



مهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire N série:.....
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
هيد حمة لخضر الوادي
Université Echahid Hamma Lakhdar -El OUED
كلية علوم الطبيعة والحياة
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
قسم البيولوجيا الخلوية والجزيئية
Département de biologie Cellulaire et Moléculaire

MEMOIRE DE FIN D'ETUDE

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

Spécialité : Biochimie appliquée

THEME

**Contribution à l'étude de la production enzymatique de
quelques espèces fongiques isolées à partir des milieux extrêmes**

Présenté Par :

M^{elle} MESSAOUDI Zahra

M^{elle} BEKKARI Hadda

Devant le jury composé de :

Président: SAADI Hamza

M.A.A, Université d'El Oued.

Examinatrice : NADJI Nassima

M.A.A, Université d'El Oued.

Promoteur : LAICHE Ammar Touhami

M.A.A, Université d'El Oued.

The page is framed by a decorative border of pearls and roses. On the left side, there are several white roses with green leaves and buds. On the right side, there is a large white rose in the bottom right corner. The top and bottom edges are decorated with a row of pearls. The text is centered and written in a serif font.

Remerciements

Avant tout nous remercions Dieu tout puissant de nous avoir donné la Patience, la force et le courage pour réaliser cette étude.

*les plus sincères remerciements s'adressent à notre encadreur monsieur **LAICHE Ammar Touhami** pour ses orientations, sa rigueur scientifique et pour la confiance qu'elle nous a accordé durant cette étude. Ce travail est pour nous l'occasion de vous témoigner notre profonde gratitude.*

*Nous adressant nos sincères remerciements aux membres de jury de nous honorer en acceptant de juger ce travail; M.**SAADI Hamza** et Mlle **NADJI Nassima***

*Un grand merci aux techniciens de: laboratoire des produits agroalimentaire de l' institut **I.N.R.A.A** en particulier le chef de laboratoire Mademoiselle **DJAAFRI Kaouther**, l'équipe de laboratoire de département des sciences et technologies particulièrement M **TLIBA Ali** ,au personnel de l'Université d'El-oued et ce de la faculté des sciences de la nature et de la vie travailleurs et enseignants qui ont contribué à notre formation universitaire.*

*Nous tenons à remercier spécialement M **DEROUICHE S.**, M **GHAMAM A.D.**, M **Abdellaouie D.** pour leurs assistances.*

Et sans oublier les filles de notre promotion de Master biochimie appliquée pour leur esprit de fraternité et leur encouragement.

Notre reconnaissance et notre grand respect s'adressent à la source de bonheur «nos parents» qui nous ont soutenu avec patience et qui nous ont donné leur confiance. Ces personnes que nous devons nos vies et toutes expressions d'avouement.

Enfin, nous tenons à remercier toute personne nous a aidé de près ou de loin à réaliser cette étude.

Résumé

Un des objectifs de l'utilisation industrielle des microorganismes concerne la production des enzymes, notre étude comporte deux axes de recherche. Le premier concerne la sélection et la caractérisation de souches levuriennes amylolytique et protéolytique isolées à partir du sol. La seconde partie est consacrée à la production enzymatique et leur optimisation par fermentation d'un sirop de datte.

Des souches levuriennes, productrices d'-amylase et protéase, ont été isolées à partir de deux échantillons de sol en provenance des différents milieux extrêmes lac de Ayata et El Chott situés dans la wilaya d El Oued, L'isolement des levures a permis de répertorier 4 souches (S1,S2,S3et S4).La sélection des ces dernières montre que toutes les souches présentent une activité amylolytique, alors que deux souches possèdent une activité protéolytique .

Les analyses de sirop de datte utilisé on révélé qu'il présente un substrat de fermentation avec un pH acide et une richesse en sucres comme source de carbone et d'énergie pour le développement des levures et la production enzymatique.

On fait une étude de l'influence de pH initial de milieu et la concentration de substrat sur activité enzymatique et la biomasse pour l'obtention de la meilleure production.

La cinétique de production des enzymes, montre que le maximum de la production protéolytique à été observé dans le 5^{ème} jour dans un milieu acide (pH=4,22) pour la souche S4 avec une valeur de la 3570UI, à ce moment la biomasse est de 120g /l et la concentration des protéines est de 79,39mg/l. Par ailleurs la meilleur souche productrice d' -amylase est la S3 qui présente la valeur maximale de 3451,308UI dans un milieu acide (pH=4,57). Cependant, dans cette période la biomasse est de 40g /l et la concentration des sucre est de 110,73mg/l.

Mots clé : Amylase, Protéase, Levure, Sirop de datte, Fermentation, Optimisation.

هدف الاستعمالات الصناعية للكائنات الدقيقة هي الإنزيمات دراستنا هذه تحمل
محورين للبحث أولها
البروتيني (الاميلاز و البروتياز) و التي تم عزلها من التربة
و دراستها بطريقة مثلى عن طريق تخمر عصير التمر.

نواع من الخميرة منتجة للأميلاز و البروتياز عزلت من منطقتين مختلفتين تتميز بمناخها
بحيرة عياطة و بحيرة الشط الواقعتين بولاية الو . انتقاء ه
إنزيم (ميلاز) و اثنان منها فقط كان لها نشاط التحلل البروتيني (البروتياز).

التحليل الفيزيوكيميائية و البيوكيميائية لعصير التمر بينت انه مادة صالحة للتخمر ذات درجة
صغيرة و غني بالسكريات كمصدر للكربون و الطاقة ملائم لنمو هذه الإنزيمات.

تحسين
جريت لتحديد تأثير
الابتدائية في
التخمر و كذلك تركيز المادة الأولية فيه.

الإنزيمات أوضحت أ النوع الرابع له أقصى إ لإنزيم البروتي (U3570)
اليوم الخامس للحضن في وسط ذا درجة PH=4,22 في الوقت نفسه كانت كتلة الخلايا المنتجة
120 / و تركيز البروتينات 79,39 / . من جهة اخرى أحسن سلالة ميلاز
بقيمة UI 3451,308 في وسط له PH=4,75 حيث كانت حيوية
40 / و تركيز السكريات 110,73 / .

مفتاحية: اميلاز, بروتياز, خميرة, عصير التمر, .

LISTE DES ABREVIATION

μ: Micron

ATP: Adénosine très phosphate

ATPase: Enzyme Adénosine très phosphate

CE: Conductivité électrique

CGTase: Cyclodextrines glucanotransferases

CO₂ : Dioxyde de carbone

E: Echantillon

HCl: Acide chlorhydrique

kDa: Kilo Dalton

NaOH : Hydroxyde de sodium

PDA: Potato Dextrose Agar

pH: potentiel d'Hydrogène

Sa: Souche améololytique

SAB: Sérum Albumine Bovine

SM: Solution mère

Sp: Souche protéolytique

Spa: Souches productrice d'amylase

Spp: Souches productrice de protéase

T°: Température

TCA: Acide trichloracétique

U: Unité enzymatique

UI: Unité enzymatique internationale

UV: Ultraviolet

LISTE DES FIGURES

Numéro	Titre	Page
Figure 1	L'aspect morphologique d'une levure	4
Figure 2	Types de division des levures	5
Figure 3	Cycle de reproduction de la levure	5
Figure 4	Datte et noyau du palmier dattier d'après Belguedj (2001)	18
Figure 5	Site de Lac Ayata (OUED RIGH).	28
Figure 6	Site d'El Chatt (OUED SOUF).	28
Figure 7	Etapas de la préparation de sirop de datte.	32
Figure 8	Conduite de la fermentation.	35
Figure 9	Sélection de souches protéolytique (Après 72 h d'incubation à 30 °C et à pH 5)	42
Figure 10	Sélection de souches amylolytiques (Après 72 h d'incubation à 30 °C et à pH 5).	42
Figure 11	Variation du pH de milieu au cours de la culture des Spp.	45
Figure 12	Variation de la biomasse au cours de la culture des Spp.	46
Figure 13	Variation de l'activité protéolytique au cours de la culture.	47
Figure 14	Variation de concentration des protéines au cours de la culture.	48
Figure 15	Evolution de l'activité protéolytique en fonction du pH initial du milieu.	49
Figure 16	Evolution de l'activité protéolytique en fonction de la concentration de la caséine.	50
Figure 17	Evolution de la biomasse pendant l'incubation des Spp en fonction du pH initial du milieu.	51
Figure 18	Evolution de la biomasse pendant l'incubation des Spp en fonction de la concentration de caséine.	52

Figure 19	Variation du pH de milieu au cours de la culture des Spa.	53
Figure 20	Variation de la biomasse au cours de la culture des Spa.	54
Figure 21	Variation de l'activité amylasique au cours de la culture.	55
Figure 22	Variation de la concentration des glucides au cours de la culture.	56
Figure 23	Evolution de l'activité amylasique pendant l'incubation en fonction du pH initial du milieu.	57
Figure 24	Evolution de l'activité amylasique pendant l'incubation en fonction de la concentration de l'amidon.	59
Figure 25	Evolution de la biomasse pendant l'incubation des Spa en fonction du pH initial du milieu.	60
Figure 26	Evolution de la biomasse pendant l'incubation des Spa en fonction de la concentration de l'amidon.	61

LISTE DES TABLEAUX

Numéro	Titre	Page
Tableau I	Différentes origines de l' amylase microbienne.	10
Tableau II	Classification des protéases Selon la nature du site catalytique.	13
Tableau III	Teneur en sucre de quelques variétés de datte Algériennes.	20
Tableau IV	Teneur des dattes en éléments minéraux (en mg/100g de datte).	21
Tableau V	Teneur en vitamines des dattes.	21
Tableau VI	Composition et valeur fourragère des noyaux de datte (%) de variété Mauritanienne et Irakienne.	23
Tableau VII	Composition biochimique du sirop de dattes.	25
Tableau VIII	propriétés physicochimiques des échantillons du sol.	38
Tableau IX	Isolement des levures à partir des différents échantillons de sol sur le milieu PDA.	39
Tableau X	Caractères culturaux et morphologiques des isolats des levures.	40
Tableau XI	Observations macroscopiques et microscopiques des isolats des levures.	41
Tableau XII	Analyses physicochimiques et biochimique de sirop de dattes.	43

SOMMAIRE

Remerciements
Résumé
Liste des abréviations
Liste des figures
Liste des tableaux
Introduction

PARTIE I : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre 1: Généralités sur les levures.....	3
I.1.1 Généralités.....	3
I.1.2 Les levures.....	3
I.1.2.1 définition.....	3
I.1.2.2 Habitats.....	3
I.1.2.3 Caractères des levures.....	3
I.1.2.4 Morphologie.....	4
I.1.2.5 Reproduction.....	4
I.1.2.6 Applications des levures.....	5
Chapitre 2 : Amylase et protéase.....	7
I.2.1 Généralité sur les enzymes.....	7
I.2.2 -amylase.....	7
I.2.2.1 Définition.....	7
I.2.2.2 Mode d'action de l' -amylase.....	8
I.2.2.3 Caractéristiques de l' -amylase.....	8
I.2.2.4 Origine de l' -amylase.....	9
I.2.2.5 Application de l' -amylase.....	10
I.2.3 Protéases.....	12
I.2.3.1 Définition.....	12
I.2.3.2 Classification des protéases.....	12
I.2.3.3 Mode d'action des protéases.....	14

I.2.3.4	Caractères des protéases.....	14
I.2.3.5	Origine des enzymes protéolytique.....	15
I.2.3.6	Applications des protéases.....	15
Chapitre 3 : Datte.....		
I.3.1	Datte.....	18
I.3.1.1	Définition.....	18
I.3.1.2	Classification des dattes.....	18
I.3.1.3	Composition biochimique.....	19
I.3.1.4	Formation et évolution des dattes.....	23
I.3.1.5	Technologie de la datte.....	24
I.3.2	sirop de datte.....	24
I.3.2.1	Définition.....	24
I.3.2.2	Composition biochimique du sirop de datte.....	24
I.3.2.3	Propriétés du sirop de datte.....	25
I.3.2.4	Aspects bactériologiques.....	26
I.3.2.5	Utilisations de sirop de datte.....	26

PARTIE II: MATERIEL ET METHODES

II.1. Isolement et sélection des souches levuriennes productrices d' -amylase et de protéase.....		
II.1.1	Echantillonnage.....	28
II.1.2	Analyse des quelque paramètres physicochimiques et biochimiques du sol...29	
II.1.2.1	Mesure du pH du sol.....	29
II.1.2.2	Mesure de la conductivité électrique du sol.....	29
II.1.2.3	Détermination de l'humidité.....	29
II.1.2.4	Détermination de la matière organique.....	29
II.1.3	Isolement des levures.....	30
II.1.4	Purification.....	30
II.1.5	Conservation.....	30
II.1.6	Sélection des souches productrices des enzymes.....	30
II.1.6.1	Sélection des souches protéolytique.....	30
II.1.6.2	Sélection des souches amylolytiques.....	31

II.2 Production enzymatique.....	31
II.2.1 Préparation du milieu de base.....	31
II.2.2 Analyses physicochimiques et biochimiques de sirop de datte.....	33
II.2.2.1 Détermination du pH.....	33
II.2.2.2 Détermination d'humidité.....	33
II.2.2.3 Détermination de taux de cendres.....	33
II.2.2.4 Détermination de l'acidité titrable.....	33
II.2.2.5 Dosage des sucres totaux.....	34
II.2.2.6 Dosage des sucres réducteurs.....	34
II.2.3 Préparation de l'inoculum.....	34
II.2.4 Conduite de la fermentation.....	34
II.2.5 Cinétique de production enzymatique des souches sélectionnées.....	35
II.2.5.1 Mesure du pH.....	35
II.2.5.2 Mesure de la biomasse.....	35
II.2.5.3 Dosage de l'activité enzymatique.....	35
II.2.5.4 Dosage des protéines.....	36
II.2.5.5 Dosage des sucres totaux.....	37
II.2.6 Optimisation de la production enzymatique et la biomasse.....	37

PARTIE III: RESULTATS ET DISCUSSION

III.1 Analyses physicochimiques du sol.....	38
III.2 Isolement des souches	39
III.2.1 Identification des souches sélectionnées.....	39
III.3 Sélection des souches productrices des enzymes.....	41
III.3.1 Mise en évidence de l'activité protéolytique.....	41
III.3.2 Mise en évidence de l'activité amylolytique.....	42
III.4 Compositions physicochimiques et biochimiques de sirop de datte.....	43
III.5 Production de protéase.....	45
III.5.1 Etude cinétique de la production de protéase.....	45
III.5.1.1 Evolution de pH des Spp.....	45
III.5.1.2 Evolution de la biomasse des Spp.....	46
III.5.1.3 Evolution de l'activité protéolytique.....	47

III.5.1.4 Evolution de la concentration des protéines.....	48
III.5.2 Optimisation de l'activité protéolytique.....	48
III.5.2.1 Optimisation de l'activité protéolytique selon la variation de pH initial.....	48
III.5.2.2 Optimisation de l'activité protéolytique selon la variation de concentration de substrat (caséine).....	49
III.5.3 Optimisation de la biomasse des Spp.....	50
III.5.3.1 Optimisation de la biomasse des Spp selon la variation de pH initial.	51
III.5.3.2 Optimisation de la biomasse des Spp selon la variation de concentration de substrat (caséine).....	51
III.6 Production d' α -amylase.....	53
III.6.1 Etude cinétique de la production d' α -amylase.....	53
III.6.1.1 Evolution de pH des Spa.....	53
III.6.1.2 Evolution de la biomasse des Spa.....	54
III.6.1.3.Evolution de l'activité amylasique.....	55
III.6.1.4 Evolution de la concentration des glucides.....	55
III.6.2 Optimisation de l'activité amylasique.....	56
III.6.2.1Optimisation de l'activité amylasique selon la variation de pH initial.	56
III.6.2.2.Optimisation de l'activité amylasique selon la variation de concentration de substrat (Amidon).....	58
III.6.3 Optimisation de la biomasse des Spa.....	59
III.6.3.1 Optimisation de la biomasse des Spa selon la variation de pH initial.	59
III.6.3.2 Optimisation de la biomasse des Spa selon la variation de concentration de substrat (Amidon).....	61
Conclusion générale.....	63
Références bibliographiques.....	65
Annexes.....

Introduction

Introduction

Au cours des dernières décennies, le développement de la microbiologie a abouti à l'obtention de matériels biologiques très divers, modifiés génétiquement ou non et susceptibles d'être utilisés dans des procédés de production de vitamines, d'hormones, de vaccins et d'enzymes (**Scriban, 1999**).

Les enzymes d'origine microbienne, présentent des propriétés et des spécificités diverses. Parmi ces enzymes, on recense les protéases et les amylases qui sont d'une grande importance en biotechnologie (**Scriban, 1999**). Ces propriétés reflètent de plus en plus leurs utilisations dans divers domaines d'applications, tels que l'industrie alimentaire humaine et animale, les détergents pour lessives, l'industrie des tanneries et l'industrie pharmaceutique. Environ 40% des enzymes industrielles sont d'origine fongique (**Botton et al., 1999**). La culture des champignons pour la production d'enzymes s'effectue soit sur substrat solide, soit en culture submergée comme c'est le cas pour la production de la plupart des métabolites d'origine microbienne.

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 oeuvre 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.

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**).

Actuellement, la compétition est très forte dans le monde des enzymes industrielles et les prix de ces produits de hautes technologies sont à la baisse entraînant des réductions majeures dans les coûts de production. La capacité de l'industrie de produire des enzymes à un faible coût est donc essentielle pour maintenir sa compétitivité (**Nathalie, 1999**).

La production industrielle des enzymes porte surtout sur les amylases et les protéases qui représentent 80 % du marché mondial des enzymes. Les enzymes les plus importantes en termes de revenus sont encore les protéases qui couvraient 34,4 % du marché en 1995 (**Morvan, 2010**).

