



N° d'ordre :

N° de série :

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE ECHAHID HAMMA LAKHDAR D'EL-OUED
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE CELLULAIRE ET
MOLECULAIRE

MEMOIRE DE FIN D'ETUDE

En vue de l'obtention du diplôme de Master Académique

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Biochimie Appliquée

THEME

**Contribution à l'étude de l'influence des paramètres
physico-chimiques sur l'activité amylolytiques des
levures**

Présenté par :

KHERRAZ Zineb et LORBI Sara

Soutenue le :30/05/2015 devant le jury composé de:

Président	Mr. HAMAD Brahim	MAA	Université d'El-Oued
Promoteur	Mr. LAICHE Ammar Touhami	MAA	Université d'El-Oued
Examinatrice	Mme TOUMI Ikram	MAA	Université d'El-Oued

Année universitaire 2014/2015



Remerciements

Nous tiens à remercier en premier lieu ALLAH, le tout Puissant de nous avoir donné courage, santé et patience pour achever ce travail.

Nos remerciements les plus sincères s'adressent à notre honorable encadreur Monsieur LAICHE AMMAR TOUHAMI (maitre assistant class A à l'université ECHAHID HAMMA LAKHDAR D'EL-OUED) qui a bien voulu diriger ce travail, pour ses conseils, sa compétence et sa gentillesse qui nous permis de bien mener ce travail.

*Monsieur HAMAD BRAHIM qui nous avons fait l'honneur de présider ce Jury ;
Madame TOUMI IKRAM pour l'honneur qu'elle nous avons fait en participant à ce Jury.*

Nos remerciements s'adressent également à tous les gens qui travaillent à la station INRAA de Sidi Mehdi-Touggourt, au Chef de laboratoire de technologies agro-alimentaires de l'INRAA Mademoiselle DJAFRI Kouthier pour leur générosité et grande gentillesse.

Nous remercions également les responsables de laboratoire VRS au département de Science Et Technologie dans notre université et spécialement monsieur TLIBA ALI et mademoiselle HAMMAMI Hadia pour avoir facilité le travail au laboratoire.

Nous associons à nos remerciements toute l'équipe du laboratoire de microbiologie et de biochimie

, tous nos enseignants qui nous accompagne tout au long de notre démarche.

Nous tenons à remercier spécialement Messieurs ALIA Zaid , DEROUICHE Samir , pour leurs aide précieuse de tous les jours.

Monsieur DAHMANI chef de laboratoire des analyses au niveau d'hôpital Ben Omor El Gilani D'el Oued, Monsieur à la pharmacie Ben Aicha à El Magran et Madame OUAHRANI OUAHIDA laborantine au CEM Ben Zaoui, Touggourt

Notre reconnaissance et nos grand respect s'adressent à la source de bonheur «nos parents» qui nos soutenue avec patience et prouvé leur confiance. Nous leur exprime notre éternelle gratitude.

Enfin, un grand merci à tous qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Résumé

Ce travail s'intéresse à la production d' α -amylase par des levures isolées des sols et eaux salées, et cultivées sur des milieux à base de lactosérum. Pour cela des prélèvements ont été effectués au niveau de 2 sites différents ; Lac de Tindla et El Chott situés dans la wilaya d'El Oued.

La première partie de l'étude consiste à purifier les souches fongiques ayant une activité amylolytique. Après isolement et purification sur milieux Sabouraud et PDA, nous avons obtenu **16** souches dont **8** possèdent une activité amylasique. Parmi ces dernières, **4** souches (**TEB**, **TSB**, **SSB** et **SEB**) ont été sélectionnées pour la fermentation selon les zones d'hydrolyse sur milieu PDA (1% amidon).

Le milieu de fermentation a été préparé à base de lactosérum camelin, bovin et caprin. L'analyse de ces derniers a montré leurs richesses en sucres (autour de **40 g/l**), en sels minéraux (**10g/L**) et la faible teneur en protéines (environ **1,5 g/L**).

L'étude cinétique de la production de l' α -amylase sur ces milieux, montre que les souches assurent le pH optimum pour la production de l'enzyme en abaissant le pH de milieu au **pH =4**, alors que les profils de biomasse s'évaluent pour atteindre des valeurs élevées (maximum de **21g/L** par **TEB**) à la fin de fermentation.

L'optimisation de la production nous a permis de considérer que la souche **SSB** comme la plus performante par rapport à sa production d' α -amylase (**771U**), après **72 heures** de fermentation dans le lactosérum camelin, ainsi que le lactosérum caprin comme milieu optimal pour la production de l'enzyme par les souches sélectionnées en assurant une activité amylasique autour de **600U**.

Mots clés : L' α -amylase, Levures amylolytiques, Lactosérum, Fermentation, Optimisation.

SOMMAIRE

Sommaire

Introduction	
PREMIÈRE PARTIE : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE	
CHAPITRE I: LES LEVURES	06
I.1. Historique	06
I.2. Définition	06
I.3. Habitats	06
I.4. Caractères des levures	06
I.5. Morphologie et structure	07
I.6. Reproduction	07
I.7. Classification	09
I.7.1. Levures Ascomycètes (<i>Hémiasco mycètes</i>)	09
I.7.2. Levures Basidiomycètes	09
I.7.3. Levures Deutéromycètes ou <i>Fungi imperfecti</i> (sans sexualité)	09
I.8. Physiologie et croissance	10
I.8.1. Besoin nutritif	10
I.8.1.1. Sources de carbone	10
I.8.1.2. Oligoéléments et facteurs de croissance	11
I.8.2. Conditions de croissance physico-chimique	11
I.8.2.1. Température	11
I.8.2.2. pH	11
I.8.2.3. Aération	12
I.8.2.4. Pression osmotique et l'activité d'eau	12
I.8.3. Métabolisme	12
I.9. Intérêt industrielles	13
I.9.1. Panification	13
I.9.2. Affinage des fromages	13
I.9.3. Production des protéines	13
I.9.4. Autres utilisations	13
CHAPITRE II : L'α-AMYLASE	16
II.1. Introduction	16
II.2. Définition	16
II.3. Nomenclature	16

II.4. Structure	16
II.5. Différentes origines	17
II.6. Mode d'action	17
II.7. Régulation de la synthèse de l'α-amylase	18
II.8. Les applications de l'α- amylase	18
II.8.1. Utilisation des α- amylases dans les industries Agro-alimentaires	18
II.8.2. Autres applications des α- amylases	19
II.9. L'α-amylase d'origine levurienne	20
CHAPITRE III : LE LACTOSERUM	22
III.1. Généralités sur le lactosérum	22
III.2. Définition du lactosérum	22
III.3. Différents types de lactosérum	22
III.4. Sources industrielles du lactosérum	23
III.5. Caractéristiques et composition biochimique du lactosérum	23
III.5.1. Protéines de lactosérum	25
III.6. Intérêts du lactosérum	26
III.6.1. Intérêt alimentaire du lactosérum	26
III.6.2. Usage Biotechnologique de lactosérum	27
III.7. La valorisation des constituants de lactosérum	27
III.8. Lactosérum et pollution de l'environnement	28
DEUXIEME PARTIE : PARTIE PRATIQUE	
CHAPITRE I : MATERIELS ET METHODES	31
I.1. Matériel biologique	31
I.1.1. Sol et eau	31
I.1.1.1. Présentation des sites de prélèvement	31
I.1.1.2. Prélèvement des échantillons de sol et d'eau	32
I.1.1.2.1. Sol	32
I.1.1.2.2. Eau	32
I.1.1.3. Dosage des paramètres physicochimiques et biochimiques	32
I.1.1.3.1. Analyses du sol	32
I.1.1.3.1.1. Mesure de pH	32
I.1.1.3.1.2. l'humidité	32
I.1.1.3.1.3. Détermination du taux des cendres	32

I.1.1.3.1.4. Mesure de la conductivité électrique	33
I.1.1.3.1.5. Mesure d'azote	33
I.1.1.3.2. Analyses des eaux	33
I.1.1.3.2.1. Mesure de pH	33
I.1.1.3.2.2. Mesure de la conductivité électrique	33
I.1.1.3.2.3. Détermination du taux des cendres	33
I.1.1.3.2.4. Mesure d'azote	33
I.1.1.4. Méthodes d'isolement et d'ensemencement	33
I.1.1.4.1. Isolement et purification	34
I.1.1.4.2. Sélection des souches amylolytiques	34
I.1.1.4.3. Méthode de conservation	34
I.1.2. Lactosérum	34
I.1.2.1. Choix du lactosérum et traitement	34
I.1.2.2. Détermination des propriétés physicochimiques et biochimiques	35
I.1.2.2.1. Mesure du pH	35
I.1.2.2.2. Humidité	36
I.1.2.2.3. Détermination du taux des cendres	36
I.1.2.2.4. Mesure de la conductivité électrique	36
I.1.2.2.5. Mesure de l'acidité Dornic	36
I.1.2.2.6. Mesure des sucres totaux	37
I.1.2.2.7. Mesure des protéines totales	37
I.2. Production de l'enzyme	37
I.2.1. Préparation du milieu de fermentation	37
I.2.1.1. Milieu de base	37
I.2.1.2. Préparation de l'inoculum	37
I.2.1.2.1. Préparation de la suspension levurienne	37
I.2.1.2.2. Dénombrement des levures	37
I.2.1.2.3. Ensemencement des milieux de fermentation	39
I.2.2. Dosage des paramètres influençant la cinétique enzymatique	39
I.2.2.1. Mesure de pH	39
I.2.2.2. Détermination de la biomasse	39
I.2.2.3. Dosage des Sucres totaux	39
I.2.2.4. Dosage de l'activité α-amylasique	39

CHAPITRE II: RESULTATS ET DISCUSSION	42
II.1. Analyses physicochimiques du sol	42
II.2. Analyses d' eaux	43
II.4. Isolement des souches levuriennes	44
II.4.2. Aspect macroscopique et microscopique des isolats	44
II.4.2. Observation microscopique	45
II.4.3. Sélection des souches amylolytiques	46
II.5. Propriétés physicochimiques et biochimiques du lactosérum	46
II.6. Etude cinétique de la production enzymatique	48
II.6.1. Evolution du pH	48
II.6.2. Evolution de la biomasse	50
II.6.3. Evolution de la concentration des glucides	51
II.6.4. La production de l'α –amylase	52
II.7. Optimisation de la production de l'α –amylase	53
II.7.1. Evolution cinétique de la production au cours de la fermentation de la souche TSB	53
II.7.2. Evolution cinétique de la production au cours de la fermentation de la souche TEB	54
II.7.3. Evolution cinétique de la production au cours de la fermentation de la souche SSB	55
II.7.4. Evolution cinétique de la production au cours de la fermentation de la souche SEB	55
Conclusion	58
Références bibliographiques	61
Annexes	71

LISTE DES TABLEAUX

Numéro	Titre	Page
Tableau 1	Classification simplifiée des levures	10
Tableau 2	Composition moyenne du lactosérum doux et acide	25
Tableau 3	Composition en acides aminés essentiels de différentes protéines de lactosérum	26
Tableau 4	Caractéristiques des sites de prélèvement	31
Tableau 5	Propriétés physicochimique du sol	42
Tableau 6	Analyses physicochimiques et biochimiques des eaux	43
Tableau 7	Isolement des levures à partir des différents échantillons du sol et d'eau	44
Tableau 8	Analyses physicochimiques et biochimiques de différents échantillons du lactosérum	47

LISTE DE FIGURES

Numéro	Titre	Page
Figure 1	Division de cellules levuriennes par bourgeonnement	08
Figure 2	Cycle de reproduction de la levure	08
Figure 3	Structure tridimensionnelle de l' α amylase	17
Figure 4	Voies technologiques permettant l'obtention des principaux types de lactosérums issus de la première transformation du lait.	24
Figure 5	Site de prélèvement d'El Chott	31
Figure 6	Site de prélèvement de Lac Tindla	31
Figure 7	Méthodes d'isolement et d'ensemencement	35
Figure 8	Préparation du milieu de base	38
Figure 9	Préparation de l'inoculum	40
Figure 10	Aspect microscopique de certaines souches isolées (x40)	45
Figure 11	Aspect microscopique de certaines souches isolées (x100)	45
Figure 12	Sélection de souches amylolytiques	46
Figure 13	Evolution du pH de la souche SSB, SEB, TSB et TEB dans les 3 milieux de lactosérum.	49
Figure 14	Evolution de la biomasse de la souche SSB, SEB, TSB et TEB dans les 3 milieux de lactosérum	50
Figure 15	Consommation des glucides de la souche TSB, TEB, SSB et SEB dans les 3 milieux de lactosérum	51
Figure 16	Evolution d'activité amylolytique dans les 3 milieux de lactosérum de les souches TSB, SSB, SEB et TEB	53
Figure 17	Optimisation de la production de l' α -amylase par TSB	54
Figure 18	Optimisation de la production de l' α -amylase par TEB	54
Figure 19	Optimisation de la production de l' α -amylase par SSB	55
Figure 20	Optimisation de la production de l' α -amylase par SEB	56

LISTE DES ABREVIATIONS

CE : Conductivité électrique

CGT : Cyclodextrine glucanotransférase

D°: Degré Dornic

DCO: Demande chimique en oxygène

DBO: Demande biochimique en oxygène

GH : Glucoside hydrolase

HCl : Acide chlorhydrique

KDa: Kilo Dalton

KCl: Chlore de potassium

LC: Lactosérum camelin

LCH: Lactosérum caprin

LV: Lactosérum bovin

PDA: Potato Dextrose Agar

POU : Protéine d'organisme unicellulaire

SCP : Single cell protein

SEB : Souche isolé à partir d'eau d'El Chott

SSB : Souche isolé à partir de Sol d'El Chott

TEB : Souche isolé à partir d'eau de Tindla

TSB : Souche isolé à partir de Sol de Tindla

U : Unité enzymatique

INTRODUCTION

Introduction

Au cours des dernières années, les microorganismes ont apporté une contribution significative dans certains domaines industriels, où diverses industries dépendent en grande partie de leurs métabolites. Cependant, les souches fongiques sont considérées comme les microorganismes les plus importants en biotechnologies pour leur fort potentiel de développement. (SICARD., 1982). Dans ce contexte, les levures ont occupé une place primordiale dans des industries agroalimentaires (brasserie, cidrerie et fromagerie) (BOTTON *et al.*, 1999).

Les levures sont des eucaryotes unicellulaires, ayant des capacités à se multiplier rapidement car elles sont moins exigeantes en nutriments. Elles sont facilement mis en œuvre dans d'autres exploitations (culture, recherche et applications industrielles) par rapport aux procaryotes (POL., 1996) et possèdent un capital génétique qui subit peu de mutations. Actuellement, ces eucaryotes, par leur capacité à produire des métabolites fonctionnels, sont mis à contribution dans l'élaboration de biomédicaments ; de plus ils constituent un vaste réservoir de catalyseurs biologiques (les enzymes) (SACI., 2012)

Par ailleurs, l'usage des préparations enzymatiques s'est considérablement développé dans de nombreux secteurs de la bio-industrie. Les enzymes amylolytiques, les α -amylases en particulier, sont les plus importantes parmi les enzymes commercialisées à cause de la diversité de leur application (tels que l'industrie alimentaire humaine et animale, les détergents pour lessives, l'industrie des tanneries et l'industrie pharmaceutique) (BOTTON *et al.*, 1999).

Les amylases, proviennent de différentes sources (plantes, animaux et microorganismes), cependant celles d'origine microbienne sont les plus utilisées industriellement (BURHAN *et al.*, 2003). L'intérêt pour les amylases fongiques (moisissures et levures), a augmenté ces dernières années, où plusieurs investigations sont menées sur les enzymes amylolytiques extracellulaires secrétées par les genres *Lipomyces*, *Saccharomycopsis* et *Schwanniomyces* (DE MOT et VERACHTERT., 1985).

Toutefois, la production d' α -amylase par des procédés biotechnologiques (fermentations), nécessite non seulement l'identification et la sélection des microorganismes amylolytiques, mais également le choix d'un substrat de fermentation à faible coût d'une part, et convenable en point de vue de son composition en élément nutritifs nécessaires au développement des microorganismes et la production d' α -amylase d'autre part.

De nombreux sous-produits rejetés par l'industrie alimentaire tels que, le lactosérum, les déchets d'oranges et de datte, peuvent être récupérés et utilisés dans différents secteurs industriels et agricoles, selon leurs caractéristiques et les possibilités des marchés (alimentation animale et humaine). Le lactosérum par sa richesse en lactose, en protéines solubles et en sels minéraux a incité plusieurs laboratoires à tenter de valoriser en l'utilisant comme substrat de production de différents produits ; levure de boulangerie, acide lactique (GANA et TOUZI, 2001) et enzymes (MIYAKAWA., 1992).

Cette caractéristique que nous allons exploiter dans ce travail ayant l'objectif d'étudier la production d' α -amylase par des levures autochtones isolées à partir des sols et des eaux de chott dans la région d'El Oued et cultivés dans un milieu à base de lactosérum. Cette étude ayant trois volets d'investigation complémentaire :

- L'isolement des levures à partir de différents milieux (Lac de Tindla et El chott), puis la sélection des souches amylolytiques.
- La production des amylases par les souches sélectionnées et cultivées sur trois types des milieux de fermentations (lactosérum camelin, caprin et bovin).
- Le suivi de l'évolution des paramètres de la production de l'enzyme, dans le but de déterminer la souche la plus performante et le milieu favorable à la production des amylases.

Notre document sera structuré en deux parties dont la première est une synthèse bibliographique contenant des connaissances générales sur les levures, l' α -amylase et le lactosérum.

La seconde partie rapporte la méthodologie adoptée lors de la présente étude, et expose nos résultats obtenus avec leur discussion. Finalement, on termine ce document par la conclusion avec les perspectives.

PREMIÈRE PARTIE :
SYNTHÈSE
BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I :

LES LEVURES

Chapitre I. les levures

I.1. Historique

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

I.2. Définition

Le mot levure, selon Phaff et *al.*, (1968), provient du mot latin « levare » qui se traduit par «soulever».Type de cellules de champignons. Au sens propre, les levures sont des cellules capables par fermentation oxydative des glucides, de produire du dioxyde de carbone faisant «lever» les pâtes .Elles présentent la particularité d'émettre des bourgeons polaires ou latéraux, générateurs d'autres cellules, identiques à la cellule mère (EUZÉBY., 2008).

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 et LEVEAU., 1991).

I.3. Habitats

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

I.4. 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 et l'absence de vrai mycélium (au moins dans la plus grande partie de leur cycle biologique) (GUIRAUD., 1998).

Les levures se développent, soit en surface, soit en profondeur des aliments (milieux solides ou liquides). 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.5. Morphologie et structure

Les levures sont des cellules eucaryotes. Elles présentent une structure plus complexe que celle des bactéries notamment par la présence d'un noyau, de mitochondrie, d'un appareil de Golgi et de plus d'un chromosome (*saccharomyces cerevisiae* a 16 chromosomes) (LABRECQUE., 2003). Les levures sont constituées par des cellules isolées de forme ovale ou ronde mesurent 3 à 10 micromètres de diamètre, soit plus de 10 fois la taille des bactéries (Fao., 2007). Leurs cellules sont généralement ovoïdes et leur taille varie de quelques microns à 30 microns (BOUIX et LEVEAU., 1991). Les levures se différencient nettement des bactéries par leur structure cellulaire eucaryote, le cytoplasme contient les organites habituels des végétaux supérieurs non photosynthétiques (GUIRAUD., 1998).

I.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 et LARPENT-GOURGAUD., 1997).

Pour la plupart des levures, la reproduction asexuée est la forme majeure de multiplication (BONALY., 1991). Elle s'effectue par bourgeonnement ou par fission (scissiparité) à partir d'une cellule mère (Figure1).

La reproduction sexuée s'effectue par conjugaison des deux cellules qui donnent naissance à un Zygote. Après différenciation et méiose un asque à 4 ascospores haploïdes se forme (OTENG-GYANG., 1984) (Figure2).

