à contrôler. C'est pourquoi la production des enzymes à partir de microorganismes est privilégiée par les producteurs puis qu'elle est plus facile à gérer avec des résultats plus constants. les Protéases d'origine microbienne peuvent être produites par les moisissures, les levures et les bactéries (**Frazier, 1967 ; Ul-haq et al., 2003**).

II.2.3. Caractères des protéases

Les protéases constituent un groupe très large et complexe contenant des enzymes qui diffèrent dans leurs propriétés tels que:

- ✓ le site actif
- ✓ le mécanisme catalytique
- ✓ les optima du pH et de température
- ✓ le profil de la stabilité et la spécificité du substrat (**Sumantha et al., 2006; Vishwanatha et al., 2009**).
- ✓ La vitesse des réactions enzymatiques dépend aussi de la présence de certains activateurs ou des inhibiteurs (**Penasse, 1974**).

La spécificité d'action des enzymes protéolytiques est régie par la nature de l'acide aminé et d'autres groupes fonctionnels (aromatiques, aliphatiques ou la présence de sulfure) autour de la liaison à hydrolyser (**Sumantha & al. 2006 ; Benedykt & Katarzyana, 2008**). Ces enzymes sont très importantes du fait qu'elles ne contrôlent pas seulement les réactions protéolytiques, mais aussi elles régulent les diverses cascades enzymatiques impliquées dans le métabolisme cellulaire tels que la décomposition des lipides et des glucides.

Les protéases sont capables de modifier les propriétés biologiques des chaînes polypeptidiques suite à la coupure des liaisons peptidiques (activation, inactivation ou une protéolyse non spécifique pendant la dégradation). La raison pour laquelle les protéases peuvent être dangereuses pour les cellules en altérant leur environnement. De ce fait, la cellule a développé une large gamme des mécanismes pour contrôler l'activité protéolytique. Cette régulation peut être effectuée à n'importe quelle étape de l'expression des gènes (la transcription depuis l'opéron, la traduction, les modifications post-traductionnelles, l'interaction avec les inhibiteurs et d'autres protéines) (**Benedykt & Katarzyna, 2008**).

II.2.4. Classification des protéases

En générale, les protéases sont classées selon plusieurs critères majeurs tout en se basant sur la localisation cellulaire, le mode d'attaque de la chaîne polypeptidique (la nature du site catalytique) , et selon leur besoin en ATP.

II.2.4.1. Selon la localisation cellulaire

Les protéases sont divisées en deux groupes selon leur localisation dans la cellule, soit les protéases intracellulaires et extracellulaires (**Mathieu, 2005**).

A. Protéases intracellulaires

Ces protéases jouent un rôle essentiel dans l'élaboration et la régulation des processus cellulaires et métaboliques, ce type de protéases est moins intéressant à l'utilisation industrielle car ces enzymes nécessitent une étape de lyse cellulaire pour en faire l'extraction (**Mala & al, 1998**).

B. Protéases extracellulaires

Ces enzymes catalysent l'hydrolyse des protéines en petits peptides assimilables par les cellules. Ces enzymes sont plus intéressantes pour utilisation en industrie car elles ne nécessitent pas d'étapes de lyse cellulaire pour en faire l'extraction (**Mala & al, 1998**).

II.2.4.2. Selon le mode d'attaque de la chaîne polypeptidique

En fonction de leur mode d'attaque, les peptidases sont subdivisées en deux classes ; les endopeptidases qui agissent à l'intérieur de la chaîne peptidique et les exopeptidases agissent seulement sur les liens peptidiques près des extrémités de la chaîne peptidique (**Penasse, 1974**).

A. Exopeptidases

Ces enzymes hydrolysent les liens peptidiques du côté extrémités N ou C-terminales des protéines. Il existe deux classes d'exopeptidases: les aminopeptidases et les carboxypeptidases. Ces enzymes sont très peu utilisées en industrie (**Mala et al., 1998**).

B. Endopeptidases

Ces enzymes sont les plus utilisées en industrie, elles sont caractérisées par leur action hydrolytique à un site spécifique de la chaîne polypeptidique loin des extrémités N et C-terminales. La présence d'un groupement amino ou carboxyl libre peut avoir un effet répressur sur l'activité de ces protéases. Les endopeptidases sont divisées en 6 classes selon leur mécanisme catalytique et la nature des acides aminés qui se trouvent au voisinage de la liaison peptidique à hydrolyser (**Robert D., & Vian B, 2004**).

Tableau 2: Classification des protéases Selon la nature du site catalytique (**Mala et al, 1998**).

Types de protéases	Classes et sous –classes
Exopeptidase	Aminopeptidase
	Peptidyle peptidase
	Dipeptidyle peptidase
	Thripeptidyle peptidase
	Carboxypeptidase
	Sérinecarboxypeptidase
	Métallocarboxypeptidase
	Cystéinecarboxypeptidase
Endopeptidase	Protéases à sérine
	Protéases cystéine ou protéase à thioils
	Protéases aspartique ou protéases acides
	Protéases thréonique
	Protéases glutamique
	Métallo protéases

II.2.4.3.Selon leur besoin en ATP

Un troisième critère de classement, est lié au besoin ou non d'ATP pour fonctionner (**Ganesh & al, 1998**) , ce groupe de protéases comprend celles composées de plusieurs sous-unités contenant des domaines d'ATPase et des domaines protéolytiques.

Il existe des protéases qui ne peuvent être classées dans aucun de ces groupes, (exemple : les signaux peptidases des lipoprotéines). Malgré leurs larges diversités, les protéases peuvent avoir une action spécifique, ce qui a attiré l'attention pour leurs exploitations et leurs applications biotechnologiques (**Mathieu, 2005**).

II.2.5. Mode d'action des protéases

Le mode d'action des protéases diffère d'une enzyme à l'autre par la nature de leur site actif, bien qu'elles aient toutes le même principe de base. Ce processus catalytique est résumé dans trois étapes :

✓ Dans les deux premières étapes, l'enzyme déforme la liaison peptidique et renforce la polarité du carbonyle, qui facilite son attaque nucléophile conduisant à la formation d'une liaison covalente transitoire entre le morceau portant le carbonyle du substrat et l'enzyme avec la libération de l'autre morceau (le premier produit) protoné par un proton cédé d'un résidu enzymatique.

✓ Dans la troisième étape, une nouvelle substitution nucléophile est exercée par le OH- d'une molécule d'eau et libère le deuxième produit de la réaction, où le site actif de l'enzyme se trouve régénérer par un proton (de l'H₂O) (**Pelmont, 1995**).

II.2.6. Applications des protéases

La naissance de l'industrie des enzymes a coïncidé avec le début du vingtième siècle et avec l'apparition des premières enzymes microbiennes, essentiellement des amylases. Aujourd'hui, l'application de différentes enzymes a connu un grand essor dans des domaines extrêmement variés (**Durand & Monson, 1982**).

Les protéases sont parmi les trois plus grands groupes des enzymes industrielles (hydrolases), comptent pour environ 60-65% des ventes totales dans le monde entier des enzymes en raison de leurs applications dans plusieurs secteurs industriels (**Wang & al., 2005; Chellappan & al., 2006; Barnali & al., 2008 ; Mukherjee & al., 2008**). Les principales industries utilisatrices de protéases sont :

- ✓ Applications alimentaires
- ✓ Industrie des détergents
- ✓ Domaine pharmaceutique et médicale
- ✓ Traitement des eaux usées industrielles
- ✓ Autres applications

II.2.6.1.Applications alimentaires

L'application des protéases à l'industrie alimentaire n'est pas récente. Pour la fabrication des fromages, seules les enzymes coagulantes fongiques ont donné de bons résultats, souvent comparables à ceux obtenus avec la présure et la pepsine bovine et porcine (**Alais, 1975 ; Peppler & Perlman, 1979**).

En panification, l'action protéolytique d'*Aspergillus oryzae*, de la papaïne ou de la bromélaïne sur le gluten améliore la manipulation de la pâte et augmente le volume de la mie en réduisant le temps de pétrissage **(Durand ; Monson, 1982 & Moodie, 2001)**.

L'enzyme bactérienne, la subtilisine est utilisée comme additif dans les conserves alimentaires pour détruire les spores des germes *Clostridium* **(Durand & Monson, 1982 ; Rao & al., 1998)**.

La papaïne et certaines enzymes protéolytiques microbiennes, telle que la protéase alcaline d'*Aspergillus oryzae*, sont employées comme des additifs pour augmenter la digestibilité des aliments et l'attendrissage des viandes. La protéase neutre de la même espèce est utilisée pour l'affinage des fromages **(Frazier, 1967 ; Durand & Monson, 1982 ; Fedrick et al., 1986 ; Haussner et al., 1996)**.

II.2.6.2.Industrie des détergents

Les protéases présentent un grand intérêt dans l'industrie des détergents pour leur capacité à favoriser l'élimination des taches protéiques vue leur avantage unique qui ne peut autrement être obtenue avec la technologie des détergents classiques **(Gupta & al., 2002)**. Maintenant, elles sont ajoutées comme ingrédients clés, ce qui représente environ 25% des ventes totales dans le monde entier des enzymes.

Parmi les principales conditions préalables pour l'utilisation des protéases dans la production des détergents sont : l'action sur une large gamme des substrats, l'activité et la stabilité à des pH et à des températures élevés et en présence des agents oxydants additionnés **(Chellappan & al., 2006)**.

II.2.6.3.Domaine pharmaceutique et médicale

La grande diversité des protéases est un avantage qui permet à ces enzymes d'être utilisées dans le développement de nouveaux agents thérapeutiques. Par exemple, des protéases d'*Aspergillus oryzae* sont utilisées comme aide à la digestion chez certains individus souffrant de déficits en enzymes lytiques au niveau du système digestif. L'asparaginase provenant de *E.coli* est utilisée pour éliminer l'asparagine dans la circulation sanguine de certains patients atteints de certaines formes de leucémie **(Rao et al., 1998 ; Gupta et al., 2002)**.

II.2.6.4. Traitement des eaux usées industrielles

Les protéases sont de plus en plus considérées comme un moyen efficace pour le traitement des rejets industriels. En effet, les protéases peuvent traiter les rejets riches en protéines (**Kumar *et al.*, 1999**).

II.2.6.5. Autres applications

La protéase neutre peut être également utilisée pour le décreusage de la soie naturelle. ils sont employées aussi avec des mélanges des enzymes hydrolytiques pour dégrader les polymères constitutifs de la matière végétale servant pour l'alimentation animale (**Aviron *et al.*, 1982**).

Chapitre III

Les dattes

III.1. Datte

III.1.1. Définition

La datte, est fruit du palmier dattier (*Phoenix dactylifera*), est une baie de forme allongée, oblongue ou arrondie. Elle constituée d'une partie dure non comestible « la graine ou noyau » et d'une partie comestible « pulpe ou chair » (**Dowson & Aten, 1963 ; Richard, 1972 ; Mansouri, 2005**).

La partie comestible des dattes comporte :

- ✚ L'épicarpe ou peau : une enveloppe fine cellulosique.
- ✚ Le mésocarpe : plus ou moins charnu et de consistance variable selon la teneur en sucres, présentant une zone périphérique de couleur plus soutenue et de texture compacte, et une zone interne de teinte plus claire et de texture fibreuse.
- ✚ L'endocarpe : de teinte plus claire ; réduit à une membrane parancheminée entourant la graine. L'ensemble de péricarpe, mésocarpe et l'endocarpe sont confondus sous l'appellation de chair ou pulpe (**Munier, 1973 & espiard, 2002**).

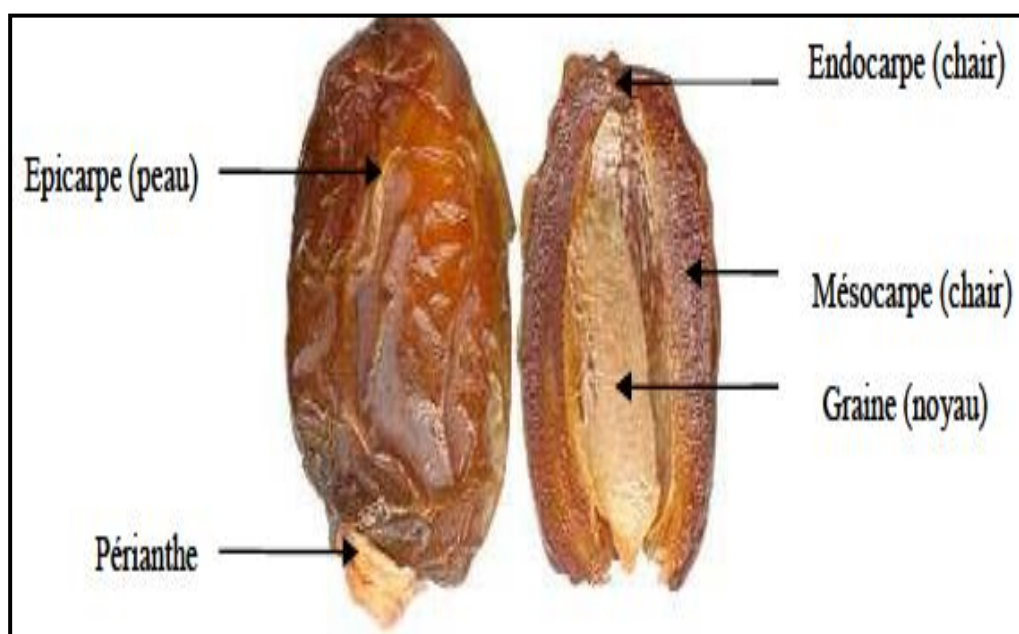


Figure 3: Dattes entière (à gauche), et sa coupe longitudinale (à droite) (**Munier, 1973**)

III.1.2. Classification des dattes :

D'après (**Espiard, 2002**), la consistance de la datte est variable. Selon cette caractéristique, les dattes sont réparties en trois catégories :

- **Les dattes molles :** taux d'humidité supérieur ou égal à 30%; elles sont à base de sucre (fructose, glucose) tel que *Ghars* (**Amellalné, 2008**).



Figure 4: dattes molles *Ghars* (Hannachi et al., 1998)

- **Les dattes demi-molles :** de 20 à 30% d'humidité, riches en saccharose telle que *Deglet-Nour* (Munier, 1973).



Figure 5: Datte demi-molle *Deglet-Nour* (Munier, 1973)

- **Les dattes sèches :** avec moins de 20% d'humidité, riches en saccharose. Elles ont une texture farineuse telle que *Meche-Degla*, *Degla Beida* (BEN Abbès, 2011).



Figure 6: Dattes sèches *Déglà-Beida* (Hannachi & al., 1998)

Dans le tableau 03, existe résumé les principales caractéristiques de chaque type de ces dattes.

Tableau 3: principales caractéristiques des trois types de dattes (**Siboukeur, 1997**)

Type de date	Molle	Demi –molle	Sèche
Teneur en eau	élevée	Moyenne	
Teneur en sucre réducteurs	élevée	Moyenne	
Teneur en Sach		Moyenne	élevée
Couleur de pulpe	Marron noir	Marron Clair	Clair blanche
Goût	Très perfume	Parfumé	Acidulé
Conservation	Faible	Bonne	Bonne

III.1.3. Composition biochimique des dattes

La datte est constituée d'une partie charnue, la chair ou la pulpe et d'un noyau. C'est un fruit de grande valeur alimentaire et très énergétique, elle fournit des calories 4 à 5 fois supérieure à celles fournies par d'autres fruits . Le tableau ci-dessous présente la composition biochimique des dattes :

Tableau 4: Composition biochimique des dattes

Constituants	Teneur (%)
L'eau	La teneur en eau, en fonction des variétés, stade de maturation et du climat, varie entre 8 à 30% du poids de la chair fraîche (Munier, 1973)
Les sucres	C'est le constituant le plus prédominant des dattes. L'analyse des sucre de dattes a révélé la présence de trois types de sucres essentiellement : le saccharose, le glucose et le fructose Cependant, il existe d'autres sucres en faibles proportions tels que : le galactose, le xylose) (Estanove, 1990 ; Acourene & Tama, 2001)
Les protéines	La teneur est faible : 3% (MS) (Khalil et al., 2002).
Les fibres	Constituées principalement par la cellulose. Les dattes fines comme <i>Deglet-nour</i> ne contiennent qu'une faible proportion. Dans le cas des dattes communes, elles peuvent atteindre parfois plus de 10% (Munier, 1973).
Les minéraux	Présence de minéraux et d'oligoélément, particulièrement abondants (Munier, 1973).
Les vitamines	La pulpe de dattes contient des vitamines en quantités variables, selon le type de dattes. On trouve les caroténoïdes et la vitamine B en quantité

	appréciables (Munier, 1973).
--	---------------------------------------

III.1.4. Stades d'évolution de la datte

Pendant sa formation et sa maturation, le fruit passe par un certain nombre de phases , qui se résument en cinq stades (**Booij et al , 1992**) :

- **Loulou ou Hababouk** : c'est le stade "nouaison" qui vient juste après la pollinisation. Les dattes ont une croissance lente, une couleur verte jaunâtre et une forme sphérique. Il dure 4 à 5 semaines après fécondation (**Munier, 1973**).
- **Khalal, Kimri ou Blah** : ce stade dur sept semaines environs, il se caractérise par une croissance rapide en poids et en volume des dattes. Les fruits ont une couleur verte vive et un goût âpre à cause de la présence des tanins (**Djerbi, 1994**).
- **Bser , Bsir ou Bissir** : les sucres totaux atteignant un maximum en fin du stade. La couleur vire au jaune, au rouge , au brun, suivant les clones. La datte atteint son poids maximum, au début de ce stade . Il dure en moyenne quatre semaines (**Djerbi, 1994**).
- **Martouba ou Routab** : c'est le stade de la datte mûre pour certains cultivars. Le poids et la teneur en eau vont diminuer à la fin. La durée de ce stade où le fruit prend une couleur brune est de 2 à 4 semaines. Les tanins émigrent vers les cellules situées à la périphérie du mésocarpe et sont fixés sous forme insoluble (**Retima, 2015**).
- **Tamar ou Tmar** : c'est la phase ultime de la maturation au cours de laquelle, l'amidon de la pulpe se transforme complètement en sucres réducteurs (glucose et fructose), et en sucres non réducteurs (saccharose) (**Djerbi, 1994**).

III.1.5. Valeur nutritionnelle des dattes

Les dattes constituent un excellent aliment, de grande valeur nutritive et énergétique (**Gilles ,2000**). En effet, la forte teneur en sucres confère à ces fruits une grande valeur énergétique avec une teneur importante en sucres réducteurs facilement assimilables par l'organisme. Les protéines de dattes sont équilibrées qualitativement même si elles sont en faibles quantités. Par ailleurs, les dattes, apportent de manière importante des éléments minéraux : Ca, Mg, P, S, Fe et Mn qui sont reminéralisants et renforcent notablement le système immunitaire ainsi que des vitamines qui se caractérisent par des teneurs appréciables en vitamines du groupe B (**Albert, 1998**).

III.1.6. Usage traditionnel et effets thérapeutiques des dattes

Les dattes sont des fruits nutritifs qui renferment une teneur élevée en fibres ainsi que des concentrations appréciables en minéraux, vitamines et antioxydants qui contribuent au bon fonctionnement de l'organisme. Les dattes sont une bonne source de composés phénoliques et flavonoïdes. L'ensemble de ces composés photo- chimiques inhibent les radicaux libres et protègent l'organisme contre les cancers et les maladies dégénératives (**Duke 1992 & Khare 2007**).

Les dattes sont utilisées traditionnellement par plusieurs populations pour différentes raisons selon (**Duke 1992 & Khare 2007**) :

- Le traitement d'hypertension.
- Comme un fortifiant.
- Associées avec d'autres remèdes naturels contre les hémorroïdes ainsi que pour réduire le risque de la colite et le cancer du côlon
- Comme adoucissant.

La décoction de dattes convient pour les maladies inflammatoires, adoucir la toux sèche et renforcer le système immunitaire. Les dattes sont, également, indiquées contre plusieurs maladies telles que le cancer, les maladies cardiovasculaires, l'ostéoporose, les troubles intestinaux, ect (**Khare, 2007; Baliga et al., 2011**).