Cette production exige la préparation de milieux à moindre coût sachant que l'estimation du coût du milieu de croissance représente 30-40% du coût de production des

enzymes industrielles. Ceci peut être atteint par l'utilisation des résidus agroindustriels disponibles et de bon marché et par l'optimisation des conditions nutritionnelles et physicochimiques du milieu de culture. C'est ainsi que plusieurs déchets et sous-produits agro-industriels sont appliqués pour la production d'enzymes. Au cours des trente dernières années, un nombre important de ces fermentations est réalisé sur des déchets agroalimentaires pour produire principalement des hydrolases (**Srinubabu *et al.*, 2007**).

Le choix du milieu approprié de fermentation est essentiel pour les microorganismes, aussi bien pour la croissance que pour la production d'enzymes (**Dubey *et al.*, 2000**).

La datte de part leur grande richesse en sucres, peuvent servir en tant que matière première en fermentation pour la production de divers métabolites (**Benahmed, 2007**). A partir de La transformation biotechnologique de datte plus de sa consommation directe, le sirop est un excellent milieu de fermentation pour la production enzymatique par les souches isolées. Cependant, l'enrichissement du milieu s'avère nécessaire afin de constituer un milieu équilibré et favorable au développement des levures (**Merabti, 2006**).

L'objectif de ce travail, est la production enzymatique par bioconversion anaérobie dans un sirop de datte d'après des souches levuriens. L'isolement et la sélection de ces souches productrices d' -amylase et de protéase seront effectués à partir du sol.

La concrétisation de ce document est comme suit:

- La première partie, concerne une étude bibliographique comportant trois chapitres: généralité sur les levures, l' -amylase et les protéases, enfin un rappel sur la datte et leur sirop.
- La deuxième partie on s'intéresse à la méthodologie expérimentale consacrée à la sélection et à la caractérisation de souches levuriennes isolées à partir de sol saharien puis l'étude de cinétique de la production des enzymes et leur optimisation.

PREMIÈRE PARTIE (1) :

Synthèse bibliographique

CHAPITRE 1 :

*Généralité sur les
levures*

I.1.1 Généralités

Les champignons sont des organismes eucaryotes, hétérotrophe, immobile, appartenant au règne des Fungi, caractérisés par une paroi cellulaire composée de polysaccharides azotés (chitine), ce qui lui assure une certaine résistance aux contraintes du milieu extérieur (**Ben cheikh ,2011**), Les champignons sont incapable de réaliser la photosynthèse (absence de chloroplastes) et présentent une forme végétative composée de cellules assemblées en filaments ou hyphes avec une reproduction sexuée et/ou asexuée (**Hugues, 2009**)

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

I.1.2 Les levures

I.1.2.1 définition :

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

I.1.2.2 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 ;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 & Pol,1996**). Par ailleurs, le sol constitue un large réservoir assurant leur survie dans des conditions défavorables (**Leclerc, 1975**).

I.1.2.3 Caractères des levures.

Les levures peuvent être définies comme des eucaryotes microscopiques. Elles sont des hétérotrophes faisant partie du groupe des champignons dont on les distingue par leur caractère unicellulaire 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 partielles de ceux-ci en alcool et en gaz (production de bière et d'autres boissons alcoolisées fermentées, production de pain en utilisant la levure de boulangerie). En général, les levures ne provoquent pas de dangers pour la santé, même si certaines altèrent les aliments en les rendant impropres à la consommation (Fao, 2007).

I.1.2.4 Morphologie

Les cellules de levures sont généralement ovoïdes ou sphériques, parfois cylindriques (Madigan et John, 2007). Leurs dimensions sont très variables de 1 à 5 microns et de diamètre jusqu'à 5 à 30 μ de longueur. Les dimensions et aspects varient selon l'âge, l'environnement et le milieu de culture (Ati abdel ouahab, 2008).

Les cellules peuvent après bourgeonnement rester liées les unes aux autres et constituer aussi un pseudo-mycélium. Plus ou moins différencié suivant les genres ou les espèces. Dans certaines conditions, d'autres levures peuvent produire de mycéliums caractéristiques de champignons filamenteux, comportant des cloisons transversales ou septa et présentant une croissance apicale (Bourgeois et al., 1988).



Figure1: l'aspect morphologique d'une levure (Bacha., 2008).

I.1.2.5 Reproduction

Les levures se reproduisent selon deux modes :

➤ **La reproduction asexuée**

Toujours présente, se fait essentiellement par bourgeonnement, aux extrémités des grands axes des cellules si elles sont ovoïdes ou allongées, (et rarement par scissiparité). Peut être aussi multilatéral, ce qui est une caractéristique de *Saccharomyces* et *Debaryomyces*.

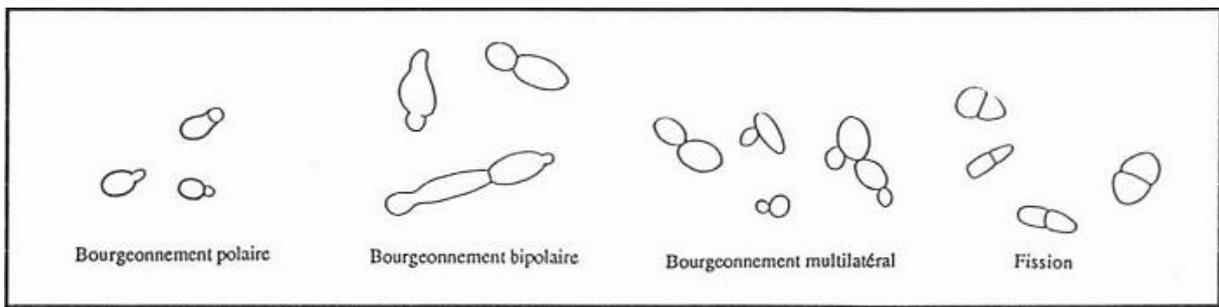


Figure 2: Types de division des levures : 1- Bourgeoisement simple, polaire (*Saccharomyces*) 2- Bourgeoisement bipolaire (*Saccharomyces*) 3- Bourgeoisement multilatéral 4 - Scissiparité, fission (*Scizosaccharomyces*) (Hencké, 2000)

➤ **La reproduction sexuée**

Elle s'effectue par conjugaison des deux cellules qui donnent naissance à un Zygote. Après différenciation et méiose un asque à 4 ascospores haploïdes se forme (Oteng-gyang, 1984) (Figure 3).

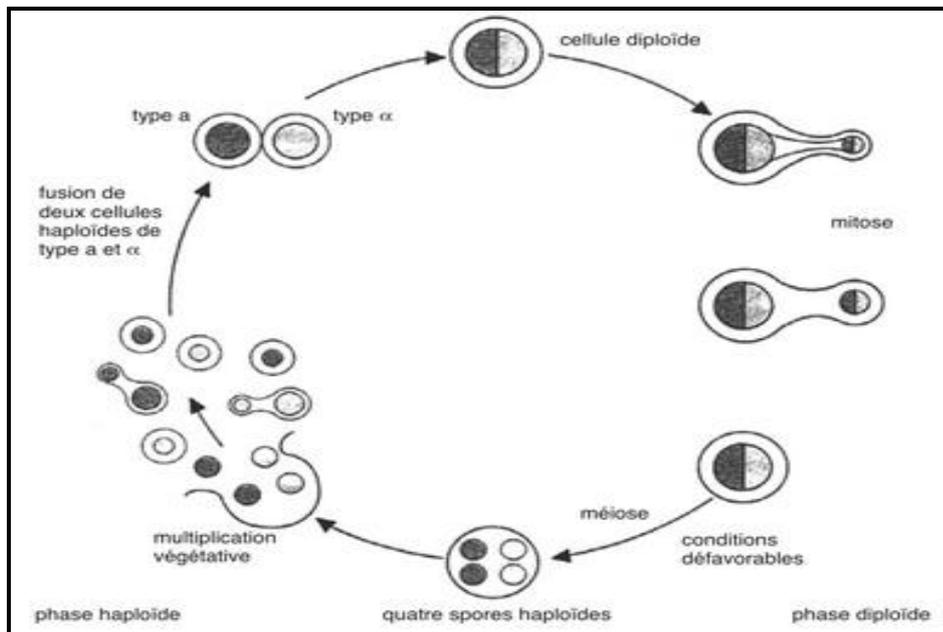


Figure 3 : Cycle de reproduction de la levure (Aline et al., 2010)

I.1.2.6 Applications des levures

Les levures ont de grandes activités métaboliques et sont donc utilisées dans les domaines agro-alimentaires

➤ **Boissons alcoolisées**

Le rôle, le plus ancien des levures est la fabrication de boissons alcoolisées (bière, vin, cidre) (Tibor deak, 2007). Cette fabrication repose sur la fermentation alcoolique, qui consiste à transformer les sucres simples en alcool. Ainsi, elles interviennent au cours de la

vinification et de l'élaboration de la bière. L'espèce la plus utilisée par l'homme est *Saccharomyces cerevisiae*, appelée aussi levure de bière (**Hencké, 2000**).

➤ **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 (**Simon et Meunier, 1970 ;Cofalec, 2006**).

➤ **Production des enzymes**

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**).

➤ **Affinage des fromages**

Les levures sont aussi capables d'utiliser les acides organiques comme source d'énergie 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. Par leurs enzymes protéolytiques et lipolytiques, elles jouent un rôle dans la formation de l'arome. (**Lupien, 1995**).

➤ **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, 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 (**Benaouid, 2008**).

CHAPITRE 2:

Amylase et Protéase

I.2.1 Généralité sur les enzymes

Tous les organismes vivants ; des bactéries jusqu'à l'être humain, dépendent pour leur existence de catalyseurs biologiques, appelés enzymes. Les enzymes sont des protéines fonctionnelles, de masse moléculaire élevée, environ 10 à 1 000 kDa (**Burhan et al., 2002**). elles jouent un rôle essentiel en contrôlant les procédés métaboliques permettant aux nutriments d'être transformés en énergie et en matériaux cellulaires par décomposition ou la modification de tels composés (**Bergmeyer et al., 1979; Pelmont, 1995; Drouin, 2005**).

Elles augmentent la vitesse de réaction, sans modifier leur état d'équilibre et sont régénérées à la fin du cycle réactionnel. Elles agissent à de faibles concentrations, possèdent une spécificité étroite ou lâche avec le substrat. Selon la commission des enzymes de l'I.U.B. (International Union of Biochemistry) (**Bergmeyer, 1979**), les enzymes se répartissent en six classes : oxydoréductases, transférases, hydrolases, lyases, isomérases et ligase.

I.2.2 -amylase

I.2.2.1 Définition

L' -amylase comme toutes les 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' -amylase et les protéases sont les plus utilisés en bio-industrie (**Scriban, 1993 ; Wallach, 1997**). 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'alpha-amylase (**Larpen-Gaugaud et Sanglier, 1992**).

L' -amylase est une endoenzyme appartenant à la famille des hydrolases. Elle hydrolyse au hasard, les liaisons osidiques de l'amylose, de l'amylopectine, de l'amidon, du glycogène et d'autres polysaccharides contenant plus de trois liaisons (1,4) D-Glucose (**Keating et al., 1998 ; Dauter et al., 1999 ; Franco et al., 2000**). En effet, elle attaque les chaînes de l'amylose en coupant les liaisons (1,4) tous les 6 glucoses, maltose et surtout d' -dextrines (**Franco et al., 2000**).

Bien que l' -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 (**Mercier, 1985**).

I.2.2.2 Mode d'action de l' α -amylase

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**).

Le mécanisme d'action de l' α -amylase nécessite la participation de 3 fonctions du site actif impliquant un attaquant nucléophile, un stabilisateur de la charge positif de l'atome attaqué et un donneur de proton au groupe déplacé ; ceci signifie que la rupture de la liaison osidique fait intervenir une série d'échanges d'électrons et de protons entre certains résidus de l'enzyme et du substrat. Les groupes impliqués dans la réaction du site actif sont deux acides carboxyliques et un noyau imidazole (**Park et al.,1997**). Ce mécanisme est une caractéristique de l'enzyme dans les conditions expérimentales telles que la T°, pH, taille et d'action des α -amylases.)

I.2.2.3 Caractéristiques de l' α -amylase

➤ Poids moléculaire

Le poids moléculaire des α -amylases varie d'une origine à l'autre et d'une espèce à l'autre. Il est compris entre 40.000 et 90.000 daltons (**Schombury et Salzmann, 1991**). Celui des α -amylases levuriennes, s'échelonne entre 40.000 et 70.000 daltons (**Panchal, 1990**).

➤ PH optimum

Les α -amylases sont généralement stables dans une gamme de pH de 5 à 8, avec un optimum se situant entre 4 à 5 pour les α -amylases fongiques et un optimum supérieur à la neutralité 6 à 8.5 pour les α -amylases bactériennes (**Ait kaki-el-hadef, 2012**). Pour les levures, l'enzyme requiert, selon les espèces, des pH entre 4 à 6 (**Panchal, 1990**).

➤ Température optimum

Selon l'origine et les espèces, les α -amylases ont des températures optimales comprises entre 40°C et 90°C (**Schombury et Salzmann, 1991**). Les amylases microbiennes, quant à elles, ont une forte thermo-stabilité (30°C–60°C) et leur température optimale peut être plus élevée, se situant entre 40°C et 70°C (**Park et al., 1997**).

En effet, l'alpha amylase bactérienne est réputée pour sa grande thermo-stabilité, celle de *Bacillus amyloliquefaciens* est caractérisée par un optimum de température qui, selon les applications va de 70°C à 90°C , alors que l'alpha amylase fongique est d'une thermo-stabilité assez faible, son optimum se situe entre 50°C et 55°C (**Nouadri, 2011**). L'alpha amylase

levurienne a des optimums de température, allant de 40°C à 60°C et parfois même 70°C pour certaines espèces comme *Lipomyces starkeyi* (**Panchal, 1990**).

I.2.2.4 Origine de l' -amylase

L' -amylase est une enzyme ubiquitaire, obtenu par extraction à partir de cellules végétales et animales ou par fermentation par des cellules microbiennes (**Nouadri, 2011**)

➤ **Source végétale**

Les -amylases végétales possèdent une importance primordiale dans le métabolisme glucidique où elles participent à la conversion de l'amidon en le réduisant en sucres réducteurs qui sont la source énergétique nécessaire à la germination et elles sont généralement incapables d'hydrolyser le maltose (**Nouadri, 2011**)

Ces enzymes végétales sont généralement obtenues par extraction à partir des céréales telles que le blé, le malt d'orge, le seigle et le riz (**Saci, 2012**).

➤ **Source animale**

L' -amylase animale est généralement extrait de la salive humaine, du pancréas des mammifères tel que les porcs et les veaux (**Rodeheaver et Wyah, 1984 ; Chatterton et al., 1996**). Cependant, la difficulté réside dans l'approvisionnement de la matière première (organe difficile à collecter) et le cout de l'extraction (**Saci, 2012**).

➤ **Source microbienne**

Dés que le développement de la microbiologie a permis de mieux comprendre les systèmes qui président à la synthèse des enzymes chez les micro-organismes, la production d'enzymes s'est orientée vers les processus fermentaires. Les principaux avantages des enzymes de fermentation par rapport aux enzymes d'extraction sont les suivants :

- une production indépendante des contraintes saisonnières et géographique.
- une possibilité d'utilisation de matière de bon marché.
- un rendement de production pouvant être augmenté de façon importante par l'amélioration des souches microbiennes et l'optimisation de conditions de fermentations. Par ailleurs, les enzymes d'origine microbienne présentent des propriétés et des spécificités diverses (**Bouix et Leveau, 1999**). Les micro-organismes utilisés dans la production de l' -amylase sont :

-Les bactéries

Industriellement, l' -amylase est obtenue par fermentation des *Bacillaceae* (Sicard, 1982 ; Sumitani et al., 2000). Cependant d'autres espèces, produisant également cette enzyme.telle que *Thermobifida fusca* (Chao-Hsun Yang & Wen-Hsiung Liu, 2004), *Streptomyces sp.* (Samrat Chakrabortya et al., 2009).

-Les champignons

L' -amylase est sans doute la première enzyme obtenue industriellement dès 1849 par Takamine qui avait breveté sa production par fermentation d'*Aspergillus oryzae* sur riz étuvé. Depuis, on continue d'utiliser le même micro-organisme et d'autres espèces pour la production de cette enzyme (Sicard, 1982). Les producteurs principaux de l' -amylase sont les moisissures des genres *Aspergillus* et *Rhizopus* (tableau I) En plus des moisissures, les levures participent également à la production de l' -amylase (Bouix & Leveau, 1999).

Tableau I: Différentes origines de l' -amylase microbienne (Bouix & Leveau, 1999)

Enzymes microbiennes	Références
Bactéries : <i>Bacillus licheniformis</i>	Kandra et al. (2002) - Dauter et al. (1999).
Moisissure : <i>Aspergillus oryzae</i>	Agger et al. (1998) - Botton et al. (1990).
Levure : <i>Saccharmyces cerevisiae</i>	Ruohonen et al. (1991) - Wang et Kuo (2001).

I.2.2.5 Application de l' -amylase

La grande spécificité d'action de l' -amylase et les conditions très douces dans lesquelles elle opère confèrent un avantage certain sur les catalyseurs chimiques ordinaires. Aussi, l'usage des préparations enzymatiques s'est considérablement développé dans de nombreux secteurs de la bio-industrie. En effet, de nombreux secteurs d'activité ont mis à profit, depuis une trentaine d'année, la bio-spécificité de l'enzyme et l'utilise comme agent de production de métabolites comme aides technologiques ou comme outils analytiques.

Les industries pharmaceutique, alimentaire et chimique sont les principaux utilisateurs de cette enzyme (**Cuveillier,1999 ; Pandey et al., 2000**).