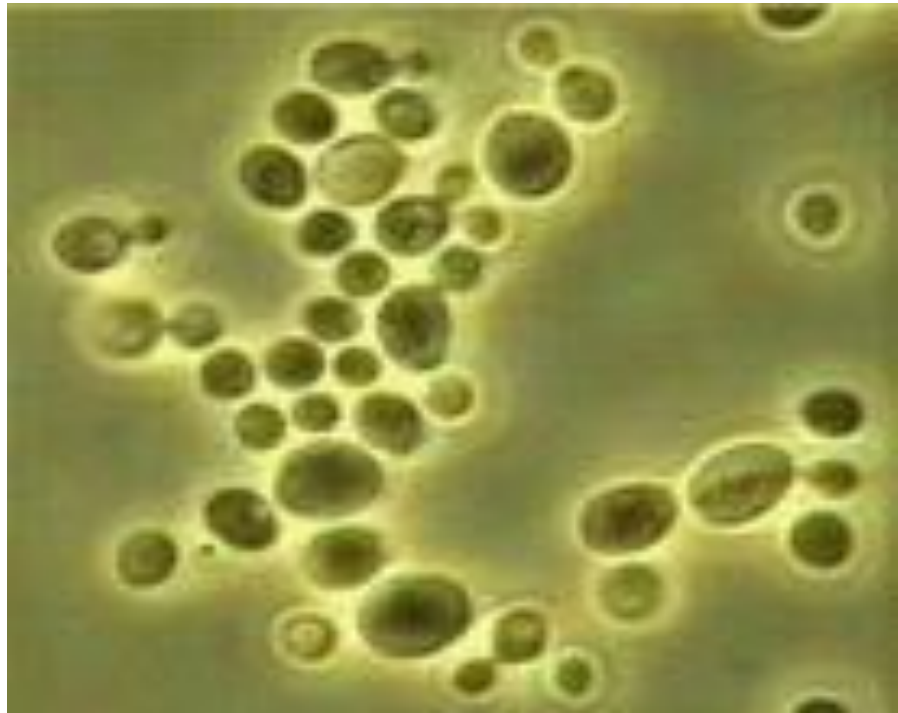


Figure 1 : Division de cellules levuriennes par bourgeonnement
(KWON-CHUNG et BENNETT., 1992)

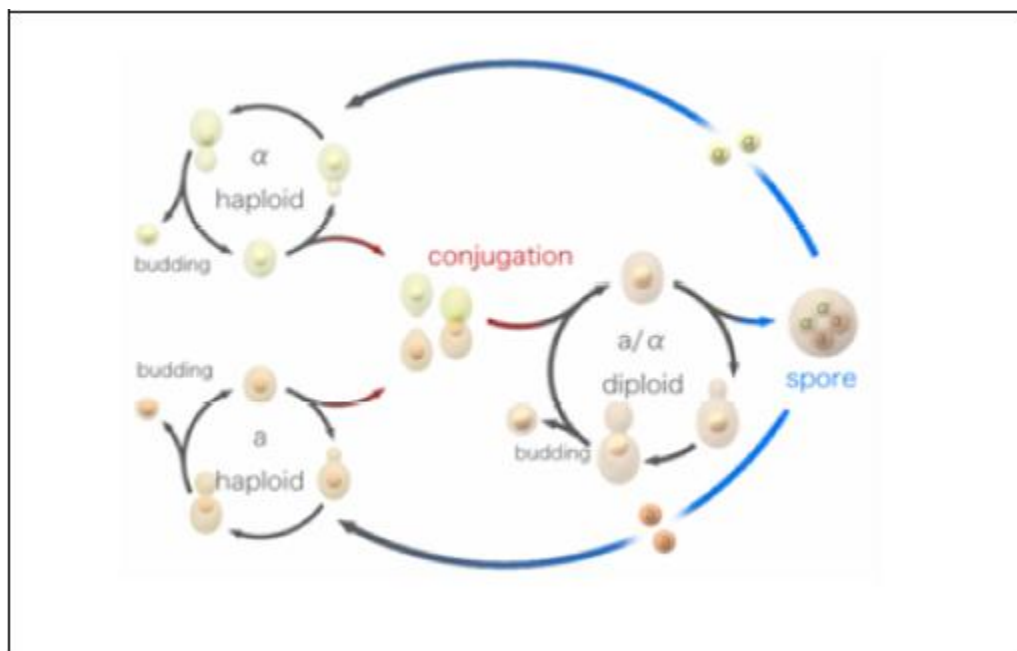


Figure 2 : Cycle de reproduction de la levure (LECLERC et *al.*, 1995)

I.7. Classification

Les levures sont classées d'après leur forme, leur possibilité de former un voile, de fermenter les sucres, de les assimiler (glucose, galactose, saccharose, maltose, lactose, raffinose). Toute souche incapable de fermenter le glucose, ne peut fermenter aucun autre sucre. Toute souche capable de fermenter le glucose, fait également fermenter le fructose et le mannose.

Le raffinose, sucre en C18, peut être fermenté complètement ou seulement le tiers de sa molécule. L'assimilation des nitrates, l'utilisation de l'éthanol, la production de pigments, sont aussi des critères de classification. En particulier, de nouveaux critères taxonomiques sont pris en considération pour permettre des études plus rigoureuses. La classification de référence est actuellement celle de Kreger-Van (1984) qui présente des changements sensibles. Il s'agit d'un groupe hétérogène, qui d'un point de vue taxonomique, comprend une soixantaine de genres et près de 500 espèces (KREGER-VAN., 1984). Les levures se divisent en 3 grandes classes :

I.7.1. Levures Ascomycètes (Hémiascomycètes)

Elles forment notamment la famille de Saccaromycetaceae divisée en 4 sous-familles:

- Les Schizosaccharomycetoideae sont des levures à mycélium et anthrospores ;
- Les Saccharomycetoideae possèdent des cellules bourgeonnantes et ont des spores non fusiformes.
- La sous famille des Nadsonioideae à bourgeonnement biopolaire ;
- Les lipomycetoideae à bourgeonnement et asque en sac (ALPHONSE., *et al.*, 2004).

I.7.2. Levures Basidiomycètes

Elles présentent une reproduction sexuée à basidiospores. Cette classe comporte peu de levures d'intérêt industriel (ALPHONSE., *et al.*, 2004).

I.7.3. Levures Deutéromycètes (sans sexualité)

Regroupent l'ensemble des levures ne présentant pas de mode connu de reproduction sexuée, ne se multipliant que par reproduction végétative. (BOUIX et LEVEAU., 1991).

Selon Alphonse (2004), elles constituent la famille des *Cryptococcaceae* qui est divisée en 4 sous-familles (tableau 01):

- Les Cryptococcoideae sont des levures à cellules bourgeonnantes, elles ne forment pas d'arthrospores et n'ont pas de pigments.
- Les Rhodotoruloideae (*Rhodotorula*) sont pigmentés ;
- Les Trichospororoideae (*Rhodotorula*) forment des arthrospores,

- Les *Sporobolomycetoideae* qui contiennent peu d'espèces. Quelques-unes appartenant au genre *Sporobolomyces* sont rencontrées parfois comme contaminants des denrées alimentaires.

Tableau 1 : classification simplifiée des levures (ALPHONSE., *et al.*, 2004)

Classes	Ordres	Familles	Sous-familles	Genres
Ascomycètes	Endomycétales	<i>Spermophthoraceae</i> <i>Saccharomycetaceae</i>	<i>Shizosaccharomycetoideae</i> <i>Nadsoniideae</i> <i>Lipomycetoideae</i> <i>Saccharomycetoideae</i>	<i>Shizosacchromyces</i> <i>Hanseniaspora</i> <i>Lipomyces</i> <i>Debaryomyces</i> <i>Hansenula</i> <i>kluyveromyces</i> <i>pichia</i> <i>saccharomyces</i> <i>Coccidiascus</i>
Basidiomycètes (reproduction sexuée avec basidiospores)	Ustilaginales Tremellales	<i>Filobasidaceae</i> <i>Levures à télisporos</i> <i>Sirobasidiaceae</i> <i>Tremellaceae</i>		<i>Filobasidium</i> <i>Leucosporidium</i> <i>Sirobasidium</i> <i>Tremella</i>
Deuteromycètes	Blastomycetales	<i>Cryptococcaceae</i> <i>Sporobolomycetaceae</i>	<i>Cryptococcoideae</i> <i>Rhodotoruloideae</i> <i>Trichosporoideae</i>	<i>Brettanomyces</i> <i>Candida</i> <i>Cryptococcus</i> <i>Torulopsis</i> <i>Rhodotrula</i> <i>Trichosporon</i> <i>sporobolomyces</i>

I.8. Physiologie et croissance

I.8.1. Besoin nutritif

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

I.8.1.1. Sources de carbone

Les sources carbonées sont d'une grande importance pour les champignons puisqu'elles fournissent le carbone exigé pour la biosynthèse de constituants cellulaires variés tels que les glucides, les lipides, les protéines, les acides nucléiques etc. (BOTTON ., 1991).

Les levures utilisent des sucres comme source principale de carbone et par conséquent d'énergie. Les sources les plus efficaces sont des oses (glucose, fructose et mannose) qui sont utilisables par plus de 400 espèces identifiées (POL, 1996).

D'autres levures particulières utilisent des sources de carbone non conventionnelles ; elles sont capables d'oxyder des acides organiques et les alcools (éthanol, Glycérol) (OTENG-GYANG., 1984). Comme les levures ne peuvent pas fixer l'azote libre, elles dépendent de ses formes oxydées ou réduites pour la synthèse des composés azotés structuraux et fonctionnels de la cellule (BABJEVA *et al.*, 1977).

La plupart des levures sont capables d'assimiler différentes sources d'azote organiques et inorganiques dans la biosynthèse des acides aminés, des protéines, des acides nucléiques et des vitamines (GUIRAUD ., 1998).

L'assimilation des ions d'ammonium (fournis dans le milieu ou dérivés du catabolisme d'autres composés azotés) est largement répandue chez les levures. Cependant, d'autres espèces levuriennes se caractérisent par une capacité à utiliser les nitrates et d'autres composés, comme source d'azote (WALKER *et al.*, 1997).

I.8.1.2. Oligoéléments et facteurs de croissance

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

I.8.2. Conditions physico-chimiques de croissance

I.8.2.1. 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 et HEMPFLING, 1979).

I.8.2.2. pH

Les levures ont tendance à coloniser des environnements acides et par leurs activités métaboliques (la respiration et la sécrétion d'acide organique) acidifiant encore plus le milieu.

Leur croissance optimale se fait à des pH entre 4,6 à 6,5 et beaucoup d'espèces tolèrent de grandes variations de pH. Elles peuvent s'adapter à des milieux acides (pH 2,8 à 3,0) ou alcalins (pH 8 à 8,5) (BOURGEOIS *et al.*, 1988 et LARPENT et LARPENT GAURGAUD., 1997).

I.8.2.3. 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 et LEVEAU., 1991).

I.8.2.4. Pression osmotique et l'activité d'eau

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

I.8.3. Métabolisme

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

- **Métabolisme oxydatif** : les levures utilisant le glucose en présence d'oxygène, par conséquent, leur métabolisme est exclusivement respiratoire et le pyruvate est oxydé par le cycle de Krebs. Cette voie métabolique est très énergétique et permet aux levures une importante multiplication. En plus des sucres simples, certaines levures utilisent d'autres glucides (mono, di ou tri saccharides et des polysaccharides comme l'amidon), mais aussi des alcools, des acides et des alcanes (LARPENT., 1991).
- **Métabolisme fermentaire** : en plus du métabolisme oxydatif, certaines levures peuvent privilégier une dégradation des glucides par un métabolisme fermentatif qui conduit à la formation d'éthanol et de CO₂. En plus de ces composés majoritaires, des alcools, des

aldéhydes, des esters, des acides sont formés en plus petites quantités. Ce métabolisme est moins énergétique que le métabolisme oxydatif (GUIRAUD et ROSEC., 2004).

I.9. Intérêt industrielles

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 et MEUNIER., 1970), du glycérol ainsi que certaines vitamines et solvants, mais aussi à la revalorisation de déchets agricoles, industriels et à la production des protéines (SCRIBAN., 1984 et LECTERC *et al.*, 1995).

I.9.1. Panification

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

I.9.2. 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 et BOUIX., 1993). De nombreuses espèces se rencontrent en fromagerie, les plus fréquentes appartenant aux genres *Kluyveromyces*, *Debaryomyces*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Torulopsis*, *Candida* et *Rhodotorula* (LARPENT., 1991).

I.9.3. 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).

I.9.4. 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 et MEUNIER., 1970).

CHAPITRE II :

L' α -AMYLASE

Chapitre II. L' α -Amylase

II.1. Introduction

L' α -amylase comme toutes enzymes, est une macromolécule qui fait partie de la classe des protéines globulaires, dont le rôle biologique est de catalyser l'hydrolyse de l'amidon. L' α -amylase et les protéases sont les plus utilisés en bio-industrie (SACI., 2012). Par ailleurs, la part du marché mondial prise par les enzymes est de 59% pour les protéases et 28% pour les glucanases dont 13% pour l' α -amylase (LARPENT-GAURGAUD et SANGLIER., 1992).

II.2. Définition

L' α -amylase [α -(1,4)-D-glucose glucanohydrolase] comme toutes les enzymes est une macromolécule appartenant à la classe des protéines globulaires (NOUADRI ., 2011). Elle est une enzyme ubiquitaire, synthétisée dans tous les genres de la vie. (MERBATI., 2006).

Les α -amylases sont des endo-enzymes dont la masse moléculaire est comprise entre 50 et 60 kDa (FEILLET., 2000), qui hydrolyse au hasard les liaisons osidiques (1,4), de l'amylose, de l'amylopectine, de l'amidon et du glycogène à l'exclusion des liaisons terminales de ces chaînes. Elle provoque la libération du glucose, du maltose et surtout d' α – dextrines (BENAOUIDA., 2008).

II.3. Nomenclature

- ✓ **Nom codifié** : EC 3.2.1.1
- ✓ **Nom commun** : α -amylase
- ✓ **D'autres nom (s)**: glycogénase, α -amylase; endoamylase; Taka-amylase A, maxilase..
- ✓ **Nom systématique**: 1,4 – α -D-glucose,4 glucano hydrolase (MARBATI ., 2006).
- ✓ **Synonymes**: glycogenase, endoamylase, maxilase, taka-amylase A. (NOUADRI., 2011).

II.4. Structure

Les α -amylases sont également considérées comme des glycoprotéines renfermant 478 acides aminés répartis en 2 domaines globulaires appelés A (1-380 résidus) et B (381-478 résidus) (NOUADRI., 2011).

Ces domaines sont associés par une chaîne polypeptidique constituée principalement de résidus hydrophobes (fig.03). La partie glucidique est formée essentiellement de mannose, les résidus constituant le site de fixation du substrat ainsi que ceux constituant le site catalytique sont localisés dans le domaine A qui montre que l' α -amylase est formée de 8 feuillets β plissés et de 8 hélices α (CHIBA., 1988 ; BURHAN., 2003 et NOUADRI., 2011).

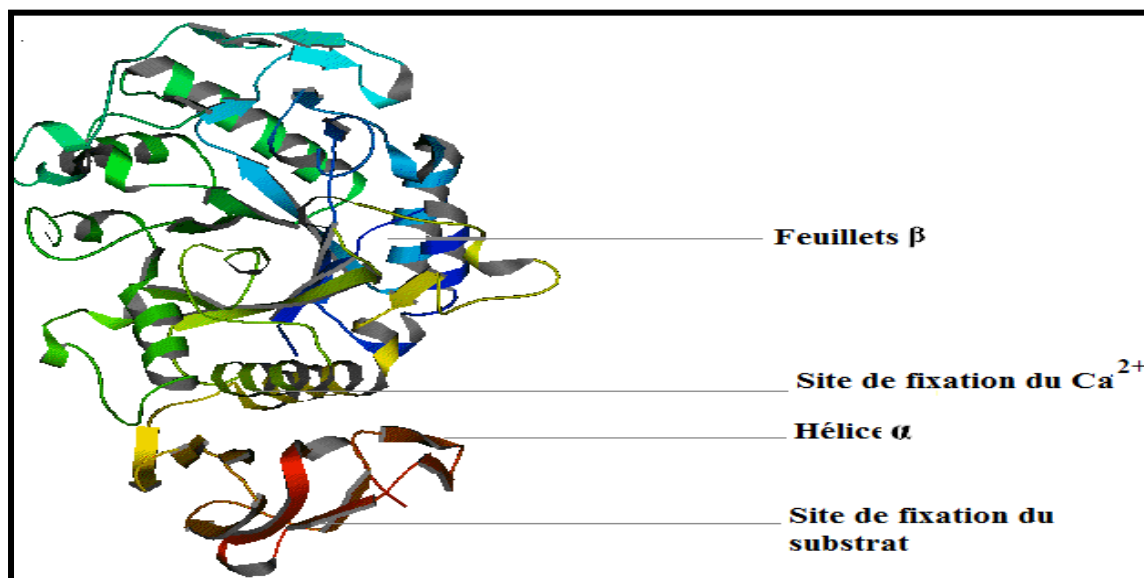


Figure 3 : Structure tridimensionnelle de l' α amylase (PRIESTLE ., 1988).

L' α -amylase fongique, comportant trois domaines globulaires (A, B, et C). Le domaine A, forme un tonneau (β / α) 8 et porte le site actif à la partie C-terminale des feuillets β . Le domaine B, forme une boucle à partir du milieu du domaine A et constitue une sorte de « couvercle » au-dessus du site actif (fig. 03). Quand au domaine C, il constitue un tonneau de 8 feuillets β antiparallèles (BENAOUIDA., 2008).

II.5. Différentes origines

L' α -amylase est largement représentée chez les animaux, les végétaux et les micro-organismes. Bien que l' α -amylase de différentes origines ait très peu de séquences d'acides aminés identiques, leur structure tridimensionnelle et l'organisation de leur site actif sont similaires (NOUADRI., 2011).

Chez les mammifères, l' α -amylase est présente principalement dans les sécrétions salivaires et pancréatiques. Celle d'origine microbienne (bactéries, moisissures et levures) est exocellulaire, exceptées certaines espèces comme *Bacillus subtilis* et *Pishia burtonii* (BEAUDEUX et DURAND ., 2011) (MARBATI., 2006).

II.6. Mode d'action :

L' α -amylase appartient à la famille des glycosides hydrolases nommée GH13, regroupant maintenant plus de 1700 enzymes, contenant également les cyclodextrines glucanotransférases (CGTases) et les pullulanases (MERBATI., 2006). Elle joue un rôle essentiel dans la dégradation des glucides, puisqu'elle est capable d'hydrolyser des liaisons α -1-4-glucosidiques à l'intérieur de polysaccharides composé d' α -D-glucose, tel le glycogène et

l'amidon, pour donner lieu à la libération de molécules plus petit : glucose, maltose et dextrines (contenant des liaisons α -1-6 glucosidique (MAKTOUF.,)

Son action peut se faire de différentes façons :

- **Une attaque aléatoire**, en coupant les liaisons (α -1,4) à partir de l'extrémité non réductrice. Il en résultera, principalement, la formation de glucose, de maltose et surtout d' α -dextrines (SCRIBAN., 1999).
- **Mécanisme uni-chaîne** où l' α -amylase dégrade une chaîne avant de passer à l'autre. Cette action est due à la formation du complexe actif avec le premier substrat. L'enzyme catalyse la réaction et ne forme pas de complexes actifs, jusqu' à l'achèvement de la dégradation de la première chaîne (BERRY et PATERSON., 1990).
- **Mécanisme multi-chaîne**, la dégradation des chaînes est simultanée (PAZUR et MARCHETTI., 1992).
- **Attaque multiple ou répétitive**, le déplacement de l'enzyme, fixée tout au long de la chaîne, conduit à plusieurs hydrolyses avant la dissociation du complexe « enzyme-substrat » (NAKATANI, 1996 et KANDRA *et al.*, 1997).

II.7. Régulation de la synthèse de l' α -amylase

La répression catabolique de l'expression des gènes est un système de normalisation fondamental et omniprésent, à fin de répondre aux changements de disponibilité nutritive. Des études, ont démontré que la biosynthèse de l' α -amylase est régulée uniquement par répression au cours de la transcription et/ou au cours de la traduction (BHELLA et ALTROSSAR., 1987).

Chez les micro-organismes, le glucose ou d'autres sources de carbone rapidement métabolisables, répriment l'expression des gènes qui codent pour des enzymes liées au métabolisme d'autres sources de carbone (CHUNG-AN *et al.*, 1998).

II.8. Les applications de l' α - amylase

Les α - amylases microbiennes sont parmi les enzymes les plus utilisées dans les procédés industriels:

II.8.1. Utilisation des α - amylases dans les industries Agro-alimentaires

➤ Glucoserie

La principale industrie utilisant de l' α - amylase est la glucoserie qui, à partir d'un substrat complexe, l'amidon, développe un nombre important de transformations faisant appel aux enzymes, parmi lesquelles les α - amylases bactériennes ou fongiques qui sont utilisées pour la dégradation de l'amidon (MARTIN *et al.*, 2003).

➤ **La sucrerie**

L' α - amylase est utilisée pour faciliter les opérations d'extraction et de raffinage du saccharose à partir de la betterave ou de la canne à sucre pour éliminer des traces d'amidon gênant la purification .De plus, des α - amylases fongiques sont très utilisées pour la préparation des sirops sucrés à base d'amidon de maïs et de sirops de chocolats (MARTIN *et al.*, 2003)

➤ **Panification et biscuiterie**

L'usage de l'alpha amylase « améliorant de panification » est devenue une pratique de fabrication machinal dans l'industrie panaière, non seulement pour améliorer la qualité du pain mais aussi pour contrôler le processus, de fabrication ce qui conduit à un gain en temps et en énergie. Cette industrie emploie les α - amylases fongiques d'*A. oryzae* pour la régulation des activités diastasiques des farines en dégradant l'amidon en maltose. Cette opération favorise la formation de la mie souple en boulangerie et améliore la texture des gâteaux pâtisseries et des biscuits (MALHOTRA *et al.*, 2002).

➤ **Industrie des boissons**

Dans ce secteur l' α - amylase intervient essentiellement dans la fabrication d'alcool éthylique, de boissons sucrées non alcoolisées, de jus de fruits. En brasserie, elle permet d'obtenir des bières sans dextrines. (MAMO *et al.*, 1999)

II.8.2. Autres applications des α - amylases

➤ **Domaine médical**

L'augmentation du taux des α - amylases dans le sang peut témoigner d'une pancréatite aiguë et se rencontre également dans certains cancers digestifs et dans les oreillons (Lo *et al.*, 2001) , elles sont donc employées en diagnostic médical pour détecter certaines maladies.

➤ **Domaine pharmaceutique**

Les α - amylases fongiques sont utilisées comme :

- ✓ Aide digestif pour éviter les dyspepsies et les fermentations intestinales par exemple : Danilase (YIHAN *et al.*, 2010).
- ✓ Agent anti-inflammatoire en soutenant le traitement antibiotique (LO *et al.*, 2001).

Les α -amylases sont aussi utilisées dans l'industrie textile pour le désencollage des tissus ainsi que dans les domaines de la tannerie, de la papeterie (TEODORO *et al.*, 2000) et des détergents pour les lessives où elles facilitent la disparition des tâches en dégradant les souillures, permettant ainsi l'augmentation du pouvoir blanchissant. Elles sont utilisées aussi dans le traitement des eaux résiduaires pour l'élimination de l'amidon (MALHOTRA *et al.*, 2002).