(**Selvam 2008**) a rapporté l'importance des dattes dans le traitement des inflammations, des douleurs thoraciques et le traitement symptomatique des constipations. Les dattes sont, par ailleurs, utilisées comme un complément alimentaire idéal pour les personnes souffrant d'anémie grâce à sa richesse en minéraux (**Khare, 2007 & Selvam, 2008**) .

III.2. Jus de datte

III.2.1 Définition

Le jus de dattes, une denrée alimentaire de certaines variétés de dattes locales connue localement comme «*Rob AT-Tamr*» (**Barreveld, 1993**), ou «*Dibs*» dans le monde arabe (**Mimouni & Siboukeur, 2011**).

Le jus de dattes est un produit sucré, brun épais-foncé de couleur marron extrait à partir des dattes et typique de la cuisine Arabe. Son goût est plus doux que celui du sirop de saccharose et il a une bonne saveur unique (**Alanazi, 2010**).

III.2.2. Composition biochimique du jus de dattes

Les dattes contiennent essentiellement un mélange de sucres qui diffèrent par un certain nombre de propriétés, mais du point de vue alimentaire, ils ont globalement la même valeur

énergétique (**Dowson & Aten, 1963**). En général, la composition biochimique du jus de dattes se résume comme suit :

- ❖ une teneur en eau de 25% du poids frais.
- ❖ une teneur élevée en sucres totaux qui représente 96% dont la majorité (il contient des proportions en glucose et fructose presque égales, et une faible quantité de saccharose, qui peut être inverti en sucres simples lors de l'extraction sous l'effet thermique, et acidité du milieu (**El-ogaidi, 1987**).
- ❖ les éléments minéraux et les protéines sont présents en faibles quantités (**Abdelfattah, 1990 ; Ibrahim & Khalil, 1997**).

Selon (**El-ogaidi ,2000**), le pH de sirop est compris entre 6 et 6,5. En outre, le sirop de dattes a un degré Brix compris entre 73 à 75 % ce qui permet sa conservation au-delà de deux ans, sans risque d'altération (**Abdelfattah, 1990**).

Tableau 5: Composition biochimique du jus de dattes (**Abdelfattah, 1990 ; Ibrahim & Khalil, 1997**)

Teneur des constituants	Abdelfatah, 1990	Ibrahim et Khilil, 1997
Teueur en eau (%)	25.00	24.80
Sucres réducteurs (glc, fru) (%)	90.40	81.50
Sucres non réducteurs (sachrose) (%)	5.60	4.90
Sucres totaux (%)	96.00	86.40
Protéines (%)	0.50	2.10
Lipides	--	--
Acidité	0.17	0.20
Eléments minéraux (%)	1.83	6.60
Degé brix (°Bx)	73-75	76.0
Vitamines A et vitamines des groupes B	+	+

III.2.3. Propriétés du jus de datte

III.2.3.1. Propriétés organoleptiques du jus

A. Goût

L'intensité du goût sucré diffère considérablement d'un édulcorant à un autre, même au sein de la famille des glucides.

La plupart des édulcorants à haut pouvoir sucrant possèdent des arrière-goût qui se superposent au goût sucré et résulte d'impuretés qui sont parfois indéfinissables au point de ne pas se ranger parmi les trois goûts fondamentaux (salé, acide, ou amer) **(Multon & Lepatre, 1984)**.

Selon **(Abdelfattah ,1990)**, le jus de dattes est caractérisé par le goût sucré pur, grâce à élever la teneur de solides solubles , par rapport à la matière première utilisée pour son élaboration. Le goût du jus est similaire au goût de la datte utilisée **(El-ogaidi, 1987)**.

B. Couleur

Selon **(Munier ,1973)**, le sirop de dattes est un produit stable d'une couleur plus ou moins brune. Dans des flacons transparents, il peut prendre une couleur noir- rougeâtre **(Abdelfattah, 1990)**.

III.2.3.2. Propriétés physiques du jus

A. Densité

La densité moyenne d'un jus est fonction de leur concentration. Cette dernière est inversement proportionnelle à la température ambiante **(Guerin et al., 1982)**. La densité de jus de dattes est très élevée grâce au taux de solides solubles existant dans ce produit, ce caractère permet leur stockage pendant une longue durée **(Abdelfattah, 1990)**.

B. Viscosité

Selon **(Abdelfattah ,1990)** , le sirop de dattes est un produit très visqueux, ceci est dû à la faible humidité. Cette propriété est importante pour préserver la qualité du produit durant deux ans et empêche la prolifération des microorganismes.

III. 2.4. Aspects bactériologiques

Le développement des microorganismes est lié à l'activité de l'eau et au couple pH/température de milieu (**Multon, 1992**).

Selon (**Abdelfattah, 1990**). L'humidité du jus de dattes est égale à 25%, ce caractère le protège des risques d'altérations microbiennes.

III.2.5. Utilisations de jus da datte

Des instituts diététiques modernes dans le monde entier recommandent l'utilisation régulière de dattes et ses sous-produits pour leurs effets sur l'organisme (**Abbes et al., 2011**) .

- Le jus de dattes est riche en certains nutriments (sucre, composés phénoliques..).
- Il fournit une bonne source d'énergie rapide en raison de leur haute teneur en sucre.

En effet, la forte teneur en sucre devrait justifier leur utilisation comme source de sucre liquide approprié à de nombreux produits alimentaires tels que: la base de la boisson, les produits de boulangerie, de la crème glacée et confiserie (**Abbes et al., 2011; Besbes et al., 2009**). Le jus de dattes peut être aussi utilisé comme édulcorant et l'agent aromatisant pour les produits laitiers comme le lait fermenté (**Abbes et al., 2015**) .

Des recherches ont été faites pour utiliser le sirop de dattes dans la préparation des gâteaux, des biscuits et pains sucrés et pour une utilisation directe sur crêpes. En outre, le jus de dattes peut être utilisé pour remplacer le caramel dans les bars de bonbons (**Barreveld, 1993**).

Partie II

Expérimentale

Chapitre I

Matériel et Méthodes

I. Matériels et méthodes

Le travail porte sur la production des protéases secrétées par des microorganismes ; champignons et bactéries isolées à partir du sol saharien et cultivés sur un milieu à base jus de datte.

I.1. Matériels

I.1.1. Matériel biologique

I.1.1.1. Sol

Notre travail est basé sur la production et la caractérisation d'une enzyme protéolytique secrétée par des microorganismes isolées à partir du sol saharien algérien. En effet, les échantillons du sol utilisés pour cet objectif sont prélevés aseptiquement.

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

1. Présentation des sites de prélèvement

Les échantillons du sol utilisé au cours de notre étude sont prélevés d'étangs Chatte de la région d'El Oued Souf, située au le Sud Est Algérien.

I.2. Méthodes

I.2.1. Analyse du sol

Les analyses physico-chimiques et biochimiques des échantillons sont effectuées au niveau du laboratoire des produits agroalimentaire de l'I.N.R.A.A (Institut National des Recherches Agronomique d'Algérie) (station sidi mahdi), Touggourt ; Ouargla.

I.2.1. 1. Mesure du pH du sol

5 g du sol sont rajoutés à 12,5 ml d'eau distillée stérile ; après agitation le pH de la suspension est mesuré (**Pochon & Tradieux, 1962**) à l'aide d'un pH-mètre.

I.2.1. 2. Mesure de la conductivité électrique du sol

10 g de sol sont mélangés avec 50 ml d'eau distillée. Après agitation de 30 min, la décantation est accélérée par centrifugation pendant 2 min. la conductivité est mesurée à l'aide d'un conductimètre (**Boucherit , 2011**).

I.2.1. 3. Détermination de l'humidité

C'est une méthode d'étuvage qui consiste à effectuer un séchage d'une prise d'essai de chaque sous échantillon à une température de 105 ± 2 °C jusqu'à l'obtention d'un poids constant.

L'humidité est mesurée par la formule

$$\text{H\%: } ((P_0 - P_1) / P_0) \times 100\%$$

H%: humidité en (%).

P₀ : poids creuset avec l'échantillon avant séchage séchage.

P₁ : poids creuset avec l'échantillon après séchage séchage.

I.2.1. 4. Détermination de la matière organique

Les échantillons sont calcinés à 525° C dans un four à moufle pendant 5 h. La perte de masse par combustion correspond à la quantité de la matière organique (Boucherit , 2011) .

I.2.2. Isolement des microorganismes

Un gramme de sol est suspendu dans 10 ml d'eau physiologique stérile et homogénéisé pendant 10 min (Ulacio & al., 1997) , cette suspension représente la solution mère à partir de laquelle d'autres dilutions sont préparées jusqu'à 10^{-3} (Botton et al., 1990).

Chaque dilution est étalée à la surface des milieux gélosés Potato-Dextrose-Agar (PDA) qui préparée (Annexe 01) , (Tsuyoshi et al., 2004) . L'ensemencement est fait en surface, par étalement de 0.1 ml de culture en strie transversale (Hammer et al.,1998) . Les boîtes de Pétri sont incubées à 30°C, pendant 5 jours (Harrigon & Mc lace, 1976).

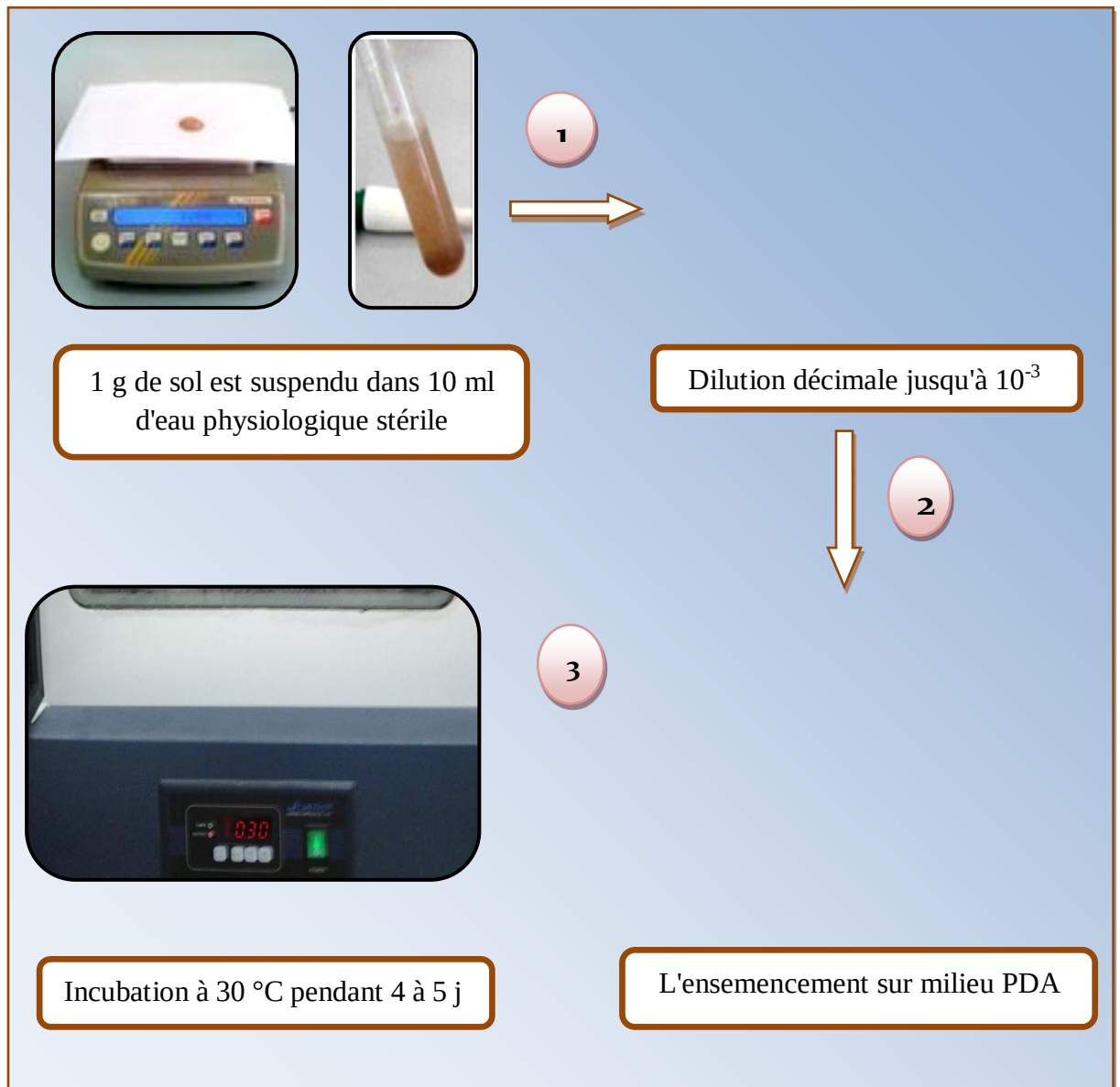


Figure 7: Technique d'isolement des souches levuriennes.

I.2.3. Purification et sélection des souches

I.2.3.1. Purification

Les champignons développés sont repiqués sur le même milieu (PDA) (**Annexe 01**). Cette étape est réalisée par prélèvement de quelques colonies à partir des boîtes PDA inclinées, que l'on transfère sur le même milieu coulé dans des boîtes de Pétri sous les conditions d'asepsie. Les cultures fongiques sont incubées pendant 3 jours dans les mêmes conditions d'incubation jusqu'à l'obtention de souches pures (**Bensmail, 2012**).

I.2.3.2. Sélection des souches productrices des enzymes

1. Sélection des souches protéolytique

L'activité protéolytique est évaluée sur un milieu de lait gélosé (**Annexe 02**), ce milieu est ensemencé soit par touche ou par strie. La protéolyse comme démontrée par la dégradation de la caséine incorporée dans le milieu de culture, se traduit par l'apparition d'une zone claire, autour des colonies. Après 24 à 48 h d'incubation à 30°C de levure (**Akacem , 2012**)

I.2.4.Conservation des souches

La méthode de conservation des souches la plus utilisée et la plus simple consiste au stockage des culture après le repiquage à 4°C, sur le même milieu de culture, pour favoriser leur viabilité et limiter les possibilités de variations . La durée de conservation de 4 à 6 semaines. Afin de pouvoir toujours disposer de souches viables, la réactivation doit se faire tous les mois (**UI-Haq et al., 2002**).

I.2.5. Identification des souches

I.2.5.1. Identification macroscopique

Les cultures sont identifiées sur milieu gélosé PDA, à 30 °C pendant une durée d'incubation de 3 à 5 j. L'examen à l'œil nu permet la détermination des caractères suivants:

- ✓ La couleur.
- ✓ La forme des colonies (contour régulier ou irrégulier, convexes ou concaves).
- ✓ la texture.
- ✓ L'aspect des cultures (brillant ou mat).

I.2.5.2. Identification phénotypique des souches

A.1. Identification microscopique

Ces caractères sont étudiés d'après des préparations microscopiques (objectif X40 puis X100), effectuées entre lame et lamelle à l'état frais et en utilisant un colorant (le bleu de méthylène) , qui présenté dans (**Annexe 02**) .

A.1.1. Caractéristiques morphologiques des cellules végétatives

Les caractéristiques morphologiques des cellules végétatives sont étudiées d'après des préparations microscopiques effectuées entre lame et lamelle à partir de cultures en milieu liquide et en milieu solide (**Bourgeois & Leveau, 1980**). L'examen à lieu à partir du milieu

liquide ou du milieu solide à partir zones . Pour l'observation microscopique utilisée des préparations à l'état frais au grossissement x40 puis x100 (**Joseph- Pierre & Guirod., 1998**).

L'étude microscopique permet de définir:

- La forme soit sphérique, ovoïde, allongée ou la taille des cellules en milieu liquide et sur milieu solide.
- Le mode de reproduction végétative par scissiparité ou bourgeonnement et dans le cas le nombre et la position (polaire, latérale) du (ou des) bourgeon (s) sur la cellule mère (**Bourgeois & Leveau , 1980**). (**Annexe 02**)

A.1.2. Test de filamentation

L'aptitude à la filamentation est observée à partir d'une culture sur lame microscopique (objectifs X40 puis 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 est ensemencée en une strie longitudinale. La lame est incubée dans la boîte de Pétri contenant un peu d'eau stérile pour éviter la dessiccation du milieu. L'observation microscopique se fait après 3 à 5 j . La bordure de la culture est examinée, si la levure filamenteuse, la nature de mycélium (pseudo mycélium ou vrai mycélium), son abondance, sa ramification sont notées (**Bacha, 2008 & Dakhmouche, 2016**), qui présenté dans (**Annexe 02**) .

A.2. Identification biochimiques et physiologiques

L'identification ne peut être effectuée que sur une souche en culture pure préalablement isolée sur un milieu gélosé pour levure (**Bourgeois & Leveau , 1980**) .

Les critères d'identification des levures peuvent être répartis en 3 groupes :

- **Caractéristiques culturelles**

Il s'agit d'examiner l'aspect des cultures en milieu liquide et sur milieu solide, après incubation à 30 °C après 3 jours ou plus. Les caractéristiques des cultures sont notées. Elles font appel à la taille, la forme et la pigmentation des colonies de levures (**Bourgeois & Leveau, 1980**) , qui présenté dans (**Annexe 02**) .

- **Fermentation des sucres**

Les sucres à tester sont le glucose, le saccharose, le maltose et le galactose. Cette étude nécessite la présence d'un témoin. Dans des tubes à essai, on reparti le milieu d'enrichissement destiné pour le développement des levures.

Pour chaque boîte d'isolement de culture pure, 5 tubes à essai remplis sur une hauteur de 5 cm environ. Les sucres testés sont le glucose, le saccharose, le le, le maltose et le galactose, le 5^{ème} sert de tube témoin.

On ajoute à chaque tube ; 5 gouttes d'une solution stérile à 30%. Il faut ensemencer en profondeur chaque souche de levure sur une gamme de cinq tubes plus un témoin. Ajouter à la surface du liquide de chaque tube quelques gouttes de paraffine molle fondue et stérile qui, en se refroidissant, forme un bouchon. Les tubes sont incubés à 25°C. **(Guirard & Rougieux, 1958).**

Le résultat positif se manifeste par le soulèvement plus ou moins du bouchon de paraffine, suivant le pouvoir fermentaire de la souche étudiée **(Annexe 02).**

- **Assimilation des composés azotée (nitrates)**

La méthode est similaire à la méthode d'auxanographique seulement le milieu minéral synthétique solide de composition suivante, ne contient pas d'aliment azoté.

Après, ensemencement de la boîte de Pétri par 1 ml de suspension de levure et solidification, il est déposé en différents points et séparément des traces de nitrate de potassium ou de sodium et de sulfate d'ammonium.

Après 1 ou 2 jours apparaît le développement plus ou moins intense des colonies de levure autour des dépôts de nitrate. Le développement est à celui du produit autour des dépôts de sulfate d'ammonium **(Girard & Rougieux, 1958)**, qui présenté dans **(Annexe 02)** .

I.2.6. Production enzymatique

I.2.6.1. Préparation de jus de datte

Nous avons élaboré un protocole pour extraire le sucre à partir de dattes .Le mélangeur électrique a été utilisé pour obtenir des dates cossettes, mélangé 1kg de datte avec 2l l'eau distillée, qui a été pressée et filtrée à l'aide d'un système de filtration conventionnel. Le jus brut obtenu a été évaporé sous vide pour éviter dans la caramélisation. Un réfractomètre portatif a été utilisé pour mesurer le sucre contenu un échantillon de jus de dattes.