➤ Industrie alimentaire

Les applications de l' -amylases dans le domaine alimentaire sont nombreuses. (**Fogarty & Kelly,1990 ; Santamaria et al.,1999**), Dans le domaine de sucrerie, l' -amylase est utilisée pour faciliter les opérations d'extraction et de raffinage de saccharose à partir de la betterave ou la canne à sucre, ainsi pour hydrolyser l'amidon des extraits de fruits évitant la formation de trouble (**Bhalla et al., 2000**).

Dans la panification et biscuiterie l'usage de l'alpha amylase « améliorant de panification » est devenue une pratique de fabrication machinal dans l'industrie panaiere, 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 -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 biscuites (**Malhotra et al., 2002**).

➤ Industrie des boissons

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

➤ Industries non alimentaires

A cause de leurs stabilités à la chaleur, les -amylases bactériennes conviennent à l'industrie, en dégradant l'apprêt amylicé lors du désencollage (**Sicard, 1982**). L' -amylase en papeterie sert à solubiliser l'amidon par liquéfaction servant à l'encollage et au couchage du papier (**Sicard, 1982**).

Dans les détergents d'aujourd'hui de blanchisserie, environs 50 % des détergents liquides et 25 % des détergents en poudre contiennent des enzymes pour aider à la décomposition des tâches, les -amylase alcalines sont les plus utilisées où elles facilitent la disparition des tâches en dégradent les souillures permettant ainsi l'augmentation du pouvoir blanchissant (**Igarashi et al., 1998**).

➤ **L'utilisation médicale et pharmaceutique**

Dans le domaine pharmaceutique, l' α -amylase est utilisée comme agent anti inflammatoire en soutenant le traitement par des antibiotiques, ou comme un aide digestif pour éviter les dyspepsies et les fermentations intestinales (**Vidal, 2003**). L' α -amylase peut être également utilisé dans le traitement du diabète et l'obésité (**Cuveillier, 1999**).

Dans le domaine médical, l' α -amylase dans les liquides biologiques peut déceler certaines maladies : insuffisance cardiaque, oreillons, cancer du pancréas... (**Pandey et al., 2000**).

I.2.3 Protéases

I.2.3.1 Définition

Les enzymes protéolytiques sont omniprésentes dans tous les organismes vivants vue leur rôle essentiel dans la croissance cellulaire et dans la différenciation (**Gupta et al., 2002; Sandhya et al., 2005**).

Les protéases sont des enzymes qui catalysent l'hydrolyse des protéines, en scindant la liaison peptidique qui lie deux acides aminés dans une chaîne peptidique. Elles sont normalement générées comme des pro-enzymes inactives (zymogènes) et selon les exigences, elles seront converties en forme active par une protéolyse limitée (**Mukherjee et al., 2008; Benedykt & Katarzyana, 2008; Reddy et al., 2008; Wilkesman & Kurz, 2009**).

I.2.3.2 Classification des protéases

D'une manière générale, les protéases sont classées selon plusieurs critères majeurs tout en se basant sur la localisation cellulaire, la nature du site catalytique, et selon leur besoin en ATP.

➤ **Selon la nature du site catalytique**

Les protéases se différencient également selon leur mode d'action : les exopeptidases et les endopeptidases, ces deux types de protéases sont divisés en plusieurs classes et sous classes.

✓ **Les exopeptidases**

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

✓ **Les endopeptidases**

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

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

Types de protéases	Classe
Exopeptidases	Aminopeptidases
	Carboxypeptidases
Endopeptidases	Protéases à sérine
	Protéases cystéine ou protéases à thiols
	Protéases aspartique ou protéases acides
	Protéases thréonique
	Protéases glutamique
	Métallo protéases

➤ **Selon la localisation cellulaire**

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

✓ **Les protéases intracellulaires**

Ces protéases jouent un rôle essentiel dans l'élaboration et la régulation des processus cellulaires et métaboliques, ce type de protéases est moins intéressant à

l'utilisation industrielle car ces enzymes nécessitent une étape de lyse cellulaire pour en faire l'extraction (**Mala et al, 1998**).

✓ **Les protéases extracellulaires**

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

➤ **Selon leur besoin en ATP**

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

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

I.2.3.3 Mode d'action des protéases

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

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

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

I.2.3.4 Caractères des protéases

Les protéases constituent un groupe très large et complexe contenant des enzymes qui diffèrent dans leurs propriétés tels que: le site actif, le mécanisme catalytique, les optima du pH et de température, le profil de la stabilité et la spécificité du substrat (**Sumantha et al., 2006; Vishwanatha et al., 2009**). La vitesse des réactions enzymatiques dépend aussi de la présence de certains activateurs ou des inhibiteurs (**Penasse, 1974**).

La spécificité d'action des enzymes protéolytiques est régie par la nature de l'acide aminé et d'autres groupes fonctionnels (aromatiques, aliphatiques ou la présence de sulfure) autour de la liaison à hydrolyser (**Sumantha et al., 2006; Benedykt & Katarzyana, 2008**).

Ces enzymes sont très importantes du fait qu'elles ne contrôlent pas seulement les réactions protéolytiques, mais aussi elles régulent les diverses cascades enzymatiques impliquées dans le métabolisme cellulaire tels que la décomposition des lipides et des glucides.

Les protéases sont capables de modifier les propriétés biologiques des chaînes polypeptidiques suite à la coupure des liaisons peptidiques (activation, inactivation ou une protéolyse non spécifique pendant la dégradation). La raison pour laquelle les protéases peuvent être dangereuses pour les cellules en altérant leur environnement. De ce fait, la cellule a développé une large gamme des mécanismes pour contrôler l'activité protéolytique.

Cette régulation peut être effectuée à n'importe quelle étape de l'expression des gènes (la transcription depuis l'opéron, la traduction, les modifications post-traductionnels, l'interaction avec les inhibiteurs et d'autres protéines) (**Benedykt & Katarzyana, 2008**).

I.2.3.5 Origine des enzymes protéolytique

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

I.2.3.6 Applications des protéases

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

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

➤ **Applications alimentaires**

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

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

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

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

➤ **Industrie des détergents**

Les protéases présentent un grand intérêt dans l'industrie des détergents pour leur capacité à favoriser l'élimination des taches protéiques vue leur avantage unique qui ne peut autrement être obtenue avec la technologie des détergents classiques (**Gupta et**

al., 2002). Maintenant, elles sont ajoutées comme ingrédients clés, ce qui représente environ 25% des ventes totales dans le monde entier des enzymes.

Parmi les principales conditions préalables pour l'utilisation des protéases dans la production des détergents sont : l'action sur une large gamme des substrats, l'activité et la stabilité à des pH et à des températures élevés et en présence des agents oxydants additionnés (Chellappan *et al.*, 2006; Guo & Ma, 2008).

➤ **Domaine pharmaceutique et médical**

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

➤ **Traitement des eaux usées industrielles**

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

➤ **Autres applications**

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

Chapitre 3 :

Datte

I.3.1 Datte

I.3.1.1 Définition

La datte, fruit du palmier dattier (**Djerbi, 1994**), est une baie généralement de forme allongée ou ovoïde de dimensions très variables et d'un poids de 3 à 15g, leur couleur va du blanc-jaunâtre ou sombre très foncée en passant par les ambrées, rouges et bruns plus ou moins foncées (**Munier, 1973**).

Elle est composée d'un noyau, ayant une consistance dure, entouré de chair.

La partie comestible dite chair ou pulpe est constituée de :

- l'épicarpe (peau) : c'est une enveloppe fine cellulosique.
- le mésocarpe plus ou moins charnu de consistance variable.
- l'endocarpe qui est une membrane entourant le noyau ou graine (**Djerbi, 1994**).

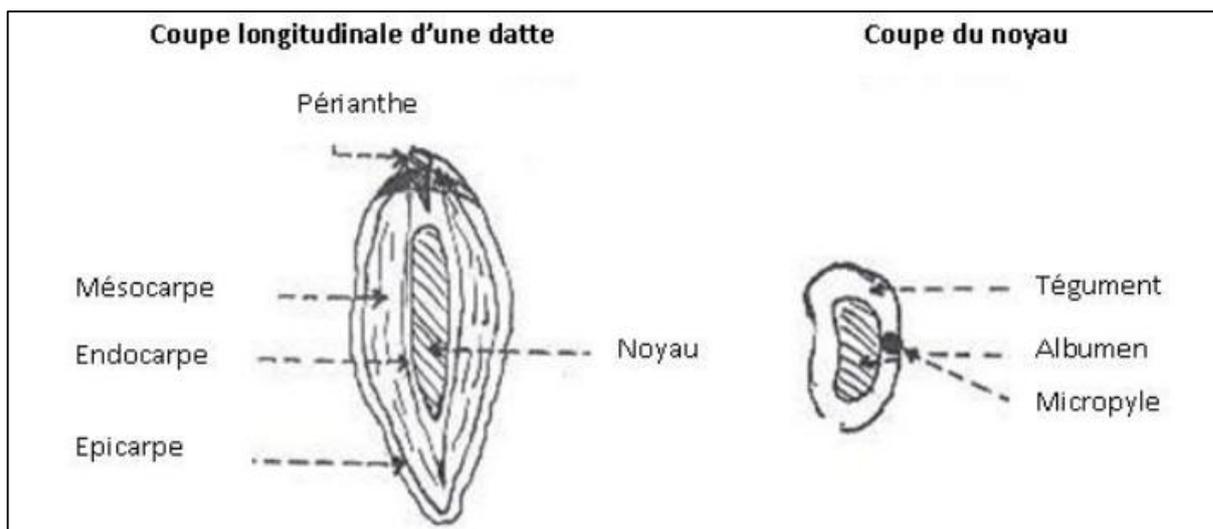


Figure 4 : Datte et noyau du palmier dattier d'après **Belguedj (2001)**.

I.3.1.2 Classification des dattes :

Les dattes sont classées en trois catégories d'après leur consistance. Celle-ci dépend de la teneur en eau de la pulpe. La stabilité de la datte dépend de la proportion de sucres par rapport à la teneur en eau. (**Munier, 1973**)

Les rapports (sucres totaux / eau) appelés aussi indices de qualité ou de dureté permettent de connaître le degré de stabilité et d'apprécier l'aptitude à la conservation des dattes (**Bouabidi et al, 1996**).

Nous distinguons :

- **Les dattes molles** : ayant un indice de dureté inférieur à 2, ces dattes passent par le stade Routab et demeurent molles au stade tamar. Il s'agit de la plus part des dattes à sucres réducteurs tel que : Menakher, Zaidi. Ghars, et Litima (**Dowson et Aten, 1963**).
- **Les dattes demi molles** : dont l'indice de dureté inférieur est compris entre 2 et 3,5 (**Bouabidi et al., 1996 ; Munier, 1973**) . Ces dattes passent par le stade Routab, mais sont un peu sèches au stade tamar. Les sucres sont le plus souvent réducteurs (**Dowson et Aten, 1963**) .Exemple : Deglet Nour, Kenta et Khalt Boufagous.
- **Les dattes sèches** : présentent un indice de dureté supérieurs à 3,5, elles ne passent pas par le stade Routab. Elles sont pour la plus part à saccharose (**Munier, 1973**). Exemple : Mech-Degla et Degla-Beida

I.3.1.3 Composition biochimique

La datte est constituée d'une partie charnue, la chair ou la pulpe et d'un noyau. C'est un fruit de grande valeur alimentaire et très énergétique, elle fournit des calories 4 à 5 fois supérieure à celles fournies par d'autres fruits (**Munier, 1973**).

- **Composition biochimique de la partie comestible "Pulpe " :**

- ✓ **Constituants majeurs**

- **L'eau :**

La teneur en eau est en fonction des variétés, du stade de maturation et du climat. Elle varie entre 8 et 30 % du poids de la chair fraîche avec une moyenne d'environ 19 % (**Noui, 2007**).

- **Les sucres :**

Les sucres sont les constituants majeurs de la datte. L'analyse des sucres de la datte a révélé essentiellement trois types : saccharose, fructose et glucose (**Estanove, 1990; Acourene & Tama, 1997**). Ceci n'exclut pas la présence d'autres sucres en faible proportion tels que : le galactose, le xylose et le sorbitol (**Favier et al., 1993; Siboukeur, 1997**).

La teneur en sucres totaux est très variable, elle dépend de la variété et du climat. Elle varie entre 70 et 90 % du poids de la matière sèche (**Belguedj, 2001**).

Tableau III: Teneur en sucre de quelques variétés Algériennes (**Belguedj, 2001**).

Variétés	% du poids à l'état sec		
	Sucres totaux	sucres réducteurs	sacharose
Ghars	77	77	0
Deglat Nour	77	39	38
Deglat Baida	76	17	59

- **Les fibres :**

La datte est riche en fibres, elle en apporte 8.1 à 12.7 % du poids sec (**Al-Shahib et Marshall, 2002**). Selon **Benchabane (1996)**, les constituants pariétaux de la datte sont : la pectine, la cellulose, l'hémicellulose et la lignine. Les dattes fines, comme la Deglet-Nour, ne contiennent qu'une faible proportion en cette substance, mais des proportions plus élevées atteignant parfois plus de 10 % dans le cas des dattes communes particulièrement fibreuses (**Munier, 1973**).

- **Les protéines :**

Les dattes présentent des teneurs faibles en composés protidiques, généralement moins de 3% (MS) (**Khallil et al., 2002 ; Besbes et al., 2009**). La pulpe des variétés algériennes renferme une faible quantité de protéines variant entre 0.38 et 2.5% (**NOUI, 2001**).

Favier et al., (1993) ont noté la présence des acides aminés suivants dans la datte: Isoleucine, Leucine , Lysine, Méthionine, Cystine, Phénylalanine, Tyrosine, Thréonine, Tryptophane, Valine, Arginine ,Histidine, Alanine ,Acide aspartique, Acide glutamique, Glycocolle ,Proline, Sérine.

- **Les acides gras :**

La datte renferme une faible quantité de lipides. Leur taux varie entre 0,43 et 1,9 % du poids frais (**Djouab, 2007**). Cette teneur est en fonction de la variété et du stade de maturation. **Yahiaoui (1998)** a étudié la composition en acides gras qui se trouvent dans la variété Deglet Nour, celle-ci est comprise entre 7 et 13%.

- **Les minéraux :**

La caractéristique la plus remarquable des dattes réside dans la présence de minéraux et d'oligoéléments particulièrement abondants dépassant nettement les autres fruits secs. (Benchelah & Maka, 2008).

Tableau IV: Teneur des dattes en éléments minéraux (en mg/100g de datte) (Djerbi, 1994)

Eléments	Teneur en mg/100g de datte	
Sodium	4,1	4,8
Potassium	649	754
Calcium	58	58,5
Magnésium	50,3	58,5
Fer	1,3	2
Cuiver	0,18	0,21
Phosphore	54,8	36,8
Soufre	43,8	51,8
Chlore	268	290

- **Les vitamines :**

La pulpe de dattes contient des vitamines en quantités variables avec les types de dattes et leur provenance. En général, elle contient des caroténoïdes et des vitamines du groupe B en quantités appréciables, mais peu de vitamine C (Munier, 1973).

Tableau V : Teneur en vitamines des dattes (Djerbi, 1994).

Types de vitamine	Teneur en mg /100g de datte
Vitamine A	100-80
Vitamine C	2,7-0,77
Vitamine B7	2,2-0,33
Vitamine B1	0,07
Vitamine B2	0,03

- **Les composés phénoliques :**

La datte renferme des métabolites secondaires dits composés phénoliques. l'analyse qualitative des composés phénoliques de la datte a révélée la présence des acides cinnamiques, des flavones et des flavonols (**Mansouri et al.,2005**). Selon Henk **et al., (2003)**, les polyphénols jouent un rôle important dans le corps : ils ont des effets anti-inflammatoires, antioxydants, abaissent la tension artérielle et renforcent le système immunitaire.....etc.

- **Les enzymes :**

Les enzymes jouent un rôle important dans le processus de conversion se produisant pendant le stade de formation et la maturation du fruit.

✓ **Constituants mineurs :**

Bien que 95% des constituants sont cités ci- dessus, il existe d'autres composés sou forme de traces tels que :

- Les acides organiques : l'acide citrique, l'acide malique.....
- Les substances volatiles : l'éthanol, l'isobutanol, l'isopentanol.
- Les pigments : les caroténoïdes, la chlorophylle..... (**Benchabane, 1996**).

➤ **Composition biochimique de la partie non comestible "Noyau "**

Le noyau représente 7 à 30% du poids de la datte. Il peut être utilisé dans l'alimentation humaine et animale.

Des données analytiques sur la composition chimique du noyaux de dattes montrent qu'il renferme plusieurs acides gras avec une proportion plus importante d'acides oléique et laurique (**Devshony et al., 1992**).

Tableau VI : Composition et valeur fourragère des noyaux de datte (%) de variété Mauritanienne et Irakienne (Djerbi, 1994).

	variété Mauritanienne	Variété Irakienne
Eau	7.16	6.46
Cendres	1.22	1.12
Lipides	8.86	8.49
Protides	6.54	5.22
Glucides	58.90	62.51
Valeur fourragère	17.32	16.20
Cellulose	1.09	1.1

I.3.1.4 Formation et évolution des dattes

La consistance varie selon la teneur en eau et le stade de maturation du fruit (Djerbi, 1994).

En effet, on peut distinguer différents stades d'évolution de la datte, chaque stade porte une appellation particulière selon les pays ; cependant ; de nombreux auteurs ont adopté la terminologie utilisée en Iraq. Ainsi les différents stades sont définis ainsi (Djerbi, 1994).