II.9. L' α -amylase d'origine levurienne :

Les levures sont les organismes les plus employées dans la production de biomasse, à valeur nutritive élevée (YANEZ *et al.*, 1972 et IMRIE *et al.*, 1975). Leur capacité à assimiler une grande variété de substrats (les hexoses, les pentoses, et les polysaccharides, est à l'origine de plusieurs investigations menées sur elles, dans le but de produire des acides organiques, des enzymes et en particulier l' α -amylase. (MERBATI., 2006).

CHAPITRE III :
LACTOSÉRUM

Chapitre III. Lactosérum

III.1. Généralités sur le lactosérum

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

III.2. Définition du lactosérum

Le terme lactosérum se rapporte au liquide translucide et verdâtre qui se sépare du caillé (HESLOT, 1996), après séparation des caséines par coagulation acide ou par processus enzymatique au moyen de la présure ou de la chymosine (JOUAN., 2002). Son pH est compris entre 5 et 6.5 (KOSIKOWSKI, 1979 ; MEREO, 1980).

Le lactosérum est constitué de la phase aqueuse du lait laquelle contient l'ensemble des éléments solubles de celui-ci (JOUAN., 2002). Il est constitué de 50% de matière sèche, contient aussi une quantité importante de protéines, de lactose et des matières minérales; des vitamines hydrosolubles, il est riche aussi en vitamine B (BENDIMERAD., 2013), des nucléotides, des acides aminés libres....c'est dans cette phase hydrique que l'on trouve les protéines solubles appelées, aussi, séro-protéines (JOUAN., 2002).

III.3. Différents types de lactosérum

Le lactosérum est un produit de grande valeur nutritionnelle (KOSSEVA., *et al.*, 2007). On distingue généralement deux catégories de sérum, selon que son acidité est inférieure ou supérieure à 1.8g d'acide lactique par litre (FAO., 1995), (18°D), (ADRIAN., *et al.*, 1980) :

***Lactosérum acide**

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

***Lactosérum doux**

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

III.4. Sources industrielles du lactosérum

Les deux principales voies industrielles de transformation du lait nature aboutissant au lactosérum, sont la beurrerie et la fromagerie (fig.04).

- **La beurrerie** : c'est l'ensemble des procédés qui conduisent à la fabrication du beurre à partir du lait nature. Après écrémage de ce dernier suivi d'une extraction de la caséine par précipitation on obtient du « lactosérum écrémé ».
- **La fromagerie** : c'est l'ensemble des procédés qui conduisent à la fabrication des fromages à partir du lait nature, ce dernier subit les processus de coagulation et de synérèse, aboutissant d'une part à une phase solide le « fromage », d'une part à une phase liquide «le lactosérum». (BENAOUIDA., 2008).

III.5.Caractéristiques et composition biochimique du lactosérum

Les nutriments du lactosérum les plus abondants sont le lactose, les protéines solubles, et les sels minéraux (Tableau 02). Les sels du lactosérum sont composés de NaCl et KCl (plus de 50%), sels de calcium (phosphate principalement) (GONZFILEZ., 1996; MAWSON, 1994; SHANG *et al.*, 1994). (MOLETTA., 2009; FAO., 1995) et autres minéraux, en plus faibles teneurs. Le lactosérum contient aussi d'autres composants, tels que l'acide lactique (0.05%) et citrique, des matières azotées non protéiques (urée et acide urique), et des vitamines du groupe B (GONZFILEZ., 1996; MAWSON, 1994; SHANG *et al.*, 1994). Lactosérum acide est aussi plusensemencé en germes lactiques et moins sujets à des fermentations délétères que lactosérum doux (MOLETTA., 2009), selon la procédé de coagulation et la composition initiale du lait (donc la saison, la race des animaux, le type d'alimentation, etc), la composition du lactosérum peut varier sensiblement (BERGEL *et al.*, 2004).

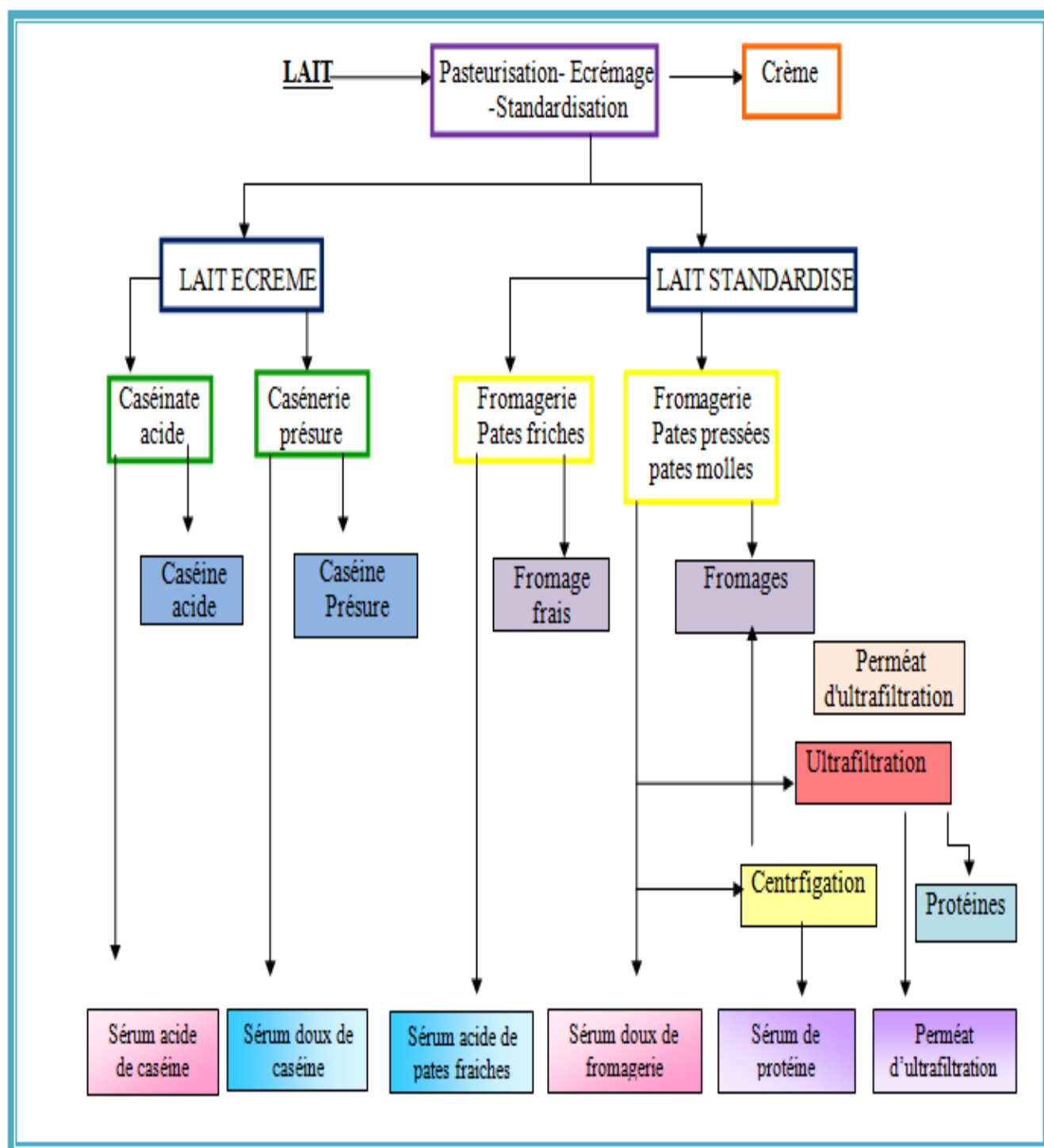


Figure 4 : Voies technologiques permettant l'obtention des principaux types de lactosérums issus de la première transformation du lait (ALAIS., 1984).

Tableau 2: Composition moyenne du lactosérum doux et acide (MORR *et al.*, 1993 ; LINDEN *et al.*, 1994), (Lupien., 1995) et (FAO. , 2002)

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

Les lactosérums sont riches en lactose et potassium (Tableau 02). Dans le lactosérum acide une partie du lactose a été transformé en acide lactique ; les lactosérums doux sont pauvres en calcium (reste dans le caillé pour participer à la coagulation des protéines), alors que les lactosérums acides sont riches en calcium (MORR *et al.*, 1993).

III.5.1. Protéines de lactosérum :

D'après LAPOINTE et VIGNOLA (2002), les protéines du lactosérum, ou protéines sériques, ont un intérêt nutritionnel important de par leur composition élevée en acides aminés essentiels (Tableau 03).

Tableau 3 : Composition en acides aminés essentiels de lactosérum (en g.100 g⁻¹ de protéines) (Jeantet *et al.*, 2008).

Acides aminés essentiels	Protéines de lactosérum
Isoleucine	6.55
Leucine	14.00
Lysine	10.90
Méthionine	2.35
Cystine	3.15
Phénylalanine	4.05
Tyrosine	4.80
Thréonine	6.70
Tryptophane	3.20
Valine	6.85

Elles représentent 20% des protéines de lait, elles sont de faible poids moléculaire, elles sont continues dans le lait sous forme de monomère et polymère, elles ne précipitent pas à leur point isoélectrique, elles ne contiennent pas de phosphore, ne précipitent pas sous l'action enzymatique, elles ont une meilleure valeur nutritionnelle, riches en Aa soufrés et riches en lysine (Tableau 03). Elles sont divisées selon NAFTI (2011), BOUBEZARI (2010) et JOUAN (2002) en :

- α lactalbumine = 2% ;
- β lactglobuline = 10% ;
- Immunoglobuline=1.9-3.3% et sérumalbumine =0.7-1.3%;
- Protéose-peptone =2 -4% et lactoferrine=1.47%.

III.6.Intérêts du lactosérum

III.6.1.Intérêt alimentaire du lactosérum

La qualité nutritive du lactosérum tient à la fois à la présence du lactose et des protéines sériques. La richesse en lactose en fait un auxiliaire actif dans le brunissement enzymatique ou maillardisation apprécié en boulangerie, biscuiterie et viennoiserie (FAO., 1995).

Dans l'alimentation animale, l'utilisation directe de lactosérum ou de son perméat comme ingrédient dans les aliments ou les boissons et l'irrigation de la terre par aspersion (AUDIC *et al.*, 2003; KOSARIC *et al.*, 1982).

Les protéines fonctionnelles liées aux protéines sériques en font des produits intéressants à la fois pour l'alimentation du bétail, mais aussi en nutrition humaine, de plus, il est utilisé pour enrichir les aliments ou les régimes pauvres en protéines (FAO., 1995). En pathologie, il est utilisé pour l'alimentation des malades diabétiques ou des sujets souffrant de mal nutrition, et en alimentation de soutien, pour les sportifs, et les personnes âgées (DRYER., 2001).

III.6.2. Usage Biotechnologique de lactosérum

En biotechnologie, le lactosérum par sa composition biochimique possède d'intéressantes propriétés comme milieu de fermentation pour plusieurs microorganismes assimilant le lactose comme source de carbone et d'énergie (BENAOUIDA ., 2008).

L'utilisation du lactosérum comme milieu de culture est également favorable au développement:

- **Des levures** : comme *Saccharomyces cerivisiae*, *Candida kefir* et *Kluveromyces fragilis* (GANA et TOUZI, 2001 ; LONGHI *et al.*, 2004).
- **Des bactéries** : à titre d'exemple *Lactobacillus bulgaricus* et *Lactobacillus lactis* pour la production d'acide lactique. (Mehaia et Cheryan, 1986 et BOUCHERIT., 2011). Certaines espèces bactériennes comme *Lactobacillus bulgaricus* fermentent sur des milieux de cultures à base de lactosérum pour la production d'acides organiques et de différentes enzymes (DENDOUGA., 2006).
- **Des moisissures** : comme *Penicillium camemberti* producteur de protéases (MECHAKRA *et al.*, 1999) ; *Mucor miehei* et *Endothia parasitica* produisant des acidoprotéases (SEKER *et al.*, 1999),(BOUCHERIT .,2011)

Le lactosérum déprotéiné a servi comme milieu de base pour la production de la cellulase par la moisissure *Aspergillus niger* (LEGHLIMI, 2004), (BENAOUIDA., 2008).

III.7. Valorisation des constituants de lactosérum

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

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

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

III.8. Lactosérum et pollution de l'environnement

Les effluents produits par l'industrie fromagère sont caractérisés par leur volume et leur charge polluante élevés (50 à 70gDCO/L de lactosérum) (PAULINE et YVES).

Bien qu'il existe des possibilités de valorisation du lactosérum, approximativement la moitié de la production mondiale n'est pas exploitée mais rejetée comme effluents, ce qui constitue une perte importante de matière alimentaire (GONZFILEZ, 1996; MARWAHA *et al.*, 1988).

Dans ces conditions le lactosérum représente un problème environnemental très important à cause des volumes considérables générés et à cause de sa teneur élevée en matière organique. Le rejet du lactosérum est considéré comme un polluant car il impose une forte demande biochimique en oxygène (DBO), de 30000-50000 ppm (MARWAHA *et al.*, 1988).

Une fois libéré dans l'eau, par exemple, les rivières, les canaux d'irrigation, ou sur la terre, le lactosérum conduit à des problèmes environnementaux. En effet, il met en danger la structure physique et chimique du sol, diminue le rendement des cultures (AULIFFE *et al.*, 1982) et réduit la vie aquatique par l'épuisement de l'oxygène dissous (YANG *et al.*, 1980).

Ils existent un certain nombre de procédés pour l'épuration des mélanges eaux blanches et lactosérum, la gestion du lactosérum seul permettrait de réduire la charge polluante totale des rejets ainsi que le dimensionnement des installations de traitement préexistantes. (PAULINE et YVES)

DEUXIÈME PARTIE :

PARTIE

PRATIQUE

CHAPITRE I :

MATÉRIEL ET

MÉTHODES

Chapitre I. Matériel et méthodes

Le travail porte sur la production des amylases secrétées par des levures isolées à partir du sol et d'eau en utilisant trois types de lactosérum comme milieux de culture.

I.1. Matériel biologique :

I.1.1. Sol et eau

I.1.1.1. Présentation des sites de prélèvement :

Les échantillons du sol et des eaux utilisés au cours de notre étude sont prélevés des différents sites de la région d'OUED SOUF (fig.05) et OUED RIGH (fig.06) située dans le Sud Est Algérien.



Figure 5: Site d'El Chatt (El-Oued)



Figure 6: Site de Lac Tindla.

Les sites choisis pour le prélèvement du sol et de l'eau en l'occurrence El Chatt ($33^{\circ}22'55.86''$ N et $6^{\circ}51'40.13''$ E) à une altitude de 63m – figure (05), qui est localisée derrière le zoo d'El-Oued et Tindla ($33^{\circ}39'50''$ N et $6^{\circ}02'44.78''$ E) à une altitude de 14m – figure (06). Leurs caractéristiques générales sont présentées dans le tableau 04:

Tableau 4 : caractéristiques des sites de prélèvement

Site	Commune	Type d'alimentation	Pérennité
El chott	El Oued (Oued Souf)	ER	Existence sur toute l'année
Lac Tindla	Tindla (Oued Righ)	EC+ER	Selon le niveau de canal

ER : Eau issue de la remontée

EC : Eau de canal principale de lac

I.1.1.2. Prélèvement des échantillons du sol et d'eau

I.1.1.2.1. Sol :

Le prélèvement du sol est réalisé à l'aide d'une tarière et pour chaque prélèvement, la couche des trois premiers centimètres (couche supérieure) est écartée. Le sol ensuite, recueilli dans des boîtes en plastique stérile soigneusement fermés et les analyses sont effectuées dès l'arrivée au laboratoire.

I.1.1.2.2. Eau :

Les échantillons d'eaux, ont été prélevés au niveau des lacs d'eau superficielle situés aux sebkhas de Tendla et de Chott. l'eau a été recueilli à l'aide des flacons en plastique de 250mL et transportée dans une glacière au laboratoire. Les analyses sont effectuées au plus tard dans les 24 heures qui suivent les prélèvements.

I.1.1.3. Dosage des paramètres physicochimiques et biochimiques du sol et d'eau:

Les analyses physico-chimiques et biochimiques des échantillons des sols, et des eaux sont effectuées au niveau du Laboratoire de chimie des sols et des eaux et 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.1.1.3.1. Analyses du sol

I.1.1.3.1.1. Mesure de pH :

Selon la méthode de Davet et Rouxel (1997); la détermination des valeurs du pH d'une suspension du sol contenant 10 g du sol dans 90 ml d'eau distillée à l'aide d'un pH mètre (BOUCHERIT.,2011)

I.1.1.3.1.2. Humidité :

Les échantillons de sol sont séchés à l'étuve à $105^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ jusqu'à l'obtention d'une masse constante, soit en moyenne après 15 heures. La différence entre le poids avant et après séchage exprime la teneur en eau de l'échantillon initial. Le poids après séchage représente la matière sèche (BOUCHERIT., 2011).

I.1.1.3.1.3.Détermination du taux des cendres

Les échantillons sont calcinés à 480°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.1.1.3.1.4. Mesure de la conductivité électrique

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

I.1.1.3.1.5. Mesure d'azote

L'azote total est déterminé par la méthode de KJELDHAL qui consiste en une minéralisation de l'échantillon par voie humide par l'acide sulfurique, puis distillation et titration avec l'acide sulfurique 0.05 N (AUDIGIE *et al.*, 1984) (annexe 01).

I.1.1.3.2. Analyses des eaux :**I.1.1.3.2.1. Mesure de pH :**

Nous avons déterminé le pH d'un volume de 50 ml d'eau dans un bécher directement à l'aide de l'électrode du pH-mètre (BOUCHERIT., 2011).

I.1.1.3.2.2. Mesure de la conductivité électrique :

Cette mesure à l'aide d'un conductimètre est très importante car elle donne directement une estimation de la minéralisation totale. La conductivité est naturellement également influencée par le pH, la valence des ions et leur degré d'ionisation (AFNOR, 1986).

I.1.1.3.2.3. Détermination du taux des cendres:

La détermination de la matière sèche est suivie par une incinération au four à moufle à 550° C pendant 5 h. La formule utilisée est la suivante (AFNOR, 1986).

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

M0 : Masse de la capsule et les cendres.

M1 : Masse de la capsule vide.

M2 : Masse de la capsule et la prise d'essai

I.1.1.3.2.4. Mesure d'azote :

Déterminé par la méthode de KJELDAHL (AFNOR, 1986) (annexe 01)

I.1.1.4. Méthodes d'isolement et d'ensemencement

Dans la présente étude, les échantillons des eaux et du sol ; servent à un support d'isolement et de sélection des souches levuriennes à activité amylolytique.

I.1.1.4.1. Isolement et purification :

L'isolement et la purification des levures prélevées sont réalisés sur le milieu de culture PDA et Sabouraud (TOURNAS., 2005). Une solution-mère de chaque échantillon est préparée avec 1 g de sol dans 9 ml d'eau physiologique. Des dilutions décimales de 10^{-1} à 10^{-4} sont effectuées ; chaque dilution subit une homogénéisation par agitation. Un volume de 0,1 ml de chaque dilution est ensuite ensemencé dans des boîtes de Pétri sur Sabouraud puis incubé à 30° C pendant 5 j (BOUCHERIT., 2011).

Les levures développées sont repiquées sur le milieu PDA dans les mêmes conditions d'incubation jusqu'à l'obtention des souches pures (Figure 7). Les colonies bien isolées, ont subi une observation macroscopique (couleur, forme, odeur), suivie d'une coloration au bleu de méthylène, puis observées au microscope à l'objectif 40, pour vérifier la morphologie et l'homogénéité des cellules.

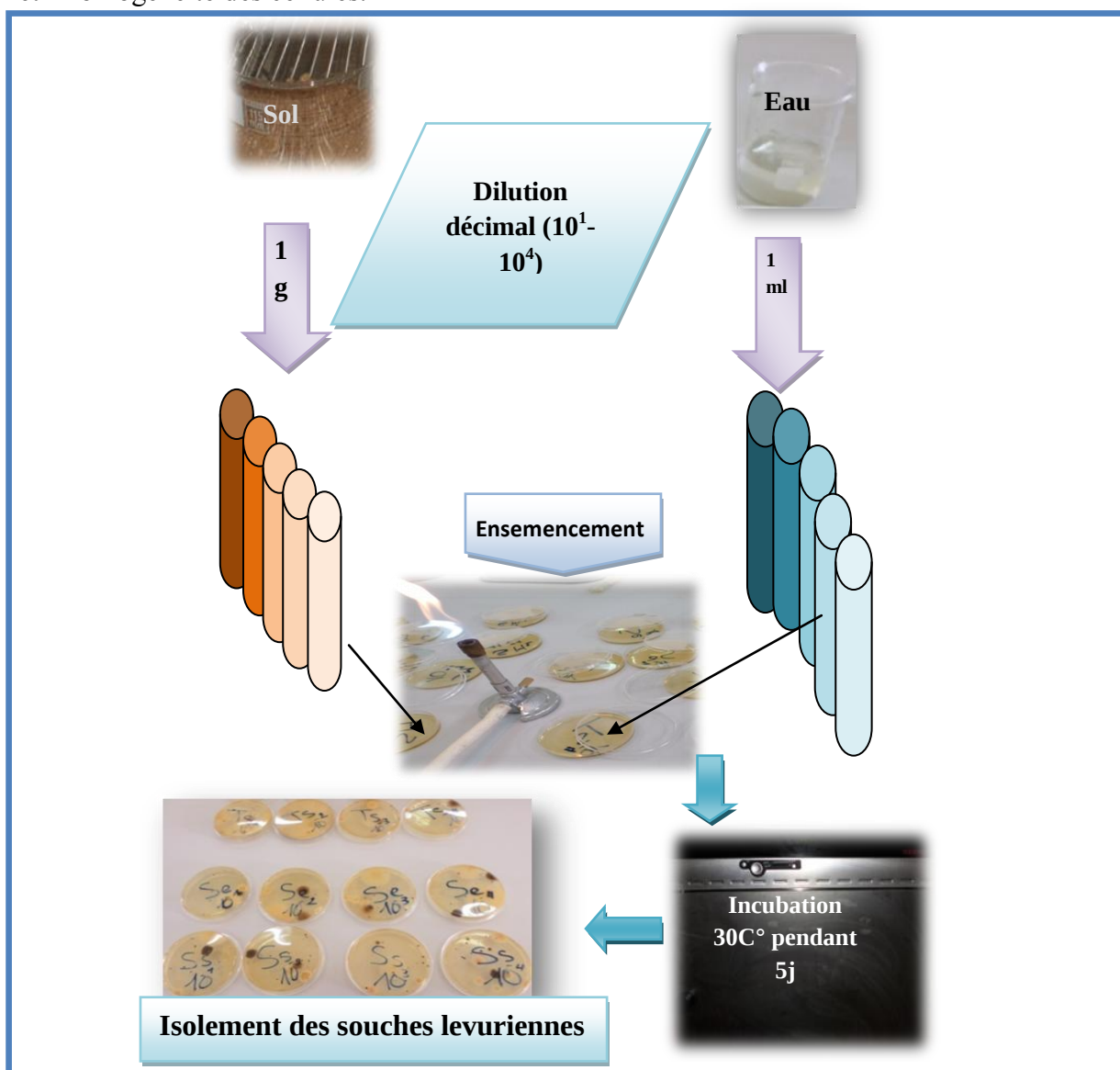


Figure 7: méthodes d'isolement et d'ensemencement.