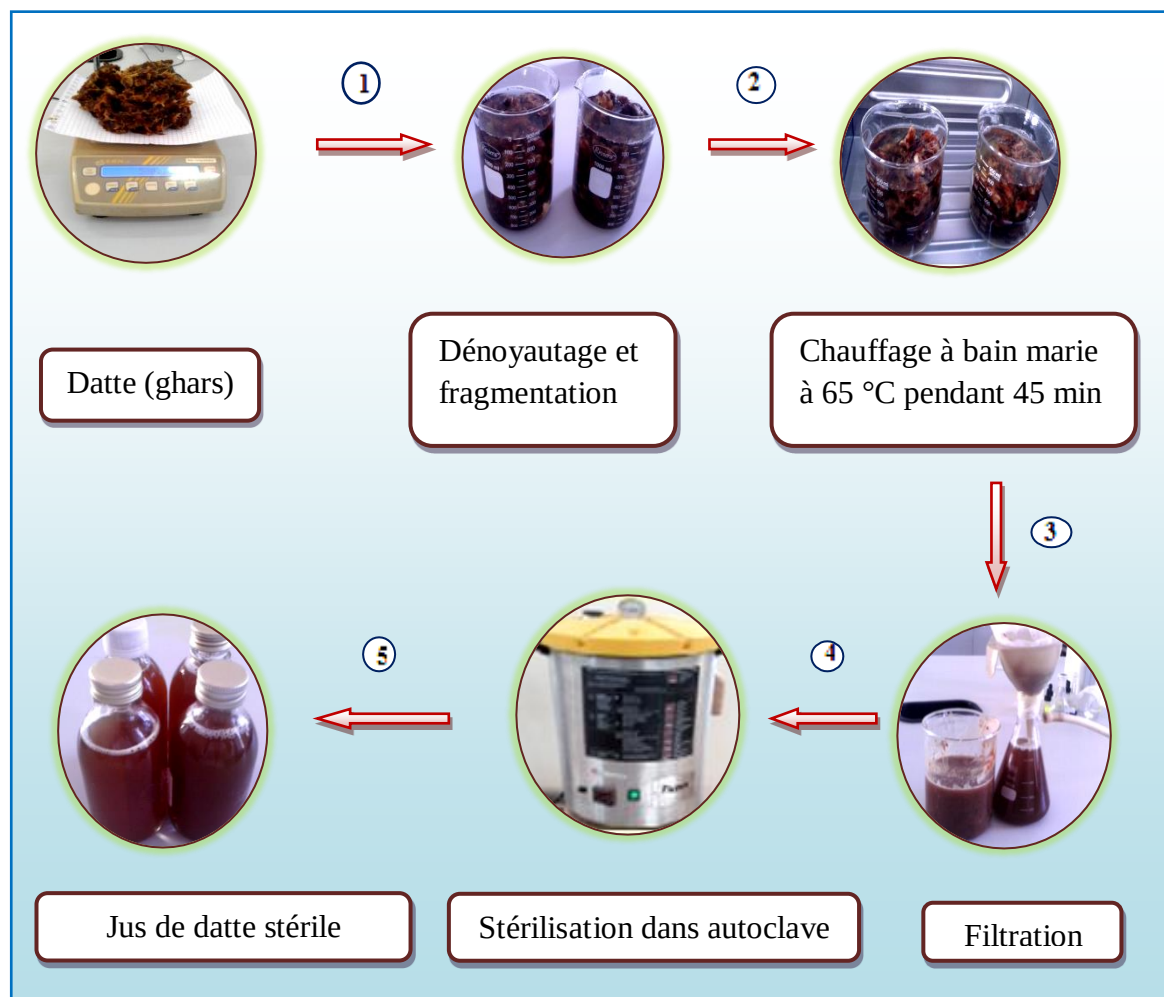


Figure 8: Les étapes de préparation de jus de datte

I.2.6.2. Analyses physicochimiques et biochimiques de jus de datte

A. Détermination du pH

La détermination du pH du jus de datte s'effectue par une lecture directe à l'aide d'un pH mètre préalablement étalonné (**Benaouida, 2008**).

B. Détermination d'humidité

La teneur en eau est la perte de masse exprimée en pourcentage effectuée par dessiccation de 10 grammes d'échantillon de dattes dans une étuve réglée à 105°C, jusqu'à l'obtention d'un poids constant (**Audigie et al., 1984**).

C. Détermination du taux de cendres

Les cendres sont déterminées par incinération. La prise d'essai ayant servi à la détermination de la matière sèche à 105°C pendant 2 à 5h est suivie par une calcination au four à moufle à 550°C pendant 5h (**Annexe 06**).

Les cendres exprimées en pourcentage de masse sont données par la formule (**Audigié et al., 1984**).

$$C\% = (M0 - M1 / M2 - M1) \times 100(\%)$$

- **M0** : masse de la capsule et les cendres
- **M1** : masse de la capsule vide
- **M2** : masse de la capsule et la prise d'essai.

D. Détermination de l'acidité titrable

Nous avons utilisé la méthode colorimétrique décrite par la norme française (**NF V 05-101 du janvier 1974**).

Le titrage de l'acidité se fait avec une solution d'hydroxyde de sodium (NaOH) de 0,1 N en présence de quelques gouttes de phénophtaléine comme indicateur, (**Annexe 07**). Il est également possible d'exprimer conventionnellement l'acidité titrable en grammes d'acides pour 100g de dattes, en multipliant par le facteur correspondant à l'acide.

$$\text{Acidité titrable} = 100 \times V1 / V0$$

- **V0** : le volume, en millilitre, de la prise d'essai.
- **V1** : le volume, en millilitre, de la solution d'hydroxyde de sodium 0,1N utilisée.

E. Dosage des sucres totaux

A 1 ml de jus de datte, ont ajouté 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 (**Annexe 3**).

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 , qui présenté dans (**Annexe 6**) (**Dubois et al., 1956**).

I.2.6.3. Préparation du milieu de base

Les jus de dattes ont été élaborés selon la méthode décrite par (**Al-farsi et al.,2007**). Par l'utilisation de datte moelle de variété ghars, la fabrication passe par plusieurs étapes, les dattes sont tout d'abord lavés, égouttés et dénoyautés. Un échantillon de 1Kg de datte découpés en petit morceaux (pour augmenter la surface de contact avec l'eau et afin d'extraire le maximum de jus), auquel on ajoute 1 l d'eau . Ensuite, le mélange est porté à la cuisson dans un bain marie à 60°C pendant 3à 4h, dans le but est le ramollissement des parois. Puis, une étape de filtration à travers papier Wattman N°4 dont le but de séparer la phase liquide (sirop) de la phase solide (pulpe). L'enrichissement de ce milieu de culture se fait par l'ajoute des éléments nutritifs suivant:

- Sulfate de magnésium $Mg SO_4$ (0,15g/l).
- Sulfate de potassium monobasique KH_2PO_4 (0,3 g/l).
- Ammoniaque (1 ml/l)

On ajouté 2g/l de substrat enzymatique comme inducteur (caséine). Enfin, son pH est ajusté à 5 par addition de NaOH et subit une stérilisation à l'autoclave 121°C pendant 20min et ensuite conservé par réfrigération à 4°C dans des flacons de verre fermés (**Refice et al., 2011**) .

I.2.7. Préparation de l'inoculum

Nous préparons l'inoculum à partir des souches de levures conservées dans des tubes à une température de 4°C; où nous repiquons ces souches à l'aide d'une anse stérile et ensemençons dans les tubes contenant 10 ml d'eau physiologique. Puis on mit à incuber à 30°C (**Merabti, 2006**).

I.2.8. Conduite de la fermentation

Cette fermentation a pour but d'adapter la souche de levure au milieu de culture utilisé. Les cultures sont réalisées dans des erlens-myers de 300 ml à raison de 50 ml par erlen, puis stérilisées à 120°C pendant 20 min. A l'aide d'une seringue, les milieux sont ensemencés par 1 ml de suspension de cellules. Les erlens sont incubées à 30°C pendant 5 jours (**UI-haq et al., 2002**) .

I.2.9. Cinétique de production enzymatique des souches sélectionnées

Des prélèvements effectués régulièrement chaque 24 h pendant 05 jours, pour la détermination du :

- pH
- Biomasse produite
- Dosage des sucres totaux
- Dosage de protéines
- Activité protéolytique pour les souches cultivées.

I.2.9.1. Mesure du pH

Le pH de l'extrait enzymatique est mesuré à l'aide d'un pH- mètre du marque consort dans (Annexe 04) (Benaouida, 2008).

I.2.9.2. Mesure de la biomasse

Le poids sec de la biomasse est déterminé à la fin des fermentations, après centrifugation et rinçage avec l'eau distillée. La biomasse est séchée dans une étuve réglée à 105°C jusqu' à poids constant , elle est mesuré à l'aide d'un balance (Pedersen & Nielsen , 2000) (Annexe 04) .

I.2.9.3. Dosage des sucres totaux

Les sucres totaux sont déterminés selon la méthode de (Dubois et al., 1956) dont le principe repose sur la réaction suivante: l'acide sulfurique concentré provoque, à chaud, le départ de plusieurs molécules d'eau à partir des oses. Cette déshydratation s'accompagne par la formation d'un hydroxy-méthyl furfural (HMF) dans le cas d'hexose et d'un furfural dans le cas d'un pentose. Ces composés se condensent avec le phénol pour donner des complexes colorés (jaune-orangé). L'intensité de la coloration est proportionnelle à la concentration des oses. La densité optique est mesurée à 488 nm à l'aide d'un spectrophotomètre(Annexe 04) .

I.2.9.4. Dosage des protéines

Les protéines ont été dosées par la méthode de (Bradford,1976), ou 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 (Annexe 04) .

I.2.9.5. Dosage de l'activité protéolytique

Cette mesure est déterminée selon la méthode décrite par (Siboukeur et al., 2005). L'objectif de la mesure de l'activité protéolytique est l'évaluation du taux de dégradation du Substrat (caséine) par l'enzyme d'origine fongique pendant la réaction primaire. Pour cela on mesure les concentrations en produits d'hydrolyse de la caséine, solubles dans l'acide trichloracétique (TCA) à 12%.

L'addition du TCA arrête la réaction, et une centrifugation à 5000 tr /min pendant 15 min à 4°C, permet de séparer le précipité de la caséine (culot) et de produit d'hydrolyse (surnageant), solubilisé dans TCA (Annexe 04).

I.2.10. Purification de protéase

Dès que la fermentation est terminée, la culture est refroidie à 4°C. Les enzymes doivent alors être après des cellules et du milieu (centrifugation ou filtration), dans le cas des enzymes endocellulaires, la récupération est plus difficile et suppose une étape supplémentaire de broyage ou de lyse des cellules microbiennes. Enfin, les enzymes sont traitées de façon à obtenir une préparation commerciale répondant aux critères de pureté et de stabilité souhaités (Benslama, 2016). Les protéases sont purifiées en 04 étapes :

- Préparation de l'extrait brut.
- Précipitation par l'sulfate d'ammonium.
- La dialyse.

I.2.10.1. Préparation de l'extrait brut

Après 04 jours d'incubation des souches à 30 °C dans le milieu de base, le milieu de culture obtenu subit une centrifugeuse à 4000 tours pendant 20 min à 4 °C. le culot obtenu qui constitue des microorganismes est écarté et utilise le surnageant qui constitue l'extrait brut (enzymatique) pour la précipitation par le sulfate d'ammonium (El Safey & Ammar, 2004; Sidkey et al., 2011).

I.2.10.2. Précipitation par le sulfate d'ammonium

Une quantité appropriée de sulfate d'ammonium (Sigma), ajoutée à l'extrait afin d'obtenir une saturation finale de 60 %, dans un bain de glace pendant 1 heure après chaque étape, une centrifugation à 9000 tours pendant 20 min à 4°C est réalisée (Claudia, 2013). Le surnageant obtenu est écarté et purifiée le culot constitue d'enzyme dans 10 ml du tampon phosphate de 0.2 M et pH= 6, qui est présenté dans (Annexe 05).

1.2.10.3. Dialyse

La dialyse permet de séparer des substances en utilisant leur capacité respective à franchir les pores d'une membrane semi-perméable appelée membrane de dialyse. Elle concerne autant les macromolécules (protéines et ADN, polymères synthétiques, anticorps...) que des molécules biologiques plus petites comme les oligonucléotides et les peptides. Les membranes de dialyse (ou boudin) sont placées dans un récipient contenant le liquide contre lequel s'effectue la dialyse (**Hainque et al., 2008**).

1. Membranes Spectra/Por®

Les membranes Spectra/Por® biotechnologiques sont la toute nouvelle génération de membranes de dialyse Spectra/Por®. Le principal avantage des membranes biotechnologiques de Spectrum par rapport aux membranes traditionnelles est le processus de fabrication qui élimine l'utilisation de sels métalliques. Ce processus fournit des membranes de haute pureté et élimine le besoin de traitements de nettoyage spéciaux. Les membranes biotechnologiques de Spectrum/Por® nécessitent seulement un rinçage minimum pour enlever l'agent de conservation s'il est présent. Les membranes biologiques en cellulose régénérée (CR) sont utilisées lorsqu'une résistance à différents solvants organiques est requise.

Les fractions obtenus après chaque précipitation sont dialysées dans des sacs de cellophane (bag 260 C.T de 2 cm de diamètre) découpées en boudins de 20 cm de longueur, contre un grand volume de tampon phosphate à 4°C pendant 24 h (**The technic file, Spectra/Por®**).

2. Paramètres de purification

Trois facteurs de purification sont déterminés afin d'évaluer les différentes étapes de la purification : l'activité spécifique, le rendement et le taux de purification (**Chaoui R & Boursas I., 2015**).

• L'activité spécifique (Ac S) (U/mg) = Activité totale (U) / Protéines totales (mg) .

• Le rendement en activité (R) (%) = (Activité totale de l'étape de purification/Activité totale de l'étape initiale) x 100

• Facteur de purification (FP) = Activité spécifique de l'étape de purification/Activité spécifique de l'étape initiale

Chapitre II

Résultats et discussion

II. Résultats et discussion

Ce travail s'inscrit dans le cadre de la production de protéase levuriennes qui prélèvent à partir de sol saharienne, à application variée dans les différents secteurs industriels. Nous allons présenter, d'abord, les résultats d'analyse physicochimie de sol étudiée provenant de sol prélevé cite d'El Chatte de la région d'El Oued Souf. Ensuite, l'isolement et sélectionnées puis l'identification phénotypique de ces souches. Aussi, certain leurs caractéristiques et physicochimie.

II.1. Analyses physicochimiques du sol

Les propriétés physicochimiques d'échantillon du sol d'étude, sont présentées dans le tableau 07, la zone d'où l'échantillon a été prélevé se considère comme un sol légères acide, il est très pauvre en matière organique.

Tableau 6: Analyses physicochimiques du sol étudiée

Les paramètres d'analyse	Sol saharienne
pH	6.68
MAT.OG (%)	0.74
CE (ds/m)	1.95
Humidité	6.24

Selon (**le Guide de fertilisation du CRAAQ, 2003**), on observées à partir les résultats d'analyses physicochimiques du sol étudiée, type du sol est Léger et le classe texturale est sable.

Le tableau 07 montre que le pH d'échantillon est neutre tendant légèrement vers l'acidité $\text{pH} = 6.68$ ce valeur concorde avec les résultats obtenus par (**Merabti ,2006** ceux obtenus par (**D. Touhtouh, 2014**) qui ont trouvés une gamme de pH entre (7.75- 7.83).

Selon (**Benmouaffeki 2011 ; & Hammia ,2012**), l'acidité du sol (pH) est influencée par la nature de sels. Alors que certains sels sont acidifiant (CaSO_4 , KCl , MgSO_4) d'autres sont alcalinisant (NaHCO_3 , CaCO_3 , Na_2CO_3) . Les analyses ont montré que l'échantillon est très pauvre en matière organique 0.74 mais relativement riches en sel minéraux. Elles ont également montré un taux relativement élevé d'humidité de sol (6.24 %).

On observées par (**le Guide de fertilisation, 1987**), matière organique (tableau 8), facteur indiquant le degré.

Tableau 7: type du sol en fonction de matière organique (le Guide de fertilisation, 1987)

Niveau	Très pauvre	Pauvre	Moyen	Riche	Très riche
Texture légère	0,0 – 2,0 %	2,1 – 3,5 %	3,6 – 6,5 %	6,6 – 8,0 %	> 8,0 %
Sable					

Il est souvent souhaitable de viser à maintenir un taux minimal de 2,5 % en général et même de 3,5 à 4 % dans les sols lourds (**Doucet, 2006**).

De façon générale, un taux de 4 à 8 % de matière organique correspond à un bonne productivité et à une bonne capacité de minéralisation. Cependant, de hautes teneurs en matière organique peuvent être révélatrices de mauvaises conditions de croissance si elles sont associées à de mauvaises conditions de drainage (**Craaq , 2003**) .

Selon (**Richards ,1969**), on peut définir le type de sol en fonction de sa conductivité (tableau 9). La conductivité électrique (CE), facteur indiquant le degré de salinité du sol, est inférieure à 1.2, révélant une faible salinité des sols environnant la source étudiée.

Tableau 8: 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

II.2. Isolement des souches

L'isolement des levures, à partir d'échantillon de sol saharien (Chatte El-oued), a permis de répertorier quatre souches (S1, S2, S3 et S4).

Le tableau 10 résume la répartition du nombre de colonies apparues dans les dilutions effectués.

Tableau 9: isolement des souches de levures à partir d'échantillon de sol sur milieu gélosé PDA

Echantillon	Région	Dilution	Nombre des souches	Code d'isolat
Sol	Chatte El-Oued	SM	01	S1
		10 ⁻¹		
		10 ⁻²		
		10 ⁻³	04	S1, S2, S3, S4

Les résultats qui apparues sur le milieu PDA sont repiquées sur le même milieu. Le développement rapide des colonies sur ce milieu reflète sa richesse en éléments nutritifs indispensables. Cette opération est suivie par des repiquages successifs qui ont permis d'obtenir des souches pures.

II.3. Sélection des souches protéolytiques

II.3.1 Mise en évidence de l'activité protéolytique

Pour la mise en évidence de l'activité protéolytique chez les quatre isolats, nous avons utilisé un milieu lait gélosé qui constitue à 5 % de caséine (milieu sélectif). Après l'incubation à 30 °C pendant 72 h, nous observons des zones de claire de différentes dimensions. Tous les souches S1, S2 S3 et S4 ont développé des zones de lyse (halo clair) sur ce milieu sélectif (figure 9).

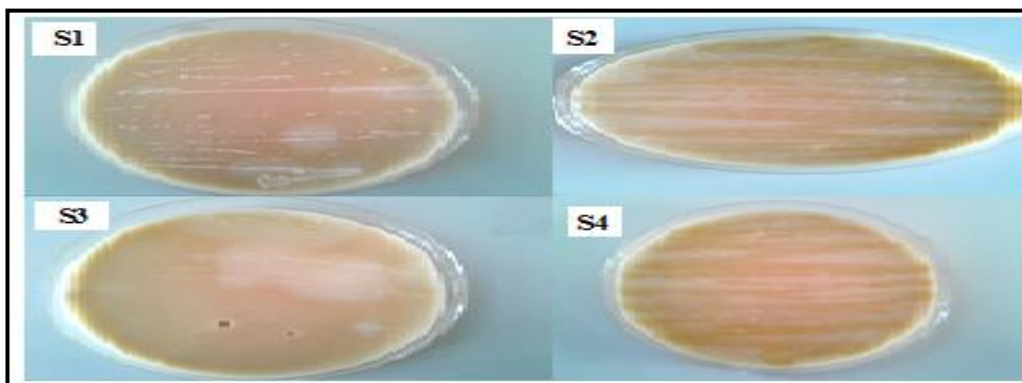


Figure 9: Sélection de souches protéolytiques sur un milieu lait gélosé à 5 % de caséine (après 72 h d'incubation à 30 °C et à pH 5).

D'après les résultats d'analyse physicochimique de sol, la zone d'étude est considérée comme un milieu extrême avec un pH relativement neutre et un teneur presque nul en matière organique. A cause de ces conditions, le sol étudié présente un peuplement faible des levures présenté par les souches résistantes grâce à leurs formes sporulant.

Par leur forte capacité à hydrolyser le caséine, tous souches (S1, S2, S3 et S4), seront sélectionnées pour la suite de travail.

II.4. Production de la protéase

II.4.1. Analyses physicochimiques et biochimiques de jus de datte

Les résultats des caractérisations de certains paramètres physicochimiques du sirop de datte utilisé comme milieu de base pour la production enzymatique sont présentées dans le tableau 11.