- Hababouk : ce stade commence juste après la fécondation. Le fruit pèse 1 gramme et la croissance est lente.
- Kimri : il est caractérisé par une élévation rapide du poids et de la taille, une accumulation des sucres réducteurs et des sucres totaux, une grande acidité active et une teneur en eau élevées .
- Khalal : on assiste à un poids et une taille maximale du fruit, une augmentation de la concentration du saccharose et une diminution de la teneur en eau
- Routab : caractérisé par une augmentation de la teneur des monosaccharides et les dattes deviennent molles .
- Tamar : c'est la maturité commerciale du fruit. Le fruit a perdu une quantité importante d'eau ce qui permettra d'éviter la fermentation et d'assurer la conservation du fruit.

I.3.1.5 Technologie de la datte

La transformation de la datte remonte à l'époque la plus ancienne de l'existence du palmier dattier. Les méthodes utilisées furent primitives, mais elles permettaient de conserver des récoltes pendant de longues durées (**El-ogaidi, 1987**).

Dans les années 80, une évolution de la technologie de la datte avait envahie certains pays arabes et plus particulièrement l'Irak (**El-ogaidi, 1987**).

De nos jours, les populations des régions phoenicicoles algériennes, continuent à élaborer de nombreux produits qu'elles utilisaient dans leur alimentation quotidienne et/ou dans leur pharmacopée traditionnelle tels que la pâte de dattes, le vinaigre, des boissons dont le sirop de dattes.

I.3.2 Sirop de datte

I.3.2.1 Définition

Le sirop de dattes est obtenu par la méthode d'extraction par diffusion. Ils présentent une coloration ambrée plus au moins foncée. Ils sont limpides, ce qui permet d'éviter d'avoir recours aux procédés de clarification.

Selon **Munier (1973)**, les sirops de dattes peuvent être utilisés comme édulcorants liquides. Ces derniers comportent plusieurs avantages par rapport au sucre cristallisé (**Guerin et al., 1982**).

I.3.2.2 Composition biochimique du sirop de dattes

Les dattes contiennent essentiellement un mélange de sucres qui diffèrent par un certain nombre de propriétés, mais du point de vue alimentaire, ils ont globalement la même valeur énergétique (**Dowson & Aten, 1963**).

En général, la composition biochimique du sirop de dattes se résume comme suit :

- une teneur en eau de 25% du poids frais.
- une teneur élevée en sucres totaux qui représente 96% dont la majorité (il contient des proportions en glucose et fructose presque égales, et une faible quantité de saccharose, qui peut être inverti en sucres simples lors de l'extraction sous l'effet thermique, et acidité du milieu (**El-ogaidi, 1987**).

- les éléments minéraux et les protéines sont présents en faibles quantités (**Abdelfattah, 1990 ; Ibrahim & Khalil, 1997**).

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

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

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

I.3.2.3 Propriétés du sirop de datte

➤ Propriétés organoleptiques du sirop

✓ Goût

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

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

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

✓ **Couleur**

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

➤ **Propriétés physiques du sirop**

✓ **Densité**

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

✓ **Viscosité**

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

I.3.2.4 Aspects bactériologiques

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

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

I.3.2.5. Utilisations de sirop de dattes

Le sirop de dattes est fréquemment utilisé dans les Biscuits et les produits laitiers (boissons, yaourts, desserts, etc), produits à base de céréales (barres et petit-déjeuner), confiserie, préparation de fruits, glaces, boulangerie, snacks, substituts du saccharose et du miel pour les consommateurs...etc

Ce produit, bien qu'il possède un aspect sombre et stable, il est utilisé comme édulcorant dans de nombreuses préparations pâtisseries et peut également servir comme matière de base dans la production de boissons gazeuses (**Hamad *et al.*, 1982**).

DEUXIEME PARTIE (11) :

Matériel et Méthodes

II.1. Isolement et sélection des souches levuriennes productrices d' α -amylase et de protéase

II.1.1. Echantillonnage

Le travail basé sur la production d' α -amylase et de protéase secrétées par des levures isolées à partir du sol. En effet, les échantillons du sol utilisés pour cet objectif sont prélevés à partir des différents sites des régions d'OUED SOUF et OUED RIGH.

Les deux lacs sahariens situés dans le Sud Est Algérien et considérés comme des écosystèmes extrêmes (Température élevée). Lac Ayata (X : 33°29'58.26"N-Y : 5°59'10.89"E) est situé dans la commune de sidi Amran-Djamaa d'altitude 39m (figure 5) et El Chatt (33°22'55.86" N et 6°51'40.13" E) à une altitude de 63m (figure 6), qui est localisée dans la commune d'El-Oued.

Les régions d'étude sont caractérisées par un climat saharien avec un été chaud et sec et un hiver doux, les précipitations sont très faibles, par contre la température est élevée et qui dépasse parfois les 45°C. Ce qui conduit à une évaporation intense et une humidité relative plus importante l'hiver qu'en été (**Drouiche ., 2008**). Le sol a une texture sableuse et il est riche en calcaire avec une salinité plus ou moins élevée (**Khadraoui 2006**).



Figure 5 : Lac Ayata (Photo originale)



Figure 6: Lac d'El Chatt (Photo originale)

Pour chaque prélèvement (100 à 200 g du sol avoisinant la source), la couche supérieure (de 3 cm) est écartée. Les prélèvements sont déposés sur des boîtes stériles, ensuite transportés au laboratoire afin d'être analysés (**Rodríguez-Zaragoza et al., 2005**).

II.1.2 Analyse des quelque paramètres physicochimiques et biochimiques du sol

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

II.1.2.1 Mesure du pH du sol

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

II.1.2.2 Mesure de la conductivité électrique du sol

10 g de sol sont mélangés avec 50 ml d'eau distillée. Après agitation de 30 min, la décantation est accélérée par centrifugation pendant 2 min. la conductivité est mesurée à l'aide d'un conductimètre (**Cirad, 2004**).

II.1.2.3 Détermination de l'humidité

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

L'humidité est mesurée par la formule :

$$H\% = ((P_0 - P_t) - (P_1 - P_t)) / (P_0 - P_t) \times 100.$$

H% : humidité en (%).

Pt : poids de la tare.

P0 : poids de la tare avec échantillon.

P1 : poids constant après séchage multiple (**Multon, 1982**).

II.1.2.4 Détermination de la matière organique

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 (**Cirad, 2004**).

II.1.3 Isolement des levures

Un gramme de sol est suspendu dans 9 ml d'eau physiologique stérile et homogénéisé pendant 10min (**Ulacio et al., 1997**), cette suspension représente la solution mère à partir de laquelle d'autres dilutions sont préparées jusqu'à 10^{-3} (**Botton et al., 1990**). Chaque dilution est étalée à la surface des milieux gélosés Potato-Dextrose-Agar (PDA) (**Tsuyoshi et al., 2004**) (Annexe 01). L'ensemencement est fait en surface, par étalement de 0.1 ml de culture en strie transversale (**Hammer et al, 1998 ;Tsuyoshi et al., 2004**). Les boîtes de Pétri sont incubées à 30°C, pendant 5 jours (**Harrigon & Mc lace, 1976**).

II.1.4 Purification

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

II.1.5 Conservation

La méthode de conservation des souches la plus utilisée et la plus simple consiste à stockage des culture après le repiquage à 4°C pour favoriser leur viabilité et limiter les possibilités de variations (**UI-Haq et al., 2002**).

Les colonies bien isolées, ont subies une coloration au Lugol, puis observées au microscope optique (l'objectif x 100), pour vérifier la morphologie et l'homogénéité des cellules (**Benaouida, 2008**).

II.1.6 Sélection des souches productrices des enzymes

II.1.6.1 Sélection des souches protéolytique

L'activité protéolytique est évaluée sur un milieu de lait gélosé (Annexe 02), ce milieu est ensemencé soit par touche ou par strie.

La protéolyse comme démontrée par la dégradation de la caséine incorporée dans le milieu de culture, se traduit par l'apparition d'une zone claire, autour des colonies, après 24 à 48 h d'incubation à 37°C (**Akacem, 2012**).

II.1.6.2 Sélection des souches amylolytiques

La sélection est effectuée sur un milieu PDA à pH 5, additionné d'amidon soluble à 2%. Les boîtes sont ensuite incubées à 30°C pendant 24 à 72 h. Après incubation, une solution de lugol est versée 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, le diamètre des zones de lyse, est pris en considération pour la sélection de la souche amylolytique la plus performante (**Tatsinkou et al., 2005**).

II.2 Production enzymatique

II.2.1 Préparation du milieu de base

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



Figure 7: Etape de la préparation de sirop de datte. **Photo originale (2015)**

L'enrichissement de ce milieu de culture se fait par l'ajoute des éléments nutritifs suivant:

Sulfate de magnésiumMg SO₄ (0,15g/l).

Sulfate de potassium monobasique.....KH₂PO₄ (0,3 g/l).

Ammoniaque (1 ml/l)

On ajouté 2g/l de substrat enzymatique comme inducteur (amidon et caséine).

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

II.2.2 Analyses physicochimiques et biochimiques de sirop de datte

II.2.2.1 Détermination du pH

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

II.2.2.2 Détermination d'humidité

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

II.2.2.3 Détermination du taux de cendres

Les cendres sont déterminées par incinération. La prise d'essai ayant servi à la détermination de la matière sèche (à 105°C pendant 20h) est suivie par une calcination au four à moufle à 550°C pendant 5h, les cendres exprimées en pourcentage de masse sont données par la formule (**Audigié et al., 1984**).

$$C\% = \frac{M0 - M1}{M2 - M1} \times 100(\%)$$

M0 : masse de la capsule et les cendres

M1 : masse de la capsule vide

M2 : masse de la capsule et la prise d'essai.

II.2.2.4 Détermination de l'acidité titrable

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

Le titrage de l'acidité se fait avec une solution d'hydroxyde de sodium (NaOH) de 0,1 N en présence de quelques gouttes de phénophtaléine comme indicateur.

Prélever 25 ml du jus et les verser dans une fiole jaugée de 250 ml. Compléter jusqu'au trait de jauge avec de l'eau distillée puis agiter (dilution). Prélever un volume $V = 25$ mL de la solution préparée, puis ajouter 0,25 à 0,5 ml de phénophtaléine. Doser cette solution à l'aide d'une solution de soude de concentration 0,1 et repérer le volume équivalent au moment du virage de l'indicateur coloré. (Coloration rose)

L'acidité titrable, exprimée en milliéquivalent, pour 100g de dattes est obtenue en tenant compte de la dilution opérée par la formule suivante:

Acidité titrable = $100 * V1 / V0$

Où

V0 : le volume, en millilitre, de la prise d'essai.

V1 : le volume, en millilitre, de la solution d'hydroxyde de sodium 0,1N utilisée.

Il est également possible d'exprimer conventionnellement l'acidité titrable en grammes d'acides pour 100g de dattes, en multipliant par le facteur correspondant à l'acide.

II.2.2.5 Dosage des sucres totaux

Les sucres totaux sont déterminés par la méthode au « phenol-sulfuric acid » (**Dubois et al., 1956**). Les oses sont dégradés en présence d'acide sulfurique concentré en composés de la famille des dérivés furfuriques. (anhydro-méthylfurfural dans le cas d'hexose, et d' furfural dans le cas de pentose). Ces produits se condensent avec le phénol pour donner un complexe jaune orangé, l'intensité de la coloration est donc proportionnelle à la concentration des oses. La densité optique est mesurée à 488 nm à l'aide d'un spectrophotomètre.

II.2.2.6 Dosage des sucres réducteurs

Par la méthode de Bertrand, rapporté par le principe de cette méthode consiste faire agir un excès de liqueur cuproalcaline dans des conditions bien fixées puis on sépare l'oxyde cuivreux et on le traite par une liqueur sulfurique de sulfate ferrique (**Acourene & Tama, 2001**).

II.2.3 Préparation de l'inoculum

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

II.2.4 Conduite de la fermentation

Cette fermentation a pour but d'adapter la souche de levure au milieu de culture utilisé.

Les cultures sont réalisées dans des erlens-myers de 350 ml à raison de 50 ml par erlen, puis stérilisées à 120°C pendant 20 min. A l'aide d'une seringue, les milieux sont ensemencés par 1 ml de suspension de cellules. Les erlens sont incubées à 30°C pendant 5 jours (**UI-haq et al., 2002**).

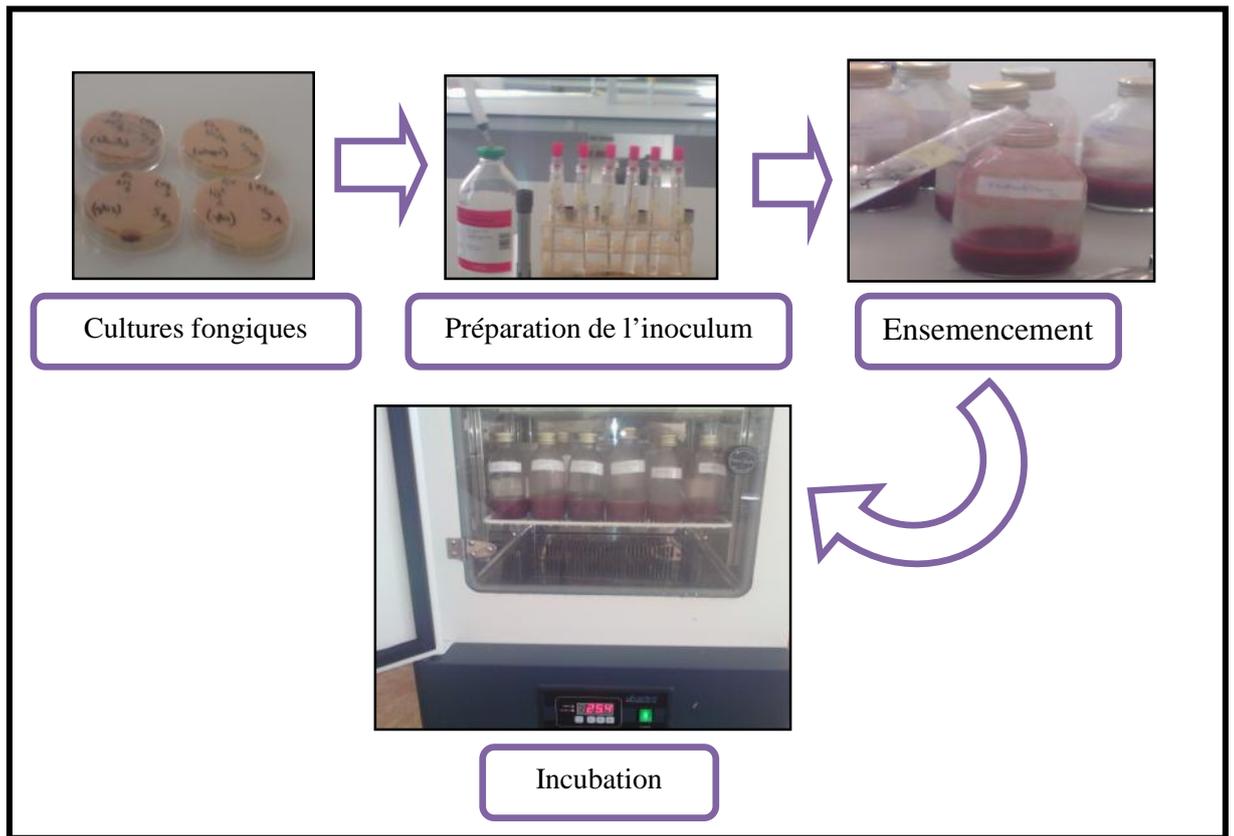


Figure 8: Conduite de la fermentation. **Photo originale (2015)**

II.2.5 Cinétique de production enzymatique des souches sélectionnées

II.2.5.1. Mesure du pH

Le pH de l'extrait enzymatique est mesuré à l'aide d'un pH-mètre (PHM210. Meterlab) (Benaouida., 2008).

II.2.5.2. Mesure de la biomasse

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

II.2.5.3. Dosage de l'activité enzymatique

➤ Dosage de l'activité protéolytique

Cette mesure est déterminée selon la méthode décrite par Siboukeur et al ., (2005)

L'objectif de la mesure de l'activité protéolytique est l'évaluation du taux de dégradation du Substrat (caséine) par l'enzyme d'origine fongique pendant la réaction

primaire. Pour cela on mesure les concentrations en produits d'hydrolyse de la caséine, solubles dans l'acide trichloracétique (TCA) à 12%.

L'addition du TCA arrête la réaction, et une centrifugation à 5000 tr /min pendant 15 min à 4°C, permet de séparer le précipité de la caséine(culot) et de produit d'hydrolyse(surnageant), solubilisé dans TCA. La détermination de l'activité protéolytique de l'extrait enzymatique comporte cinq étapes :

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

Les résultats s'expriment en terme de concentration de tyrosine ($\mu\text{g/ml}$) d'extrait enzymatique (**Federici, 1982 cité in Femani, 2002**), par référence à un courbe étalon établie à partir de concentration croissante en tyrosine variant de 10 à 100 $\mu\text{g/ml}$ (Annexe 03).

➤ Dosage de l'activité amylasique

A 1ml de l'extrait enzymatique tamponnée à pH 7 avec du tampon phosphate 0.1M sont ajoutés 1 ml de substrat (solution d'amidon 2g/l). Le mélange est incubé 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 (**Saci, 2012**)).

II.2.5.4 Dosage des protéines

Les protéines ont été dosées par la méthode de **Bradford (1976)**, ou le bleu de coomassie forme avec les protéines un complexe coloré présentant un maximum d'absorption à 595nm. La coloration très sensible peut être effectuée très rapidement et reste stable pendant 30min, le Sérum Albumine Bovine (SAB) est utilisé comme standard (Annexe 04).

II.2.5.5 Dosage des sucres totaux

A 1 ml d'échantillon, on ajouté 10 ml d'eau distillé suivi par l'adition de 1ml de phénol à 5% et 5 ml d'acide sulfurique concentré. Puis l'agitation du tube et Laisser refroidir à obscurité pendant 30 min à température ambiante.