I.1.1.4.2. Sélection des souches amylolytiques

Les souches amylolytiques sont sélectionnées sur un milieu PDA à pH 5 (annexe 02), additionné d'amidon soluble à 1% par repiquage. L'incubation a lieu à 30° C pendant 24 à 72 h. Après incubation, une solution de Lugol est vaporisée sur la surface de la boîte, afin de mettre en évidence l'activité amylasique. Les souches, à halo clair sur le pourtour, sont considérées comme productrices d'amylases (TATSINKOU *et al.*, 2005 et BENAOUIDA., 2008).

I.1.1.4.3. Méthode de conservation

Les souches productrices d'amylase sont repiquées sur PDA inclinée, incubées à 30° C pendant 7 J puis stockées à 4° C (BOUCHERIT., 2011).

I.1.2. Lactosérum :

I.1.2.1.Choix du lactosérum et traitement:

Les échantillons du lait caprin, ovin et camelin sont approvisionnés par des éleveurs des bétails dans la région d'El-Oued. Les échantillons ont été prélevés dans des flacons en plastique, puis conservés par réfrigération à 4°C.

La séparation des lactosérums des trois types du lait a été réalisée par addition de Hcl 80% en utilisant une pipette pasteur et à l'aide d'un pH mètre et avec une agitation continue par un agitateur magnétique jusqu'à l'attient de pH de séparation convenable pour chaque lait.

Les produits sont mis dans l'étuve à 30°C pendant 24h et ensuite filtrer et conservés par réfrigération à 4°C dans des flacons de verre fermés.

I.1.2.2. Détermination des propriétés physicochimiques et biochimiques

I.1.2.2.1. Mesure du pH

La valeur du pH à une importance exceptionnelle par l'abondance des indications quelle donne sur la richesse du lait en certains de ces constituants, sur son état de fraîcheur ou sur sa stabilité (MATHIEU, 1998). Nous avons déterminé le pH à l'aide de pH-mètre.

I.1.2.2.2. Humidité

Un volume déterminé de lactosérum est séché également à l'étuve à 105° C jusqu'à l'obtention d'un poids constant. La matière sèche est exprimée par la formule suivante (AFNOR, 1986).

$$MS = (M2 - M1) (1000 / V) \text{ mg/ml.}$$

M1: Masse en gramme de la capsule vide.

M2: Masse en gramme de la capsule et le résidu.

V : Volume en millilitre de l'échantillon.

L'humidité (%) est donnée par la formule : **H = 100 (%) – MS (%)**.

I.1.2.2.3. Détermination du taux des cendres

La prise d'essai ayant servi à la détermination de la matière sèche est suivie par une incinération au four à moufle à 550° C pendant 5 h. La formule utilisée est la suivante (AFNOR., 1986).

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

M0 : Masse de la capsule et les cendres.

M1 : Masse de la capsule vide.

M2 : Masse de la capsule et la prise d'essai

I.1.2.2.4. Mesure de la conductivité électrique

Par la méthode directe et par la lecture simple de valeur obtenue en émergeant l'électrode du conductimètre dans 50mL de lactosérum.

I.1.2.2.5. Mesure de l'acidité Dornic

L'acidité Dornic est mesurée par titration d'un volume déterminé de lactosérum additionné de 2 à 3 gouttes de phénolphtaléine (1 %) par NaOH N/9. La réaction est arrêtée dès l'apparition d'une couleur rose qui dure quelques minutes par rapport à un témoin (AFNOR., 1986). L'acidité est donnée par la formule :

$$A = V / E.$$

V : Volume de soude (ml).

E : Volume du lactosérum (ml).

I.1.2.2.6. Mesure des sucres totaux

Les sucres totaux sont déterminés selon la méthode de (DUBOIS *et al.*, 1956) dont le principe repose sur la réaction suivante : l'acide sulfurique concentré provoque, à chaud, le départ de plusieurs molécules d'eau à partir des oses. Cette déshydratation s'accompagne par la formation d'un hydroxy-méthylfurfural (HMF) dans le cas d'hexose et d'un furfural dans le cas d'un pentose. Ces composés se condensent avec le phénol pour donner des complexes colorés (jaune-orangé). L'intensité de la coloration est proportionnelle à la concentration des oses. La densité optique est mesurée à 488 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (annexe 03).

I.1.2.2.7. Mesure des protéines totales

La méthode utilisée est celle de Lowry (1965) dont la principale réaction est la réduction de la tyrosine et le tryptophane entrant dans la composition de la protéine à doser. La concentration de protéines est déterminée par rapport à une courbe d'étalonnage.

I.2. Production de l'enzyme

Dans cette partie, les trois types du lactosérum collecté sont utilisés comme un support de la culture des levures et de production de l' α amylase.

I.2.1. Préparation du milieu de fermentation

I.2.1.1. Milieu de base

Le milieu choisi pour la culture des levures sélectionnées est à base de lactosérum déprotéiné par la technique de précipitation des protéines après ajustement du pH à 4.60 puis chauffé à 100°C pendant 2 h dans un bain-marie, décanté, filtré puis le filtrat est centrifugé à 3000 tour pendant 15 min. Le milieu ainsi préparé est enrichi par addition d'extrait de levure (4 g/l), et Fer d'ammonium sulfate hexahydrate ($\text{H}_2\text{FeN}_2\text{O}_8\text{S}_2$) (4 g/l). le milieu de base est additionné de substrat inducteur (l'amidon à 1%) puis son pH est ajusté à 5 par addition de NaOH et subit une stérilisation à l'autoclave (121°C pendant 15min) puis conserver à 4C° (figure 08).

I.2.1.2. Préparation de l'inoculum

I.2.1.2.1. Préparation de la suspension levurienne

Les souches amylolytiques sont misent en suspension par addition de 9 ml d'eau physiologique et subissent une homogénéisation par agitation.

I.2.1.2.2. Dénombrement des levures

Le nombre des levures est établi par comptage microscopique des levures contenues dans 1mL de suspension levurienne à l'aide de la cellule de Mallasez (annexe 04).

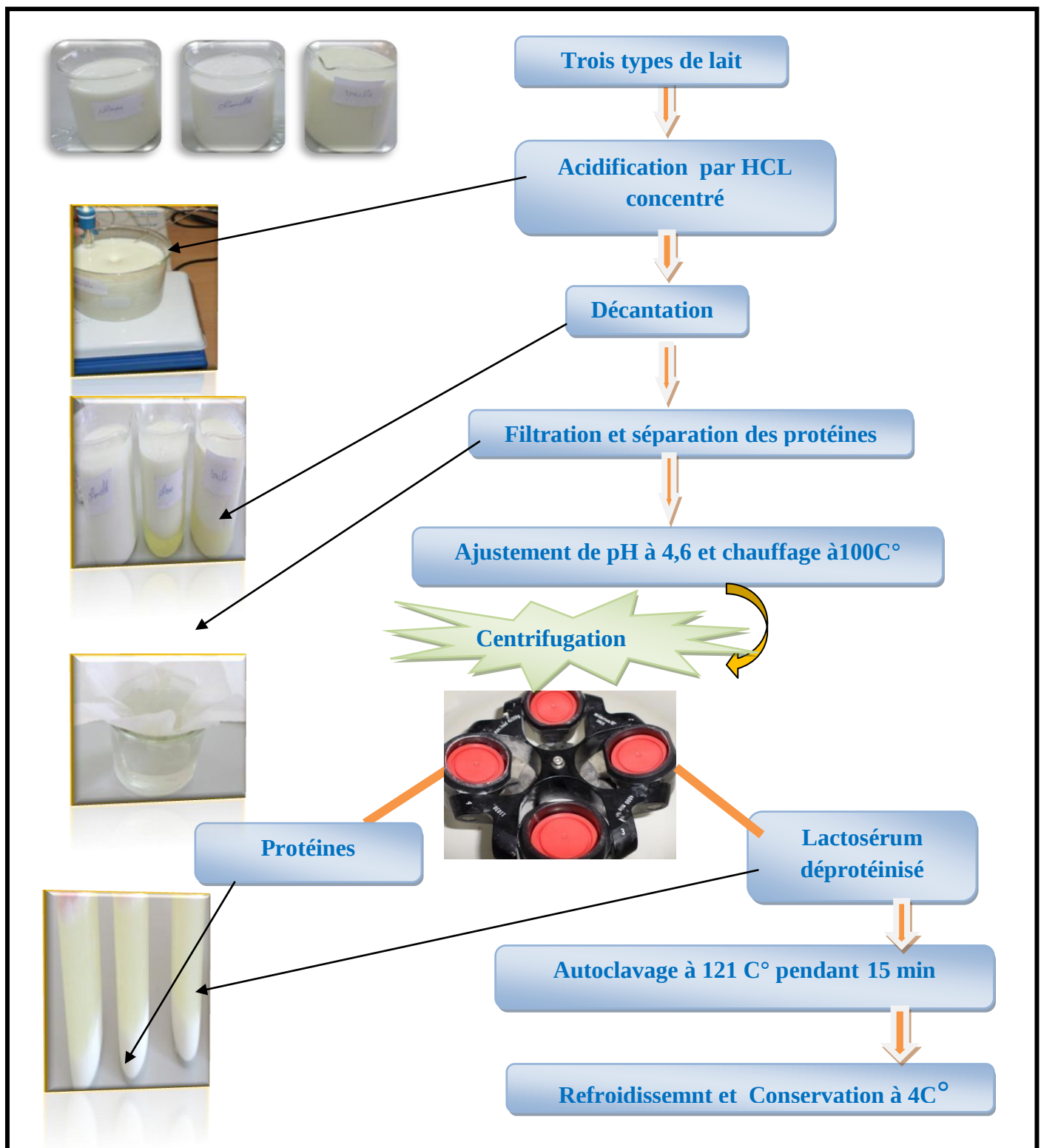


Figure 8 : Préparation du milieu de base

I.2.1.2.3.Ensemencement des milieux de fermentation

Les milieux sont ensemencés à un volume de 1ml de suspension pour chaque 50ml de milieu de culture. Les flacons sont bien fermés puis incubés à 30° C pendant 3J .Des prélèvements quotidiennes ont été effectuées pour les dosages et tous les essais sont effectués en trois répétitions (figure 09).

I.2.2. Dosage des paramètres influençant la cinétique enzymatique:

I.2.2.1.Mesure de pH :

La détermination de pH est effectuée à l'aide d'un pH mètre au Laboratoire de recherche (VTRS), de la faculté de sciences et technologie au l'Université ECHAHID HAMMA LAKHDER El-Oued.

I.2.2.2.Détermination de la biomasse :

La biomasse est séparée par filtration sur papier Wattman N°2. Le poids sec est déterminé après rinçage avec l'eau distillée et séchage dans une étuve réglée à 105 C° jusqu'à poids constant.

I.2.2.3. Dosage des Sucres totaux:

A 1 ml de l'échantillon, 1ml de phénol à 5% et 5 ml d'acide sulfurique concentré sont ajoutés, suivi d'un repos de 10 minutes puis une incubation de 20 minutes à 30°C au bain marie. La densité optique est mesurée à 488 nm à l'aide d'un spectrophotomètre contre une gamme étalon (DUBOIS, 1956) (annexe 3).

I.2.2.4.Dosage de l'activité α -amylasique:

A 1 ml de l'extrait enzymatique tamponnée à pH7 avec du tampon phosphate 0.1M sont ajoutés 1 ml de substrat (solution d'amidon 2g/l). Le mélange est incubé à 50 C° pendant 30 min. La réaction est arrêtée par addition de 0,5 ml HCl suivie de 2,5 ml du réactif de l'iode. L'absorbance est lue à 580 nm contre le blanc (préparé à partir de l'extrait enzymatique dénaturé à 100°C (ZHIZHUANG, 2006) (annexe 05).

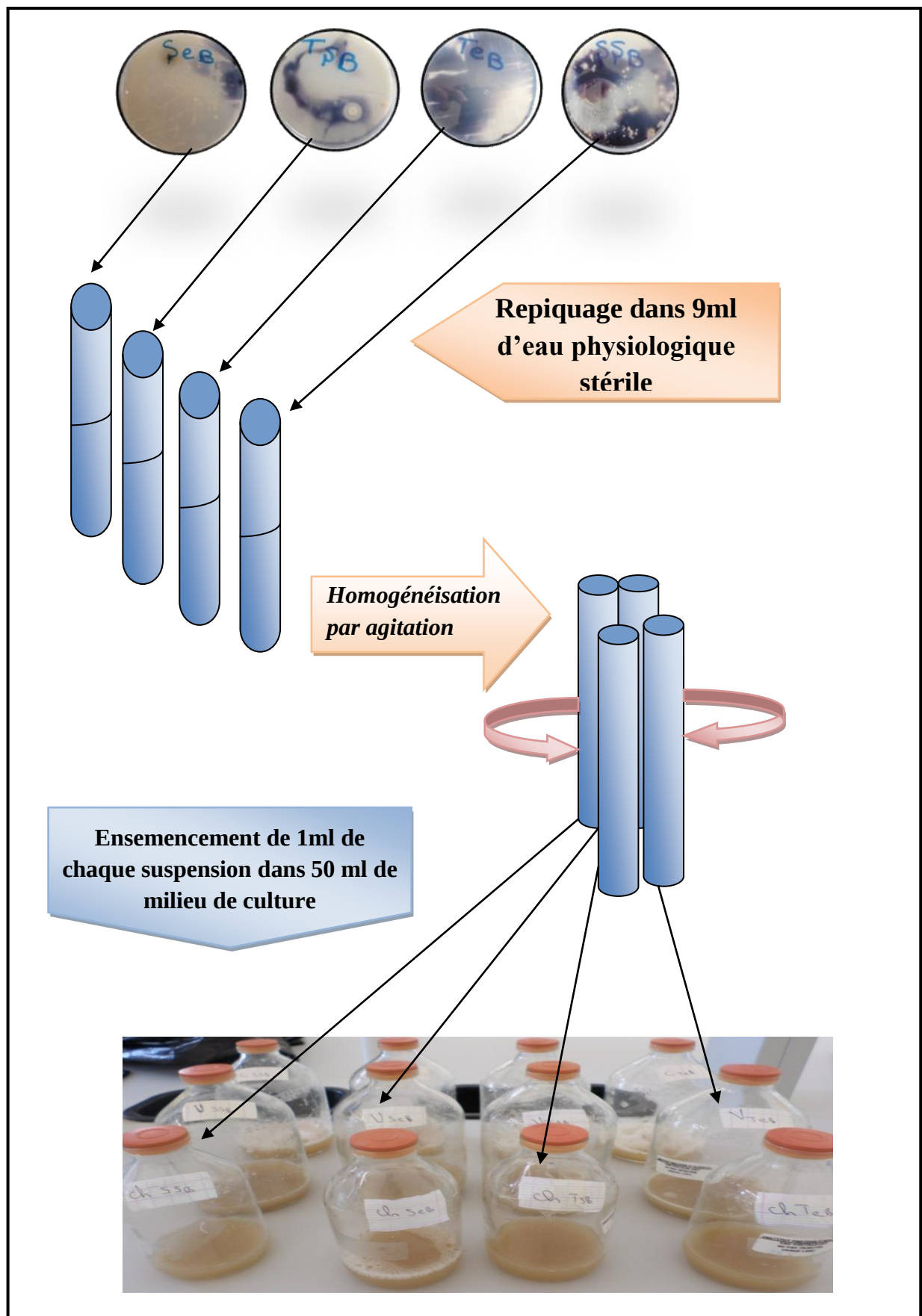


Figure 9 : préparation de l'inoculum

CHAPITRE II :

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Chapitre II. Résultats et discussion

II.1. Analyses physicochimiques du sol :

Les propriétés physicochimiques des échantillons du sol prélevés à partir du Chott et de Tindla ; sont rapportées dans le tableau 05:

Tableau 5: Propriétés physicochimique du sol.

Paramètres	Sol de Tindla	Sol de chott
pH	8,11	8,03
Conductivité électrique (ms /Cm)	55,85	2,79
Humidité(%)	3,84	3,27
Azote(%)	0,03	0,01
Cendre(%)	89,97	98,93

Le tableau 05 montre que le pH des échantillons est légèrement alcalin ; à savoir un pH de 8,11 pour le sol du chott et 8, 03 pour les échantillons du Tindla. Ces valeurs concordent avec les résultats obtenus par Oren (2002) et (Cantrell *et al.*, 2006) ,ces derniers ont observé un pH variant entre 7,3 et 8,2 après l'étude des milieux hypersalins au Puerto Rico ; c'est également ce qu'a révélé l'étude de Stivaletta *et al.*, (2009), ainsi les résultats de Ayad (2012) pour la sebkha Ezzemoul et de Chott Melghir ont révélé un pH neutre à légèrement alcalin (de 7,10 à 7,50) .Le pH légèrement alcalin des sols est dû probablement à la présence du gypse (BOUTAIBA *et al.*, 2011).

Les Sebkha d'où les échantillons ont été prélevés se caractérisent par une salinité extrêmement élevée et un taux de végétation très réduit. Selon Richards (1969), on peut définir le degré de salinité de sol en fonction de sa conductivité.

Ainsi l'échantillon de chott dont la conductivité est 2,79ms/cm (entre 2,4 - 6) est considéré comme étant un sol très salé (Tableau 05). Alors que l'échantillon de Tindla est considéré comme extrêmement salé avec une conductivité égale à 55,85mS /cm (CE > 6) (Tableau 05).

Les analyses des échantillons ont montré que les deux sols sont pauvres en matière organique mais relativement riches en sel minéraux (89,97% et 98,93%) pour l'échantillon de Tindla et El chott respectivement (Tableau 05). L'action conjuguée d'un climat caractérisé par une évaporation intense et la présence d'une nappe peu profonde fait que la plupart des sols ont subi le phénomène de salinisation secondaire (HATTAL., 2001), Ceci est probablement dû à la présence de la végétation au niveau du site (Tableau 05). Elles ont également montré un taux faible d'humidité des sols pour le chott est de 3 ,84% et 3 ,27% pour Tindla. La mesure d'Azote montre la présence d'azote en faible quantité (0,03 et 0 ,01)

respectivement pour le sol de chott et de Tindla montre que les deux sols sont très pauvres en Azote (CALVET et VILMIN., 1986).

Selon les résultats, les deux échantillons sont considérés comme des sols secs et salés avec pH légèrement alcalin, riches en sels minéraux et très pauvres en Azote.

II.2. Analyses d'eaux:

L'étude des propriétés physicochimiques des échantillons d'eaux a donné les résultats mentionnés dans le tableau 06:

Tableau 6 : Analyses physicochimiques et biochimiques des eaux.

Paramètres	Eau Tindla	Eau chott
pH	7,79	7,92
Conductivité électrique (mmoh/cm)	50,3	25,3
Cendre (%)	2,6	2,31
Azote (%)	0,035	0,105

Les valeurs de pH sont neutres et tendent vers l'alcalinité (7,79 et 7,92) pour Tindla et El chott respectivement (Tableau 06). Ces résultats concordent avec ceux obtenus par CRSTRA, en 2013 (7,13 ; 10,8) respectivement enregistrés dans les remontées d'eau dans la vallée d'oued Righ. Ainsi CHAIB *et al.*, (2013), montrent que le pH des eaux oscille entre 7,52 et 8,97 dans la même région. Les valeurs de pH montrent que nos échantillons prélevés à partir de ces régions sont riches en ions carbonate.

Les deux échantillons sont considérés comme des eaux pauvres en matière minérale on révélant des pourcentages des cendres comprises entre 2,6% et 2,31% et elles sont riches en sels avec une conductivité électrique de l'ordre de 50,3 et 25,3 mmoh/cm (Tableau 06). Ce qui concorde avec les résultats de CRSTRA (2013), qui montre que le lac de Tindla a une CE égale à 6,68 mmoh/cm. La valeur élevée de la conductivité électrique est probablement due à la forte évaporation car la région d'étude est caractérisée par un climat aride (une pluviosité faible et des températures élevées, pouvant atteindre les 50 °C en saison estivale).