Tableau 10: Les caractéristiques physicochimiques et biochimiques du sirop de datte de variété Ghars.

Paramètre	pH	Acidité (g/l)	Humidité (%)	Cendre (%)	Sucres totaux (%)
Valeure	5.56	6.72	10.3	1.73	70

II.4.1.1. Le pH

Le pH de l'extrait de datte est légèrement acide, il est de 5,56 Cette valeur est légèrement semblable à celle donnée par **(Soltani ,2007)** avec de valeur de 5,56 et inférieur à valeur trouvée par **(Noui ,2007)** avec de valeur de 6,14, alors qu'elle est peu supérieure à celle obtenus par **(Benagga & Gougui , 2014)** et qui ont donné 3.98 et 4.33 respectivement **(Mimouni & Siboukeur, 2011)**. Il peut donc favoriser la multiplication des levures et moisissures et parallèlement freine le développement des bactéries à l'exception des acidophiles **(Sayah & Ould elhadj, 2010)**.

II.4.1.2. L'acidité (g/l)

L'extrait de datte utilisé dans notre expérience possède une acidité titrable de 6.72 g/l. Ces valeur d'acidité observée est comparable à celle trouvée par **(Benagga & Gougui ,2014)** et **(Benahmed ,2012)** qui ont été évaluées, respectivement, à 5.5 et 2.24 g/l. Toutefois, nos résultats restent largement inférieurs à celle rapporté par **(Bendjelloul & Berraghda ,2014)**, qui ont trouvé un teneur s'étendant de 14.33 à 15.85 g/l.

L'acidité titrable renseigne sur l'état physique du fruit ainsi que le pH. Notons qu'une forte acidité est souvent associée à une mauvaise qualité des dattes. En effet, il a été rapporté

par (**Booij et al. 1992**), que le taux d'acidité de la datte est proportionnel à la teneur en eau et donc inversement proportionnel au degré de maturité.

II.4.1.3. Humidité (%)

L'humidité nous permet de déterminer la teneur en matière sèche par rapport au poids totale, et d'exprimer les constituants biochimiques en % de la matière sèche. La teneur en eau de la datte utilisée dans notre expérience est de 10,3 %, nos résultats restent largement inférieurs à celle rapporté par (**Benflis, 2006 ; Noui & 2007 ; Benamara & al.,2007**), avec des teneurs de 13.1, de 14.15% et de 14,71%,

La teneur en eau est en fonction des variétés, stade de maturation et du climat (Matallah., 1970).Selon Booij et al., 1992, l'humidité décroît des stades verts aux stades murs.

D'après (**Munier ,1973**) ; la teneur en eau varie d'une classe à une autre, les dattes de consistances molles ont une humidité supérieure à 20%, par contre les dattes sèches ont une humidité inférieure à 20% et les dattes de consistance demi-molles ont une humidité variant entre 20-30%.

II.4.1.4. Teneur en cendres totales

Le taux des cendres représente la quantité totale en sels minéraux présents dans l'échantillon. La teneur moyenne trouvée dans notre échantillon est de 1,73 %, nous pouvons dire que cette dernière est conforme à celle donnée par : (**Boudraa ,2004**) signale un teneur de 1,74 % pour la variété Ghars. La teneur en cendres est dépendante aux conditions de fertilité du sol, aussi d'état d'irrigation des palmiers (**Baangood et al., 1984**).

II.4.1.5. Teneur en sucres totaux :

L'extrait de datte utilisé dans notre expérience possède une teneur de 70 %. Ces teneurs sont conformes aux résultats donnés par : (**Soltani ,2006 & Noui, 2007**), avec des valeurs de l'ordre de 70,66 % et 79,75 % du poids sec, et son supérieur à celles données par (**Benflis ,2006**), avec une teneur de 52,79 % du poids frais, soit 60,75 du poids sec.

Généralement, les valeurs trouvées montrent la richesse de la datte en sucres totaux, ce qui constitue un substrat favorable à la multiplication des levures.

II.5. Identification

L'identification des souches précédemment sélectionnées est basée sur les clefs de détermination de (**Barnett, 2000; Kreger-Van, 1984; Lodder, 1971**). Ces souches sont identifiées après une étude morphologique (microscopique), culturale (macroscopique) et

II.5.1. Etude de caractères macroscopiques

D'après l'incubation pendant trois jours à 30 °C, les colonies isolées ont subi une observation macroscopique. Les caractéristiques principales des colonies sont récapitulées dans le tableau 12.

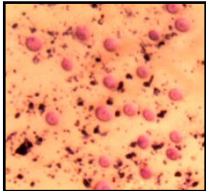
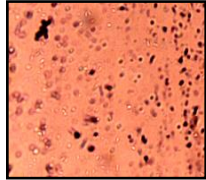
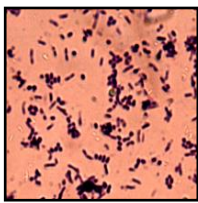
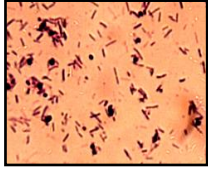
Tableau 11: Caractères macroscopiques des quatre souches de levures sélectionnées.

Code	Caractéristiques macroscopiques			Observation macroscopique
	Couleur	Forme et texture	Aspect	
S1	Blanche	Colonies plates, rondes, Contour entier (régulier), crèmeuses	Lisses, brillantes	
S2	jaune	Contour entier (régulier), crémeuse, plate	Lisses, brillantes	
S3	Blanche	Contour entier (régulier), crémeuse, plate	Lisses, brillantes	
S4	Jaune	Contour entier (régulier), crémeuse, plate	Lisses, brillantes	

II.5.2. Etude de caractères microscopiques

Étude macroscopique réalisée préalablement est accompagnée par une étude microscopique (X100) dans le but de déterminer les espèces des souches sélectionnée. Les résultats d'observation sont rassemblés dans le tableau 13.

Tableau 12: Caractères microscopiques (X100) des souches sélectionnées

Code	Caractéristiques microscopiques				Observation microscopique
	Forme des cellules	Mode de reproduction	Filamentation	Mobilité	
S1	Rondes à ovalaires de grande taille	Méiose	Pas de filaments	Immobile	
S2	Ovoïdes à Sphériques	Bourgeonnement simple	Pas de filaments	Mobile	
S3	Ronde de petit taille	Bourgeonnement Alternné	Pas de filaments	Mobile	
S4	Ronde ovale de petite taille	Bourgeonnement simple	Pas de filaments	Immobile	

II.5.3. Etude des caractères biochimiques et physiologiques

Les composés carbonés et azotés sont les substrats le plus fréquemment utilisés par les levures. Certaines levures ont la capacité d'utiliser une large gamme de ces composés, contrairement à d'autres qui en assimilent moins. Vue à l'importance de ces critères dans la physiologie des levures, nous avons les utilisés pour l'identification des quatre souches sélectionnées. Les résultats sont présentés dans le tableau 14.

Tableau 13: caractères biochimiques et physiologiques des souches sélectionnées

Code	Fermentation des sucres				Assimilation des composés azotés		Espèces
	Glu	Mal	Gal	Sach	(NH ₄) ₂ SO ₄	KNO ₃	
S1	-	+	+	+	+	+	<i>Cryptococcus neoformans</i>
S2	-	+	-	-	+	+	<i>Coccidioides Malbranchea</i>
S3	-	+	+	-	+	-	<i>Onychocola canadensis</i>
S4	-	-	+	-	+	+	<i>Neoscytalidium</i>

Fermentation négative (-)

fermentation positive (+)

Les tests de fermentescible des sucres recherche à identifier les différentes souches. Les résultats du tableau 18, révèlent que les différents sucres testés dont le glucose, le fructose et le galactose, seul le maltose est non fermentescible par les quatre souches. Il apparaît que les souches de levure étudiées (S1 et S3) peuvent fermenter deux sucres dont (le galactose et le maltose) mais la souche S1 peut fermenter aussi le saccharose, alors que la souche S2 peut fermenter le maltose seulement et aussi le souche S4 peut fermenter le galactose seulement.

II.6. Cinétique de la production de protéase

La cinétique de la production de protéase par les quatre souches sélectionnées et cultivées dans un milieu à base d'extrait de dattes variété Ghars. Elle est étudiée au cours de la fermentation par l'évaluation des paramètres du milieu pendant la période d'incubation.

III.6.1. Evolution du pH

Le pH du milieu de production de l'enzyme est initialement ajusté à 5. La figure 12 montre l'évolution du pH de milieu en fonction de la durée d'incubation pendant cinq jours

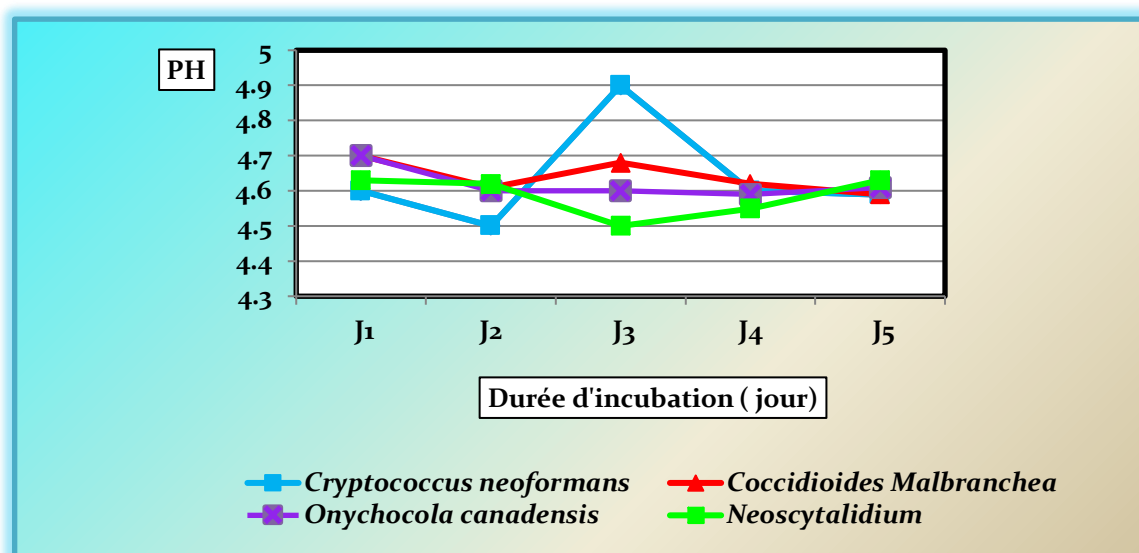


Figure 10: variation du pH de milieu au cours de culture chez des souches levuriennes

Au cours de la fermentation, On observe une variation faible de pH (fig. 10), ce dernier varie à son tour d'une souche à l'autre en fonction de la durée d'incubation, le pH diminue de manière progressive pour les quatre souches pendant les premières 02 et 03 jours. Il passe de pH 5 à pH 4.5 pour *C. neoformans*, pH 4.61 pour *C. malbranchea*, pH 4.6 pour *O. canadensis* et pH 4.5 pour *Neascytalidium*. Cette baisse est suivie d'une légère augmentation, qui ne dépasse pas le pH initial, au-delà de 3ème j pour toutes les souches.

Notre pH de milieu se situe entre 4.5 et 4.9, ces résultats sont similaires à ceux trouvés par (Massaoudié, 2016 ; Bessei & Ramha., 2017 & Zoubiri., 2012) ; à savoir un pH varié entre 3.50 à 5. La variation de pH de milieu au cours de la fermentation est due au changement de la composition du milieu et aux souches utilisées.

La diminution du pH dès les premières heures d'incubation, enregistrée pour les souches des levure étudiées. Ceci peut être expliqué par l'acidification du milieu de culture due à la sécrétion d'acides organiques extracellulaires par ces souches (Boiron, 1996 & Akin, 2008).

L'augmentation de pH, peut être engendrée par de la dégradation des protéines par les levures qui libèrent progressivement des acides aminés hydrolysés en suite en ammoniacque par désamination (Benaouida, 2008). Aussi la diminution de la synthèse des acides organiques dans le milieu et la lyse cellulaire, provoquent aussi une augmentation de pH (Bouix & Leveau, 1999).

Toutefois, 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**). Par ailleurs, (**Kelly 1985 & Prieto, 1995**), rapportent pour l' α -amylase, un pH optimum acide (4 à 4.5) pour *Lipomyces starkeyi* et (4.5 à 5.0) pour *Lipomyces kononenkoae* respectivement.

II.6.2. Evolution de la biomasse

le processus de fermentation microbien conduit à la formation de biomasse. La figure 11 représente la variation de la biomasse en fonction du temps d'incubation pour les quatre souches: *C. neoformans*, *C. malbranchea*, *O. canadensis* et *Neascytalidium* montrent une cinétique de croissance microbienne durant les cinq jours de culture.

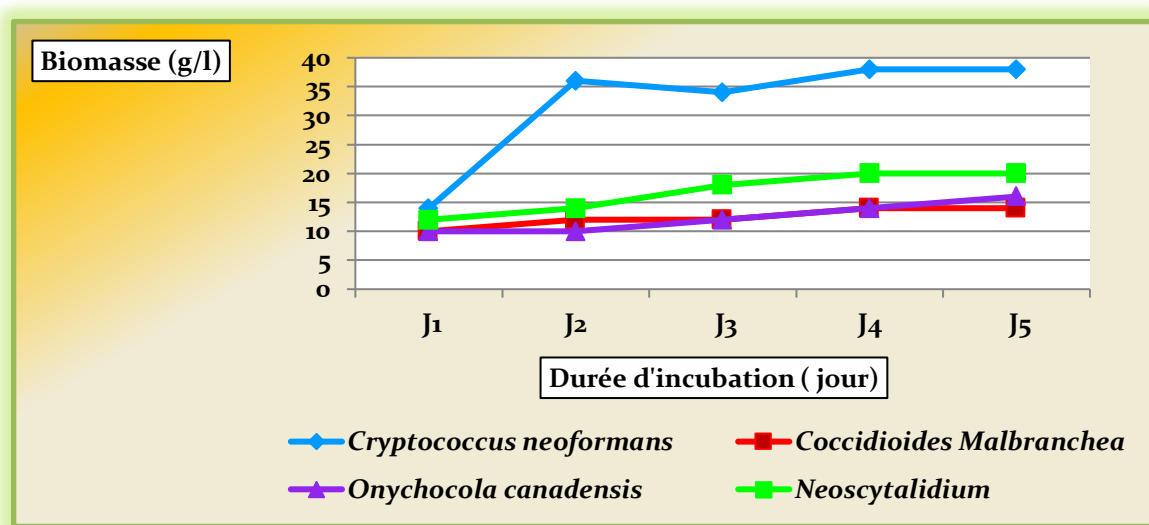


Figure 11: variation de la biomasse au cours de la culture chez les souches levuriennes

L'augmentation rapide de la quantité de biomasse dès 05 jours d'incubation, pour atteindre son maximum de 38/l, 14g/l, 16g/l et 20 g/l, respectivement pour les souches *C. neoformans*, *C. malbranchea*, *O. canadensis* et *Neascytalidium*. il est expliquée par le fait que le moût de datte de milieu est riche en sucres simples facilement assimilable. Il peut donc servir comme milieu pour le développement des levures notamment quand on enrichit ce moût par les sels minéraux (**Ould El Hadj., Bitour & Siboukeur., 2006**). L'analyse biochimique de l'extrait de datte montre sa richesse en sucres fermentescibles (glucose), ces sucres sont utilisés par la levure comme substrat organique pour réaliser sa croissance (BACHA., 2008).

La diminution de la quantité de biomasse, atteignant 6.50g/l, 6.84g/l, 6.90g/l et 6.46 g/l à 96 heures, respectivement pour les souches *C. neoformans*, *C. malbranchea*, *O. canadensis*

et *Neascytalidium*, est due à la phase de décélération qui se termine par une phase de déclin caractérisée par la présence dans le milieu, de substances ou déchets sécrétés par ces levures, inhibant la croissance progressivement jusqu'à l'arrêter.

L'accumulation de ces substances d'excrétions, provoque une autodestruction des cellules microbiennes ; ce qui explique la diminution de leur quantité (Leclerc et al., 1995; Leveau et Bouix, 1993; Arnaud et guiraud 1999).

II.6.3. Evolution de la concentration des glucides

La figure 12 montre la variation de la concentration des glucides de milieu en fonction de la durée d'incubation pendant cinq jours pour les souches des levures.

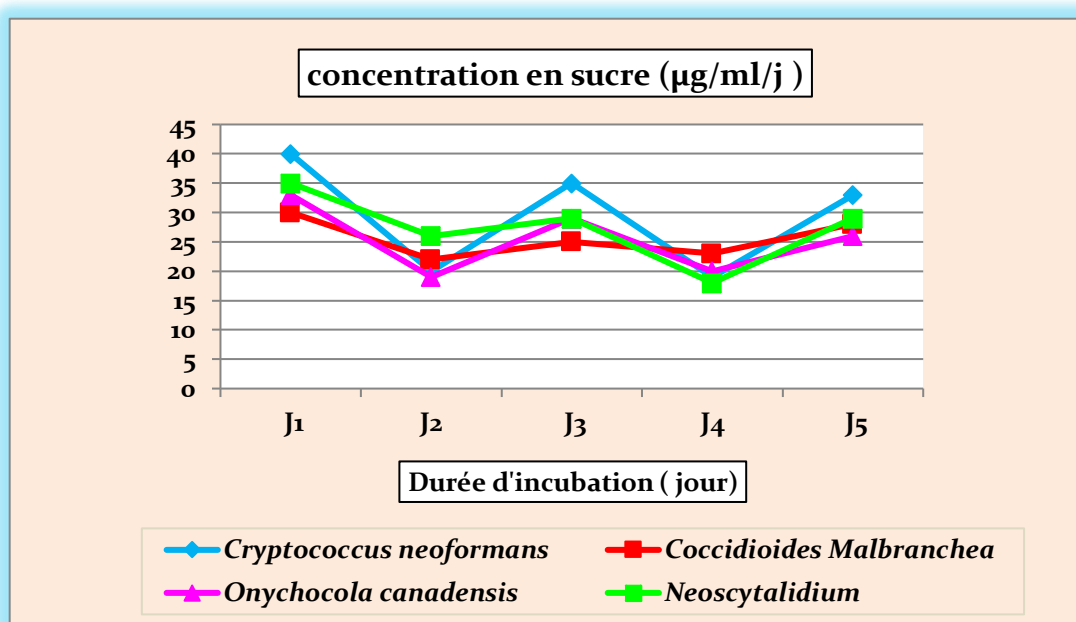


Figure 12: Variation de la concentration des glucides au cours de la culture chez les souches levurènnnes

La consommation des glucides varient selon la souche. Au cours de la fermentation, la quantité totale de glucide diminue pendant la phase de latence (jusqu'à 2ème jours), ensuite la consommation des glucides devient importante dans la milieu pour les quatre souches. Ceci peut être expliqué 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 & Bouix, 1993).

La concentration de sucre augmente le troisième jour et diminue ensuite le quatrième jour, puis revient à augmenter le cinquième jour de fermentation pour atteindre une valeur maximale de 33 $\mu\text{g/ml/j}$.

(Dakhmouche ,2016) expliquent l'augmentation remarquable des sucres, durant la phase stationnaire, est donc due probablement à la production des polysaccharides par *Clavispora lusitaniae* ABS 7.