L'apparition du complexe jaune orange est suivie en mesurant la densité optique à 490 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV / Visible. Le taux de sucre est calculé par référence à une courbe d'étalonnage préalablement établie avec une solution mère de glucose à 100 µg/ml (**Dubois et al., 1956**) (Annexe 05).

II.2.6 Optimisation de la production enzymatique et la biomasse

Il est très connu que la production des enzymes microbiennes est fortement influencée par la composition du milieu de fermentation, les facteurs physicochimiques et par le temps d'incubation (**Djekrif-Dakhmouche et al., 2006**).

La méthode adoptée pendant notre étude préliminaire d'optimisation est la technique d'un facteur à la fois (one factor at a time), basée sur la variation d'un seul facteur pendant que les autres facteurs sont gardés à des niveaux constants. Ce protocole permet d'évaluer l'effet individuel d'un paramètre et d'incorporer par la suite sa valeur optimale avant de passer à l'optimisation du paramètre suivant (**Kumar et al., 2003; Wang & Wan, 2009**).

Cette stratégie présente l'avantage d'être simple et facile, en plus les effets individuels des composants de milieu de culture et les conditions de processus de fermentation sont capables d'être visualisés sous forme de graphes. La méthode présente des limitations du fait qu'elle ignore les interactions entre les paramètres, le temps consommé est important, les coûts élevés surtout en cas d'un grand nombre de variables, conduisant à une expérimentation étendue (**Wang & Wan, 2009**). dans notre étude on fait l'étude de la production enzymatique et la biomasse selon la variation de pH initial du milieu et la concentration de substrat enzymatique.

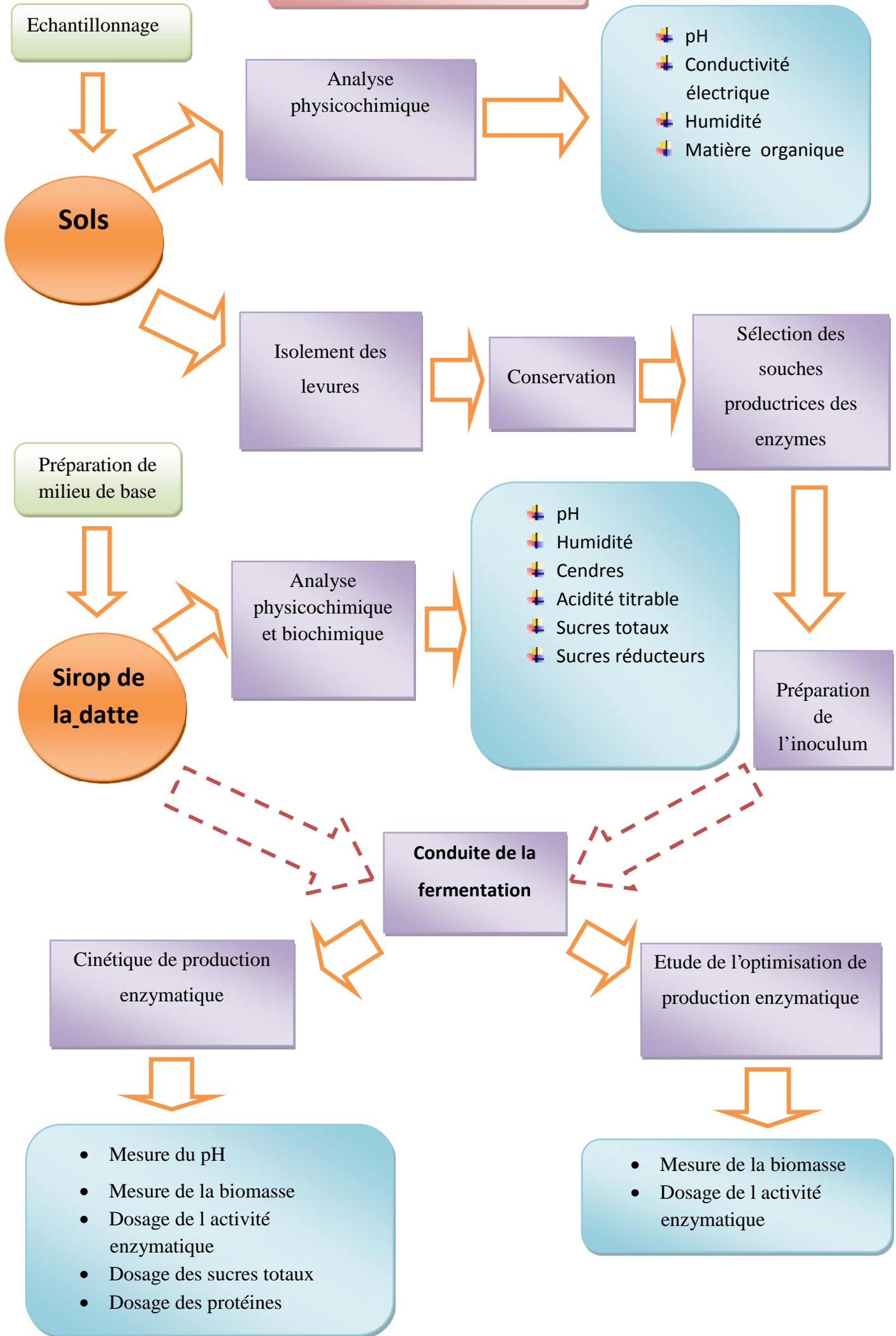
✓ pH initial du milieu

Afin d'étudier l'influence du pH initial du milieu sur la production enzymatique et la biomasse, des fermentations sont conduites à la température optimale (30°) et a concentration de substrats fixé (2g/l) mais à différents pH variant de 3,5,7 et 9 pendant 5 jours. L'ajustement du pH est effectué avec une solution d'HCl et /ou du NaOH (1N).

✓ **Concentration de substrat enzymatique initial**

On fait une étude sur l'influence de la concentration de substrat initial dans le milieu sur la production enzymatique et la biomasse à des conditions de fermentation stable (température optimale (30°) et pH initial fixé(5)) mais à différentes concentrations variant de 2,5, 10 et 15g/l pendant 5 jours.

Matériel et méthodes



TROISIEME PARTIE (III) :

Résultats et Discussion

III.1 Analyses physicochimiques du sol

Les propriétés physicochimiques des échantillons du sol sont rapportées dans le tableau VIII.

Tableau VIII : propriétés physicochimiques des échantillons du sol.

Paramètre	Echantillon d'Ayata (E1)	Echantillon d'EL Chatt (E2)
PH	7.99	8.02
CE ds/m	5.72	2.23
Matière organique %	0.82	0.05
Humidité %	0.44	0.9

Le tableau VIII montre que le pH des échantillons est neutre tendant légèrement vers l'alcalinité ce qui concorde avec les résultats obtenus par **Boucherit (2011)** sur trois échantillons au niveau des sites différents : du sol de sebkha d'Ain Ezzmoul, Ain-mlila et Wilaya d'Oum-el-Bouaghi avec respectivement des pH égales à 7,71, 7,75 et 7,76; c'est également ce qu'a révélé l'étude de **Stivaletta et al., (2009)** (pH entre 7,4 et 7,8) pour les sebkhas de Tunisie.

Selon **Richards (1969)**, on peut définir le type de sol en fonction de sa conductivité. Ainsi l'échantillon AIATA (E1) dont la conductivité est 5.72ds/m est considéré comme étant un sol très salé par rapport à l'échantillon d'El Oued (E2) ; ce dernier est considéré comme sol salé avec une conductivités égale à 2.23 ds/ m.

Les analyses des échantillons ont montrées que La matière organique est en faible teneur pour E1 et presque nul dans l'autre échantillon, alors que elles sont relativement riches en sel minéraux. Ceci est probablement dû à la présence de la végétation au niveau du site **Boucherit (2011)**. Elles ont également montré un taux d'humidité des sols très faible pour E1 (0.44%) est relativement élevé pour E2 (0.9%).

D'après ces résultats on note que les deux échantillons sont caractérisés par une humidité et matières organique faible et un taux de salinité élevé .Par ailleurs, un pH, relativement neutre (E1 :7,90 ; E2 :8,02) ; ce qui favorise une reproduction rapide des populations bactériennes (**Allen et Ahearn., 1987**) au dépens de celle des levures, dont

la croissance est optimale à des pH acides (**Phaff et Starmer., 1978**). Malgré ces conditions extrêmes, quelques souches levuriennes arrivent à résister.

III.2 Isolement des souches

Les cultures des prélèvements sur milieu de PDA ont permis l'isolement de quatre souches différentes. Les résultats sont rassemblés dans le tableau IX ; ils font apparaître la répartition du nombre de colonies appartenant aux champignons apparus dans chaque échantillon.

Tableau IX : Isolement des levures à partir des différents échantillons de sol sur le milieu PDA.

Echantillon	Origine	Dilution	Codes d'isolats
Lac Ayata (E1)	Sol avoisinant le lac	10^{-2}	S1
Lac chatt (E2)	Sol avoisinant le lac	SM	S2
		10^{-1}	S3
		10^{-3}	S4

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

III.2.1 Identification des souches sélectionnées

Les souches sélectionnées sont identifiées après une étude macroscopique et microscopique.

✓ Identification macroscopique

L'étude macroscopique des isolats après incubation de 3 jours sur milieux PDA à température 30°, est réalisée par des observations à l'œil nu. Les résultats d'observation rassemblés dans le tableau X; l'aspect des colonies est représenté dans le tableau XI.

Tableau X : Caractères cultureux et morphologiques des isolats des levures.

Codes d'isolats	Caractères macroscopiques			Caractères microscopiques	Identifications des genres
	Aspect	Surface	Couleur		
S1	Lisse	Plate	Blanche	Sphérique. Bourgeonnement simple	Pichia
S2	Lisse	Plate	Crème	Ovoïde avec pseudo mycélium Bourgeonnement multilatéral	Saccharomyces
S3	Cireux	Bombée	Blanche Cassée	Thalle cloisonné simple fragmentation du mycélium	Candida
S4	Lisse	Plate	Jaune	Sphérique. Bourgeonnement simple	/

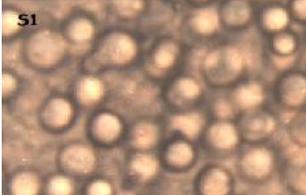
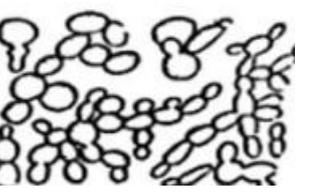
✓ Identification microscopique

L'étude macroscopique réalisée préalablement est complétée par une étude microscopique dans le but de déterminer les espèces des souches sélectionnées.

cette étude repose sur des critères (aspect, couleur et structure des conidiophores). L'étude microscopique de ces souches est réalisée au grossissement $\times 100$.

Le classement des isolats est réalisé en se basant sur les caractères cultureux et la morphologie cellulaire. Les caractéristiques présentées par la souche S1 peut être rapprochée au genre *Pichia* (Harrigan, 1998 ; Higgins & Cregg, 1998 ; Kavanagh, 2005); la souche S2 se rapprochent du genre *Saccharomyces* (Harrigan, 1998 ; Osiewacz, 2002 ; Guilliermond, 2003); la souche S3 semble appartenir au genre *Candida* (Beuchat, 1987 ; Harrigan, 1998); l'aspect macroscopique et microscopique de la souche S4, nous a pas permis de l'attribuer à aucun genre levurienne (Tableau XI).

Tableau XI: Observations macroscopiques et microscopiques des isolats des levures.

Codes d'isolats	Observations macroscopiques	Observations microscopiques (X 100)	Observations microscopiques de Pichia (1) ; Saccharomyces (2) ; Candida (3) (1: Kavanagh, 2005 ., 2, 3: Harrigan, 1998;)
S1			
S2			
S3			
S4			/

III.3 Sélection des souches productrices des enzymes

III.3.1 Mise en évidence de l'activité protéolytique

Le choix des milieux de culture est déterminant dans l'isolement et le dénombrement des microorganismes ; il l'est aussi dans la mise en évidence de l'activité enzymatique et surtout dans le choix de la substance protéique employée comme substrat pour la production des protéases (**Clarke & Steel, 1966**). Pour cela, on a utilisé le milieu au lait gélosé (la gélose au lait) comme milieu sélectif.

Les résultats obtenus après incubation sur gélose caséinée ont permis la sélection de 2 souches ayant une activité protéolytique parmi les 4 souches testées. Les souches

protéolytiques sont reconnues par l'halo transparent résultant de la dégradation de la gélose caséinée par l'exo-protéase produite et qui entoure les colonies (Figure 9). Les diamètres des zones de lyse sont mesurés et presque la plupart des isolats ont des diamètres entre 1,5-2 Cm. D'après **Thapa et al., (2006)**, nos souches fongiques ont une activité protéolytique performante.



Figure 9: Sélection de souches protéolytique (Après 72 h d'incubation à 37 °C et à pH 5)

III.3.2 Mise en évidence de l'activité amylolytique

Parmi les quatre souches levuriennes isolées, nous devons sélectionner la souches les plus performantes, pour la production de l' -amylase. Ces souches, sont testées sur milieu PDA à 2% d'amidon. Tous les souches S1, S2, S3 et S4 ont développé des zones de lyse (halo clair) sur ce milieu sélectif (figure 10). Parmi ces souches levuriennes amylolytiques, la souche S3 se distingue par une activité amylolytique élevée.

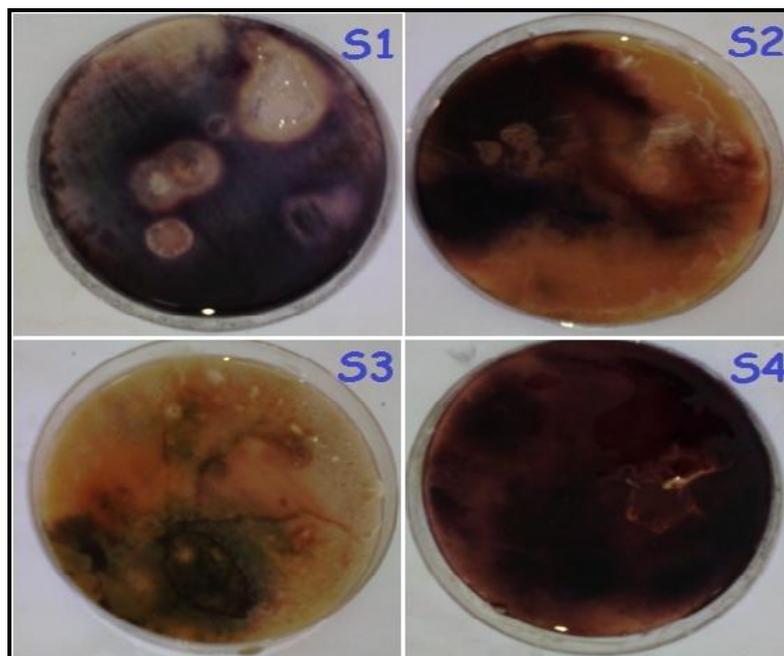


Figure 10: Sélection de souches amylolytiques (Après 72 h d'incubation à 30 °C et à pH 5).

III.4 Compositions physicochimiques et biochimiques de sirop de datte

Le processus de fermentation est lié à la quantité des éléments entrant dans la composition du milieu de culture utilisé. Par conséquent, la détermination de la composition biochimique de sirop de datte (milieu de base pour la production des enzymes) est nécessaire.

Tableau XII : Analyses physicochimiques et biochimique de sirop de datte.

Paramètre	Valeur
pH	5.53
Acidité g/Kg	1.028
Humidité %	77.3
Cendre %	1.4
Sucre totaux %	52.68
Sucre réducteur %	19.03

Les résultats des analyses physico-chimiques, laissent remarquer que la datte molle (Ghars) présente un pH acide (5.53), Ces résultats restent similaires à ceux montrés par **Benagga (2014)**. Le pH constitue l'un des principaux obstacles que la flore microbienne doit franchir pour assurer sa prolifération. Un pH de l'ordre de 3 à 6 est très favorable au développement des levures et moisissures. Les bactéries par contre préfèrent des milieux neutres, soit 7 et 7,5. Certaines tolèrent des variations entre 6 et 9 (**Siboukeur., 1997 & Rygg., 1977**). Ce pH est défavorable à la prolifération des bactéries, mais il est favorable à la prolifération des champignons. Les altérations provoquées par les levures et les moisissures affectent surtout la qualité organoleptique (**Bourgeois et al.,1988**).

Le sirop de datte faisant l'objet de ce travail, présentent une teneur en humidité 77.3 % pour ce type de datte (Ghars) et un taux d'acidité de 1.028 g/Kg, Cette valeur est inférieure à celle trouvée par **Benahmed (2012)** ; à savoir 2,10 et cité par **Benagga (2014)**. L'acidité titrable renseigne sur l'état physique du fruit que le pH. Notons, qu'une forte acidité est

souvent associée à une mauvaise qualité des dattes. Comme il a été rapporté par **Booij et al., (1992)** le taux d'acidité de la datte est proportionnel à la teneur en eau et donc inversement proportionnel au degré de maturité (**Khalil et al., 2002**).

Le taux de cendres (1.4%) indiquant sa richesse en sels minéraux présents dans l'échantillon. La valeur trouvée est inférieure à celle trouvée par **Acourene et al., (2001)** qui est 1,84%. La teneur en cendres de la datte est dépendante des conditions de fertilité du sol de même que les palmiers bien irrigués donnent des dattes présentant une teneur en eau élevée par rapport aux palmiers mal irrigués (**Baangood et al., 1984**).