Par ailleurs, un pH du sol et l'eau, relativement basique, favorise une reproduction rapide des populations bactériennes (ALLEN *et al.*, 1987) au dépens de celle des levures, dont la croissance est optimale à des pH acides (PHAFF *et al.*, 1978). Malgré ces conditions extrêmes, quelques souches levuriennes arrivent à résister, ce qui explique le faible taux de souches obtenues.

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

II.3. Isolement des souches levuriennes

La culture des échantillons de sol et d'eau sur deux milieux (Sabouraud et PDA) a permis l'isolement de 16 souches levuriennes. Les résultats sont récapitulés dans le tableau 07 :

Tableau 7: Isolement des levures à partir des différents échantillons du sol et d'eau

Région	Type d'échantillon	Nombre des souches
El chott	Eau	04
	Sol	04
Tindla	Eau	04
	Sol	04

Après l'incubation ; nous avons isolées 16 souches levuriennes à partir du sol et de l'eau (Tableau 07). Ce nombre est supérieur à celui de 5 souches isolées à partir des sols sahariennes par BENAOUIDA (2008) et MERABTI (2006). Ce taux de population levurienne peut être justifié par le pH du sol, relativement basique favorisant plutôt la croissance des populations bactériennes (ALLEN et AHEARN, 1987). En effet, pour une croissance optimale, les levures préfèrent des pH acides.

II.3.1. Aspect macroscopique et microscopique des isolats :

Après l'incubation pendant 72 h à 25°C, les colonies isolées ont subies à une observation macroscopique. Les principales caractéristiques des colonies sont:

- **Couleur** : blanc, beige, crème
- **Odeur** : des odeurs légèrement alcoolisé ou absence d'odeur
- **Forme** : arrondie, ovale

L'étude macroscopique des colonies permet d'observer la diversité des souches levuriennes dans nos échantillons. L'étude de l'aspect macroscopique des colonies doit être suivie d'une observation microscopique des cellules.

II.3.2. Observation microscopique :

L'observation microscopique des cellules après la coloration par le bleu de méthylène, nous permettons de confirmer l'appartenance des ces cellules au groupe levurienne et de vérifier leurs caractéristiques de la reproduction végétative et sexuelle :

- Morphologie cellulaire : Ovale ou ronde,
- Mode de reproduction : Bourgeonnement unipolaire à multipolaire.

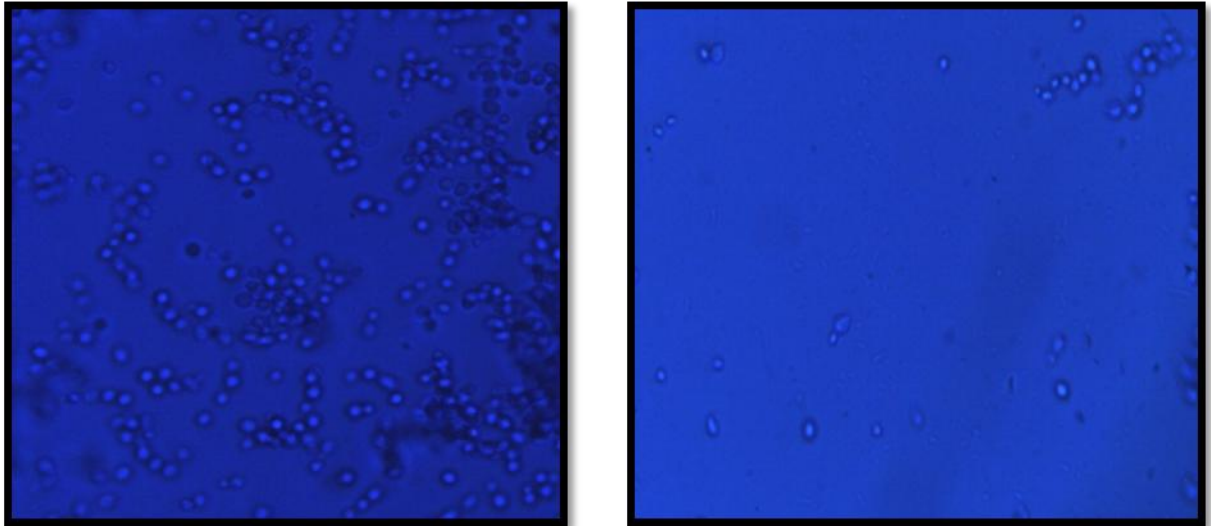


Figure 10 : Aspect microscopique de certaines souches isolées (x40)

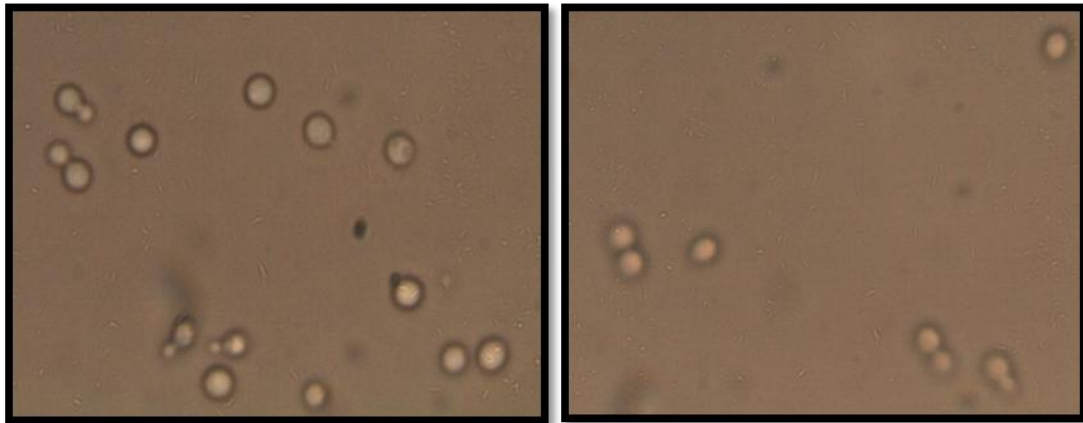


Figure11 : Aspect microscopique de certaines souches isolées (x100)

II.4. Sélection des souches amylolytiques :

Pour la mise en évidence de l'activité amylasique chez les 16 souches isolées précédemment, nous avons utilisé le milieu PDA à 1 % d'amidon (milieu sélectif). Après l'incubation (à 30°C pendant 48 h), nous observons des zones de lyse de différentes dimensions chez 8 souches, quatre souches SEB, TSB, TEB et SSB ont des zones de lyse plus développées par rapport aux autres souches, cela indique la forte capacité à hydrolyser l'amidon (figure 12). Ces souches seront sélectionnées pour la culture dans les trois types de lactosérums (caprin bovin et camelin).

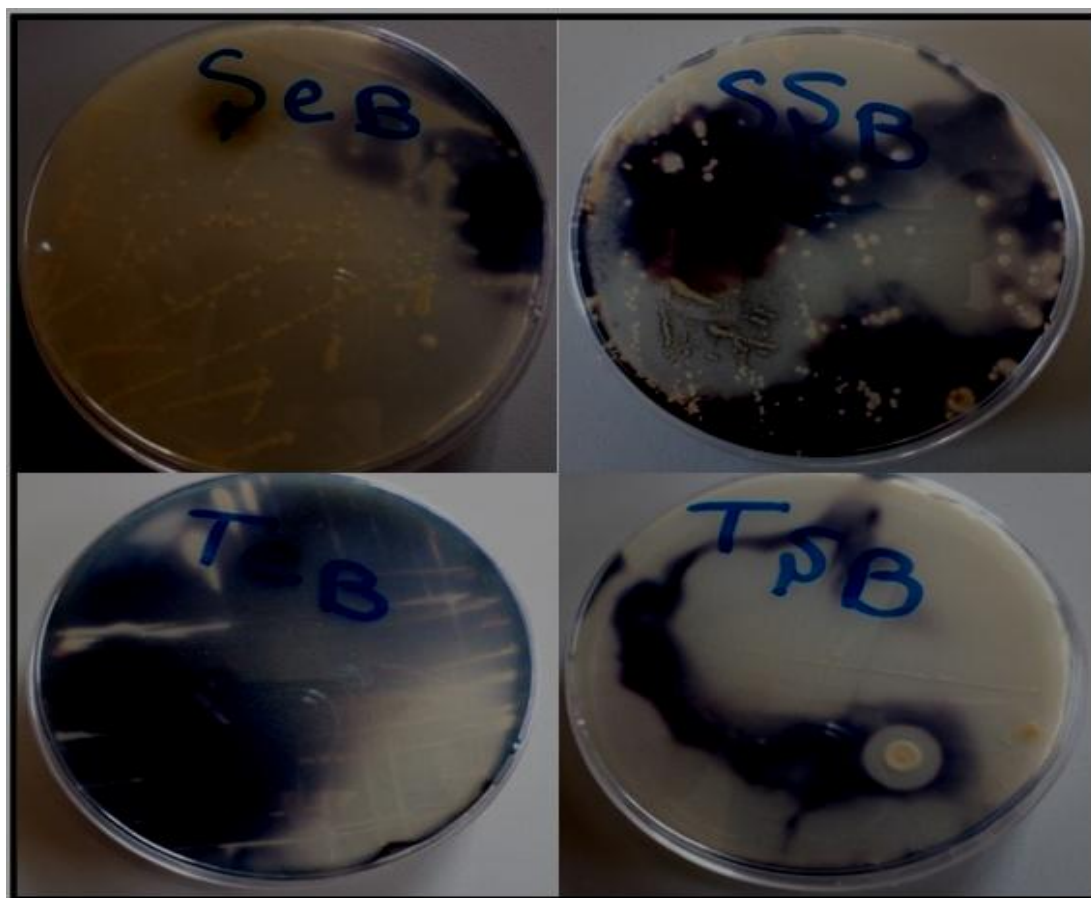


Figure 12: Sélection de souches amylolytiques (Après 48 h d'incubation à 30 °C et à pH 5)

II.5. Propriétés physicochimiques et biochimiques du lactosérum

L'étude de la composition chimique des trois lactosérums bovin, caprin et camelin a donné les résultats représentés dans le tableau suivant :

Tableau 8: Analyses physicochimiques et biochimiques de différents échantillons du lactosérum

Paramètres	Lactosérum de vache	Lactosérum de chèvre	Lactosérum de chamelle
pH	5,06	4,92	2,57
Conductivité électrique (mmoh/cm)	9,44	9,1	40,9
Acidité Dornic (D°)	45°	37°	164°
Cendre (%)	0	1	1
Humidité (%)	93	93	94,42
MS (%)	7	7	5,58
Protéines (g/l)	1,071	0,57	1,74
Sucres réducteurs (g/l)	43,08	42,6	38,5

Ces résultats ont donné un pH de 5,06 et 4,92 pour le lactosérum bovin et caprin respectivement (Tableau 08). Ces résultats sont proche à celle de DENDOUGA (2006) pour le lactosérum bovin, au temps que le pH du lactosérum camelin est très acide (2,57), c'est probablement due à la procédure de séparation (baissement du pH de séparation).

Les valeurs de l'acidité Dornic est de 45°D, 37°D et 164°D pour le lactosérum de vache, de chèvre et de chamelle, enregistrées respectivement (Tableau 08).

Ces résultats sont supérieures à celles indiquée par Adrian *et al.*, (1991) ; à savoir une acidité de l'ordre de 18°D. Ceci est dû à l'acidification du lait avec l'acide chlorhydrique (HCl).

Par ailleurs, La concentration des protéines est de 1,071g/l pour le lactosérum bovin, ceci est inférieure à celui rapportée par BOUCHERIT (2011), pour un lactosérum bovin industriel (1,221 g/L). Pour le lactosérum caprin et camelin; la concentration des protéines est de 0.57 et 1,74 g/L respectivement (Tableau 08).

Les conductivités électriques mesurées sont de 9,44 et 9,1mmoh/cm respectivement pour lactosérum de vache et de chèvre qui semblent très proches à celles rapportées par ALAIS (1975) et JEANTET (2007), soit de 6-8 mmoh/cm et 9 mmoh/cm respectivement. En effet le lactosérum de chamelle présente une conductivité de 40,9 mmoh/cm, ce qui montre la richesse de ce dernier en électrolytes et en sels minéraux et probablement son degré d'acidification lors de la séparation (Tableau 08).

Le tableau 08, indique également que nos échantillons contiennent des quantités moyennes en sucres réducteurs égale à 43,08 g/l et 42,6 g/l, respectivement pour le lactosérum de vache et de chèvre, et de 38,5 g/l pour lactosérum de chamelle. Ces valeurs sont comparables à celles citées par BOUCHERIT (2011) ; à savoir une concentration en sucres réducteurs de 44,17 g/l pour un lactosérum bovin industriel. Les taux élevés de l'humidité (Tableau 08), pour le lactosérum de vache et de chèvre est égale à 93% et de 94,42% pour le lactosérum de chamelle ce qui indique la richesse des trois échantillons en eau et leur pauvreté en matière sèche ; à savoir un taux de 7 % pour lactosérum de vache et de chèvre et 5,58% pour lactosérum de chamelle (Tableau 08). Ceci se concorde avec les normes pour le lactosérum acide à de 6,5% de matière sèche cités par FAO (2002).

La composition chimique, de lactosérum révèle un milieu d'une grande valeur alimentaire (sucres, protéines, sels minéraux). Ce sous produit laitier peut donc être employé comme un milieu de fermentation pour la production de l' α -amylase. Ce recyclage évite la pollution de la nature par la prolifération microbienne. Par ailleurs, GANA et TOUZI (2001) préconisent la revalorisation du lactosérum après sa déprotéinisation pour la production de biomasse par des levures lactiques.

II.6. Etude cinétique de la production enzymatique.

La cinétique de la production de l' α -amylase par les différentes souches sélectionnées (TEB, TSB, SSB et SEB) et cultivées dans un milieu à base de lactosérum bovin, caprin et camelin. Elle est étudiée au cours de la fermentation par l'évaluation des paramètres du milieu.

II.6.1. Evolution du pH

Le pH du milieu de production de l'enzyme est initialement ajusté à 5. La figure 13 montre l'évolution du pH des trois milieux au cours de la fermentation.

On observe une variation faible de pH (fig. 13), ce dernier varie à son tour d'une souche à l'autre en fonction de la durée d'incubation, où il diminue progressivement dès les premières heures d'incubation pour toutes les souches et atteint des valeurs faibles à la fin de la fermentation. Le milieu qui présente une variation considérable de pH pour les 4 souches est le LC ; à savoir une diminution atteignant des valeurs autour de 3 (fig. 13).

Pour les deux autres milieux LCH et LV, cet abaissement du pH atteints des valeurs autour de 4 (fig. 13). Ce qui concorde avec les résultats de BENAOUIDA (2008) et ZOUBIRI (2012) qui affirment que le pH varie entre 5 et 4 dans le lactosérum et sirop de datte respectivement, pour la production d' α -amylase levurienne.

Cependant, le pH diminue suite à la formation d'acide organiques (acides succinique, acétique, formique) à partir des glucides (GANCEDO et SENANO, 1989).

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) et Prieto (1995), rapportent pour l' α -amylase, un pH optimum acide : 4 -4.5 pour *Lipomyces starkeyi* et 4.5-5.0 pour *Lipomyces kononenkoae* respectivement.

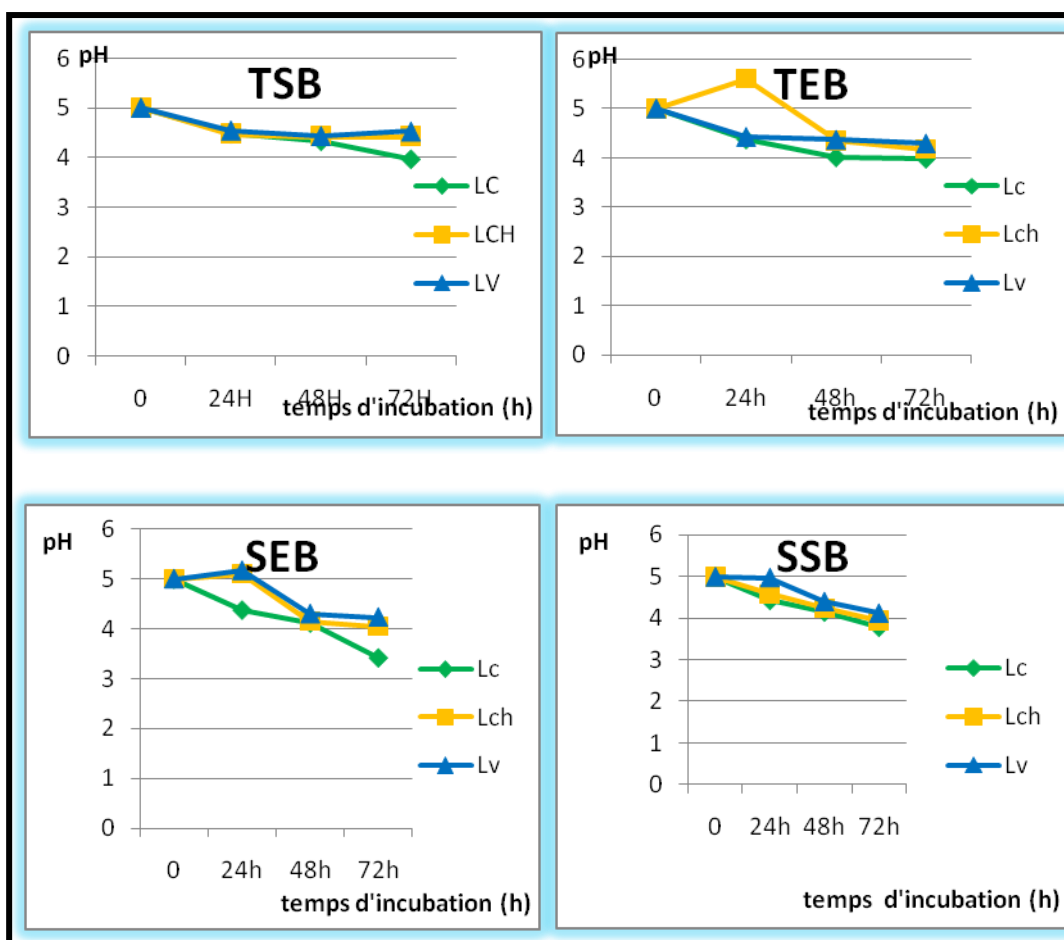


Figure 13: Evolution du pH des souches SSB, SEB, TSB et TEB dans les 3 milieux de lactosérum.

II.6.2. Evolution de la biomasse :

L'évolution de la biomasse est présentée par la figure 14 où les souches TSB, TEB, SSB et SEB montrent une cinétique de croissance microbienne durant les trois jours de culture.

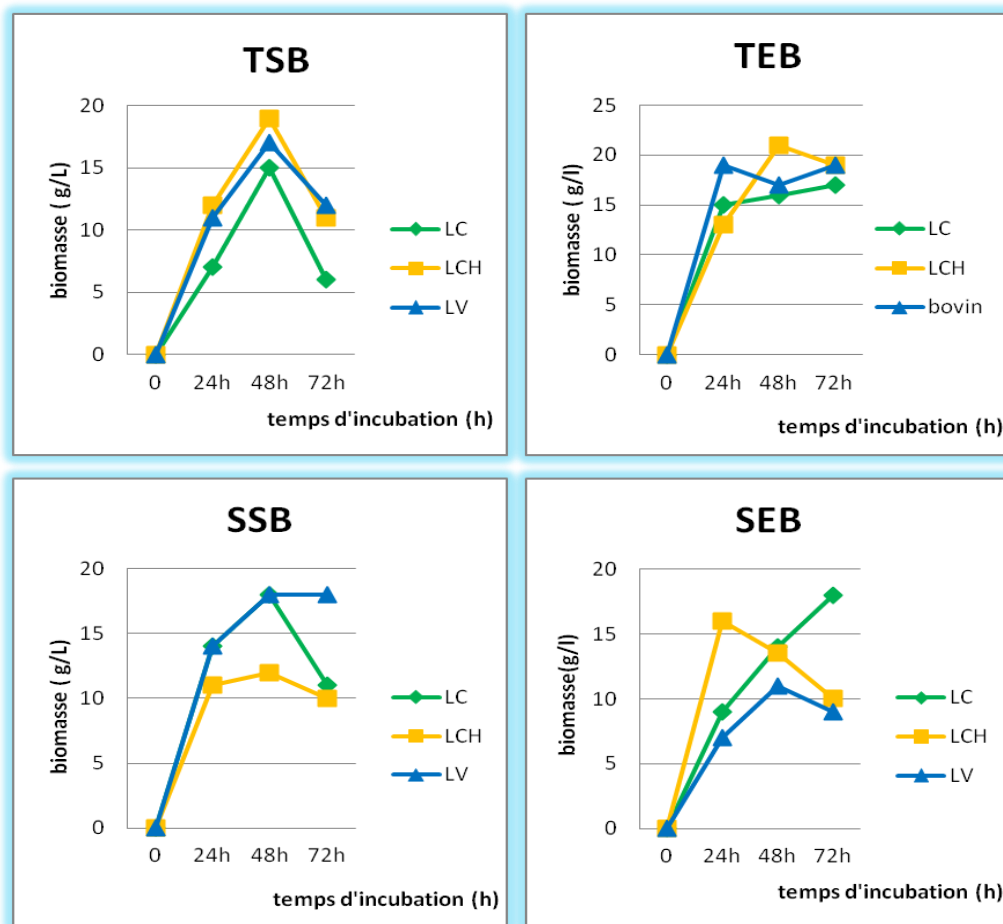


Figure14 : Evolution de la biomasse des souches SSB, SEB, TSB et TEB dans les 3 milieux de lactosérum.