II.6.4. Evolution de la concentration des protéines

L'analyse des résultats et la comparaison de la concentration des protéines chez les différentes souches fongiques indiquent que la production de protéase fongique, obtenue par les quatre souches sur le milieu liquide à base de jus de datte, est très importante. Ces résultats seront plus détaillés dans le courbe suivant :

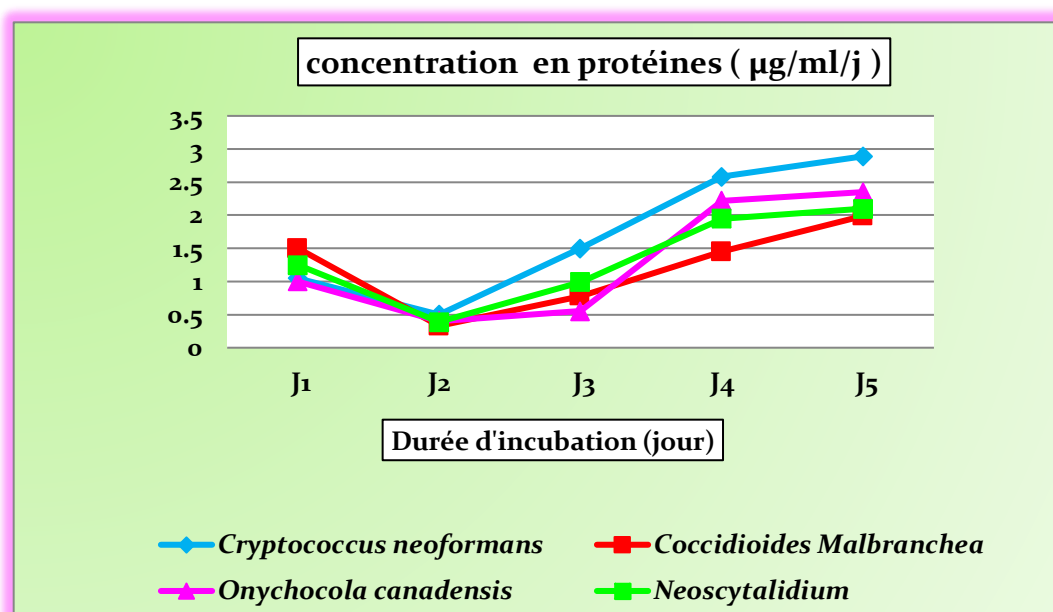


Figure 13: variation de concentration des protéines au cours de la culture chez les souches levurèennes.

La concentration en protéines diminue pour les quatre souches des levures pendant 2ème jour. Il passe de 1.85 à 0.5 $\mu\text{g/ml/j}$ pour *C. neoformans*, 1.5 à 0.33 $\mu\text{g/ml/j}$ pour *C. malbranchea*, 1 à 0.4 $\mu\text{g/ml/j}$ pour *O. canadensis* et 1.23 à 0.39 $\mu\text{g/ml/j}$ pour *Neascybalidium*. Après le 2ème jour, On observe une augmentation de 0.42 à 2.2 $\mu\text{g/ml/j}$ dans le taux de protéines cette augmentation pendant la phase exponentielle de la fermentation (à partir de 2ème jour) est expliquée par la synthèse des enzymes et en particulier protéase (Arnaud et Guiraud, 1999). Cette progression est en parfaite synergie avec les cinétiques de croissance et d'activité protéolytique des souches. ce qui laisse suggérer que la diminution de taux des

protéines pendant les premiers jours de fermentation est le résultat de la faible production de protéase (nature protéique) dans cette phase.

Au dernier jour nous assistons une diminution, qui se stabilise à des concentrations minimales. (Merabti ,2006) aussi noté une telle baisse dans son étude sur la levure *Lipomyces sp* au bout de la fermentation. Cette chute est probablement due à l'action protéolytique des protéases (Leveau & Bouix, 1999).

4. Evolution de l'activité protéolytique

La cinétique d'évolution de l'activité protéolytique des quatre souches, durant le temps d'incubation dans un milieu le milieu liquide à base de jus de datte, est représentée dans la figure suivante :

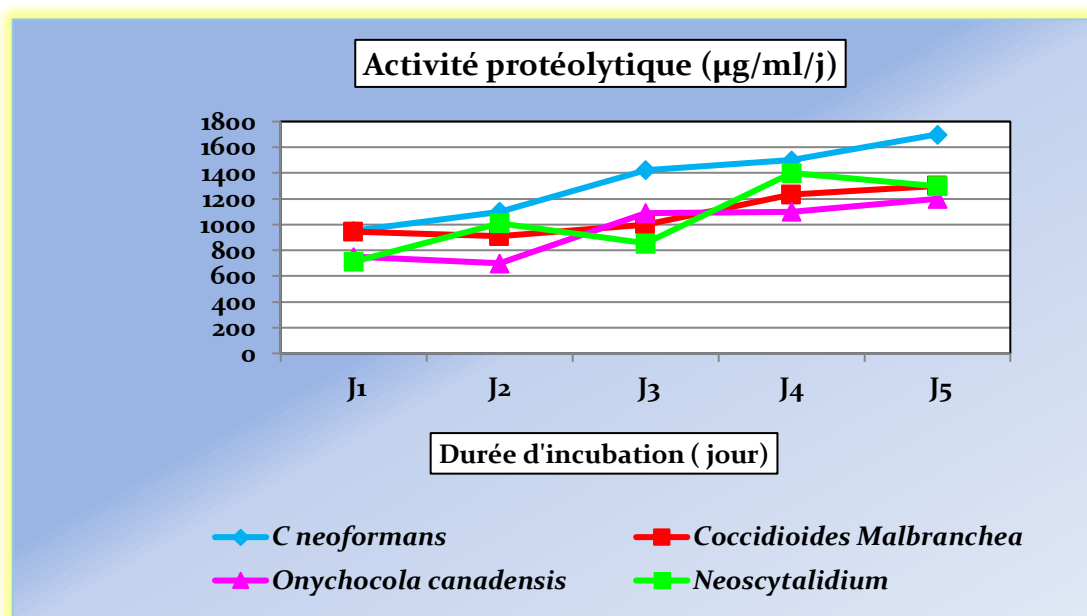


Figure 14: variation de l'activité protéolytique au cours de la culture chez les souches levurées

On observe l'apparition de l'enzyme dès le début de la fermentation faible, (activité protéolytique de 1000 à 610 µg/ml/j). Après 2 jour, l'activité augmente progressivement pour atteindre une valeur maximale de 1700 µg/ml/j après cinq jours de fermentation à 30 °C .

Durant les premières 24 h, l'activité est très faible, cela indique que les spores sont métaboliquement dormantes et que la dégradation du substrat ne peut s'installer qu'après la germination (Assamoi & al., 2009).

Aussi, (**Leveau & Bouix, 1993**) est expliquée la diminution par le fait qu'au début de fermentation, les souches utilisent les nutriments facilement assimilables, tels que les sucres fermentescibles du jus de dattes pour leur croissance.

Ces résultats sont similaires à ceux obtenus par de nombreux auteurs en particulier (**Agrawal & al.,2005**) pour l'activité protéasique produite par *A. oryzae* NCIM 649 sur le son de blé supplémenté des protéines de soja, (**Lazim & al.,2009**) pour la production d'une protéase alcaline par *Streptomyces* sp. CN902 cultivée sur un mélange du son de blé et des pierres de dattes hachées et (**Chellappan & al.,2006**) lors de la production d'une protéase alcaline par *Engyodontium album* BTMFS10 sur un milieu à base du son de blé.

Le maximum de la production d'enzyme a été observé après 96 heures de la fermentation.

Le même temps est rapporté aussi bien pour la production de protéase par *Aspergillus oryzae* (**Wang & al., 2008 ; Murthy & Naidu, 2010**). Par ailleurs, (**Battaglino et al., 1991**) indiquent un intervalle de temps de 72-96 heures nécessaire pour la production d'une activité maximale de la protéase neutre par *Aspergillus oryzae* cultivée sur le son de blé en SSF.

D'après ces résultats on trouve que l'activité protéolytique varie d'une souche à l'autre suivant la durée d'incubation dont la meilleure production de protéase est obtenue avec la souche S1 identifiée comme *Cryptococcus neoformans* avec une valeur de 1700 µg/ml/j et biomasse de 38 g/l au 5ème jour d'incubation.

II.7 Purification de la protéase à partir *Cryptococcus neoformans*

La souche *Cryptococcus neoformans* donne un profil d'activité plus remarquable par rapport aux autres souches ; ceci justifie le choix de cette dernière pour l'étape de la purification.

II.7.1. Précipitation par sulfate d'ammonium et dialyse

Beaucoup de sels sont utilisés pour effectuer la précipitation des protéines (enzyme) par le salage. Cependant, le sulfate d'ammonium est le produit le plus largement répandu de par sa solubilité très élevée, son faible coût et son pouvoir non dénaturant vis à vis des enzymes (Nam Sun Wang., 2001).

Tableau 14: Bilan de la précipitation fractionnée par le sulfate d'ammonium de la protéase produite par *Cryptococcus neoformans*

Etape	Ac T (U)	PT (mg)	Ac S (U/mg)	R (%)	FP
Extrait enzymatique brut	930.2	25.6	38.41	100%	1
Précipité à 60%	100.30	2.56	39.18	10.2%	1.02
Après dialyse	522	12	43.5	53.09%	1.13

D'après les résultats obtenus, on note une augmentation remarquable de l'activité spécifique au cours de la purification, qui passe de 38.41 U/mg pour l'extrait enzymatique brut à 43.5 U/mg dans le cas de l'extrait purifié obtenu par dialyse, ce qui reflète une augmentation en rendements d'activité jusqu'à 53.09 % obtenu à la fin de la purification.

Le degré (facteurs) de purification obtenu pour la protéase de *Cryptococcus neoformans* (1.02) sont inférieurs à ceux rapportés par (Preetha & Boopathy, 1997 & Siala *al.*, (2009), qui ont obtenu des facteurs de purification de 5,3 et 3,55 concernant la protéase de *Rhizomucor miehei* NRRL 3500 et d'*A. niger* I1 respectivement. Alors qu'il est inférieur par rapport aux résultats trouvés par (El-Bendary *et al.*, 2007) et (Nuoani *et al.*, 2009), travaillant sur la purification des enzymes produites par *Bacillus sphaericus* et *Mucor pusillus* respectivement (le facteur de purification trouvé est 13).

L'augmentation du facteur de purification et de rendement au fur et à mesure des étapes, ce qui reflète l'approche vers l'obtention d'une enzyme pure (Nam Sun Wang., 2001).

Conclusion et perspective

L'enzyme protéolytique est l'une des plus importantes hydrolases actives sur caséine dont les domaines d'application s'élargissent de plus en plus. La production de cette enzyme a été faite par levure, moisissures et des bactéries.

Notre étude comporte trois axes de recherche. Le premier concerne la sélection et l'identification de souches levuriennes protéolytiques isolées du sol saharienne (châta El-Oued), la seconde partie est consacrée à la préparation et l'analyse physico-chimie de jus de datte et troisième partie concerne la purification de la protéase par l'utilisation de membrane de dialyse de marque Spectra/Por® 3.

Plus de suite, l'isolement des levures, a permis de répertorier 04 souches (S1, S2, S3 et S4), pour la sélection, nous avons utilisé un milieu PDA à 5 % de caséine. Toutes les souches S1, S2, S3 et S4 ont révélé des activités protéolytiques importantes. Ces dernières ont ensuite subi des tests pour son identification: études morphologique, biochimique et physiologique. Elles semblent être appartenir au genre pour *Cryptococcus neoformans* S1, *Coccidioides Malbranchea* S2, pour *Onychocola canadensis* S3 et *Neoscytalidium* S4. Tous les souches précédemment sélectionnés et identifier ont été retenues pour la production enzymatique.

L'étude cinétique de la production de la protéase sur le milieu de base, révèle que la production enzymatique atteint son maximum de 1700 µg/ml/j après 05 jours d'incubation de *Cryptococcus neoformans* avec un taux de croissance maximale (biomasse) de 38 g/l.

La purification totale de protéase par le sulfate d'ammonium à 60 % de saturation a permis l'obtention d'une activité spécifique 39.18 (U/mg). En effet l'utilisation de centrifugeuse réfrigèrent 9000 tour /20 minute apparue des protéines précipitées, qu'ils utilisées par de membrane de dialyse Spectra/Por® 3, pour obtenues le résultat finale de protéase pure.

L'importance de protéase dans les différentes fonctions vivants, nous préposons comme perspective, la production de protéase poudre pour facilitées ces utilisation dans les différentes domaines d'application (alimenteux, pharmaceutique, médicale).

Référence Bibliographique

Abbes F., Bouaziz M.A., Blecker C., Masmoudi M., Attia H., Besbes S. (2011). Date syrup: Effect of hydrolytic enzyme (pectinase/cellulase) on physicochemical characteristics, sensory and functional properties. *LWT-Food Science and Technology*. 44, 1827-1834.

Abbes F., Masmoudi M., Kchaou W., Danthine S., Besbes S. (2015). Effect of enzymatic treatment on rheological properature transition and microstructure of date syrup. *LWT-Food Science and Technology*. 60, 339-345.

Abd-elfattah, A.C. (1990). La date et le palmier dattier. Ed Dar El-Talae, Caire.

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

Agrawal D., Patidar P., Banerjee T., Patil S., 2005. Alkaline protease production by a soil isolate of *Beauveria felina* under SSF condition: parameter optimization and application to soy protein hydrolysis. *Proc. Biochem.*, 40; 1131–1136.

Akacem, O. (2012). Activité protéolytique des *Pseudomonas* d'origine hospitalière Au niveau des services de réanimation et d'urologie (C.H.U –Tlemcen). Mémoire de master. Université Abou bekr Belkaid – Tlemcen.

Alais C. (1975). Sciences du lait. Principes et techniques laitières. Masson. Paris. P. 108-645.

Alanazi FK. (2010). Utilisation of date syrup as a tablet binder, comparative study. *Saudi Pharmaceutical Journal*. 18, 81-89.

Albert L. (1998). La santé VEECHI, 44-74.

Amellal née 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.

Arnaud A. et Guiraud J.P., (1999). Le métabolisme microbien. In. Scriban. R. Biotechnologie. 5ème édition. Techniques et Documentation-Lavoisier (Ed.), pp: 91-96

Arnaude ,A & Guiraut , J.P (1999). Les métabolisme microbien .In : Scriban , R.Biotechnologie, 5 éme Ed. Paris : Edition Techniques et Documentation Lavoiseir

Assamoi A. A., Destain J., Thonart P. (2009). Aspects microbiologiques de la production par fermentation solide des endo- β -1,4-xylanases de moisissures : le cas de *Penicillium canescens*. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*, 13(2) : 281–294.

Aviron-Violet, P., Baret, J.L., Bertrand, C., Blazy, B., & Bouvier, F. (1982). Les enzymes : Production et utilisation industrielles. Bordas, Paris. pp. 23; 123; 140–153.

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.

Barnali, R. B., Ajit B. K., & Manas D. (2008). Production and characterization of extracellular protease of mutant *Aspergillus niger* AB100 grown on fish scale. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24:449–455.

Barrett A. J. (1994). Classification of Peptidases. *Methods in Enzymology*, 244, 1–15.

Barreveld W.H.,(1993); Date palm products, Bull. Serv. FAO, 101, Roma, Italy.

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.

Benagga, S. et Gougui, S. (2014). *Etude bibliographique des caractéristiques physicochimiques et biochimiques de sous-produits des dattes*. Mémoire de licence en Biochimie fondamentale et appliquée, université Kasdi Merbah, Ouaregla.

Ben ahmed, 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.

Ben aouida, 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.

Ben Cheikh Ahmed,(2011). Les Champignons Accompagnés De L'embryon Du Palmier Dattier. mémoire de fin d'etude. UNIVERSITE KASDI MERBAH – OUARGLA

Bendjelloul, N. et Berraghda, A. (2014). *Caractérisations biochimiques des trois variétés de dattes (Ghars, Déglet-Nour et Dégla-Beida).* Mémoire de Licence en Biochimie fondamentale et appliquée, université Kasdi merbah, Ouaregla.

Benedykt, W., & Katarzyana, P. (2008). Regulation of bacterial protease activity. Cellular & Molecular Biology Letters, 13: 212-229.

Benflis S., (2006). Caractéristiques biochimiques de l'extrait de datte variété sèche "MechDegla". Mémoire d'Ingénieur. Institut d'Agronomie. Batna, 50 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.

Besbes, S., Drira, L., Blecker, K., Deroanne, C., & Hamadi, A. (2009). Adding value to hard date (*Phoenix dactylifera* L.): compositional, functional and sensory characteristics of date jam. J. Food. Chem. 112: 406-411.

Bessei et Ramha, (2017), Contribution à la caractérisation d'une α -amylase produite par une souche levurienne isolée à partir d'un milieu extrême, du diplôme de Master Académique en Sciences biologiques, Biochimie Appliquée, Université d'El-Oued.

Boiron, P. (1996). *Organisation et biologie des champignons.* Paris: Edition Nathan.

Bonaly R. (1991). Morphologie et reproduction asexuée des levures Ds : Larpent J.P., Biotechnologie des levures. Masson, Milan Barcelone Bonn. Paris. p : 4-18.

Booij, 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., Fever M., Gauthier S., Guy P., Larpent J.P., Reymond P., Sanglier J.J., Vayssier Y. and Veau P. (1990). Moisissures utiles et nuisibles. Importance industrielle. 2^{ème} édition. Masson. Collection Biotechnologies. p : 34-381.

Botton B., Breton A., Fevre M., Gauthier S., Guy P., Larpent J.P., Reymond P., Sanglier J.J., Vayssier Y. & Veau P. (1999). Moisissures utiles et nuisibles. Importance industrielle. Masson. Paris. P. 12-426.

Boudraa S., (2004). La production de biomasse *Saccharomyces cerevisiae* sur un milieu a base d'extrait de datte variété sèche : « Mech-Degla ». Mémoire d'Ingénieur. Institut d'Agronomie. Batna, 70 p.

Bouix, M. et Leveau, J. Y. (1991). *Les levures* (vol: 2). Paris: Edition Techniques et documentation-Lavoisier.

Bouix M., Leveau j.y. (1993), Microbiologie industrielle: les micro-organismes d'i
BOURGOIS C M ET LARPENT J., 1996. Microbiologie alimentaire tome II : a aliments
ntérêt industriel Ed. Tec & Doc Lavoisier,.-612 p.

Bourgeois C.M., Meslle J. F., Zucca J., (1988). Microbiologie alimentaire. Tome I. Aspect microbiologique de la sécurité et de la qualité alimentaire. Ed. Technique et Documentation, LAVOISIER, APRIA, Paris: 161-169. Cité par BENAOUIDA K., 2008- Etude de l'alpha amylase de levure isolée d'un écosystème extrême (sole environnant des sources thermales) et cultivées sur un milieu à base de lactosérum. Diplôme de magistère. Université MANTOURI Constantine. 100p.

Bourgeois C. M., Larpent J., (1996). Microbiologie alimentaire. Vol II: Aliments fermentés et fermentation alimentaire. Ed Lavoisier. Paris, 523 p.citées par BACHA A.,2008- production et étude de l'activité de l'invertase produite par la levure *saccharomyces cerevisiae* sur substrat a base de datte. Diplôme de magister: technologie alimentaire. Batna: université el hadj lakhdar. 98p.

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.

Botton, B., Breton, A., Fevre, M., Gauthier, S., Guy, P. H., Larpent, J. P., Reymond, P., Sanglier, J. J., Vayssier, Y et Veau, P. (1990). *Moisissures utiles et nuisibles d'importance industrielle* (2^{ème} édition). Paris: Edition Masson.

Botton B., Breton A., Fevre M., Gauthier S., Guy P., Larpent J.P., Reymond P., Sanglier J.J., Vayssier Y. & Veau P. (1999). Moisissures utiles et nuisibles. Importance industrielle. Masson. Paris. P. 12-426.

Boucherit z., (2011) - Production et étude de propriétés de la protéase acide d'une moisissure isolée de Sebkh. Mémoire Magistère. Université Mentouri. Constantine. 71p.

Burhan, A., U. Nisa, C. Golman, C. Omer, A. Ashabil and G. Osman. (2003). Enzymatic properties of a novel thermostable, thermophilic, alkaline and chelator resistant amylase from an alkaliphilic *Bacillus* sp. isolate ANT-6. *Process Biochemistry*. 38:1397-1403.

Chaoui R ., Boursas I., (2015) .Purification partielle et caractérisation des protéases de fleurs de *Galactites tomentosus* Moench. Université les Frères Mentouri Constantine Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie , 21-26.

Chellappan S., Jasmin C., Basheer S.M., Elyas K.K., Bhat S.G., M. Chandrasekaran M., (2006). Production, purification and partial characterization of a novel protease from marine *Engyodontium album* BTMFS10 under solid state fermentation. *Proc. Biochem.*, 41; 956–961.