D'après le tableau XII, nous remarquons que les teneurs en sucres totaux est 52.68% et les teneurs en sucres réducteurs est égale 19.03%. Ces résultats sont proches de celle trouvée par **Benahmed (2012)** où les sucres totaux sont de 50,50% et les sucres réducteurs sont de 15,09%. Les sucres sont les constituants les plus importants dans les dattes. Ils sont également responsables de la douceur de l'aliment. De nombreux auteurs, dont **Munier (1973)** ; **Nixon et al., (1978)** ; **Sawaya et al., (1983)**, s'accordent sur le fait que les sucres de dattes varient en fonction de la variété considérée, du climat et du stade de maturation. Les résultats rapportés par différents auteurs dépendent en partie de la méthode utilisée.

Les résultats des analyses biochimiques de la présente étude montrent que les sucres constituent la majeure partie de la pulpe. Ceci lui confère une grande valeur énergétique. L'analyse quantitative des sucres montre que les dattes molles renferment des teneurs élevées en sucres totaux, en sucres réducteurs. Les sucres réducteurs (glucose et fructose) résultent de l'inversion du saccharose par l'invertase au cours de la maturation de la datte. Le sucre inverti (fructose) empêche la cristallisation des sucres (**Doucet & Multon., 1992**). Il est responsable de la texture tendre des dattes molles et demi-molles. Il a un pouvoir sucrant élevé ce qui explique probablement le goût sucré des dattes molles. Les sucres réducteurs favorisent le phénomène de brunissement non enzymatique qui est relativement responsable de la coloration brune des dattes.

Ces résultats des analyses de sirop de datte de la présente étude, montrent que ce support présente des caractéristiques physicochimiques (pH acide, humidité, L'acidité titrable, Le taux de cendres) et biochimiques (sucres totaux, sucres réducteurs) qui lui confère un milieu favorable pour la prolifération des levures.

III.5 Production de protéase

III.5.1 Etude cinétique de la production de protéase

La cinétique de la production de la protéase par les deux souches sélectionnées (S3p et S4p) et cultivées dans un milieu à base de sirop de datte se fait par l'évaluation des paramètres du milieu pendant cinq jours.

III.5.1.1 Evolution de pH des Spp

Les résultats du pH des souches sont mentionnés dans la figure 11. Ils montrent une diminution du pH pour la souche S3p jusqu'à 3,63, par contre on observe une augmentation importante du pH dans les cultures de S4p qui atteint un pic de 5,66 puis elle diminue jusqu'à 4,22.

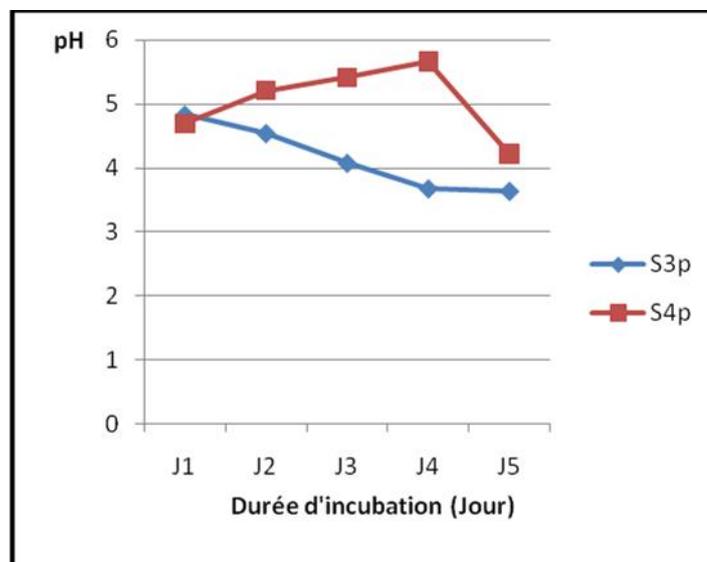


Figure 11: Variation du pH de milieu au cours de la culture des Spp.

Le pH est un facteur important qui influence la croissance des microorganismes (Prescott *et al.*, 1995). Le pH a également une forte influence sur la production de protéases. Calik *et al.*, (2002) ont démontré que le pH affecte les mécanismes de régulation métabolique de la production de protéases chez *B. licheniformis*. Également, Hameed *et al.*, (1999) & Kembhavi *et al.*, (1993) ont démontré que la production de protéases par *B. subtilis* est maximale lorsque le pH est contrôlé durant la culture microbienne. Des résultats semblables ont été observés dans plusieurs autres études (Gupta *et al.*, 2002 & Kumar *et al.*, 1999). De plus, des variations importantes de pH au cours de la fermentation peuvent mener à la désactivation des protéases excrétées dans le milieu (Kumar *et al.*, 1999).

La diminution du pH peut être due à une libération d'acides organiques dans le milieu (**Botton *et al.*, 1990**). L'augmentation de ce dernier indique une production d'ammoniac résultant du métabolisme de protéines après l'action des protéases puis de l'oxydation des acides aminés au cours de leur utilisation comme source d'énergie (**García-Gómez *et al.*, 2009**). L'oxydation s'effectue selon la réaction suivante :



Ces résultats indiquent que le pH du milieu est affecté par les processus enzymatiques et le transport des divers composants à travers la membrane. En effet, les variations du pH sont des indicateurs des changements dans les activités métaboliques. Mais ces variations dépendent du type de fermentation (**Sandhya *et al.*, 2005**).

III.5.1.2 Evolution de la biomasse des Spp

La croissance des souches productrices de protéase (S3p, S4p) est étudiée à travers l'évolution de la biomasse cellulaire en fonction du temps.

L'évolution de la biomasse en fonction du temps est représentée par la figure 12. Elle se traduit par les deux premières phases d'une courbe de croissance classique : de latence et exponentielle, (**Scriban, 1999**). La diminution signifie la phase de latence qui peut durer 24 h et correspond à l'adaptation et à la germination de l'inoculum. Mais l'augmentation correspond à la phase exponentielle; elle est caractérisée par une croissance rapide où le poids humide atteint des valeurs maximales de 120-140 g/l, ces valeurs sont plus supérieures à celle trouvée par **Boucherit (2011)** à savoir 38 g/l.

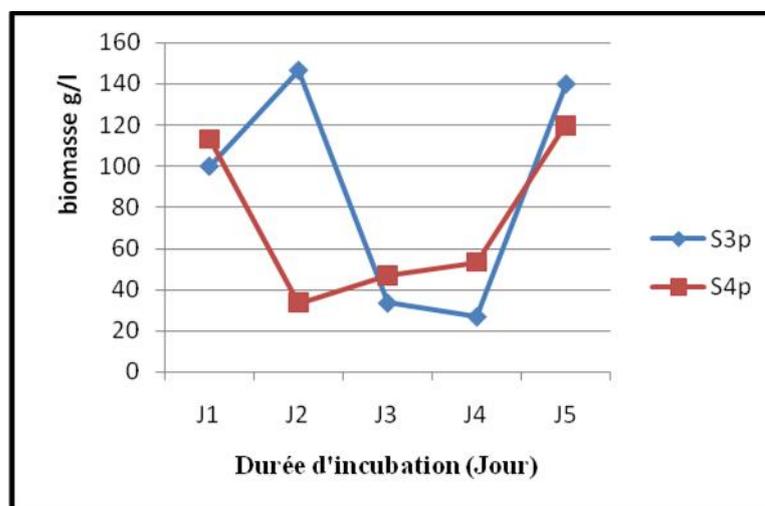


Figure 12: Variation de la biomasse au cours de la culture des Spp.

III.5.1.3 Evolution de l'activité protéolytique

Le profil de la production de la protéase en fonction de temps a été déterminés par incubation des cultures fongiques dans des conditions optimales préalablement établies à différents temps allant de 1 à 5 jours.

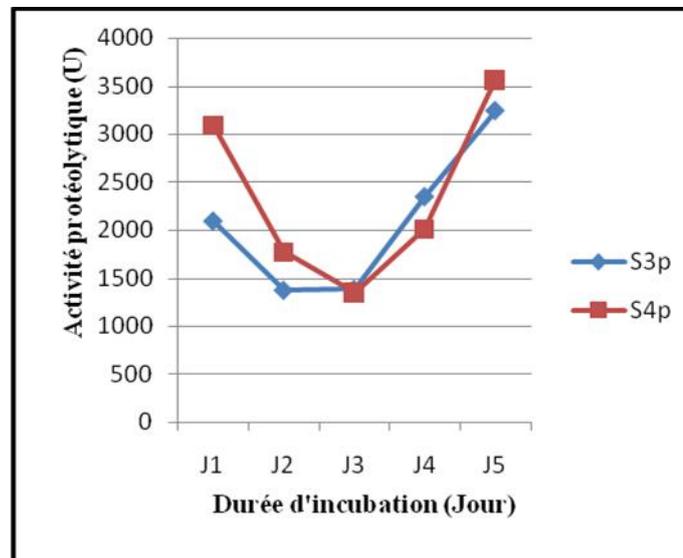


Figure 13: Variation de l'activité protéolytique au cours de la culture.

La cinétique de production (figure 13) montre que la production s'amorce au 3^{ème} j jusqu' à 1385 U (S3p) et 1345 U (S4p) puis elle augmente tout au long des phases de croissance exponentielle et stationnaire.

Le maximum de la production d'enzyme a été observé après 72h de la fermentation. Le même résultat a été obtenu avec *A. niger* (Moosavi-Nasab *et al.*, 2010) & *A. oryzae* (Shata, 2005) sur son de blé, *Rhizopus microsporus* sur son de riz (Sumantha *et al.*, 2006) et avec *A. clavatus* sur milieu liquide (Tremacoldi *et al.*, 2004).

Le profil cinétique montre que la production maximale de la protéase neutre par *Aspergillus oryzae* sur milieu à base de déchets de tomates est obtenue après 96 h de fermentation, aussi bien dans la culture liquide (4687 U) (Belmessikh, 2011). Le même temps de production est rapporté aussi bien pour la production de protéase neutre par *Microbacterium sp.* (Thys *et al.*, 2006) que pour la protéase alcaline par *Colwellia sp.* et *A. oryzae* (Murthy & Naidu, 2010; Wang *et al.*, 2008).

Par ailleurs, Battaglino *et al.*, (1991) indiquent qu'un intervalle de temps de 72-96 h nécessaire pour la production d'une activité maximale de la protéase neutre par *A. oryzae* cultivée sur le son de blé en SSF (Solide State Fermentation).

Cependant, d'autres travaux rapportent des temps de fermentation différents selon l'activité protéasique mesurée ; 84 h pour **Chutmanop *et al.*, (2008)**, 72 h pour **Hajji *et al.*, (2008) & Kumar *et al.*, (2008)** ; **Sandhya *et al.*, (2005)** et 44 h pour **García-Gómez *et al.*, (2009)**.

III.5.1.4 Evolution de la concentration des protéines

La concentration en protéines varie modérément au cours de la fermentation (figure 14). Une diminution est observée dans le milieu de souche S3 suivi par une augmentation jusqu'à le 4^{ème} jour. Par ailleurs, le taux de protéines prend une grande hausse depuis le début de durée l'incubation de S4.

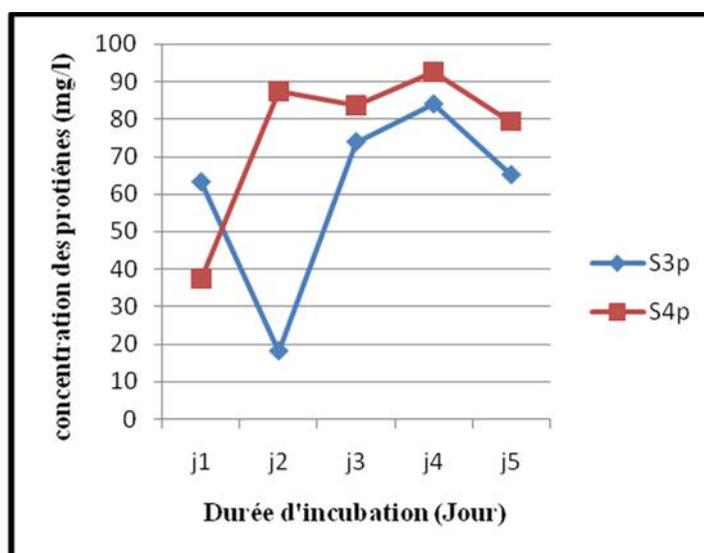


Figure 14: Variation de concentration des protéines au cours de la culture.

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

III.5.2 Optimisation de l'activité protéolytique

Dans cette étape on a étudié les effets de pH initial de milieu et la concentration de substrat utilisé (caséine) sur variation de l'activité protéolytique.

III.5.2.1 Optimisation de l'activité protéolytique selon la variation de pH initial

D'après la figure 15, on note la diminution de l'activité protéolytique jusqu'à 3^{ème} j à savoir des valeurs de 989 U à 905U. Par ailleurs, une augmentation de l'activité est observée et elle atteint le maximum, au delà de cette valeur, elle garde une activité importante à un pH 5, 9, 7 et moins dans les milieux de pH 3.

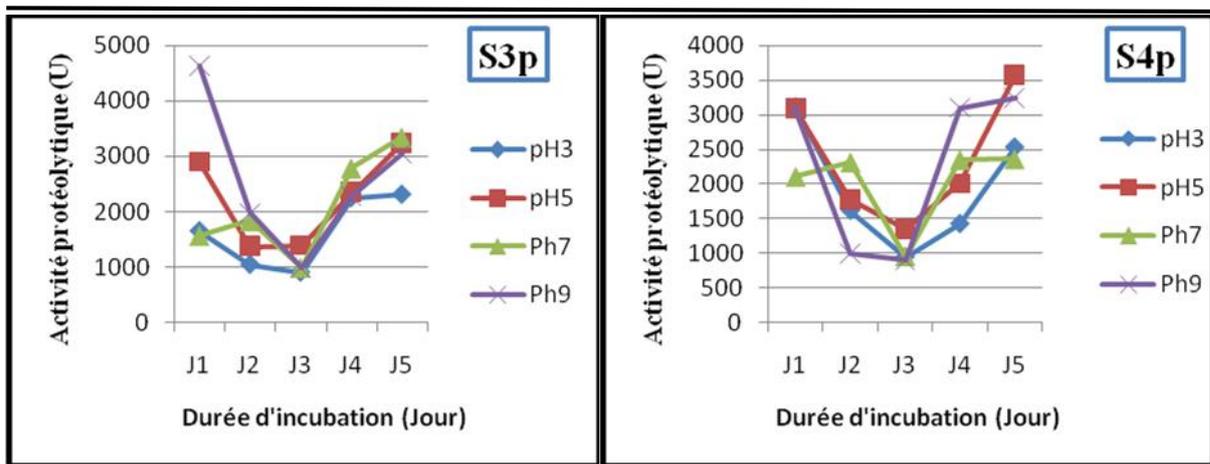


Figure 15: Evolution de l'activité protéolytique en fonction du pH initial du milieu.

La même figure indique que la souche sélectionnée S3p présente également une activité protéasique à pH neutre, alcalin et acide, mais l'activité de ce dernier est moins importante que les milieux neutre et alcalin. Presque les mêmes résultats concernent la souche S4p, cette levure produit donc des différents types de protéases. Les résultats obtenus se rapprochent de ceux rapportés par **Singh et al., (1994)** par rapport à la protéase acide.

Chaque enzyme possède un pH optimal auquel la vitesse de la réaction catalysée est maximale. Des légères variations du pH autour de cette valeur entraînent une diminution de l'activité enzymatique, en raison des modifications de l'ionisation des groupements compris dans le site actif de l'enzyme. Des déviations plus importantes du pH, conduisent à dénaturer l'enzyme en modifiant l'ionisation des acides aminés et en rompant les interactions non covalentes maintenant sa structure tridimensionnelle (**Hames et al., 2006**).

III.5.2.2 Optimisation de l'activité protéolytique selon la variation de concentration de substrat (caséine)

L'activité enzymatique est mesurée à différentes concentrations de caséine. La figure 16 indique que l'activité est diminuée jusqu'au troisième jour d'incubation, puis elle atteint des valeurs maximales convergentes malgré la différence de la concentration de caséine. Ces résultats peuvent être signifiés que les concentrations croissantes de ces substrats n'affectent pas la production enzymatique.

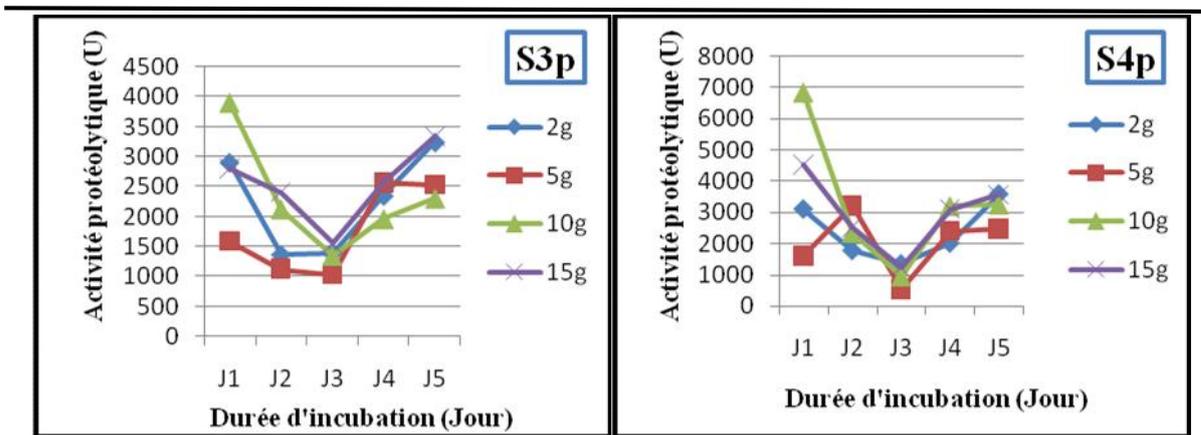


Figure 16: Evolution de l'activité protéolytique en fonction de la concentration de la caséine.