On observe généralement une augmentation progressive de la biomasse dans les trois milieux, dès le 1^{er} jour de culture est autour de 14g/L, pour atteindre des valeurs maximales pendant le 2^{ème} jour est d'environ 20g/L, puis on remarque une diminution de ses valeurs jusqu'au 3^{ème} jour à environ 16 g/L (fig. 14). Selon BOUCHERIT (2011), la phase de latence dure 24 h et correspondant à l'adaptation et à la germination de l'inoculum et que la phase exponentielle dure 120 h (du 2^{ème} jusqu'au 7^{ème} jour), elle est caractérisée par une croissance rapide avec une valeur la plus élevée de 21g/L. Elle est rapportée par la souche TEB dans le lactosérum caprin dans le 2^{ème} jour, ceci est inférieur à celui de SACI (2012) à

savoir une valeur de 48,54 g/L pour une souche d'Actinomycète isolée à partir de sol salin cultivée dans un milieu à base de déchet d'orange. Nos résultats est plus supérieur à ceci de BOUCHERIT (2011), qui est signale une valeur de 6,42 g/L par *Aspergillus sp* isolé à partir de sebkhas cultivé a base de lactosérum industriel.

Durant le 3^{ème} jour, la valeur la plus faible de biomasse est marquée par TSB dans le milieu LC (7g/L) (Fig. 14) où la concentration cellulaire viable diminue du fait de la lyse cellulaire causée par les conditions devenues défavorables dans le milieu (épuiement en source d'énergie). Cette valeur concorde avec ceci de BENAOUIDA (2008) qui est trouvé une valeur de 7g/L.

Malgré l'acidification excessif pendant la procédure de séparation, les milieux LC et LCH sont les plus rentables en biomasse pour les quatre souches en présentant des valeurs très élevée par rapport au milieu LV et au lactosérum industriel (BENAOUIDA ., 2008 et BOUCHERIT., 2011) ,

II.6.3. Evolution de la concentration des glucides :

La figure 15 illustre l'évolution de la concentration des glucides durant l'incubation.

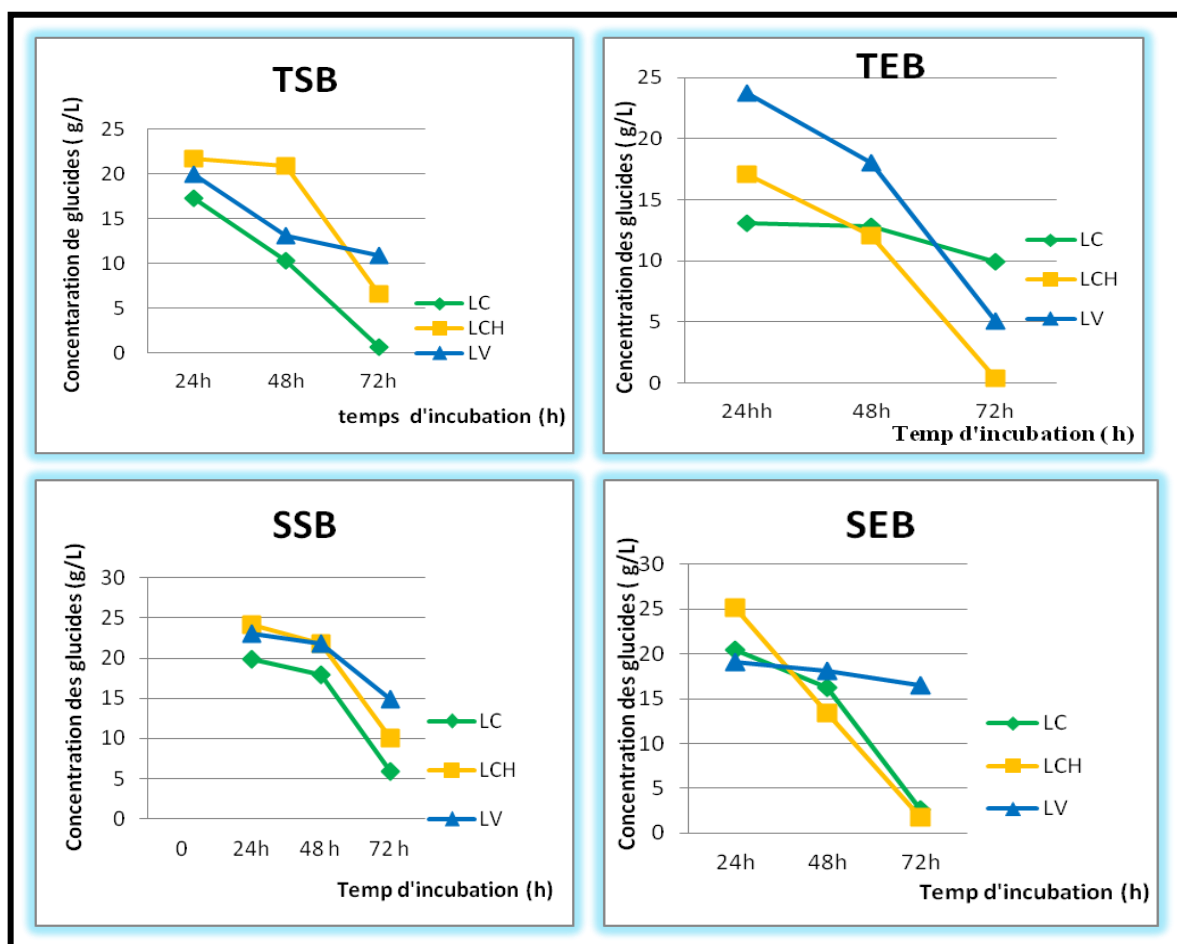


Figure 15: consommation des glucides par les souches TSB, TEB, SSB et SEB dans les 3 milieux de lactosérum.

La consommation des glucides varient selon la souche et le milieu de culture. Au cours de la fermentation la teneur du milieu en sucres diminue à partir du 1^{er} jour, ensuite la consommation des glucides devient importante dans les trois milieux pour les quatre souches.

Nous notons une diminution la plus rapide de 25,13 g/L à 1,78 g/L marqué par la souche SEB dans le milieu LCH comparativement avec les autres souches (fig. 15). Nos résultats est supérieur à celle-ci obtenue par MERABTI (2006) en remarquant une diminution rapide de concentration des sucres de 8,83 à 6 g/L dans le sirop de datte par *lipomyces* sp.

La diminution des concentrations des glucides dans le lactosérum est due à leur assimilation par les levures pour ses activités métaboliques (ZOUBIRI., 2012).

Les milieux LC et LCH sont les plus convenables pour l'assimilation des glucides par les quatre souches par rapport au milieu LV.

II.6.4. La production de l' α –amylase

La figure 16 montre un début d'apparition d' α -amylase durant 24 heures d'incubation, pour toutes les souches dans les trois types de lactosérum. 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 lactosérum pour leur croissance (LEVEAU et BOUIX., 1993).

Cependant, au-delà de 24 heures et avec l'épuisement des sucres fermentescibles, les souches secrètent des enzymes extracellulaires, telles que l' α -amylase leur permettant de dégrader l'amidon pour garantir leur survie. (ZOUBIRI., 2012).

La production de l'enzyme se manifeste par une augmentation progressive d'activité amylolytique qui atteint une quantité maximale de 708 U pour la souche TSB cultivée dans le milieu LV (fig. 16). Ce résultat est supérieur à celui de MERABTI (2006), à savoir une valeur de 571 U marquée par la souche *lipomyces* sp. isolée à partir du sol saharien et cultivée dans un milieu à base rebut de datte. Nos résultats est inférieur à celui rapporté par Djekrif-Dakhmouche *et al.*, (2006), d'où l'activité amyliasique d'une culture mixte d'*Aspergillus niger* et *Rhodotorula* sp. dans le lactosérum est de 8124 U.

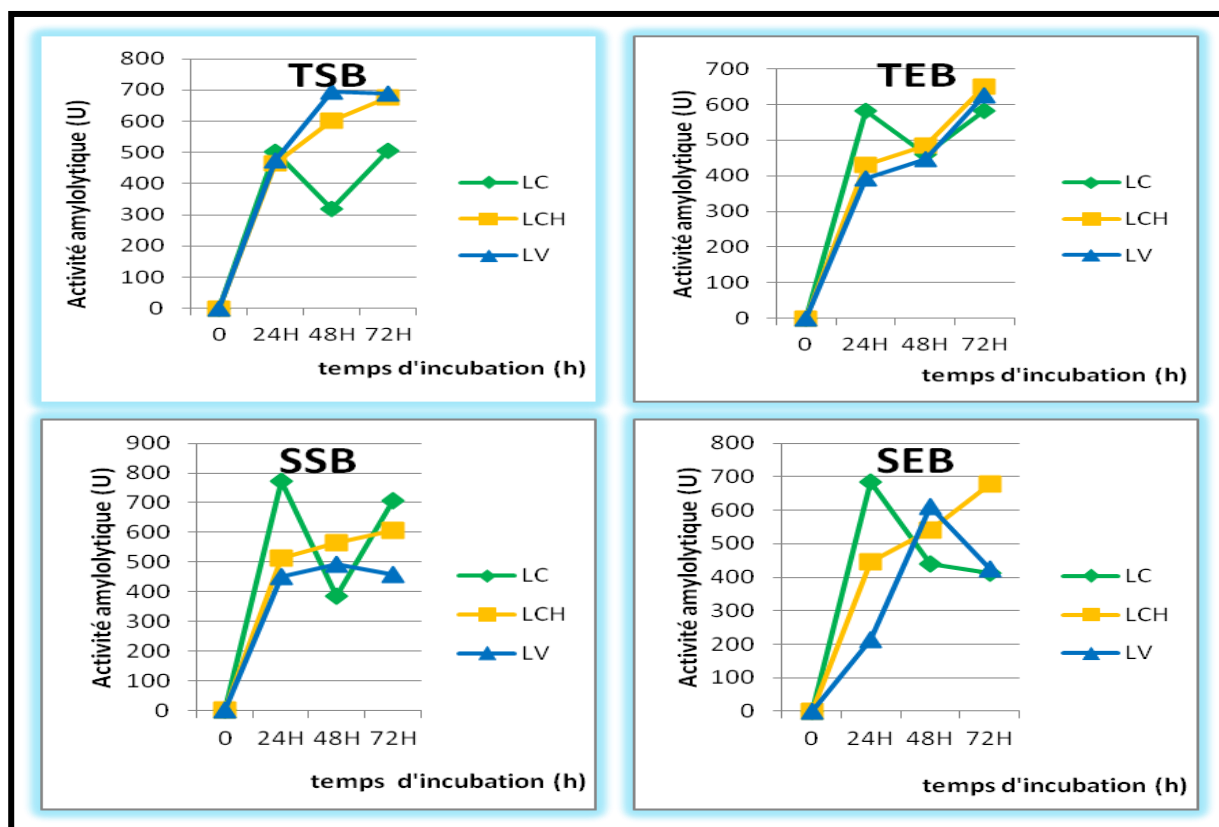


Figure 16: Evolution d'activité amylolytique dans les 3 milieux de lactosérum de les souches TSB,SSB, SEB et TEB.

II.7. Optimisation de la production de l' α -amylase

Le temps de fermentation nécessaire pour arriver à l'activité amylasique optimale ainsi que l'évolution de la biomasse et l'assimilation des glucides varie d'une souche à une autre et d'un milieu de fermentation à un autre

II.7.1. Optimisation de production de l' α -amylase par la souche TSB :

Selon les résultats de la figure 17, le temps d'arriver à une activité amylolytique maximales par la souche TSB se diffère d'un milieu à un autre. Le maximum d'activité a été marqué après 24 heures dans le milieu LC (771U), 48 heures dans le milieu LCH (690U) et après 72 heures dans le milieu LV (690U) (fig. 17), cette différence de temps de production de l'enzyme est probablement due à la teneur de chaque milieu en sucres fermentescibles et facilement assimilable (une consommation considérable des glucides dans le milieu LC).

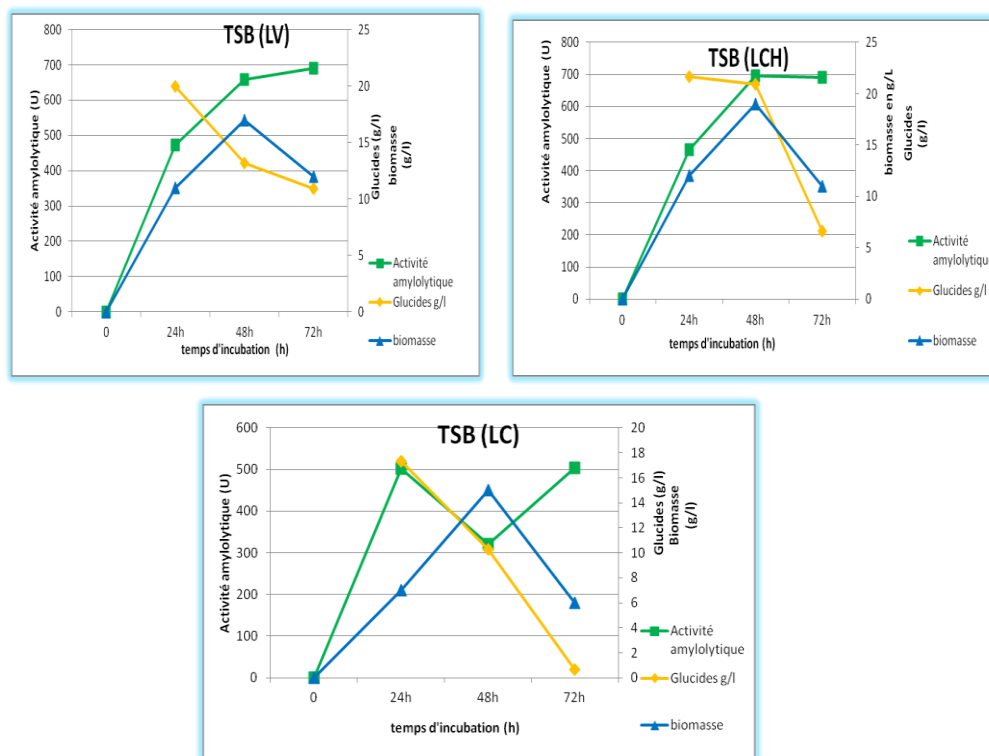


Figure17 : Evolution cinétique de la production au cours de la fermentation de la souche TSB.

II.7.2. Optimisation de production de l' α -amylase par la souche TEB :

D'après la figure 18, la production de l'enzyme par la souche TEB est maximale généralement après 72 heures de fermentation, c'est dans les milieux LCH et LV où on remarque des valeurs maximales d'activité amylasique autour de 600U (fig. 18), au temps qu'elle atteint cette valeur dans le milieu LC après 24 heures seulement, mais cette dernière semble non stable durant la suite de fermentation.

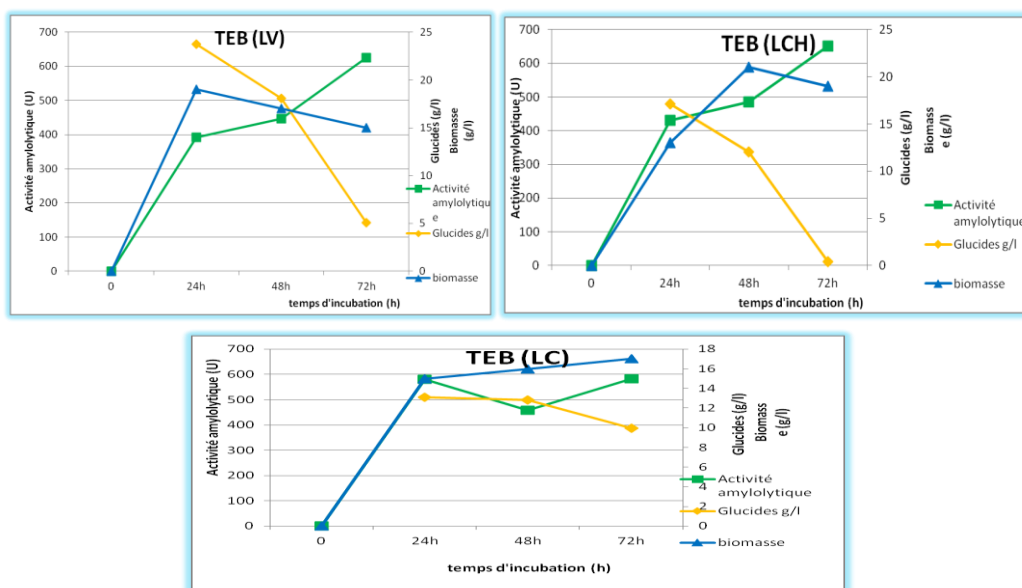


Figure18 : Evolution cinétique de la production au cours de la fermentation de la souche TEB

II.7.3. Optimisation de la production de l' α -amylase par la souche SSB

L'évolution des paramètres de la culture de la souche SSB ; à savoir la biomasse, l'assimilation des glucides et la production de l' α amylase est représentée dans la figure 19.

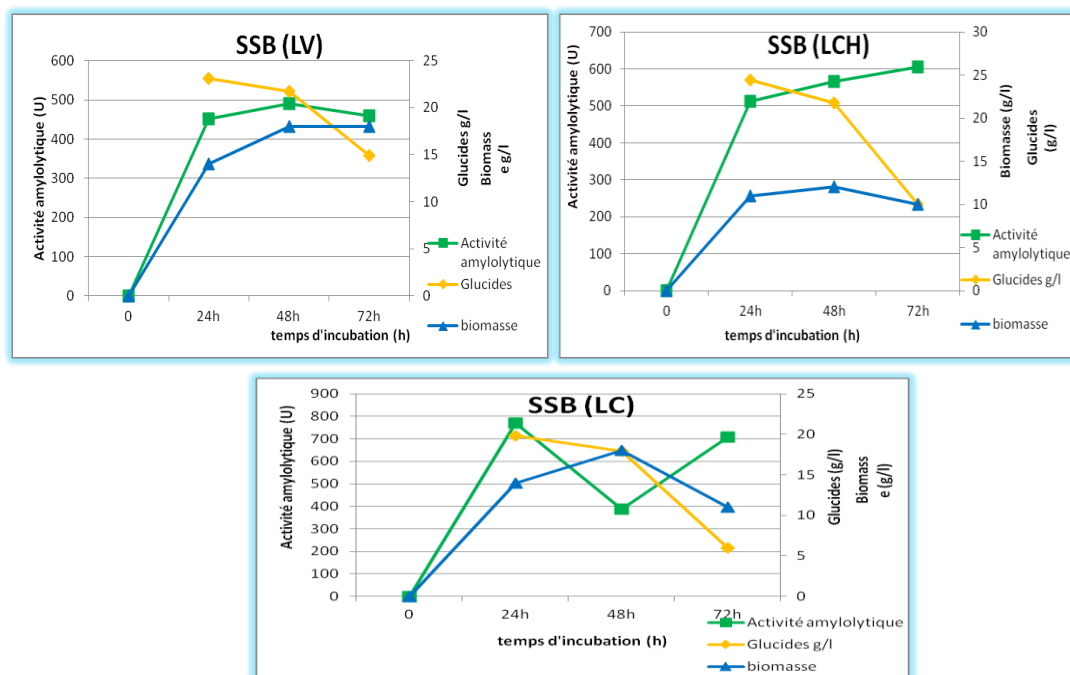


Figure 19 : Evolution cinétique de la production au cours de la fermentation de la souche SSB

Les valeurs de l'activité amylolytique marquée par la souche SSB, devient maximales à la fin de fermentation dans les deux milieux LV et LCH avec 491 et 605 U respectivement (fig. 19). Au temps que l'arriver au maximum d'activité dans le milieu LC se manifeste dans les premier 24 heures de la fermentation, ce qui est due à l'évolution de la production de l'enzyme amylolytique au cours de la fermentation, expliquer par l'évolution de nombres d'individu levuriennes, qui est à son tour traduit par l'augmentation de la biomasse.

II.7.4. Optimisation de production de l' α -amylase par la souche SEB :

Dans les milieux LV et LC la souche SEB présente un maximum d'activité amylolytique après 48 heures de fermentation avec des valeurs élevées variées entre 600 et 700U ce qui montre le taux élevé de production enzymatique (fig. 20). Dans le milieu LC on atteint le maximum est de 685 U après 24 heures, mais cette valeur ne se stabilise pas au cours de la fermentation, on peut déduire que l'enzyme produite est instable dans ce milieu par rapport au autre milieu (fig. 20).