Cofale C., (2006). Caractérisation des levures de boulangerie. Adopté par Comité de Fabrication de levures de panification de l'union européenne, Paris : 1-10.

Coultouly, G. (1991). Génie enzymatique. Masson éditeur, Paris, France, 244 pages.

Dakhmouche-djekrif Scheherazed, (2016) , Production et caractérisation de l'amylopullulanase de la levure *Clavispora lusitaniae* ABS7 isolée de blé cultivé et stocké en zones arides, THESE DE DOCTORAT, Département de Biochimie et Biologie Moléculaire et Cellulaire , Université des Frères Mentouri Constantine.

- Dow son W.H. et Aten A. (1963).** Fonctionnaire technique (petites industries agricoles) Sous-Division du génie Rural. Organisation des nations unies pour l'alimentation et l'agriculture, édition FAO, Rome, 334 p.
- Djerbi M., (1994).** Précis de phéniculture, F.A.O, Rome. 191p.
- Duke J.A. (1992).** Handbbook of Phytochemicalof grasherbs and other economic plants. Boca aton,FL,USA:CRC Press.
- 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.
- Durand, G. et Monsan, P. (1982).** Les enzymes. Production et utilisations industrielles. Eds. Gauthier-Villars.
- El-Bendary M. A., Moharam Maysa E. and Ali Thanaa H. (2007).** Purification and characterization of milk-clotting enzyme production by *Bacillus sphaericus*. *Journal of Applied Sciences Research*, 3 (8): 695-699.
- El-Ogaidi A. K. H. (1987).** Dates and Confectionery Product. F.A.O, Rome : 1-25.
- El-Ogaidi A. K. H. (2000).** Le palmier dattier science technologique Agronomique et industrielle. Ed. Dar ezahran, Oman
- Ellaiah P., Adinarayana K., Sunitha M., Devi R.B., (2003).** Alpha amylase product by *Penicillium* sp. from some soil in India. *Lab: pharmaceutical biotech. Indian journal of microbiology*.43 (2), pp.135-137.
- 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).
- Espiard, E. (2002).** *Introduction à la transformation industrielle des fruits*. Paris: Techniques et documentation-Lavoisier.
- Estanove, P. (1990).** Note technique : Valorisation de la datte. In : Options méditerranéennes, série A, N°11. Systèmes agricoles oasiens. Ed. CIHEAM. pp 301-318.
- FAO., (2007).** Les bonnes pratiques d'hygiène dans la préparation et la vente des aliments de rue en Afrique: Outils pour la formation. Ed. Food & Agriculture Org, Italie. 175p.

Fedrick I.J., Aston J.W., Nottingham S.M., & Dulley J.R. (1986). The effect of a neutral fungal protease on cheddar cheese ripening. *New Zealand J. Dairy Sci Technol.* 21: 9-19.

Frazier W.C. (1967). Food microbiology. Academic presse. London. P. 3-429.

Fukumoto, J., T. Takarazuka" T. Yamamoto, Y. Amagasaki et D. Tsuru (1974). Process for producing detergent resisting alkaline protease. Brevet américain no. 3 838 009. 5 pages

Ganesh Kumar, C., Malik, R.K., Tiwari, M.P. (1998). Novel enzyme-based detergents : an Indian perspective. *Curr Sci (Bangalore)* 75: 1312-1318.

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

Guide pour l'interprétation d'une analyse de sol. Cours « Fertilisation des sols en agriculture bio » / Cégep de Victoriaville / Ghislain Jutras.

http://sis.agr.gc.ca/siscan/glossary/reaction_soil.html.

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

Guiraud J-P., et Rosec J-P., (2004). Pratique des normes en microbiologie alimentaire. AFNOR. p: 228-235.

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

Hainque B., Baudin B. et Lefebvre P. (2008). Appareils et méthodes en biochimie et biologie moléculaire. 34-46.

Hammer, E., Krowas, D., Schafer, A., Specht, M., Franche, W., & Schauer, F. (1998). Isolation and characterisation of a Dibenzofuran-Degrading Yeast : Identification of Oxidation and Ring Cleavage Products. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64, p: 2215-2219.

Hanachi, S., Khitri, D., Benkhalifa, A. et Brac DE Perriere, R.A., (1998), Inventaire variétal de la palmeraie algérienne 225 p.

Harrigan, W.F. (1998). Laboratory methods in food microbiology. Third Edition. Gulf Professional Publishing; 532 P.

Haussner, K., Hilgendor, P., Hofbauer, C., Demeester, J. & Lauwers, A. (1996). New international F.I.P. method for the determination of the activity of *Aspergillus oryzae* proteases. *Pharmazie*. 51 (12): 946-50.

Hencké S., (2000). Utilisation alimentaire des levures. Diplôme de Docteur: Pharmacie. NANCY I: Université HENRI POINCARÉ.188p.

Hencke Stéphanie (1975), Utilisation alimentaire des levures; UNIVERSITE Henri Poincaré - NANCY 1, p

Hugues, C. (2009). Etude des champignons de la forêt dense humide consommés par les populations du nord du Gabon. Thèse Doctrat. Université d'Ouagadougou Burkina-Faso .46p

Ibrahim, M.A., & Khallil, H.N.M. (1997). Le palmier dattier protection et production. Ed Iskandaria : 432 – 627.

Khalil, K.E., Abd-El-Bari, M.S., Hafiz, N.E., & Ahmed, E.Y. (2002). Production, evaluation and utilization of date syrup Concentrate (Dibis). *Egypt. J. Food Sci*, 30(2): 179-203.

Kemassi, H. (2015). *Essai de production de levure alimentaire cultivée sur moût de dattes de faible valeur marchande*. Mémoire de master en biotechnologie végétale, université Kasdi Merbah, Ouaregla.

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.

Kreger van, N. J. (1984). *The yeast, a Taxonomic Study* (Ed: 3). Amsterdam: Cletus P. Kurtzman et Jack W. Fell.

Kumar, C.G., & Takagi, H.(1999). Microbial alkaline proteases: From a bioindustrial viewpoint. *Biotechnology Advances* 17: 561-594.

Labrecque, M. H. (2003). *Étude de la capacité de deux souches de levures à dégrader le xylène*. Mémoire de maîtresses sciences, université Laval.

Lammi S., (2011). Recherche de substances à activités antimicrobiennes (antibactériennes et anticandidoses) produites par des souches levuriennes isolées des sols sahariens. Département de Biochimie et de Microbiologie. Université Mentouri. Thèse de Magistère, Constantine. 91p.

Larpent, J. P. (1990). *Biotechnologie des levures*. Paris: Edition Masson.

Larpent I-P., Larpent-Gourgaud M. (1991)Mémento technique de microbiologie - 3ème éditionEd. Tec & Doc, 1997,-1039p.

Larpent, L. P. et Larpent-Gourgaud, M. (1997). *Mémento technique de microbiologie*, 8ème éd. Paris: Edition Techniques et documentation-Lavoisier.

Lazim H., Mankai H., Slama N., Barkallah I., Limam F., 2009. Production and optimization of thermophilic alkaline protease in solid-state fermentation by *Streptomyces* sp. CN902. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 36; 531–537

Leclerc H., (1975). Microbiologie générale, doin éditeurs, Paris. p : 28

Leclerc H., Meyer A. et Deiana J., 1995. Cours de microbiologie générale. Nouveau programme. Biosciences et Techniques. Doin éditeurs, Paris, pp.73-92.

Leveau J.Y. et Bouix M., 1993. Les moisissures. In : Florent J. Ed. Microbiologie industrielle. Les micro-organismes d'intérêt industriel. Edition Tec et Doc .Lavoisier .Apria, pp.110-170.

Lodder, J. (1971). *The yeasts, a taxonomic study*, 2ème Ed. North Holland, Amsterdam: Londres.Soccol C-R., Marin B. et Raimbault M., 1994. Breeding and growth of *Rhizopus* in raw cassava by solide state fermentation. *App. Microbiol. Biotechnol.* (41), pp.330-336.

Maatallah S., 1970. Contribution à la valorisation de la datte algérienne. Mémoire d'Ingénieur. Institut National d'Agronomie. El-Harrach, 77 p.
McKane, L. et J. Kandel (1996). *Miuobiologt: essentials and qplications*. McGraw-Hill" New-Yorlq NY, Etats-Unis, 843 pages.

Mala, B.R., Aparna, M.T., Mohini, S.G., Vasanti, V.D. (1998). Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiol Mol Biol Rev.* 62: 597-635.

Mamo, G. and Gessesse, A. (1999). Purification and characterization of two raw-starch-digesting thermostable α -amylase from a thermophilic *Bacillus*. *Enzyme and Microbial Technology*, 25.

Mansouri, A., Guendez E., Kokkalou E., & Kefalas P. (2005). Phenolic profile and antioxidant activity of Algerian ripe date palm (*Phoenix dactylifera*). *Food.Chem.*89:411-420.

Mathieu, D. (2005). Etude de la production des protéases alcalines par *Bacillus licheniformis* en utilisant des boues d'épuration municipales comme substrat. Mémoire de Métrise. INRS-Eau Université du Québec, Canada.

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

Marlene C., (2006). Etudes physiologiques de l'adaptation et de la résistance de la levure *Saccharomyces cerevisiae* au cours de la production intensive d'éthanol. Thèse doctorat Microbiologie et Biocatalyse industrielles. Toulouse. INSA.265P.

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.

Meunier, N. (1999). Évaluation du potentiel de production de protéases bactériennes à partir des boues d'épuration municipales. Mémoire de maîtrise. INRS-Eau, Université du Québec, Canada. 168 pages.

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.

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.

Mohand Mouloud B., (1994). Relation entre la structure des polymères pariétaux et la floculation des levures *KLUYVEROMYCES LACTIC*. Thèse doctorat science naturelles .université Henri Pointcarré.448p.

Moodie, P. (2001). Traditional baking enzymes-proteases. Enzyme Development Corporation. 212 :736-1580.

Morvan, J. (2010). Marché européen des enzymes dans les applications alimentaires. M55B. <http://www.frost.com>.

Mukherjee, A. K., Adhikari H., & Rai S.K. (2008). Production of alkaline protease by a thermophilic *Bacillus subtilis* under solid-state fermentation (SSF) condition using Imperata cylindrical grass and potato peel as low-cost medium: characterization and application of enzyme in detergent formulation. *Biochemical Engineering Journal*, 39: 353-361.

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, Ed. maisonneuve, Paris, 221 p.

Nam Sun Wang., (2001). Fungal Biotechnology in Agricultural Food, and Environmental application. Edited by Dilip K. raror .

Nouani A., Dako E., Morsli A., Belhamiche N., Belbarouet S., Bellal M. M. and Dadie A. (2009). Characterization of the purified coagulant extracts derived from artichoke flowers (*Cynara scolymus*) and from the fig tree latex (*Ficus carica*) in light of their use in the manufacture of traditional cheeses in Algeria. *Journal of Food Technology*, 7 (1): 20-29

Noui Y., (2001). L'optimisation de la production de la biomasse *Saccharomyces cerevisiae* cultivée sur un extrait de datte. Mémoire d'Ingénieur. Institut d'Agronomie. Université de Batna, 62 p.

Oteng-Gyang, K. (1984). *Introduction à la microbiologie alimentaire dans les pays chauds*. Paris: Technique & Documentation Lavoisier.

Ould el hadj M. D., Bitour Z., Siboukeur O., 2006- etude de la production de levure boulangere (*saccharomyces cerevisiae*) cultivee sur mout de rebuts de dattes. courrier du savoir. n°07: 13-18.

Pedersen H and Nielmsen J. (2000). The influence of the nitrogen source on the α -amylase productivity of *Aspergillus oryzae* in contiuous cultures . *Appl Microbiol. Biothechnol.* 53, p: 278-281.

Pelmont J., (1995). Enzymes : catalyseurs du monde vivant. Presse Universitaire de Grenoble. pp. 7; 621; 652–654.

Penasse, L. (1974). Les enzymes cinétiques et mécanisme d'action. Masson. Paris. P. 58-86.

Peppler, H. J., & Perlman, D. (1979). Microbial technology. Academic press. San Francisco. P.42-60.

Phaff, H. G., Miller, M. W and Mrak, E. K. (1968). *The life of yeasts*. Harvard University Cambridge, Massachsetts.

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.

Pochon, J.,Tardieux, P. (1962). Techniques d'analyse en microbiologie du sol. Edition la tourelle. St. Mandé. 110 - 111.

Pol D., (1996). Travaux pratiques de biologie des levures. Guide de laboratoire.

Preetha S. and Boopathy R. (1997). Purification and characterization of a milk clotting protease from *Rhizomucor miehei*, *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 13: 573- 578.

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.

Purves WK, Orians GH et Heller HC (1994). Le monde vivant. Traité de biologie. Sciences/ Flammarion. 1224p

- Rao, M. B., Tanksale, A. M., Ghatge, M.S., & Deshpande, V.V. (1998).** Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62 (3): 597-653.
- Refice, Z., Abdelkrim, S. et Messaoudi, S. (2011).** *Optimisation d'un milieu de culture à base de datte pour la production de levure boulangère «Saccharomyces cerevisiae» et le dénombrement de la flore fongique.* Diplôme d'Ingénieur en Contrôle de qualité et analyses, université Mohamed Khider, Biskra.
- 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.
- Richard, R. (1972).** *Eléments de biologie végétale.* Paris: Edition Touchet.
- Robert, D., & Vian, B. (2004).** *Element de biologie cellulaire.* Doin Ed3. PP 33-69.
- Sandhya, C., Sumantha, A., Szakacs, G., Pandey, A. (2005).** Comparative evaluation of neutral protease production by *Aspergillus oryzae* in submerged and solid-state fermentation. *Proc. Biochem.*, 40; 2689–2694.
- 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).
- Scherr G.H. & Weaver R.H. (1953).** The dimorphism phenomenon in yeasts. *Bact Rev*, 17: 51- 92.
- Scriban R. (1993).** *Biotechnologie.* 4ème édition. Technique et Documentation Lavoisier, Paris. P: 40.
- Scriban, R. (1984).** *Biotechnologies*, 2^{ème} édition. Paris: Techniques et documentation-Lavoisier
- Siala R., Sellami-Kamoun A., Hajji M., Abid I., Gharsallah N. and Nasri M. (2009).** Extracellular acid protease from *Aspergillus niger* I1: purification and characterization. *African Journal of Biotechnology*, 8 (18): 4582-4589.
- Siboukeur, O. (1997).** *Qualité nutritionnelle, hygiénique et organoleptique du jus de dattes.* Thèse de magistère, INA, El Harrach, Alger.

- 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>
- Simon P. ET Meunier R., (1970).** Microbiologie industrielle et génie biochimique. Masson ET Cie, Editeurs. Paris Vie : 31-47, 385-411.
- Soccol, C. R., Marin, B. and Raimbault, M. (1994).** Breeding and growth of *Rhizopus* in raw cassava by solid state fermentation. *Applied Microbiology Biotechnology*, (41), 330-336.
- Soltani H., (2007).** Etude comparative de la composition biochimique de trois types d'extrait de dattes: Datte molle "Ghars", Demi-molle "Deglet-Nour" et Sèche "MecDegla". Mémoire d'Ingénieur. Département d'Agronomie. Batna, 57 p.
- Sumantha, A., Deepa, P., Sandhya, C., Szakacs, G., Soccol, C.R., & Pandey, A. (2006).** Rice bran as a substrate for proteolytic enzyme production. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 49 (5): 843-851.
- The technic file de Spectra Pors** Standard Grade Regenerated Cellulose Dialysis Membrane (Spectra/Por® 1 - 5, 6 & 7) , spectrumlabs.com product instruction manual , 420-10116-000 Rev.11 .
- Tibor Deak., (2007).** Handbook of food spoilage yeasts. 2nd Ed. DNLM. New York. 350P.
- Tsuyoshi, N., Fudou, R., Yamanaka, S., Kozaki, M., Tamang, N., Thapa, S., & Tamang J.P. (2004).** Identification of yeast strains isolated from marcha in Sikkim, a microbial starter for amylolytic fermentation. *International Journal of Food Microbiology*. 99. p: 135-146.
- Uhlig H., (1998).** Industrial Enzymes and Their Applications. Ph.D, Translated and Updated by Elfride M. Linsmaier-Bednar, Ph.D. John. Wiley & Sons, Inc ed., 158 p.
- UI-Haq, I., Roheena, A., Ashraf, H., & Shah, A.H. (2002).** Isolation and Screening of Fungi for the biosynthesis of Alpha Amylase. *Biothechnology*, 1 (2-4), p: 61-66.

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.

Vishwanatha, K. S., Appu, Rao A. G., & Singh, S. A. (2009). Characterization of acid protease expressed from *Aspergillus oryzae* MTCC 5341. *Food Chemistry*, 114: 402-407

Viccaro, J.P. (1973). Allaline protease, methde for its prùrction, and detergent composition Brevet américain.3 748233.5 pages.

Vishniac H.S and Hempfling W.P.(1979). *Journal of General Microbiology* .p: 112:301.

Waldron K., (2010). bioalcohol production: biochemical conversion of lignocellulosic biomass. woodhead publishing limited and CRC press LLC, cornwall. 467p.

Walker G. M. & White N. A. (2005). Introduction to Fungal Physiology. *In* «Kavanagh K., *Fungi: Biology and applications*, John Wiley & Sons Ltd., Chichester, 267 p.»

Walker G.M .,Wiley J and Chihhster S.(1997).Yeast Physiology and Biotechnology.

Yahiaoui, K. (1998). Caractérisation physico-chimique et évolution du brunissement de la datte « D-N » au cours de la maturation. Mémoire de Magister. I.N.A. El-Harrach. Alger.66p.

Zoubiri, L. (2012). *Production d'alpha amylase par des moisissures cultivées sur milieu à base de rebuts de dattes.* Thèse magister en Biotechnologie alimentaire, universite Mentouri, Constantine.

Annexes

Annexe 01: Milieux de culture

1. Potato dextrose agar (PDA) (Guiraud, 1998)

Compositions

- Pomme de terre200 g
- Glucose20 g
- Agar20 g
- Eau distillée.....1000 ml

Protocole

- ✓ mesuré par d'un balance du marque KERN, 200 g de la pomme de terre lavées .
- ✓ Couper en cubes dans 500 ml d'eau distillée.
- ✓ Utilisé le plaque chauffant du marque LABTECH, pour se réchauffe d'échantillon pendant 30 à 45 min.
- ✓ Écraser la pomme de terre, filtrer par papier de filtre pour obtenue le filtrat.
- ✓ D'autre part faire fondre 20 g de l'agar dans 500 ml d'eau distillée.
- ✓ Ajouter le filtrat à la solution d'agar , puis ajouter 20 g de glucose..
- ✓ Compléter le volume à 1000 ml dans l'erlenmeyer .
- ✓ Stériliser par d'autoclavage de la marque TIMO PRINT à 120° C pendant 20 min.