Cependant, des résultats semblables sont trouvés par **Belmessikh (2011)**, où la caséine à 1% n'entraîne pas d'effet significatif sur la production de l'enzyme en fermentation liquide; dans ce cas, l'effet est négatif et non significatif. Ceci est en accord avec les résultats de plusieurs études qui signalent des activités protéolytiques très faibles produites en présence de caséine (**Abidi et al., 2008; Chi et al., 2007; Joo & Chang, 2005; Laxman et al., 2005; Hajji et al., 2008; Tari et al., 2006**). Ceci est probablement dû à la nature du substrat azoté ; en effet, les substrats simples tels que la caséine et la gélatine possèdent une faible solubilité et donnent des faibles rendements en activités enzymatiques. Au contraire, les substrats complexes tels que la farine de soja entraînent de bons rendements en activités protéolytiques (**Sumantha et al., 2006**).

L'induction de l'activité protéolytique par l'enrichissement des substrats en protéines semble être dépendante de la souche microbienne et du type de substrat utilisé pour l'expérience (**Agrawal et al., 2005**). Les sources d'azote organiques sont des inducteurs de la production d'une grande quantité de protéase par rapport aux sources inorganiques (**Wang et al., 2008a**). La caséine pourrait donc fournir les peptides nécessaires au processus d'induction.

III.5.3 Optimisation de la biomasse des Spp

La concentration de substrat et le pH initial des milieux sont des facteurs importants pour déterminer les conditions optimales pour la meilleure production de la biomasse des souches productrices de la protéase.

III.5.3.1 Optimisation de la biomasse des Spp selon la variation de pH initial

L'étude de l'influence du pH initial de milieu sur la biomasse montre une diminution au quatrième jour d'incubation après l'augmentation enregistré dans les deux premiers jours à des valeurs variant entre 26,66 à 93,33 g/l. Dans le cinquième jour on a enregistré une augmentation surtout dans le milieu à pH 9 (S4p). Ces résultats des milieux à différent pH (3,5 et 9 à l'exception des milieux à pH 7, la biomasse est augmentée au quatrième jour puis elle diminuée à la fin (figure 17).

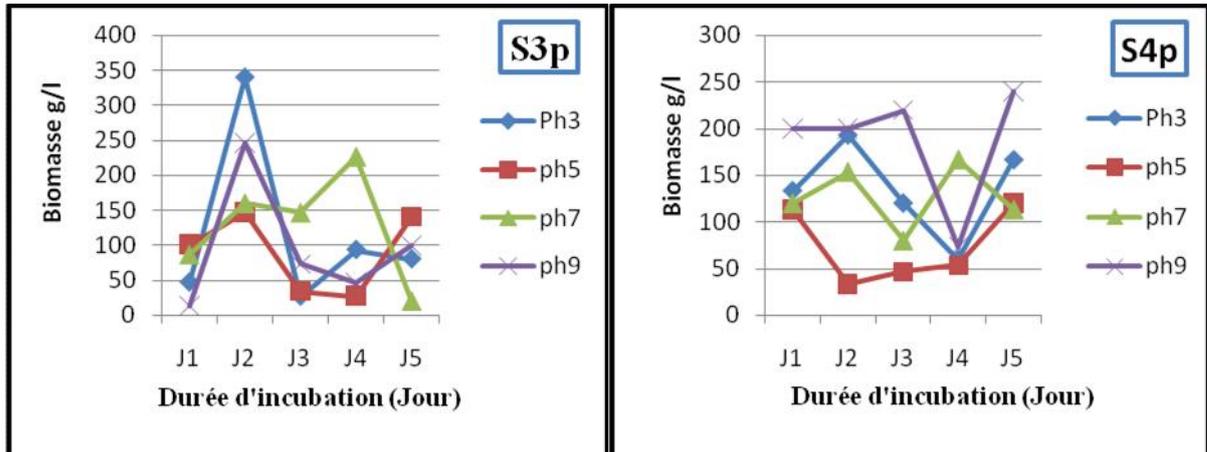


Figure 17: Evolution de la biomasse pendant l'incubation des Spp en fonction du pH initial du milieu.

En effet, les activités métaboliques des microorganismes sont très sensibles à la variation de pH, car il influe fortement sur des nombreux processus enzymatiques ainsi que le transport de différents éléments nutritifs à travers la membrane cellulaire assurant la croissance et la production des métabolites (Lazim *et al.*, 2009; Paranthaman *et al.*, 2009; Sandhya *et al.*, 2005). Ces activités métaboliques conduisent inévitablement à un changement dans l'équilibre des ions hydrogène et donc du pH du milieu de culture (Elibol & Moreira, 2005).

III.5.3.2 Optimisation de la biomasse des Spp selon la variation de concentration de substrat (caséine)

La figure 18 montre qu'il y a une variation de la biomasse presque parallèle avec la variation de l'activité protéolytique; une diminution en premier jours jusqu'à 33,33 g/l puis une augmentation est observée (253,33g/l), cette valeur diminue au cinquième jour (40 g/l), cela concerné les concentration 5 et 10 g/l. mais dans les milieux à une concentration 2g/l la biomasse reste augmenté.

On remarque une diminution de la biomasse à une concentration élevée de substrat 15g/l à partir de deuxième jour jusqu' à le dernière duré d'incubation dans la culture de S3p.

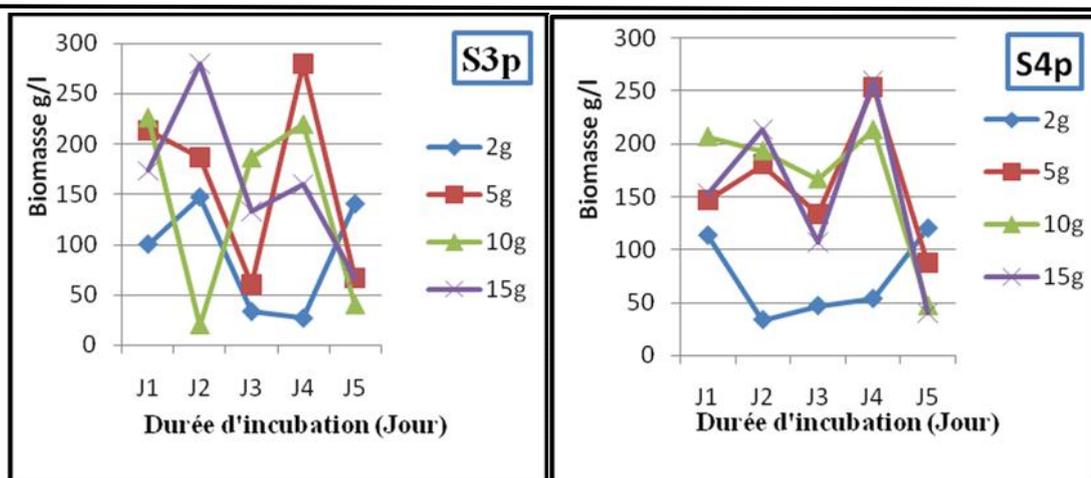


Figure 18: Evolution de la biomasse pendant l'incubation des Spp en fonction de la concentration de caséine.

En comparaison avec les cultures à 5 g/L et 10 g/L de caséine; les deux milieux favorisent l'adaptation des micro-organismes. Cela suggère que la meilleure adaptation de la culture plus diluées serait due à l'absence du phénomène d'inhibition (**Barnabé, 2004; Vidyarthi et al., 2002**).

La faible croissance observée dans la culture de S3p à 15g/l pourrait également s'expliquer par un phénomène d'inhibition de la croissance par de fortes concentrations. En effet, le passage d'un milieu faiblement concentré (faible concentration en éléments nutritifs) à un milieu plus fortement concentré amène des modifications au niveau de la pression osmotique. De brusques et grandes modifications dans la pression osmotique peuvent affecter le métabolisme de la cellule et empêcher son bon fonctionnement (**Prescott et al., 1995**).

Une diminution progressive de la croissance peut être liée à l'augmentation du temps d'incubation, suggérant clairement le rôle d'enzyme en tant qu'un métabolite primaire, produit pendant la phase logarithmique de la croissance du champignon afin d'utiliser les nutriments (protéines) présents dans les milieux.

L'incubation au-delà de cette période a montré un déclin rapide dans le rendement, cette diminution était probablement due à l'épuisement des éléments nutritifs à la disposition des microorganismes. (**Lazim et al., 2009; Paranthman et al., 2009; Sumantha et al., 2006**).

III.5 Production d' -amylase

III.5.1 Etude cinétique de la production d' -amylase

La survie de la cinétique de la production enzymatique par les quatre souches sélectionnées (S1a, S2a, S3a et S4a) en les cultivant dans un milieu à base de sirop de datte se fait par l'évaluation des paramètres du milieu pendant la période d'incubation.

III.6.1.1 Evolution de pH des Spa

Au cours de la culture microbienne (production ou croissance), le pH du milieu change en fonction du temps. Nous observons une augmentation faible de pH jusqu'à 2^{ème} jour d'incubation pour les souches S1a, S2a, S3a, S4a. On a enregistré une petite augmentation pendant le 3^{ème} jour pour la souche S2a (5.04) par rapport aux autres souches qui enregistrent une diminution. Dans le 4^{ème} jour la S2a diminue avec les autres souches jusqu'à la fin de fermentation (5^{ème} jour).

Notre pH de milieu se situe entre 3.81 et 5.04, ces résultats sont proches à ceux trouvés par **Zoubiri (2012)** ; à savoir un pH varié entre 3.5 à 5. La variation de pH de milieu au cours de la fermentation est due au changement de la composition du milieu et aux souches utilisées.

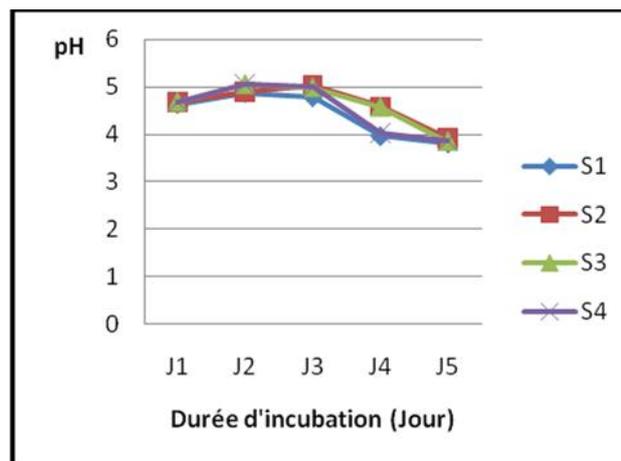


Figure 19: Variation du pH de milieu au cours de la culture des Spa.

La diminution de pH peut être expliquée par la fermentation des sources carbonées disponibles dans le milieu par ces souches, puis elles en fabriquent des acides organiques, qui augmentent l'acidité du milieu, ce qui se traduit par une diminution de pH (**Panchal, 1990 & Refice et al., 2011**). Mais l'augmentation de pH, peut être engendrée par la dégradation des protéines par les levures qui libèrent progressivement des acides aminés hydrolysés en suite en ammoniacque par désamination (**Benaouida, 2008**).

III.6.1.2 Evolution de la biomasse des Spa

On observe généralement une augmentation progressive de la biomasse concernées les trois souches productrices de l'enzyme S2a, S3a et S4a, dès le 1^{er} jour de la culture (autour

20g/L), pour atteindre des valeurs maximales pendant le 3^{ème} jour est d'environ 140g/L, puis on remarque une diminution de ses valeurs jusqu'au 4^{ème} jour (environ 40 g/L). Durant le 5^{ème} jour d'incubation ces valeurs de biomasse elles atteignent leur maximale, sauf que la souche (S1a) qui se caractérise par une diminution de la biomasse au-delà de 2^{ème} jour puis une augmentation est enregistrée. Pour le reste de la durée d'incubation jusqu'à 186,66g/l.

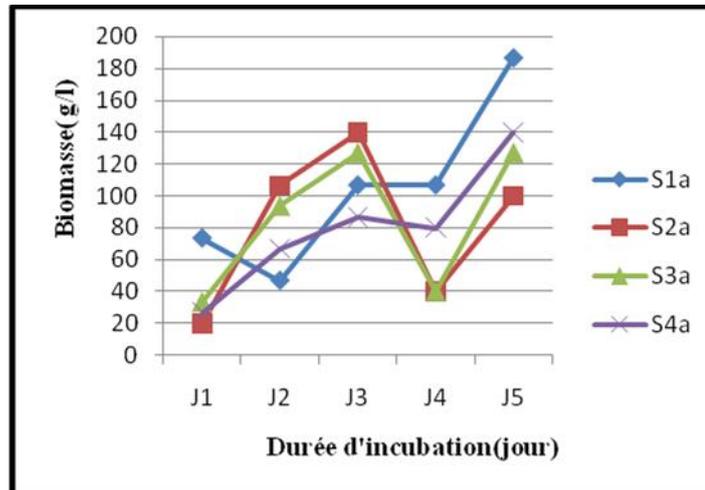


Figure 20: Variation de la biomasse au cours de la culture des Spa.

D'après les résultats obtenus (figure 20), la S1a donne une quantité maximale de biomasse de l'ordre de 186,66 g/l, cette valeur est la plus élevée par rapport aux autres souches. Ces résultats sont plus supérieurs à celles trouvées par **Saci (2012)** ; à savoir 48.54 g/l.

L'augmentation de biomasse est expliquée par le fait que le moût de datte de milieu est riche en sucres simples facilement assimilable. Il peut donc servir comme milieu pour le développement des levures notamment quand on enrichit ce moût par les sels minéraux (**Ould el hadj., Bitour., Siboukeur., 2006**). L'analyse biochimique de l'extrait de datte montre sa richesse en sucres fermentescibles (glucose), ces sucres sont utilisés par la levure comme substrat organique pour réaliser sa croissance (**Bacha, 2008**).

La diminution de la croissance pour la souche S1a dans le 1^{er} jour correspond à la période d'adaptation à son environnement et la synthèse d'enzymes indispensables pour métaboliser les substrats présents dans le milieu. Au cours de cette phase, il n'y a pas de production cellulaire (**Bensmira, 2006**).

En note une phase dite d'accélération, où la concentration de la biomasse augmente significativement pour les souches S2a, S3a, S4a au 1^{er} jour et dans le 2^{ème} jour chez la S1a.

On assiste au démarrage de la croissance proprement dite avec une biomasse qui passe de 40 à 180 g/L.

III.6.1.3 Evolution de l'activité amylasique

Nous constatons que l'activité amylasique varie d'une souche à l'autre suivant la durée d'incubation dont une diminution de la production est enregistré à 2^{ème} jour d'incubation pour les souches S1, S2, S3, S4 .puis on assiste à une augmentation de la production qui atteint un maximum de (3451,308 UI/l). Cette augmentation est suivie par une diminution jusqu'à une valeur minimale de (2526,51 UI/l) pour le S3a au 5^{ème} jour d'incubation.

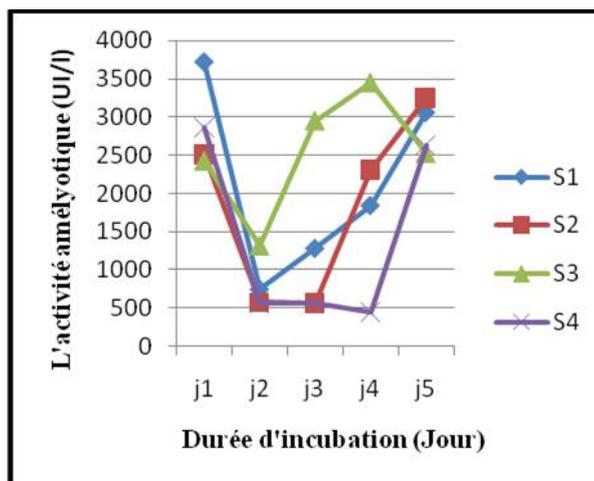


Figure 21: Variation de l'activité amylasique au cours de la culture.

Pour la souche S3 présence une baisse de l'activité enzymatique dans le 4^{ème} jour est due à l'apparition des protéases après la lyse (**Bancerz et al., 2005**) et au changement des conditions de la fermentation (épuisement du milieu, variation de pH, rétro-inhibition de l'enzyme par le glucose) (**Chung et al., 1995**).

III.6.1.4 Evolution de la concentration des glucides

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**).

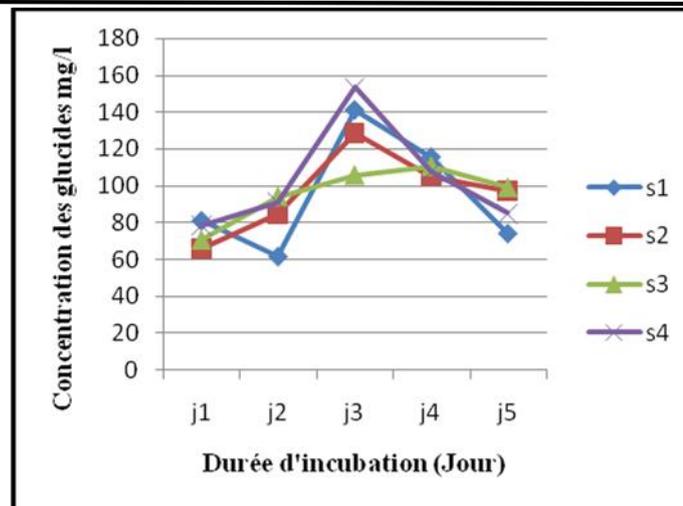


Figure 22: Variation de la concentration des glucides au cours de la culture.