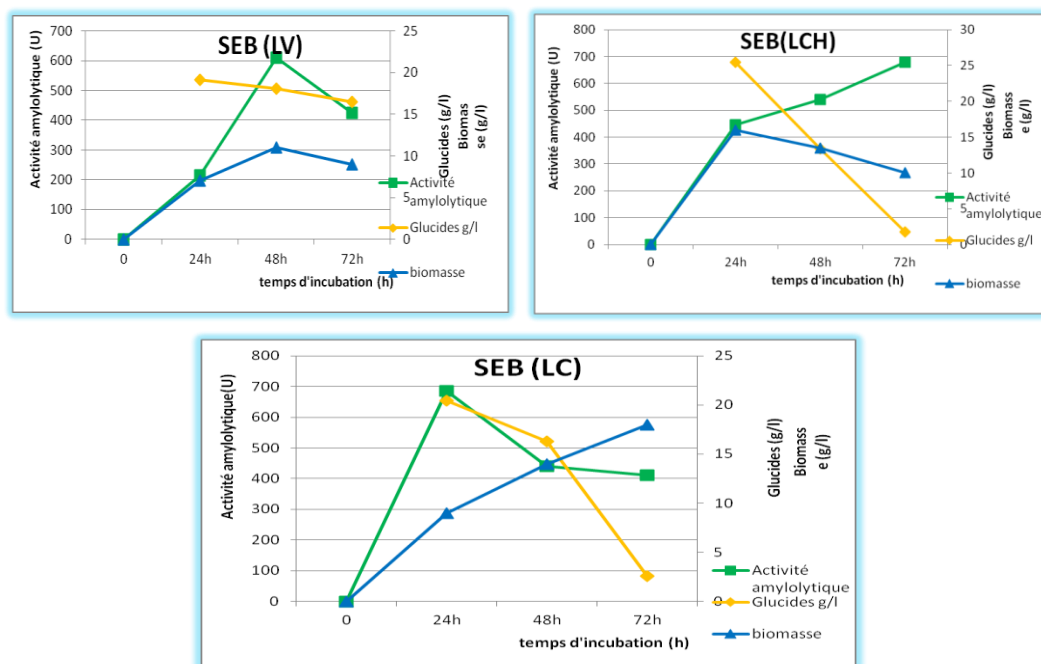


Figure 20: Evolution cinétique de la production au cours de la fermentation de la souche SEB

Au cours de la fermentation, l'activité amylasique évolue en parallèle avec la biomasse et antiparallèle avec la concentration des glucides chez TSB, TEB, SSB et SEB dans les trois milieux LV, LCH, et LC (fig. 20). La juxtaposition des profils de biomasse et d'activité amylasique traduit une synthèse associée à la croissance (KOCHER et KATYAL., 2003 ; TATSINKOU *et al.* , 2005).

On note globalement une similitude entre l'augmentation de l'activité enzymatique et la dégradation des glucides, ce qui laisse suggérer que l' α -amylase est produite aux dépens de la dégradation de l'amidon et des oligosaccharides (fig. 20). Le même constat a été signalé par DJOULDE (2004), suite à la fermentation du manioc par sa propre microflore (levures, moisissures et bactéries).

La souche SSB présente la activité amylasique la plus élevée avec 771 U dans le milieu LC, donc elle est considérée comme la plus productrice d' α –amylase (fig. 20). Tandis que les souches TSB, TEB et SEB présentent leurs maximums d'activité amylasique avec des valeurs de l'ordre de 695, 651 et 679 U respectivement dans le milieu LCH (fig. 20).

L'optimisation de la production de l' α –amylase, nous a permis de considérer le milieu LCH comme le milieu le plus convenable pour la production enzymatique par les souches TSB, TEB, SSB et SEB, comparativement aux autres types de lactosérums LV (690 U), LC (771 U) et d'autres supports rebut de datte (158 U) d'après MRABTI (2006) et déchets d'oranges (530 U) selon SACI (2012) par des souches amylolytiques.

CONCLUSION

Conclusion

Notre étude comporte sur la sélection et la caractérisation des souches levuriennes amylolytiques isolées du sol et d'eau de deux régions sahariennes (Lac de Tindla, et El Chott) et la production de l' α -amylase par fermentation dans un milieu à base de trois types de lactosérum (camelin, bovin et caprin).

Une analyse des paramètres physicochimiques et biochimiques des échantillons du sol et d'eau sont effectuées. Celle-ci montre que les deux sites de prélèvement des échantillons de sol et d'eau sont pauvres en Azote, et se caractérisent par des pH basique avec une salinité élevée, ce qui permet de les classer comme des milieux extrêmes pour la survie des levures.

En effet, l'isolement des levures sur les milieux Saboraud et PDA, a permis de répertorier **16 souches** levuriennes. Pour la sélection, nous avons utilisé un milieu PDA à 1% d'amidon. Seules les souches SSB, SEB, TSB et TEB ont révélé des activités amylolytiques importantes, ces dernières ont été retenues pour la production enzymatique.

L'étude de la composition chimique des trois lactosérums acides a révélé la richesse de lactosérum camelin en protéines (**1,74 g/L**) par rapport aux autres types, en effets ; le lactosérum bovin et caprin est les plus riches en sucres réducteur (**43,08** et **42,6 g/L**) qui peuvent servir de source de carbone et d'énergie.

L'étude de la production de l' α -amylase par des souches levurières cultivée dans ces milieux, révèle que la souche **SSB** est la plus performante, où la production enzymatique atteint son maximum de **771U** après **72 heures** de fermentation dans le lactosérum camelin. La souche **TEB** dans le lactosérum caprin donne un rendement en biomasse de **21g/L** en 3 jours. Une diminution rapide et considérable dans les concentrations des glucides de **25,13 g/L à 1,78 g/L** a été marquée par la souche **SEB** dans le milieu **LCH**.

Le pH des milieux semble stable autours de (**pH=4**) durant la fermentation, ce dernier est estimer comme le pH optimum pour la production de l'enzyme par toutes les souches. Pour les valeurs de pH des milieux de fermentation, la souche **SSB** a été capable de dévier le pH dans le lactosérum camelin de 5 à **3,77**, elle est alors la souche la plus productrice des acides organiques.

Les profils de cinétique des productions de biomasse et d' α -amylase sur les trois types de lactosérum chez les quatre souches, mettent en évidence que les deux maximums de l'activité α -amylasique (**771U**) (**SSB** dans **LC**) et de la biomasse (**21g/L**) (**TEB** dans **LCH**)

sont obtenus après 48 jusqu'aux 72 heures de fermentation. Cette superposition des profils indique que les deux produits sont corrélés positivement entre eux mais inversement avec la concentration des glucides qui se diminue au cours de la fermentation.

Les souches **TEB**, **TSB** et **SEB** sont les souches amylolytiques les plus performantes, en assurant une activité enzymatique autour de 600U dans les trois milieux de lactosérum.

Le lactosérum caprin (LCH) est le milieu le plus convenable pour l'obtention du maximum d'activité amylasique et de biomasse par les quatre souches amylolytique TEB, TSB, SSB et SEB isolées à partir du sol et d'eau.

Ces résultats intéressants nécessitent d'autres travaux complémentaire qui portent sur :

- L'identification des souches isolées.
- L'optimisation du milieu de production de l' α -amylase, à base de lactosérum, afin d'augmenter le rendement enzymatique.
- La purification de l'enzyme pour une éventuelle utilisation de l' α -amylase en industries alimentaires ou pharmaceutique est recommandée.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques

- ABIDI N., 2009-** Valorisation du lactose et du lactosérum en acide succinique par fermentation bactérienne. Mémoire de maître es Sciences (M. Se.). Université LAVAL. Québec. 86p.
- ADRIAN J ., BOURLIER G., ET SABEL A., 1980-**Composition minérale du lactosérum. Influence des facteurs technologiques, saisonniers et géographiques. Ed. C.N.A.M, Paris. 457p.
- AFNOR., 1986** - Les dossiers de la normalisation ISSN, (2), 8297,4827.
- ALAIS C., 1984-**Sciences du lait. Principes des Techniques Laitières. Ed. SEPAIC (4ed) , Paris. In SCHUCK P *et al .*, 2004.
- ALLEN N.H and AHEARN D.G., 1987-** Ecology of Aquatic In : Rose A.H., Harrison J.S. (eds), The yeast, V1, Biology of yeast. 2 nd edition Academic Press. London. p: 123- 174.
- ALPHONSE M., JOSE D., ET BERNARDA., 2004** -Cours de microbiologie générale avec problèmes et exercices corrigés. Ed. Wolters Kluwer, France 430 p.
- AUDIC J.L., CHAUFER B. and DAUFIN G., 2003** -Non-food applications of milk components and dairy co-products : A review. INRA, EDP Sciences: 417-438.
- AUDIGIE C.L., FAGERELLA J., ZONSZAIN F., 1984-** Manipulation d analyse biochimique. Edition Tec & Doc, Lavoisier. Paris. p : 270.
- AULIFFE M-K. W., SCOTTER D-R., MACGREGOR A-N., EARL K-W., 1982-**Casein whey waste water effects on soil permeability. Journal of Environmental Quality, 11 : 31 -34.
- AYAD R., 2011.**Screening d'activités hydrolytiques extracellulaires chez des microorganismes halophiles aérobies isolés d'environnements hypersalins de l'Est algérien. Mémoire Magister. Université Mentouri. Constantine. 118p.
- BENAOUIDA K., 2008** -Etude de l'alpha amylase de levures isolées d'un écosystème extrême (sol environnant des sources thermales) et cultivées sur un milieu à base de lactosérum. Mémoire Magistère. Université Mentouri. Constantine. 104p.
- BENDIMERAD N., 2013-**Caractérisation phénotypique technologique et moléculaire d'isolats de bactéries lactiques de laits crus recueillis dans les régions de l'Ouest Algérien. Essai de fabrication de fromage frais type «*Jben*. ». Thèse de Doctorat. Tlemcen. Université Aboubekr Belkaid. 255p.
- BERRY D., and PATERSON A., 1990** -Enzymes in food industry In: Sucking C.J.(ed.),Enzyme chemistry impact and application. Edition champman and hall London, 2nd edition.p: 306-351.

- BHELLA R-S., et ALTOSSAR I., 1987**-Translational control of α -amylase gene expression in *Aspergillus awamori*. Biotechnology and Applied Biochemistry. 9 :287-293.
- BONALY R., 1991** -Morphologie et reproduction asexuée des levures Ds : Larpent J.P., Biotechnologie des levures. Masson, Milan Barcelone Bonn. Paris. p : 4-18.
- BOTTON B., 1991** - La physiologie des levures Ds : Larpent J.P., Biotechnologie des levures. Masson, Milan Barcelone Bonn, Paris :97-127.
- BOTTON B., BRETON A., FEVER M., GAUTHIER S., GUY P., LARPENT J-P., REYMOND P., SANGLIER J-J., VAYSSIER Y., and VEAU P., 1990** -Moisissures utiles et nuisibles d importance industrielle. 2ème édition. Masson. Collection Biotechnologies :34-381.
- BOUBEZARI M-T., 2010**- Contribution a l'étude des caractéristiques physicochimiques et mycologiques du lait chez quelques races bovines, ovines et caprines dans quelques élevages de la région de Jijel. Mémoire Magister. Université Mentouri Constantine. 124p.
- BOUCHERIT Z., 2011**- Production et étude de propriétés de la protéase acide d'une moisissure isolée de Sebkha. Mémoire Magistère. Université Mentouri. Constantine. 71p.
- BOUIX M., et LEVEAU J-Y., 1991** -Les levures Ds : Bourgeois C.M., Leveau J.Y., Techniques d'analyse et de contrôle dans les industries agroalimentaires. Ed. édition 2 Lavoisier-Tec &Doc, Paris. 3 : 206-229.
- BOURGEOIS C-M., MESCLE J.F. et ZUCCA J., 1988** - Microbiologie alimentaire, Tome 1. Aspect microbiologique de la sécurité et de la qualité alimentaires. Ed. Technique et Documentation. Lavoisier, Paris. 8: 161-171.
- BOUTAIBA S., HACENE H., BIDLE K.A et MAUPIN-FURLOW J.A., 2011**-Microbial diversity of the hypersaline Sidi Ameur and Himalatt Salt Lakes of the Algerian Sahara. J Arid Environ 75: 909-916.
- CALVET G et VILMIN P ., 1986**.interprétation des analyse de sol. Ed. société commerciale de la potasse et de l'azote 24 p
- CANTRELL S-A., CASILLAS-MARTINEZ L et MOLINA M., 2006**. Characterization of fungi from hypersaline environments of solar salterns using morphological and molecular techniques. *Myco. res.* **110** : 962 – 970.
- CHIBA S., 1988**. Amyloglycosidase. In. Handbook of Amylases and related enzymes (The Amylase Research Society of Japan, éd.). Pergamum Press, Oxford, U.K : 104-116.
- CHUNG-AN L ., ENG-KIAT L AND SU-MAY Y., 1998** -Sugar Response Sequence in the Promoter of a Rice α -Amylase Gene Serves as a Transcriptional Enhancer. J Biol Chem, 17 : 10120-10131.

- COFALE C., 2006** -Caractérisation des levures de boulangerie. Adopté par Comite de Fabrication de levures de panification de l union européenne, Paris : 1-10
- CROGUENNEC T., JEANTET R., et BRULE G., 2008**-Fondements physicochimiques de la technologie laitière. Ed. Lavoisier, Paris. 176 p.
- DENDOUGA W., 2006**-Isolement et identification de moisissures productrices de protéases à partir de milieux extrêmes. Extraction et étude des propriétés de la protéase produite. Mémoire de Magister. Université Mentouri. Constantine. 84p.
- DE WIT J.N., 1981**-Structure and fonctional behavior of whey proteins Netherlands milk and Dairy journal. Vol (35): 47-64.
- DE WIT J.N., 1989** -The use of whey proteins products, in developments in dairy chemistry, Fox, P.F. Ed. Elsevier applied science, New York, Vol (4). 323p.
- DE WITT J.N., 2001**-Manuel de l'Enseignant sur le Lactosérum et les Produits de Lactosérum, 1^{ère} édition. European Whey Products Association, Bruxelles, Belgique.
- DE WIT ,J.N. ET HONTELEZ-BACKX E., 1981**-Les propriétés fonctionnelles des protéines du Lactosérum, conséquences des traitements thermiques. La technique laitière. Vol (952) : 19-22.
- DJEKRIF-DAKHMOCHE S., GILLMANN L., SAUNIERM. ,MERAIHI Z., 2002.** Production d'une α -amylase thermostable par culture mixte de microorganismes. 9p.
- DRYER J., 2001** -La grande diversité du lactosérum. *Dairy foods*. 102(5). 35p.
- DUBOIS M., GILLES K- A., HAMILTON J- K., REBERS P-A., & SMITH F. ,1956**
- Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* **28** (3): 350-356.
- EUZÉBY., 2008**- Grand dictionnaire illustré de parasitologie médicale et vétérinaire. Ed. Lavoisier, Paris. 832p.
- FAO., 1995** -Le lait et les produits laitiers dans la nutrition humaine. Collection FAO. Alimentation et Nutrition. Ed. Food et Agriculture Org. 271p.
- 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.
- GANNA S., TOUZI A., 2001** - Valorisation du lactosérum par la production de levures lactiques avec les procédés de fermentation discontinue et continue. *Rev. Energ. Ren :* Production et valorisation –Biomasse : 51-58.
- GHALY A-E., KAMAL M-A., 2004** -Submerged yeast fermentation of acid cheese whey for protein production and pollution potential reduction. *Water Research*, **38** : 631 — 644.

- GONZFILEZ M., SISO. I., 1996**-The biotechnological utilization of cheese whey: a review. *Bioresource Technology*, 57 (1): 1-11.
- GUIRAUD J-P., 1998** - Microbiologie alimentaire. Dunod, Paris. p : 310-321.
- GUIRAUD J-P., et ROSEC J-P., 2004** -Pratique des normes en microbiologie alimentaire. AFNOR. p: 228-235.
- HATTAL A., 2001**-2èmes journées scientifiques de l'INRAA. Station de Touggourt, Institut National de la Recherche Agronomique d'Algérie. p. 5-49.
- HESLOT H ., 1996**-L'ingenierie des proteines et ses applications . Lavoisier Tec et Doc : 424- 432.
- IMRIE F-K and VLITOS A-J., 1975** -Production of Fungal Protein from Carob (*Ceratonia siliqua* L.),*In*: S.R. Tannenbaum and D.I.C. Wang, eds., *Single-Cell Protein II* .MIT Press : 223-243.
- JEANTET R., CROGUENNEC T., MAHAUT M., SCHUCK P., et BRULE G., 2008**- Les produits laitiers. Ed : Lavoisier (2^{ème} ed), Paris. 200 p.
- JOUAN P., 2002**-Lactoprotéines et lactopeptides: propriétés biologiques. Ed. Quae. INA. 127p.
- KANDRA L.,GYEMANT G., FARAKAS E. AND LIPTAK A., 1997** - Action pattern of porcine pancreatic -amylase on three different series of beta-maltooligosaccharide glycoside. *Carbohydr. Res.*, 289(3), p: 237-242.
- KOSARIC N., ASHER Y., 1982**. Cheese whey and its utilization. *Conservation and Recycling*, 5: 23 - 32.
- KOSIKOWSKI F V., 1979**-Utilisation du lactosérum et produits à base de lactosérum. *Laitière Français* : 11-21.
- KOSSEVA M-R., FATMAWATI A., PALATOVA M., et KENT C-A., 2007**- Modelling thermophilic cheese whey bioremediation in a one-stage process. *Biochemical Engineering Journal*. Vol(35) : 281-288.
- KREGER-VAN RIJ N. J.,1984**-The Yeast, a Taxonomic Study, Elsevier Biomedical. Press, Amsterdam.
- KWON-CHUNG K., J and BENNETT J-E., 1992**- *Medical Mycology*. Lea & Febiger, Philadelphia.Press, Amsterdam.
- LABRECQUE M-H., 2003**-Etude de la capacité de deux souches de levures à dégrader le xylène.Mémoire, Faculté des sciences de l agriculture et de l alimentation, Université LAVAL : 19-24.

- LACHEBI S., 2009-** Valorisation des rejets de l'industrie laitière par technique membranaires (ultrafiltration). Mémoire de Magister. Université M'Hamed Bougara. Boumerdes. 151p.
- LAICHE A.T., 2011** -Contribution à la valorisation du lactosérum par l'étude de l'influence des conditions de stockage sur la microflore lactosérique bovine. Mémoire de Magister. Université Kasdi Merbah- Ouargla. 129p.
- LAPOINTE C., VIGNOLA., 2002-** Science et technologie du lait: transformation du lait. Ed. Presses inter Polytechnique. Fondation de technologie laitière, Québec. 600 p.
- LARPENT-GOURGAUD M. and SANGLIER J-J., 1992** - Biotechnologies. Principes et méthodes : 574-581.
- LARPENT J.P.,1991** - Biotechnologie des levures. Masson, Milan Barcelone Bonn. Paris : 97-127.
- LARPENT J.P. et LARPENT-GOURGAUD M., 1997** -Mémento technique de microbiologie. Ed. 3e édition, Lavoisier-Tec &Doc, Paris. 8, p : 217-240.
- LECLERC H., 1975**-Microbiologie générale, doin éditeurs, Paris. p : 28
- LECLERC H., MEYER A. et DEIANA J., 1995** - Cours de microbiologie générale. Nouveau programme. Biosciences et Techniques. doin éditeurs, Paris. p : 73-92.
- LEGHLIMI H ., 2004** -Optimisation de la production de la cellulase d *Aspergillus niger* ATCC 16 404 cultivé sur un milieu à base de lactosérum : étude comparative entre *Aspergillus niger* ATCC 16 404 et *Aspergillus niger* O.Z isolée localement. Thèse de magistère. Université Mentouri Constantine.
- LINDEN G et LORIENT D., 1994-** Valorisation alimentaire de la production agricole. Biochimie agroindustrielle. Ed. Masson, Paris Milan Barcelone.
- LO H.F., LIN L.L., CHEN H.L., HSU H.H., CHANG C.T., 2001** -Enzymatic properties of a SDSresistant *Bacillus* sp. TS-23 Alpha-amylase produced by recombinant *Escherichia coli*. Process Biochemistry. (36):743-750.
- LONGHI L-G-S., LUVIZETTO D-J., FERREIRA L-S., RECH R., AYUB M-A-Z., SECCHI A-R., 2004** -A growth kinetic model of *Kluyveromyces marxianus* cultures on cheese whey as substrate. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 31: 35-40.
- LOWRY O- H., ROSEBROUGH N- J., FARR A- L. & RANDALL R-J., 1965** - Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*193 (1) : 265-275.
- LUPIEN J., 1995** -Le lait et les produits laitiers dans la nutrition humaine. Organisation des Nations pour l'Alimentation et l'Agriculture. Rome. 272p.

- MAKTOUF S., 2013** – Activités amylase et lichenase d’une nouvelle souche de *Bacillus* production sur milieu solide et caractérisation. Thèse de Doctorat. Université de Toulouse. France. 171p.
- MALHOTRA R., NOORWEZ S. M., SATYANARAYANA T., 2002** -Production and partial characterization of thermostable and calcium-independent alpha-amylase of an extreme thermophile *Bacillus thermooleovorans* NP54. *Lett. Appl. Microbiol*, 31(5):378-384.
- MAMO G., GESSESSE A., 1999** -Purification and characterization of two raw-starch-digesting thermostable a-amylase from a *thermophilic Bacillus*. *Enzyme and Microbial Technology*. (25): 433-438.
- MARTIN M.T., PLOU F.J., ALCADE M., BALLASTEROS A., 2003** - Immobilization on Eupergit C of cyclodextrin glucosyltransferase (CGTase) and properties of immobilized biocatalyst, *J. Mol. Catal.* (21): 299-308.
- MARWAHA S-S., KENNED J-F., 1988**-Whey pollution problem and potential utilization. *International Journal of Food Science and Technology*. Vol (23) : 323 - 336.
- MAWSON A- J., 1994**. Bioconversions for whey utilization and waste abatement. *Bioresource Technology*, 47: 195 - 203.
- MEHAIA M-A., CHERYAN M., 1986**- Lactic acid from acid whey permeate in a membrane recycle bioreactor. *Enzyme Microb. Technol.* 8: 289-292.
- MERABTI R., 2006** -Isolement et caractérisation de souches levuriennes amylolytiques à partir de sol saharien algérien. Thèse de Magistère. Université Mentouri Constantine. 85p.
- MEREO J., 1980** -Les utilisations industrielles du sérum, fromagerie. Paris, revue française (365). 401p.
- MEZIANE M., 2008**-Production en continue de l’acide lactique et du diacétyle par *Lactococcus lactis* sp immobilisée sur pouzzolane dans un bioréacteur à lit fixe. Mémoire de Magister. Université Hassiba Ben Bouali. Chelef. 166p.
- MOLETTA R., 2009** -Le traitement des déchets. Ed. Lavoisier, Paris. 715p.
- MOLETTA R., 2002**- Gestion des problèmes environnementaux dans les IAA. Ed. Tech et Doc, Paris .600p.
- MORR C-V., AND HAE Y., W., 1993**- Whey protein concentrates and isolate: processing and functional properties. Ed. *Critical reviews in food science and nutrition*. 33 (6): 431-476.
- MOSLAH J., 1994** - La production laitière du dromadaire en Tunisie, actes du colloque : « dromadaires et chameaux, animaux laitiers ». Nouakchott, Mauritanie **Nafti Y., 2011**- Module Biochimie Alimentaire. Ed. biohay. Université de DJELFA. 93p.
- NAKATANI H., 1996** - Ronte carlo stimulation of multiple attack mechanism of α - amylase. *Biopolymers*. 39 (5), p:665-669.