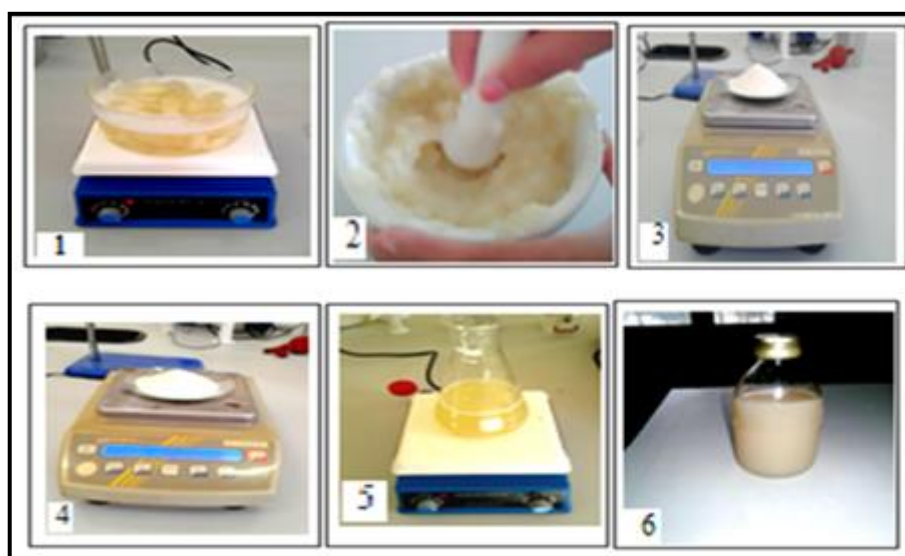


Figure 15: les étapes de préparation de milieu PDA

2. Milieu de lait gélosé

Compositions

- ❖ Poudre de lait..... 5g
- ❖ Agar 5g
- ❖ Eau distillée 100 ml

Protocole

- ✓ Mesuré par d'un balance du marque KERN , 5g poudre de lait et nous versons dans l'erlenmeyer avec 50 ml d'eau distillée .
- ✓ Ajouter de 5g d'agar .
- ✓ Compléter le volume jusqu'a 100 ml d' eau distillée .
- ✓ Porter sur agitateur magnétique chauffant du marque UVB , pour l'ébullition pendant 30 à 45 min.
- ✓ Puis stérilisé le milieu de lait gélosé par l'autoclave du marque TIMO PRINT à 120°C pendant 30 minutes .
- ✓ couler dans des boites de pétrie pour l'expérience .



Figure 16: le milieu de lait gélosé qui préparé

3. Milieu Eau de levure 0.5 %

Préparation de milieu d'eau de levure 0.5 %

- ❖ 5 g d'extrait de levure.
- ❖ 1000 ml d'eau distillé.

Protocole

- Mesuré par d'un balance du marque KERN , 5g d'extrait de levure.
- Nous versions dans l'erlenmeyer , 5g d'extrait de levure avec 1000 ml d'eau distillé.
- Ajuster le pH à 5.0 par de pH mètre du marque INOLAB
- Stériliser par d'autoclavage du marque TIMO PRINT à 120 °C pendant 15 min.

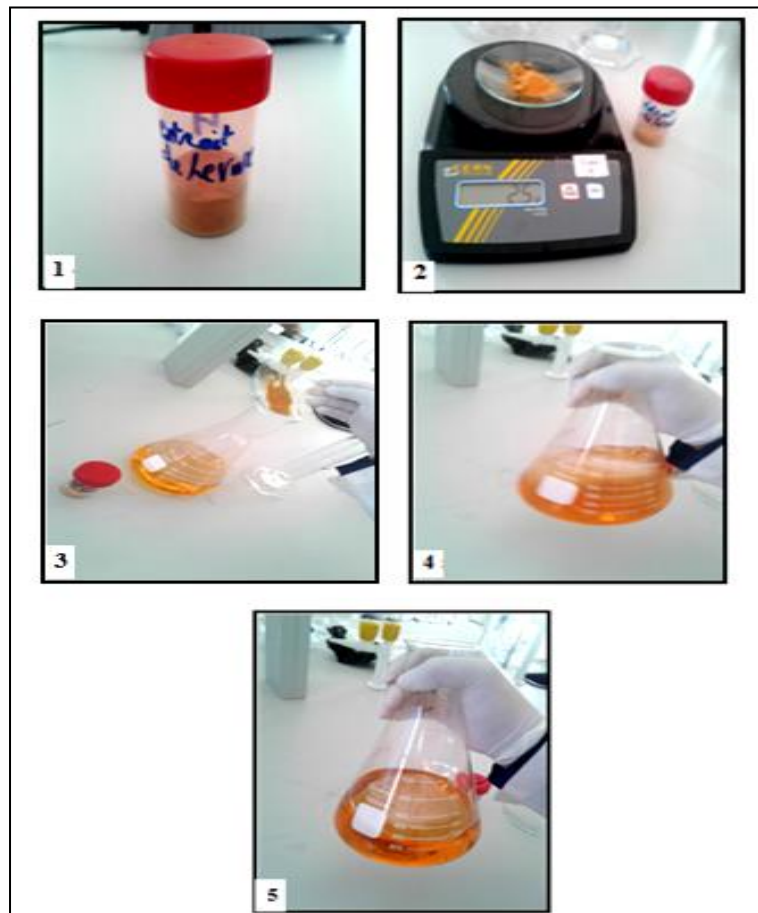


Figure 17: les étapes de préparation de milieu d'eau de levure 0.5 %

Annexe 02: Identification phénotypique des souches

pour l'identification phénotypique des souches levuriennes , dans le tableau suivant il existe 02 types des études des caractères microscopiques et biochimiques et physiologique .

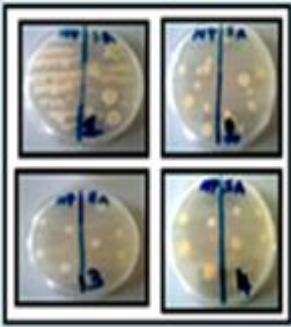
1. d'étude des caractères microscopiques

- Morphologie cellulaire et mode de multiplication végétative.
- Test de filamentation

2. d'étude des caractères biochimiques et physiologique

- Test de fermentation des sucres sur milieu d'eau de levure 0.5 %.
- Test d'assimilation des composés azotés.

Tableau 15: les types des études des caractères microscopiques et biochimiques et physiologique.

étude des caractères microscopiques		étude des caractères biochimiques et physiologique	
Morphologie cellulaire et mode de multiplication végétative	Test de filamentation	Test de fermentation des sucres sur milieu d'eau de levure 0.5 %.	Test d'assimilation des composés azotés
			

Annexe 03 : Détermination des caractères physicochimique

1. Détermination d'humidité (Audigie et *al.*, 1984)

Compositions

- de dattes10 g.

Protocole

- ❖ Mesure de capsule vide par d'un balance du marque KREN .
- ❖ Mesure la masse d'échantillon de datte avant de placée à l'intérieur d'étuve .
- ❖ Nous entrons dans l'échantillon de datte dans l'étuve du marque MEMMERT réglée à 105°C pendant 2 h jusqu'a 5 h.
- ❖ Puis mesure la masse séché d'échantillon de datte après 5h par balance du marque KREN , pour détermination l'humidité .

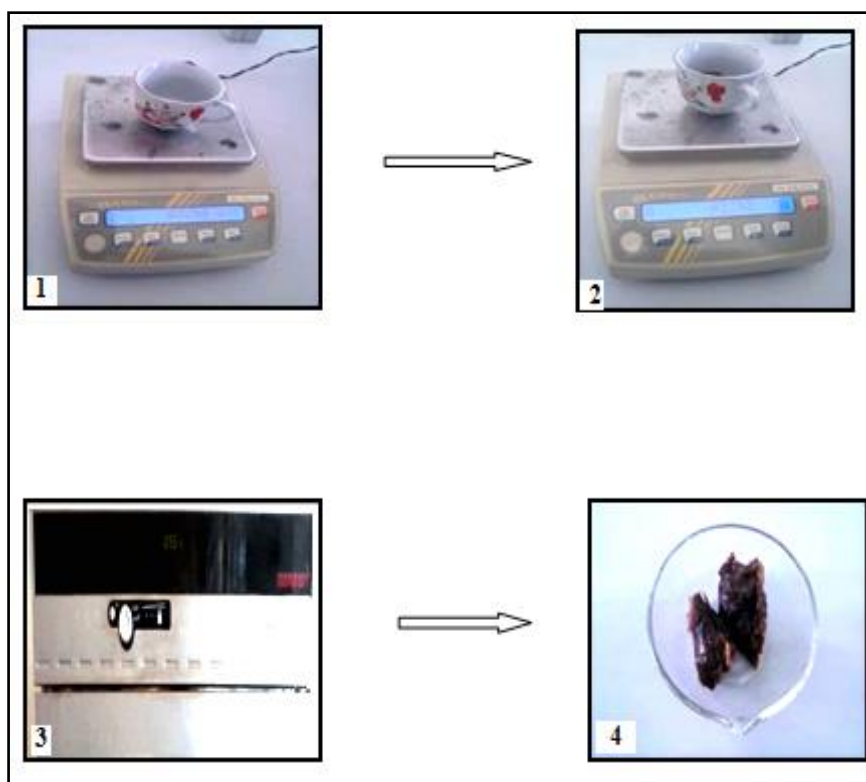


Figure 18: les étapes de la détermination l'humidité de datte

2. Détermination du taux de cendres (Audigié et *al.*, 1984)

➤ De datte10 g .

Protocole

- ✓ Les cendres sont déterminées par incinération.
- ✓ La prise d'essai ayant servi à la détermination de la matière sèche à 105°C pendant 2 à 5h.
- ✓ Suivie par une calcination au four à moufle du marque NABERTHERM à 550°C pendant 5h.
- ✓ Mesuré la masse d'échantillon par d'un balance analytique du marque AS 220 R2 RADWG .
- ✓ Les cendres exprimées en pourcentage de masse sont données par la formule

$$C\% = (M0 - M1 / M2 - M1) \times 100(\%)$$

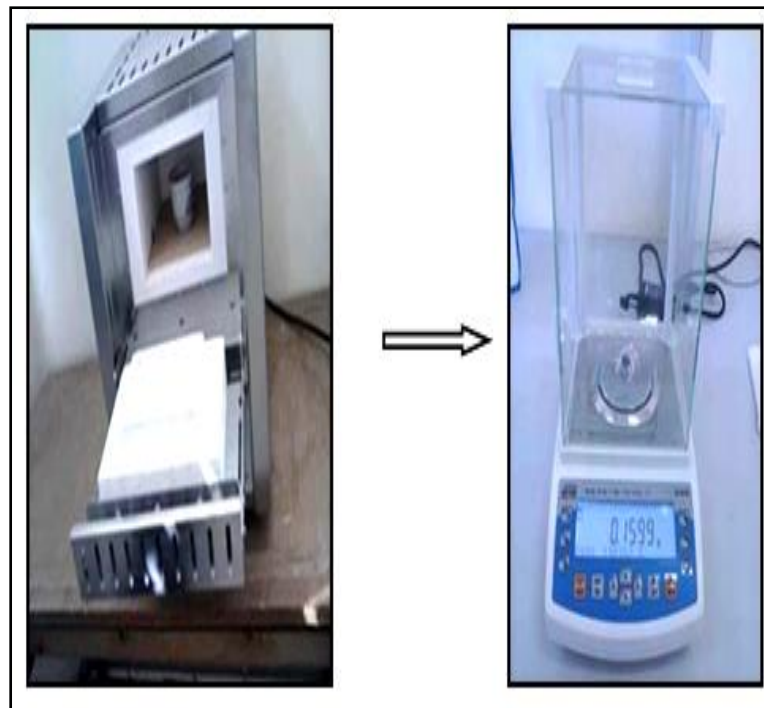


Figure 19: la détermination du taux de cendres de datte

3.L'acidité titrable (NF V 05-101 du janvier 1974)

Protocole

- ✓ Prélever 25 ml du jus et les verser dans une fiole jaugée de 250 ml.
- ✓ Compléter jusqu'au trait de jauge avec de l'eau distillée puis agiter (dilution).
- ✓ Prélever un volume $V = 25 \text{ mL}$ de la solution préparée.
- ✓ Puis ajouter 0,25 à 0,5 ml de phénophtaléine.
- ✓ Doser cette solution à l'aide d'une solution de soude de concentration 0,1 et repérer le volume équivalent au moment du virage de l'indicateur coloré. (Coloration rose).
- ✓ L'acidité titrable, exprimée en milliéquivalent, pour 100 g de datte est obtenue en tenant compte de la dilution opérée par la formule suivante:

$$\text{Acidité titrable} = 100 \times V1 / V0$$

- **V0** : le volume, en millilitre, de la prise d'essai.
- **V1** : le volume, en millilitre, de la solution d'hydroxyde de sodium 0,1N utilisée.

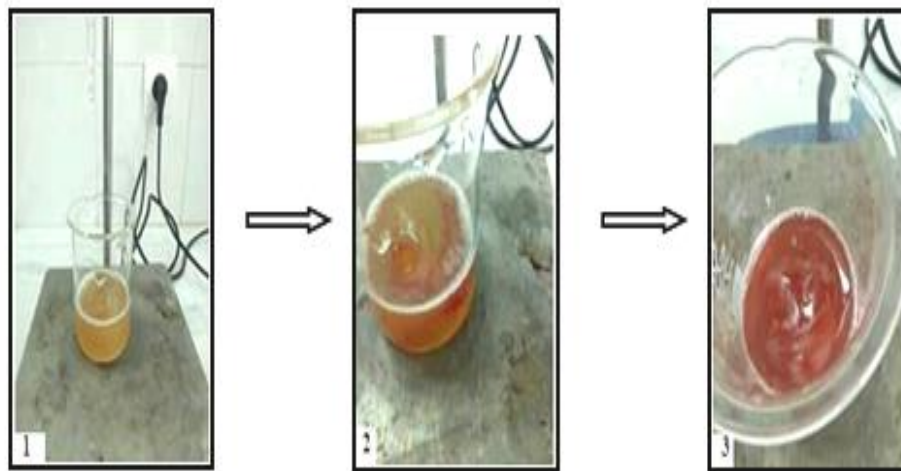


Figure 20: les étapes de la détermination l'acidité titrable de datte par l'utilisation d'agitateur magnétique

Annexe 04 : Détermination cinétique de production enzymatique des souches sélectionnées

1. Détermination de pH

Composition

- milieu de base constitue de microorganisme .



Figure 21: mesuré le pH de l'extrait enzymatique des souches sélectionnées par de pH mètre du marque CONSORT

2. Mesure de la biomasse (Pedersen & Nielsen , 2000)

Protocole expérimentale

Pour déterminé le poids sec de la biomasse suivez les étapes suivantes :

- ✓ Le poids sec de la biomasse est déterminé à la fin des fermentations , après centrifugation par l'utilisation de centrifugeuse du marque SIGMA en 3900 tours pendant 20 min .
- ✓ le surnagent est écarté mais, rinçage le culot avec 1 ml l'eau distillée.
- ✓ Dans l'étuve du marque MEMMERT , réglée à 105°C jusqu' à poids constant pendant 24 h .
- ✓ A la fin mesuré la biomasse à l' aide d'un balance analytique du marque AS 220 R2 RADWAG .

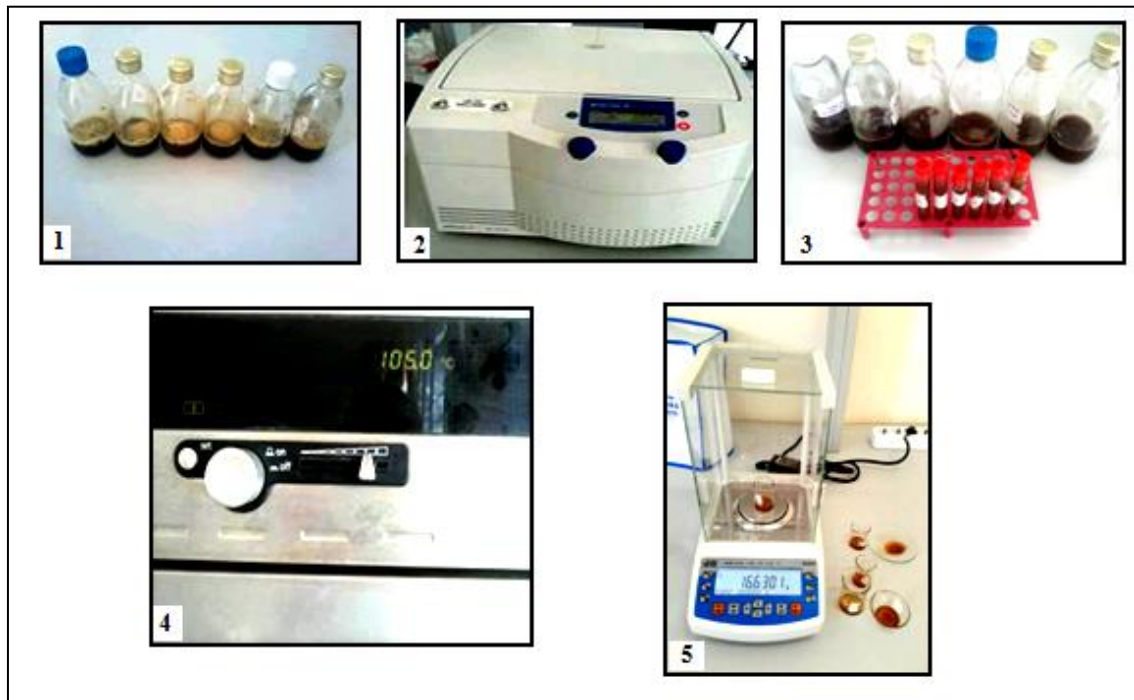


Figure 22: les étapes mesure de la biomasse par utilise le centrifugeuse à 3900 tours et l'étuve à 105 ° C

3. Dosage des sucres totaux (Dubois et *al.*, 1956)

Réactifs

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

Protocole expérimentale

- On ajoute 1 ml l'extrait enzymatique de datte avec 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 par le spectrophotomètre du marque UV MINI 1240 , 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 .

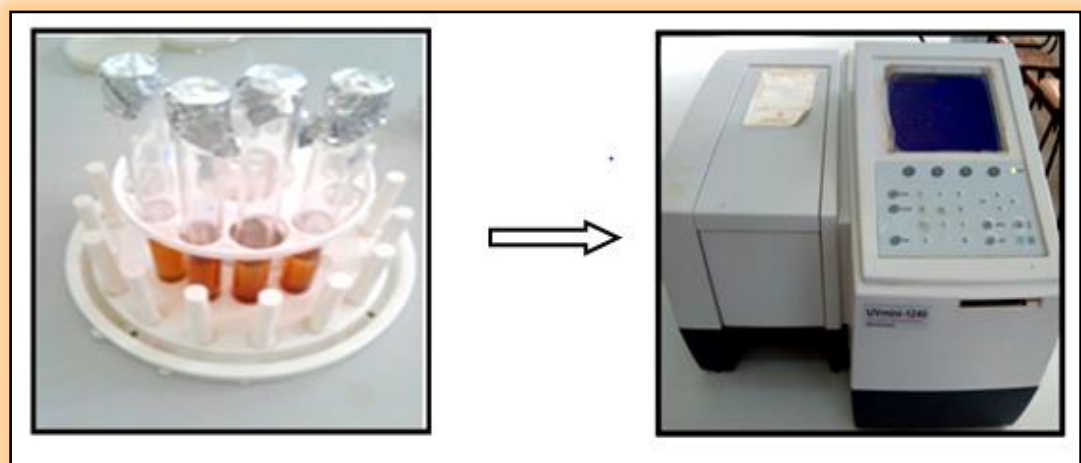


Figure 23: détermination le dosage des sucres totaux par le spectrophotomètre UV MINI 1240

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 complet le volume jusqu'à 1 l , par l'eau distillée.

Protocole expérimentale

- ✓ On ajoute 0.1 ml de l'extrait enzymatique avec 5 ml du bleu de coomassie.
- ✓ Le mélange est laissé à obscurité pendant 2 à 30 min à la température ambiante.
- ✓ Lecture par le spectrophotomètre du marque UV MINI 1240 l'absorbance est lue à 595 nm.

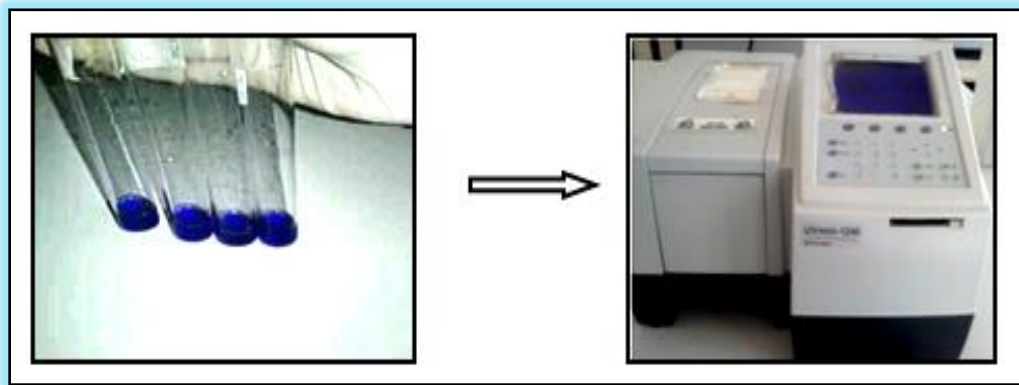


Figure 24: détermination de dosage des protéines par le spectrophotomètre UV MINI 1240

5. Préparation la solution tampon citrate de sodium (pH 5,2, 0,1 M)

Protocole

la solution tampon citrate de sodium (pH 5,2, 0,1 M) compose en 02 type des solutions (d'acide citrique / de citrate trisodique) .