- NOUADRI T., 2011** -L' α -amylase de *Penicillium camemberti* PL21:Production, Purification, Caractérisation et Immobilisation .Mémoire de Magister. Université Mentouri. Constantine. 160p.
- OREN A., 2002a**- Diversity of halophilic microorganisms: environments phylogeny, physiology, and applications. *J Ind Microbiol Biotechnol* 28: 56-63.
- OREN A., 2002b** - Halophilic microorganisms and their environments. In: Seckbach J(ed) Cellular Origin and Life in Extreme Habitats. Kluwer Academic, Dordrecht. P. 595.
- OTENG-GYANG K., 1984**-Introduction à la microbiologie alimentaire dans les pays chauds. Technique & Documentation Lavoisier, Paris. 8 :43-51.
- PAULINE C., et YVES L**-Essai de traitement du lactosérum pur issu de la fromagerie pilote de la ferme caprine du Pradel par la méthanisation. Ed. Institut National Polytechnique .École d'Ingénieurs de Purpan et Institut de l'élevage. 8p.
- PAZUR J- H., and MARCHETTI N-T., 1992** -Action patterns of amylolytic enzyes as determined by the [1-14C]mlto-oligo-saccharides mapping method. *Carbohydr. Res.*, 227: 215-225.
- PHAFF H-J., and STARMER W-T., 1987**-Yeast associated with Plants, Insects and Soil *In* : Rose A.H., Harrison J.S. (eds), The yeast, V1, Biology of yeast. 2 nd edition Academic Press. London : 123- 174.
- PHAFF H-G., MILLER M-W and MRAK E-K., 1978**-The life of yeasts. Harvard University Press, Cambridge, Massachsetts .
- POL D., 1996**- Travaux pratiques de biologie des levures. Guide de laboratoire.ellipses édition marketing S.A, Paris. 15: 20-38, 42-57, 141-151.
- PRIESTLE Y-P., 1988** -A sterea cartoon-drawing program for proteins. *J.Appl. Crystall.*, 21 :472-576.
- Richards L-A., 1969** -Diagnostic and improvement of saline and alkaline soils. *Agr. Handbook*.
- SACI A., 2012** -Production d' α -amylase par *Streptomyces* sp. Optimisation d'un milieu de production à base de déchets d'orange. Mémoire de Magister. Université Mentouri. Constantine. 92p.
- SCHUCK P., BOUHALLAB S, DURUPT D., VAREILLE P., HUMBERT J-P., MARIN M., 2004** -Séchage des lactosérums et dérivés : rôle du lactose et de la dynamique de l'eau. Ed. INRA, EDP Sciences: 243-268.
- SCRIBAN R., 1984** -Biotechnologies. 2èmeédition. Techniques et Documentation-Lavoisier. Paris. 531p.

- SCRIBAN R., 1999**-Biotechnologies. 5ème édition. Techniques et Documentation. Lavoisier, Paris : 149-157.
- SEKER S., BEYENAL H., TANYOLAÇ A., 1999**- Modeling milk-clotting activity in the continuous production of microbial rennet from *Mucor miehei*. *J. food sci.* 64 (3): 525-529.
- SIENKIEWICZ T., RIEDEL C-L., VERLAG T., MANN G-B., 1992** .Whey and whey utilization. *International Dairy Journal*, 2 (6) : 373 - 375.
- SIMON P. ET MEUNIER R., 1970** -Microbiologie industrielle et génie biochimique. Masson ET Cie, Editeurs. Paris Vie : 31-47, 385-411.
- SHANG T.Y., HUI Z .,YING L., 1994**. Continuous propionate production from whey permeate using a novel fibrous bed bioreactor. *Biotechnology and Bioengineering*, 43,11: 1124-1130.
- SOTTIEZ P., 1990** -Produits dérivés des fabrications fromagères, lait et produits laitiers. Tome(2). Ed. Lavoisier, Paris : 357-392.
- STIVALETTA N., BARBIERI R., PICARD C et BOSCO M., 2009**. Astrobiological significance of the sabkha life and environments of southern Tunisia. *Planetary space sci.* 57: 597- 605.
- TEODORO C-E-D., MARTINS M-L-L., 2000** -Culture conditions for the production of thermostable amylase by *Bacillus* sp. *Brazilian Journal of Microbiology*. (31):28-302.
- TATSINKOU F.B., TAVEAI F and NDJOUEENKEUI R., 2005** - Production and partial characterization of a thermostable amylase from ascomycetes yeast strain isolated from starchy soils. *Africcan Journal of biotechnology.*, 4(1), p: 14-18
- VALLIER P., BATA J., COLABERT L., 1977**- Optimal conditions of alpha-amylase production by *Aspergillus oryzae* in liquid media .*Ann.Microbial.*128(3):359-71.
- VISHNIAC H.S AND HEMPFLING W.P.,1979** - *Journal of General Microbiology* .p: 112:301.
- WALKER G.M., WILEY J. and CHIHSTER S., 1997** -Yeast physiology and biotechnology.
- YANEZ E ., BALLESTER N., FERNANDEZ V and MONCKEBERG F., 1972** - Chemical Composition of *C utilis* and the Biological Quality of the Yeast Protein, *J. Sci. Food Agric.* 23, p: 581-586.
- YANG S-Y., JONES J-H., OLSEN F- J., PETERSON J., 1980**-Soil as a medium for dairy liquid waste disposal. *Journal of Environmental Quality.* (9) : 370 - 372.
- YIHAN L., FUPING L., GUANQUN C., CRYSTAL L., SNYDER J., SUN YU L., JIANLING W., JING X., 2010** -High-level expression, purification and characterization of a

recombinant mediumtemperature α -amylase from *Bacillus subtilis*. Biotechnology Lett. (32):119–124.

Zhizhuang X., Reginald S. et Adrian T., 2006- A quantitative starch–iodine method for measuring alpha-amylase and glucoamylase activities. Analytical Biochemistry 351, 146–148.

ZOUBIRI L., 2012 - Production d'alpha amylase par des moisissures cultivées sur milieu à base de rebuts de dattes. Mémoire de Magister. Université Mentouri. Constantine. 104p.

ANNEXES

Annexes

Annexe 1: Dosage de la matière azotée totale

Réactifs : - Acide sulfurique concentré ($d = 1.84$)

- Acide sulfurique 0.1 N
- Soude 0.1N
- Lessive de soude, à 33%
- Sélénium en poudre pur (catalyseur)
- Indicateur rouge de méthyle
- Papier pH ou papier tournesol
- Billes en verre ou pierre ponce

Matériels : - Balance de précision

- Matras kjeldahl de 500ml
- Appareil à distiller
- Réchaud à gaz ou électrique
- Burette de 250 ml
- Erlen- meyer de 300 ml

Protocole :

Première étape : minéralisation sulfurique

Introduire dans un matras Kjeldahl de 500 ml :

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

Porter ensuite le matras sur une rampe chauffante, permettant l'aspiration des vapeurs sulfuriques. Prolonger le chauffage une demi- heure après décoloration complète, c'est-à-dire après que la solution soit devenue limpide. Laisser refroidir.

Seconde étape : déplacement et distillation de l'ammoniaque :

Verser dans le matras de Kjeldahl contenant le sulfate d'ammonium :

- 160 ml d'eau distillée
- 80 ml de lessive de soude à 33%

Ajouter quelques graines de pierre ponce pour régulariser l'ébullition. Pour le déplacement de l'ammoniaque, il faut ajouter la lessive de soude délicatement , une fois que l'appareil à distiller est prêt à fonctionner : Réfrigération assurée et extrémité de l'appareil plongeant dans

un erlen –meyer contenant 20 ml d'acide sulfurique 0.1 N(l'extrémité de l'appareil doit être en contact avec le liquide). Vérifier la fin de la distillation en recevant quelques gouttes de distillat, soit sur un papier tournesol rouge, soit sur du papier.

Troisième étape :

L'ammoniaque distillée, est reçu dans l'erlen-meyer contenant l'acide sulfurique en excès (20ml). On ajoute dans l'erlen- meyer quelques gouttes de rouge de méthyle et on titre par la soude 0.1N l'acide sulfurique restant (proportion qui n'a pas réagi avec l'ammoniaque). Doser goutte à goutte avec la soude contenue dans la burette, jusqu'au virage jaune pale persistant.

Calculs : Le pourcentage d'azote est déterminé selon la formule suivante :

$$N = 0.0014 \times V \times 100p$$

V : volume initial de l'acide sulfurique – volume de l'acide sulfurique restant qui n'a pas réagit avec l'ammoniaque

P : poids de l'échantillon

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

$$N = 0.0014 \times V \times 100 \times 100p (100 - H)$$

H : l'humidité de l'échantillon.

Et pour obtenir une valeur appropriée du taux de protéines, il faut multiplier le taux d'azote par un coefficient déterminé expérimentalement, qui est égal à 6.25 dans notre échantillon.

Annexe 2: Potato Dextrose Agar (PDA)

Pomme de terre250 g

Glucose20 g

Agar15 g

Eau distillée.....compléter jusqu'à 1000 ml

- Laver la pomme de terre non pelée.
- Couper en cubes dans 500 ml d'eau distillée.
- Porter à ébullition pendant 30 – 45 min.
- D'autre part faire fondre l'agar dans 500 ml d'eau distillée.
- Écraser la pomme de terre, filtrer puis ajouter le filtrat à la solution d'agar.
- Ajouter le glucose.
- Compléter le volume à 1000 ml.
- Stériliser par autoclavage à 121° C / 15 min.

Annexe 3: Dosage des sucres

Réactifs: - Phénol 5 % dans l'eau distillée.

- Acide sulfurique concentré à 95% de pureté et de densité $d = 1,84$

Protocole :

- Ajouter à 1 ml d'échantillon, 1 ml de phénol et 5 ml d'acide sulfurique concentré. Agiter et laisser reposer 10min à température ambiante.

- Incuber au bain marie à 30°C pendant 20 min.

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

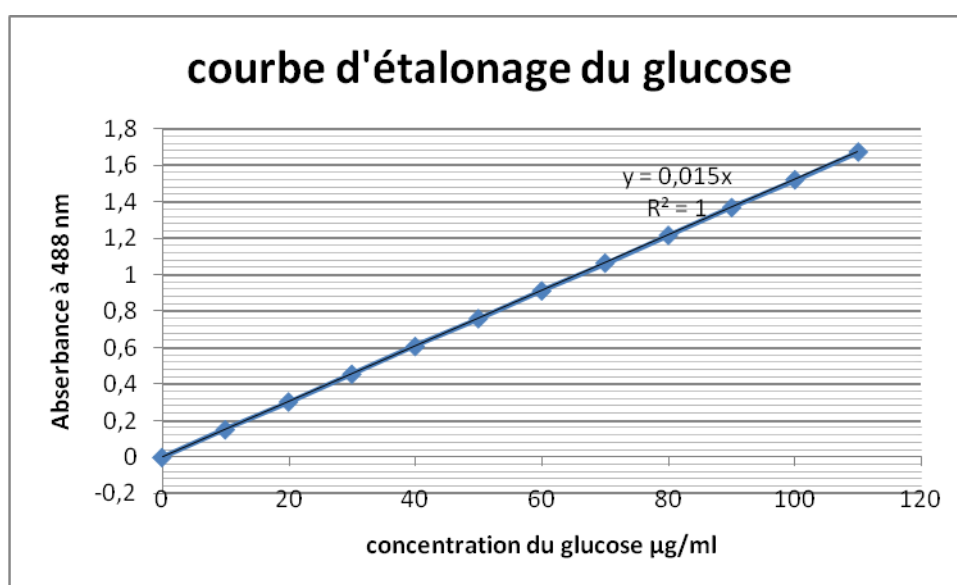


Figure 21: La courbe d'étalonnage de glucose.

Annexe 4

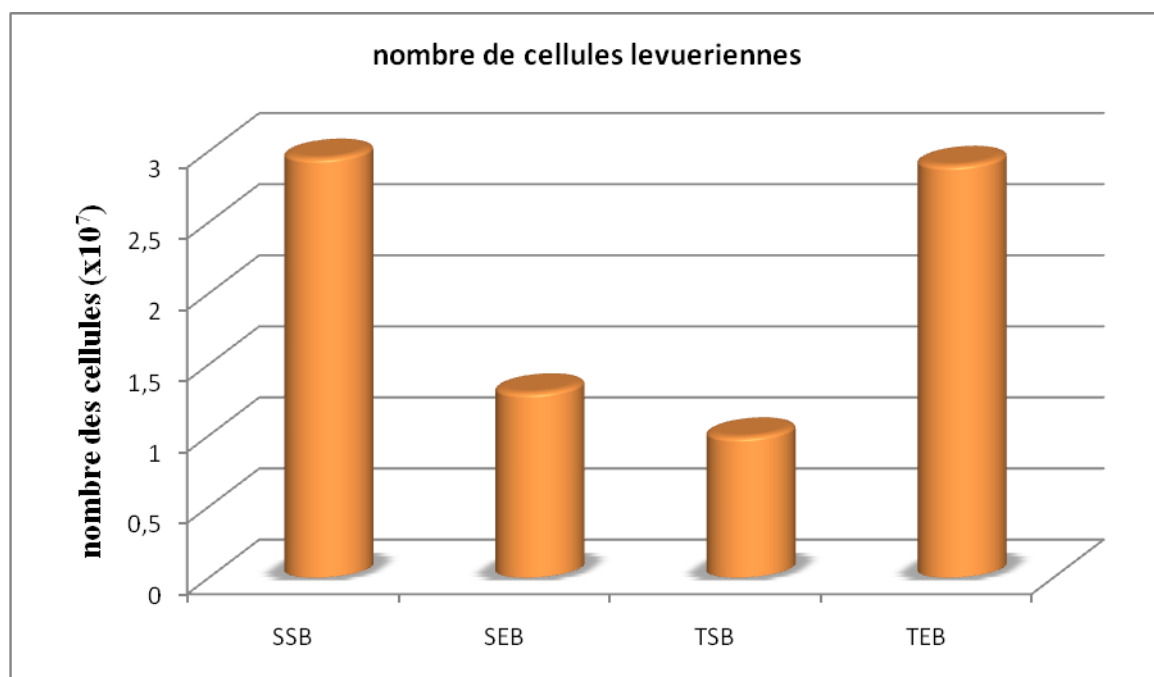


Figure 22 : dénombrement des cellules levuriennes contenues dans 1ml de suspension.

Annexe 5 : dosage de l'activité amylasique

Réactifs pour le dosage de l'amidon

- Solution d'amidon à 2mg/ml.
- Réactif de l'iode : 0.2 g d'I₂ dissous dans 100 ml de KI à 2 % dans 0.1 N HCl.
- 1M HCl.

Protocole :

- 1 ml de l'extrait enzymatique tamponnée à pH7 avec du tampon phosphate 0.1M
- 1 ml de substrat (solution d'amidon 2g/l).
- incuber à 50 pendant 30 min.
- La réaction est arrêtée par addition de 0,5 HCl suivie de 2,5 ml du réactif de l'iode.
- L'absorbance est lue à 580 nm contre le blanc (préparé à partir de l'extrait enzymatique dénaturé à 100°C).

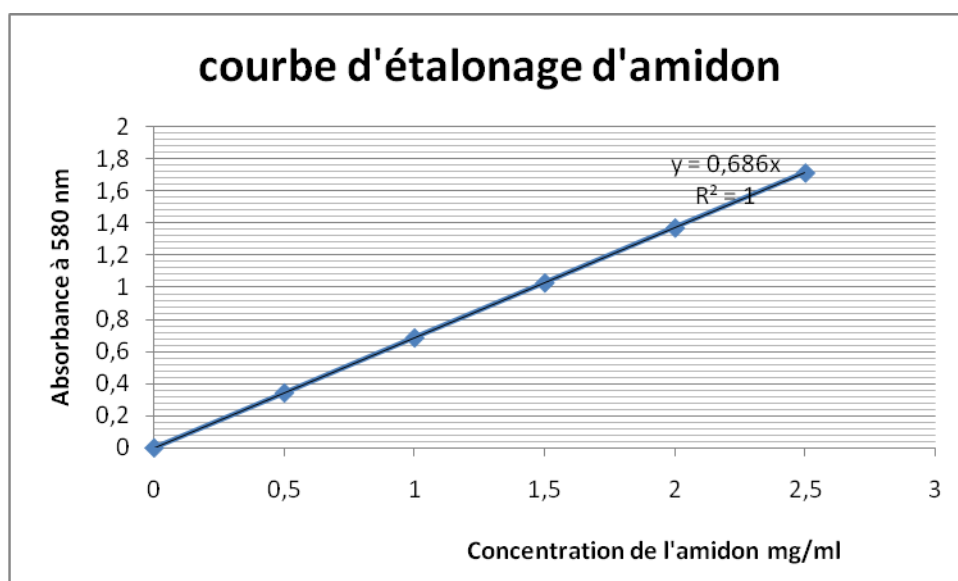


Figure23 : courbe d'étalonnage de l'amidon

Résumé :

Contribution à l'étude de l'influence des paramètres physico-chimiques sur l'activité amylolytiques des levures

Ce travail s'intéresse à la production d' α -amylase par des levures isolées des sols et eaux salées, et cultivées sur des milieux à base de lactosérum. Pour cela des prélèvements ont été effectués au niveau de 2 sites différents Lac de Tindla et El Chott situés dans la wilaya d'El Oued.

L'étude consiste à purifier les souches fongiques ayant une activité amylolytique. Après isolement et purification sur milieux Saboraud et PDA, on a obtenu **16** souches dont **8** possèdent une activité amylasique. Parmi ces dernières, **4** souches (**TEB**, **TSB**, **SSB** et **SEB**) ont été sélectionnées pour la fermentation selon les zones d'hydrolyse sur milieu PDA (1% amidon).

Le milieu de fermentation a été préparé à base de lactosérum camelin, bovin et caprin. L'analyse de ces derniers a montré leurs richesses en sucres (autour de **40 g/l**), en sels minéraux (**10g/L**) et la faible teneur en protéines (environ **1,5 g/L**).

L'étude cinétique de la production de l' α -amylase sur ces milieux, montre que les souches assurent le pH optimum pour la production de l'enzyme en abaissant le pH de milieu au **pH =4**, alors que les profils de biomasse s'évaluent pour atteindre des valeurs élevées (maximum de **21g/L** par **TEB**) à la fin de fermentation.

L'optimisation de la production nous a permis de considérer la souche **SSB** comme la plus performante par rapport à sa production d' α -amylase (**771U**), après **72 heures** de fermentation dans le lactosérum camelin, ainsi que le lactosérum caprin comme milieu optimal pour la production de l'enzyme par les souches sélectionnées en assurant une activité amylasique autour de **600U**.

Mots clés : L' α -amylase, Levures amylolytiques, Lactosérum, Fermentation, Optimisation.

الملخص:

المساهمة في دراسة تأثير العوامل الفيزيوكيميائية على النشاط الإنزيمي للخمائر

الهدف من هذا العمل هو استخلاص الأميلاز من طرف خمائر معزولة من تربة ومياه مالحة طبيعيا وإنتاجها على ثلاثة أنواع من مصل الحليب (بقر، ماعز، ناقة). لهذا الغرض تم أخذ عينات من منطقتين مختلفتين بحيرة تندلة والشط على مستوى ولاية الوادي.

من خلال عزل الفطريات ذات النشاط الإنزيمي تحصلنا على 16 سلالة من الخمائر من بينها 8 أظهرت نشاط إنزيمي. من هذه الأخيرة تم انتقاء 4 سلالات (SSB, TSB, TEB و SEB) حسب مناطق التحلل في الوسط PDA (1% نشاء) لغرض التخمر في أوساط تم تحضيرها من مصل حليب الناقة، البقر و الماعز والتي أظهر تحليلها الكيميائي غناها بالسكريات (حوالي 40 غ/ل) الأملاح المعدنية (10 غ/ل) ونسبة قليلة من البروتينات (1,5 غ/ل تقريبا). أظهرت الدراسة الحركية لإنتاج الأنزيم في هذه الأوساط أن الخمائر تضمن درجة الحموضة الملائمة للإنتاج وذلك بخفضها لحموضة الوسط إلى pH=4 في حين أن الكتلة الحيوية تتطور لتبلغ قيم قصوى (21 غ/ل كأعلى قيمة من طرف السلالة TEB) في نهاية الإنتاج. سمحت لنا دراسة تحسين الإنتاج باعتبار السلالة SSB الأكثر إنتاجية للأنزيم الأميلاز (771U) في ظرف 48 ساعة من التخمر في مصل حليب الناقة، وكذا اعتبار مصل حليب الماعز الوسط الأمثل لإنتاج الأنزيم من طرف الخمائر المنتقاة لضمانه نشاطا إنزيميا يفوق 600 U.

الكلمات المفتاحية: الأميلاز، خمائر محللة للنشاء، مصل الحليب، تخمر، تحسين الإنتاج.