Tableau 16: les étapes de préparation la solution tampon citrate de sodium

1. Solutions d'acide citrique	2. Solutions de citrate trisodique
Dans un fiole jaugée dissolvez : ✓ 4.803 g d'acide citrique ✓ 4.3815 g de chlorure de sodium ✓ 0.1 g d'acide de sodium Dans l'eau distillée et compète à 500 ml. 	Dans un fiole jaugée dissolvez : ✓ 7.3525 g de citrate de sodium ✓ 4.3815 g de chlorure de sodium ✓ 0.1g d'acide de sodium Dans l'eau distillée et compète à 500 ml. 
Ajuste le pH = 2.5 de la solution de citrate trisodique à pH 5.03 avec la solution d'acide citrique .   	

6. Dosage de l' activité protéolytique (Siboukeur et al ., 2005)

Réactifs

- ✓ la solution tampon citrate de sodium (pH 5,2, 0,1 M)

✓ TCA à 12%.

Protocole

La détermination de l'activité protéolytique de l'extrait enzymatique comporte cinq étapes :

- + Dilution des extraits enzymatique avec la solution tampon citrate de sodium (pH 5,2, 0,1 M) .
- + Hydrolyse enzymatique réalisée par l'incubation à 35°C pendant 60 min d'un volume de 1ml d'extrait dilué.
- + Blocage de la réaction enzymatique obtenu après 60 min par l'adition de 5 ml de TCA à 12%.
- + Mesure de la protéolyse effectuée après un repos de 15min à la température ambiante du surnageant.
- + Détermination de l'absorbance à 280 nm.

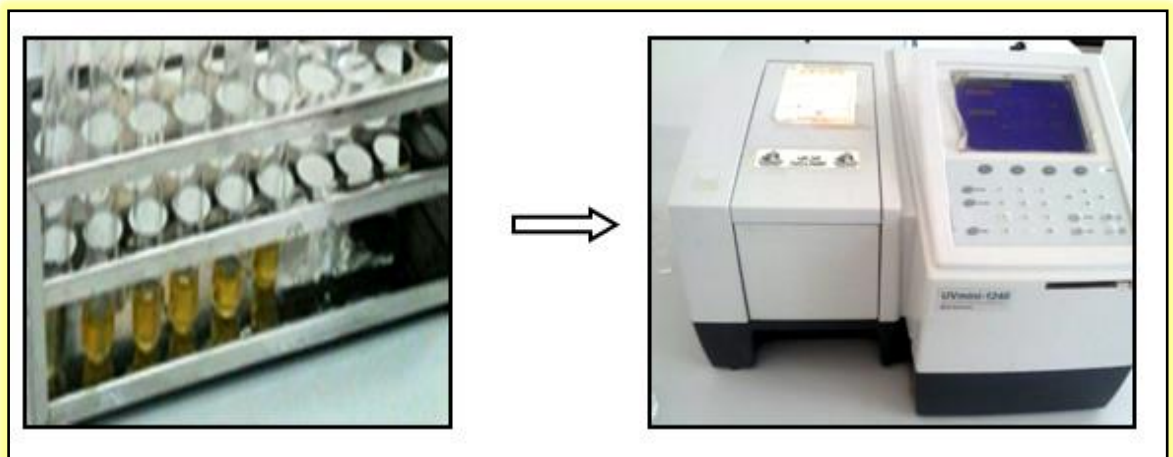


Figure 25: détermination la dosage de l'activité protéolytique par de spectrophotomètre UV MINI 1240

Annexe 05: Courbes d'étalonnages

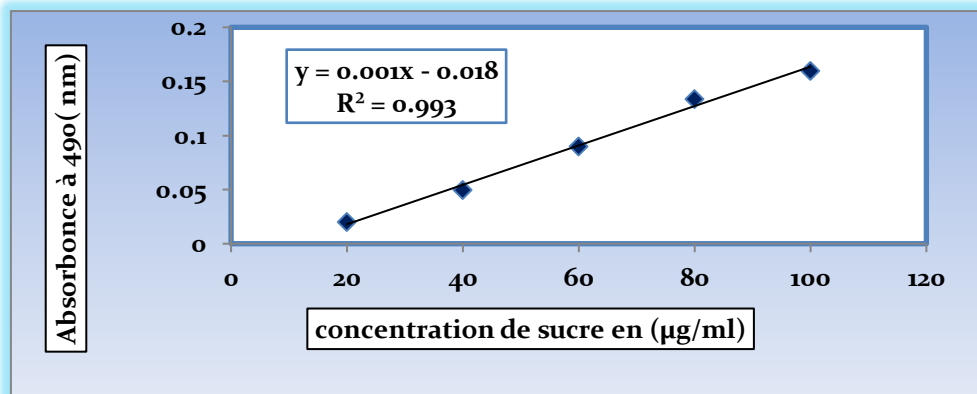


Figure 26: Courbe d'étalonnage de glucose (1µg/ml) pour le dosage de sucre

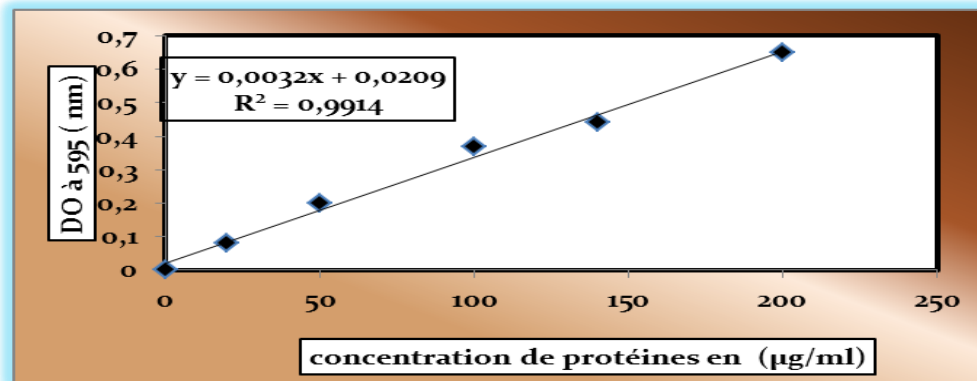


Figure 27: Courbe d'étalonnage utilisée (BSA 1µg/ml) pour le dosage des protéines

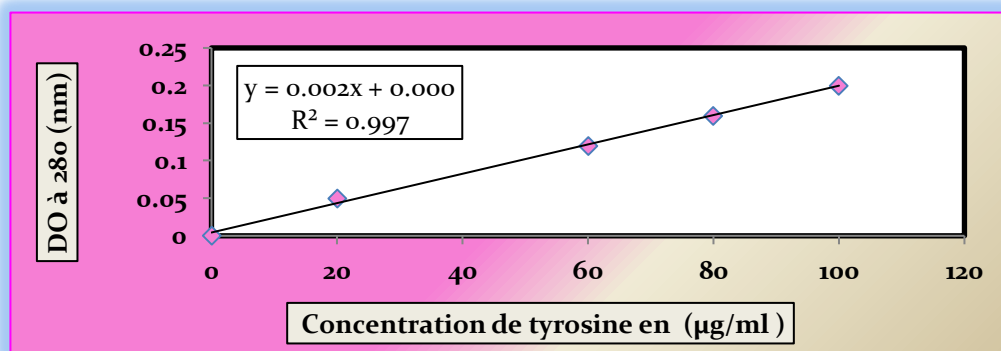
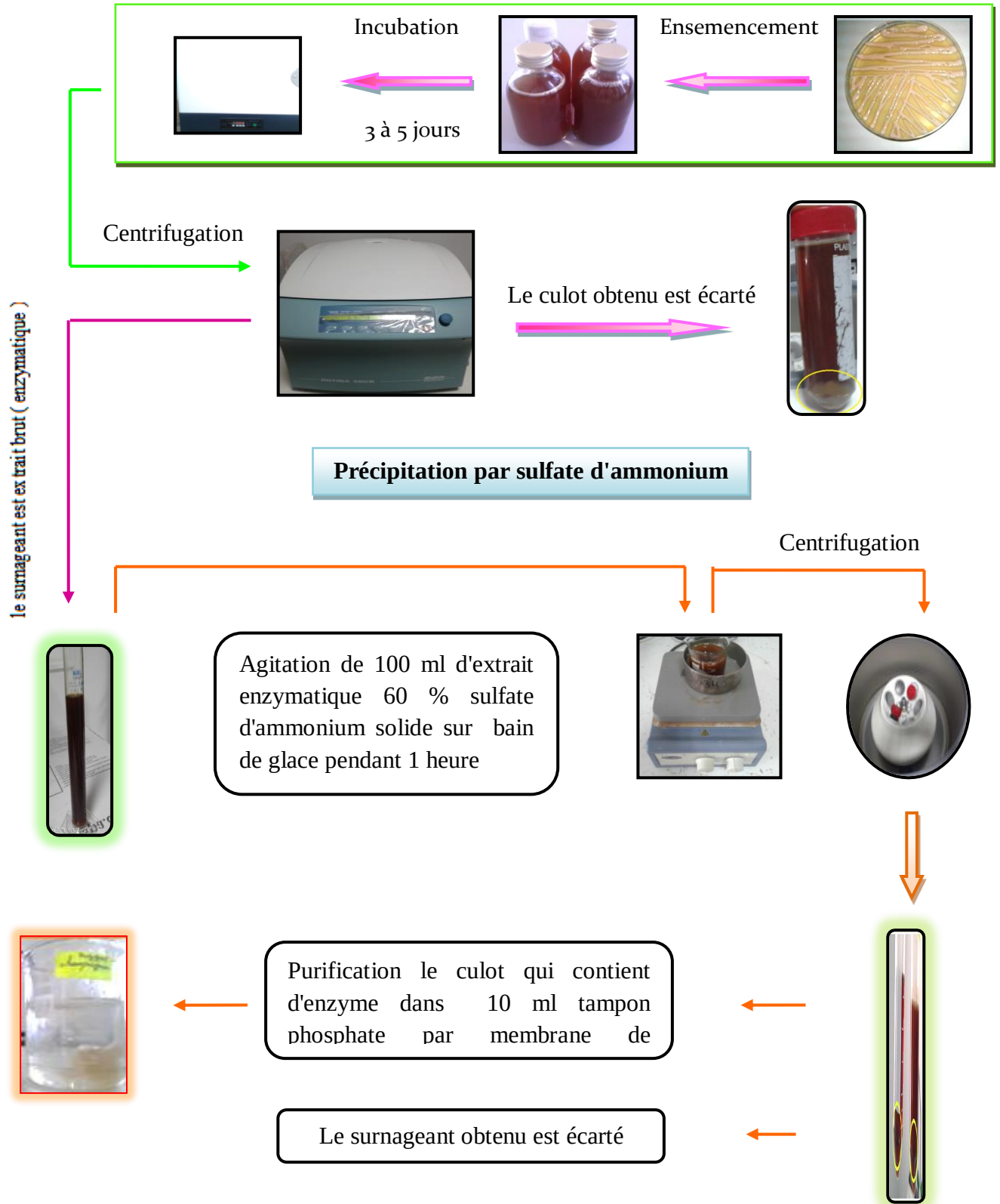


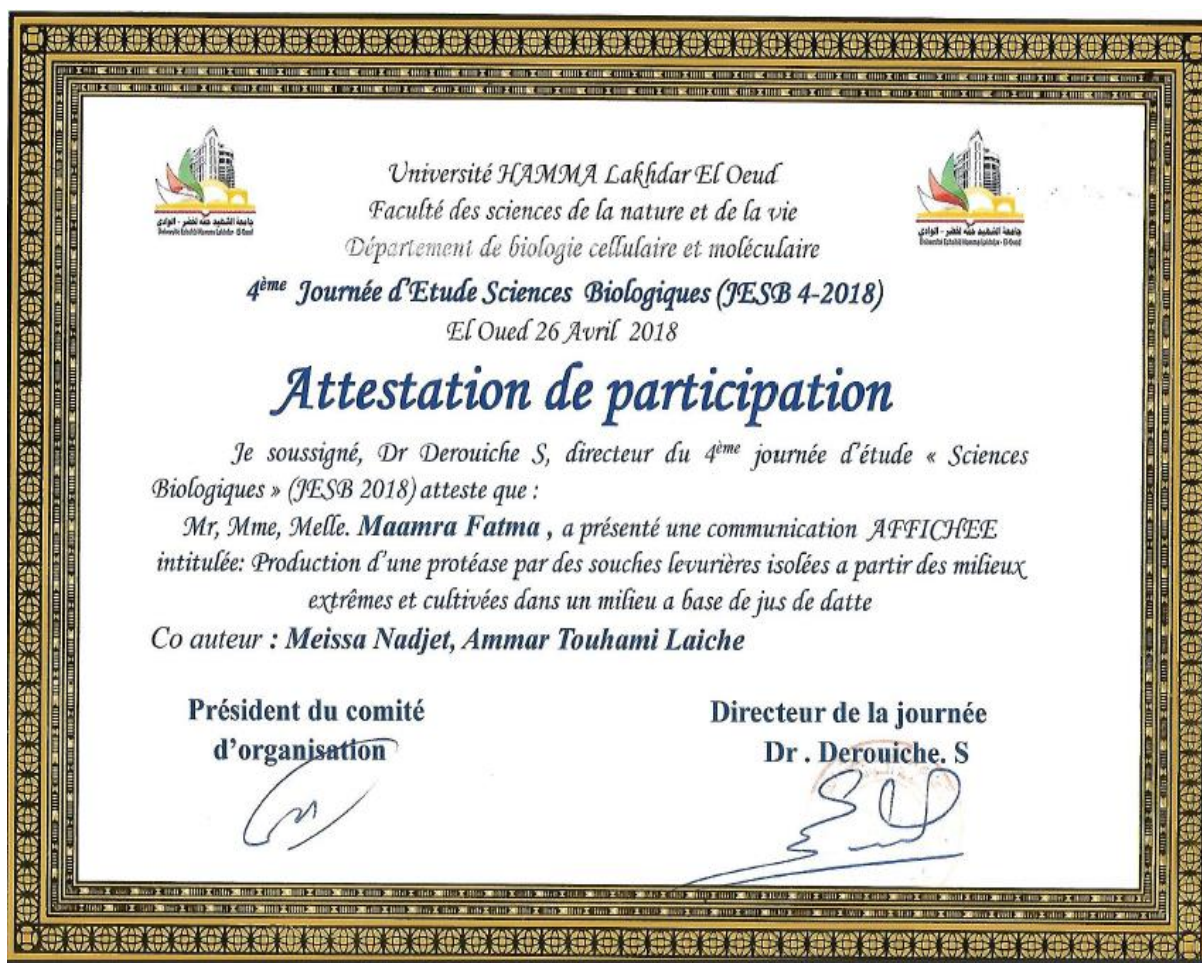
Figure 28: Courbe d'étalonnage utilisée de concentration de tyrosine (1µg/ml) pour d'activité enzymatique

Annexe 06: Purification de protéase

Préparation de l'extrait enzymatique



Annexes 7: Attestations de participation au 4^{ème} journée des sciences biologiques



Résumé

Le but d'étude est de produire et d'étudier les propriétés de l'enzyme protéase, produite par la levure isolée du sol du désert algérien d'El Oued (Chatte). Quatre types de levures ont été isolés, et ces espèces ont été sélectionnées en utilisant un milieu de traitement lait gélosé stérile, avec 5% de caséine. Lorsque les résultats obtenus ont montré que quatre souches de levure ont la capacité de produire une protéase pour cette substance .En étudiant les caractéristiques des phénotypes, il nous est apparu que les quatre types de souches de levure différentes: *Cryptococcus neoformans* pour souche 01, la souche 02 sont *Coccidioides Malbranchea* , que ce soit la souche 03 sont *Onychocola canadensis*, et la souche 04 *Neoscytalidium* . Après avoir procédé à des analyses physico-chimiques de jus dattes, obtenus par les résultats ont montré que le jus de dattes est très riche en sucres pourcentage estimé (70%), qu'il est approprié pour la culture de levure isolée à partir du sol, et est responsable de la production des caséines analyte de la protéase. On a également étudié la production de l'enzyme dans le centre d'un milieu liquide stérile, à l'intérieur d'un des flacons en verre stériles avec une capacité de 200 ml contenant chacun 50 ml du centre de l'implant, où (température 30 ° C et pH 5). Dans ces conditions, la masse des cellules produites à 38 g / l et l'activité enzymatique ont été estimées à 1700 unités, telles qu'obtenues au cinquième jour d'incubation.. En étudiant et en comparant de production de la protéase à des degrés divers, ont été sélectionnés souche 1 *Cryptococcus neoformans*, produisant une souche meilleure par rapport au des autres espèces.En fin de compte, les résultats obtenus ont montré par la purification de l'enzyme, en utilisant une centrifugeuse spéciale, pour séparer l'enzyme à partir des cellules de levure et le reste des composants de la centrale de l'implant, où la température de 4 ° et la rotation vitesse du cycle 9000 pendant 20 minutes, plus Dialyse technologie, que nous utilisons dans lequel une membrane spécifique du type de Spectra / Por® 3, pour séparer l'enzyme à partir des sels restants à la suite de l'utilisateur de sulfate d'ammonium au cours de l'expérience, de sorte que nous avons pu finalement et à travers ces techniques pour obtenir la protéase avec un caractère liquide du produit pure à 100% par la levure isolée de reproduction saharien algérien dans la Wilayat d'El Oued.

Mots-clés: protéase, levure, jus de dattes, purification, *Cryptococcus neoformans*, Spectra / Por® 3.

Abstract

The aim of the study is to produce and to study the properties of the protease enzyme, produced by the yeast isolated from the soil of the Algerian desert of El Oued (Chatt). Four types of yeasts were isolated, and these species were selected using sterile milk agar with 5% casein. When the results obtained showed that four yeast strains have the ability to produce a protease for this substance. By studying the characteristics of the phenotypes, it appeared to us that the four different types of yeast strains: *Cryptococcus neoformans* for strain 01, the strain 02 are *Coccidioides Malbranchea* , that it is the strain 03 are *Onychocola canadensis*, and the strain 04 *Neoscytalidium*. After conducting physicochemical analyzes of juice dates, obtained by the results showed that the dates juice is very rich in estimated percentage (70%) sugars, that it is suitable for the yeast culture isolated from the soil, and is responsible for producing casein analyte protease. The production of the enzyme in the center of a sterile liquid medium was also studied inside one of the sterile glass vials with a capacity of 200 ml, each containing 50 ml of the center of the implant, where (temperature 30 ° C and pH 5).(Under these conditions, the mass of the cells produced at 38 g / l and the enzymatic activity were estimated at 1700 units, as obtained at the fifth day of incubation. By studying and comparing production of the protease with various degrees, were selected strain 1 *Cryptococcus neoformans*, producing a better strain compared to the other species .In the end, the results obtained showed by the purification of the enzyme, using a special centrifuge, to separate the enzyme from the yeast cells and the rest of the components of the implant plant, where the 4 ° temperature and 9000 cycle speed rotation for 20 minutes, plus Dialysis technology, which we use in which a specific membrane type Spectra / Por® 3, to separate the enzyme from the remaining salts as a result of the ammonium sulphate user during the experiment, so that we could finally and through these techniques to obtain the protease with a liquid character of the 100% pure product by the isolated Algerian Saharan breeding yeast in the Wilayat d'El Oued.

Keywords: protease, yeast, date juice, purification, *Cryptococcus neoformans*, Spectra / Por® 3.