Au cours de la fermentation, la teneur du milieu en sucres augmente pendant les trois premiers jours et elle atteint des valeurs maximales de 128,8 à 153,3 mg/l sauf que la souche S3, la concentration de sucres reste élevée jusqu'à le 4^{ème} jour. Dans le milieu d'incubation de S1 on remarque une diminution de concentration au 2^{ème} jour (61,55 mg/l) puis elle a augmenté dans le 3^{ème} jour. Toutes ces valeurs maximales elles diminuent au dernier jour d'incubation où la teneur en sucres a des valeurs minimales qui varient entre 74,03 à 99,17 mg/l (figure 22). Des variations similaires ont été trouvées par **Bensmir (2006)** où il a trouvé une baisse significative au bout de troisième jour.

La consommation des glucides devient importante dans les derniers jours, elle est due à l'assimilation des glucides totaux présents dans les milieux par les levures pour leurs activités métaboliques (**Benaouida, 2008**).

III.6.2 Optimisation de l'activité amylasique

Dans cette partie, la cinétique de production de biomasse et d' α -amylase par les quatre souches a été suivie en vue de l'optimisation de la croissance et de la production enzymatique. Pour cela, on étudie l'influence du pH et la concentration de l'amidon sur cette cinétique.

III.6.2.1 Optimisation de l'activité amylasique selon la variation de pH initial

La cinétique d'évolution de l'activité amylasique des quatre souches durant le temps d'incubation en fonction du pH initial de milieu est représentée dans la figure 23.

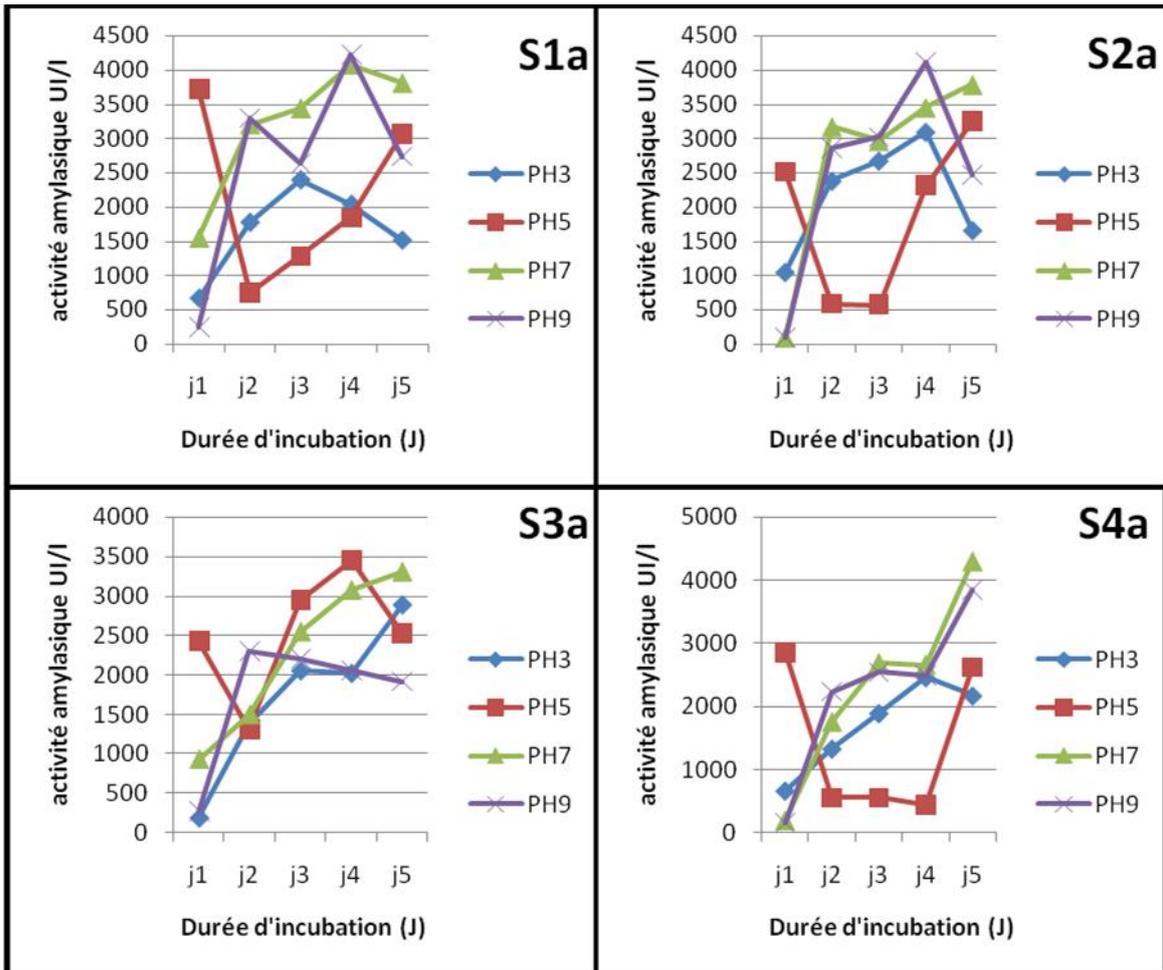


Figure 23: L'évolution de l'activité amylasique pendant l'incubation en fonction du pH initial du milieu.

D'après ces résultats on observe une variation d'augmentation de l'activité amylasique pour toutes les souches dans les milieux (pH :3 ;7 ;9) avec des valeurs entre 2052,988 à 4303,012 UI /L. Cette augmentation est suivie par un diminution pour quelques souches, donc ces variations ne se stabilisent pas au cours de la fermentation, on peut déduire que l'enzyme produite est instable dans un milieu par rapport un autre milieu **Lagzouli et al., (2007)** et due certainement à l'effet du pH sur l'ionisation des groupements des chaînes latérales qui maintiennent la structure de l'enzyme d'une part et interviennent dans l'activité du site actif d'autre part.

Dans le milieu à pH5 on observe une diminution de l'activité amylasique chez toutes les souches jusqu'à 2^{ème} jour d'incubation, puis on enregistre une variation d'augmentation de l'activité amylasique avec une valeur maximale 3451,308 UI /L.

La culture de ces souches dans les différents pH (acide, neutre et basique) montre, que les souches S1a, S2a, présentent la meilleur production d' -amylase dans le milieu basique

dans le 4^{ème} jour avec des valeurs 4223,562 à 4115,51 UI/L, mais pour les souches S3a, S4a; on a enregistré la meilleure activité amylasique maximale dans le milieu neutre dans le 5^{ème} jour de fermentation.

La souche S4a présente la activité amylasique la plus élevée avec une valeur de 4303,012 UI/L dans le milieu neutre, ce résultat est en concorde à celui trouvé par **Drapron (1961)**, leur résultat montre que le pH optimal pour production de l' -amylase varié entre (5-7), aussi **Lagzouli et al., (2007)** le maximum de production des enzymes amylolytiques chez *Filobasidium capsuligenum* été enregistré dans des milieu présentant des pH allant de 5 à 6.5, semblable à celui des -amylases fongiques, mais différent de celui des -amylases bactériennes, qui ont plutôt des pH optimum alcalins (pH 8) .

III.6.2.2 Optimisation de l'activité amylasique selon la variation de concentration de substrat (Amidon)

Nous constatons que la production d' -amylase chez la souche S2a augmente dès le 1^{er} jour jusqu'à le 5^{ème} jour d'incubation chez les plupart des milieux (La meilleure valeur : 4801,958 UI/L à la concentration 5g/l de l'amidon).

On note une fluctuation de la production d' -amylase dans les milieux (2g ,5g ,15g). Dans le milieu 10g on observe une augmentation de l'activité jusqu'à la fin d'incubation pour la plupart des souches, sauf le S3a qui présente augmentation de l'activité jusqu'à le 4^{ème} jour.

La meilleure valeur de production d' -amylase de la fin d'incubation a été enregistrée dans le milieu de concentration (5g) à un (4801,958UI/L) pour la plupart des souches (figure 24).

À partir ces valeurs, nous constatons qu'il existe une corrélation directe entre la concentration de l'amidon et l'activité enzymatique; où la concentration d'amidon dans le milieu influencent positivement sur l'activité de l'enzyme.

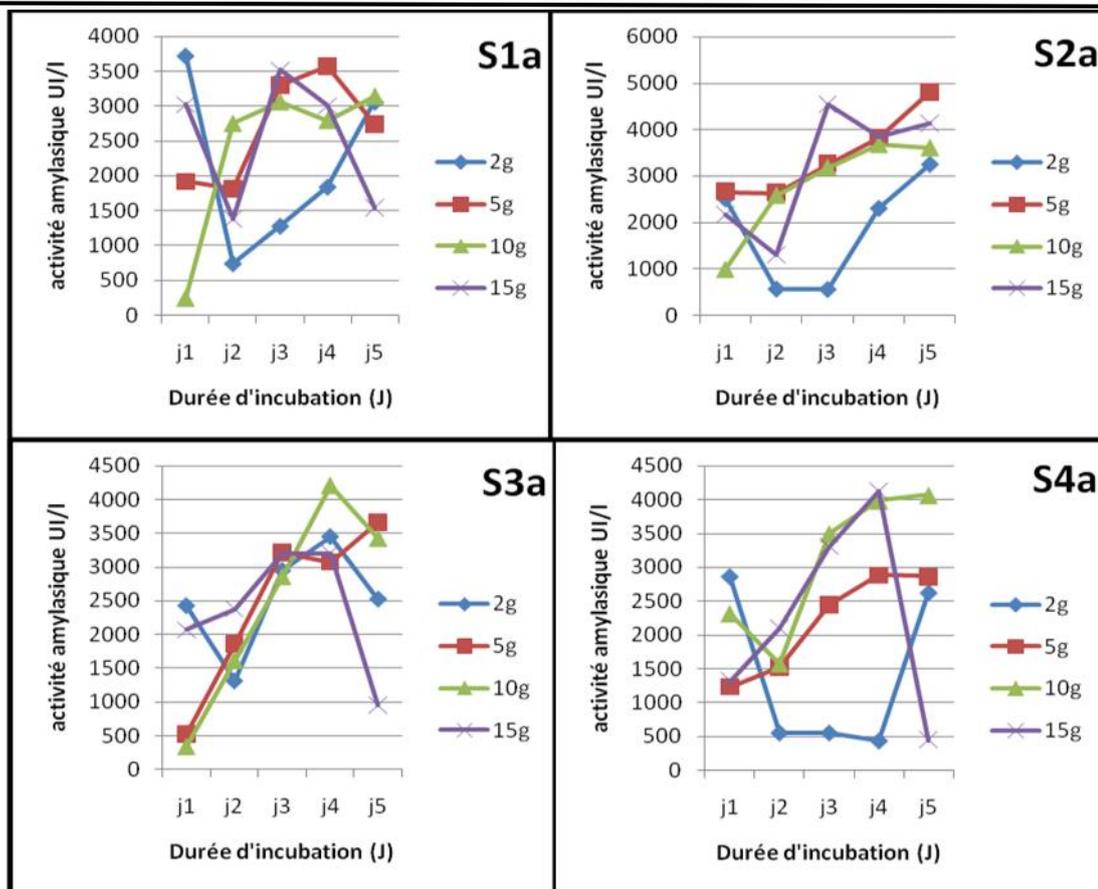


Figure 24: Evolution de l'activité amylasique pendant l'incubation en fonction de la concentration de l'amidon.

Cette augmentation est due à l'utilisation de l'amidon par les souches comme source de carbone et d'énergie, aussi l'amidon est considéré comme un substrat idéal de l'induction de l' α -amylase (Bennamoun *et al.*, 2004). Plusieurs auteurs ont remarqué son efficacité dans la synthèse de l' α -amylase testés (Ayogu., Amadi., 2009 ; Kanimozhi *et al.*, 2014 et Saci., 2012). Il a été démontré également que la présence d'amidon soluble dans les milieux de culture stabilise et protège l'enzyme vis-à-vis de la dénaturation (Saci, 2012).

II.6.3 Optimisation de la biomasse des Spa

Différents essais ont été réalisés pour vérifier l'influence de pH et la concentration de l'amidon sur la biomasse.

III.6.3.1 Optimisation de la biomasse des Spa selon la variation de pH initial

Le pH est un facteur important de la croissance des levures, car il va déterminer l'activité métabolique des cellules. La valeur du pH a un effet sur la solubilité des nutriments et sur la perméabilité de la membrane cellulaire (Martinez & coll, 1999 ; Sanchez & coll, 1997).

D'après la figure 25; pour la plupart des souches on a enregistré une variation de la biomasse. Il ya une augmentation jusqu'au 2^{ème} jour d'incubation avec une valeur maximale de 193.33g/l (S1a dans pH9).

Ces résultats sont proches à ceux obtenus lors de la culture dans des milieux à pH différents, ces résultats sont supérieurs à ceux cités par **Benaouida (2008) & Zoubiri (2008)** avec un intervalle de valeurs se situant entre 7 et 10.18 g/l.

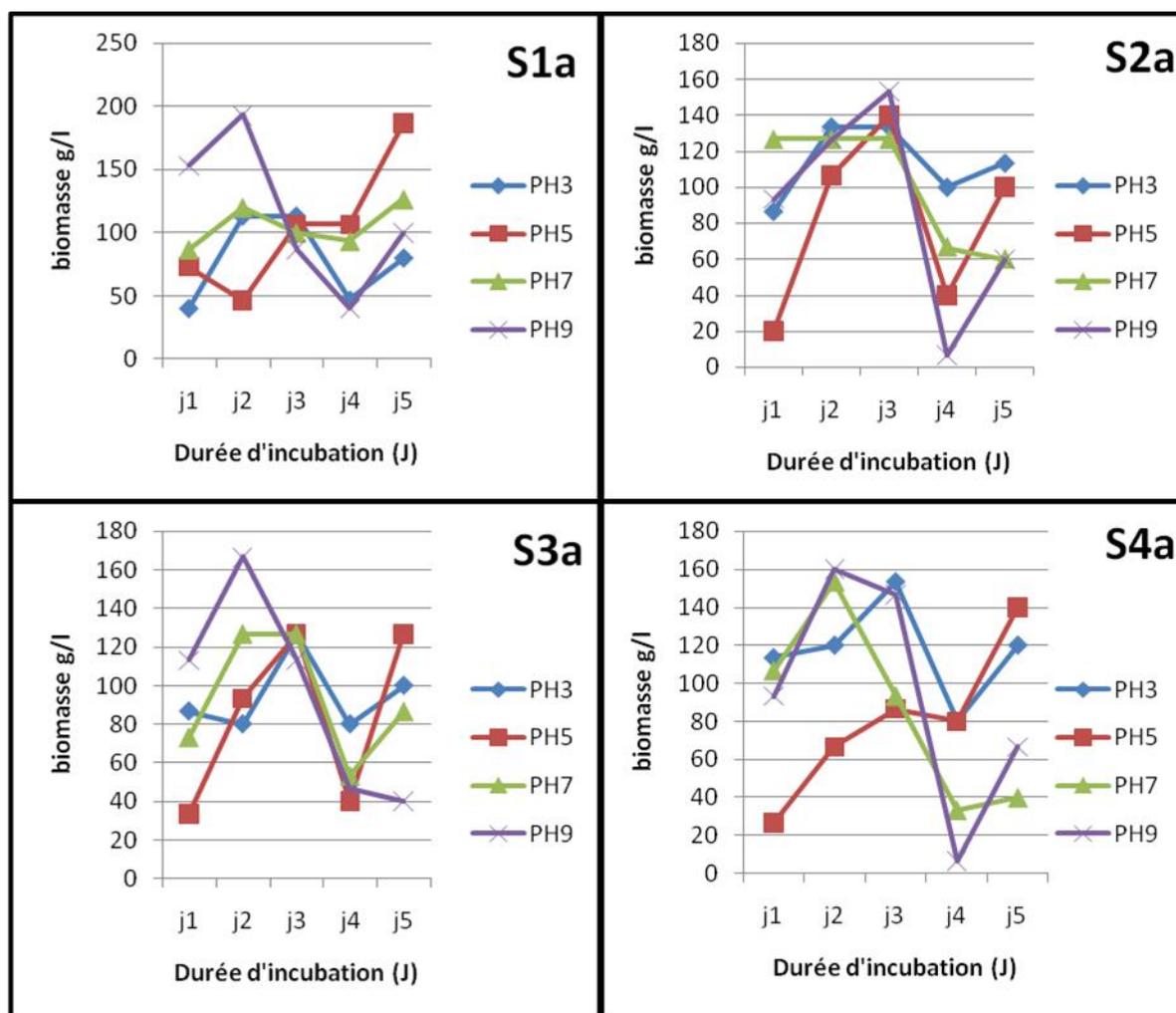


Figure 25: Evolution de la biomasse pendant l'incubation des Spa en fonction du pH initial du milieu.

La variation du pH affecte également la perméabilité membranaire et entraîne un ralentissement de l'activité enzymatique et de la croissance (**Boiron, 1996**).

La diminution de biomasse est due probablement à la lyse du mycélium par des protéases (**Rao et al., 1998**) libérées (**Siso et al., 1998**). Donc, le pH interne à une influence importante sur l'activité des cellules et des systèmes intracellulaires tels que la synthèse des protéines, les mécanismes de transport, l'activité enzymatique et l'excrétion des métabolites pendant la fermentation (**Liu & coll, 2003**).

Le pH externe, peut influencer sur la vitesse avec laquelle les molécules sont transportées vers l'intérieur de la cellule et des valeurs de pH extrêmes peuvent endommager la membrane cellulaire et provoquer la mort cellulaire (Eddy, 1982). Le pH joue aussi indirectement en agissant sur les équilibres de dissociation de divers constituants du milieu (acides organiques) ou d'adjuvants du procédé de vinification comme l'anhydride sulfureux.

III.6.3.2 Optimisation de la biomasse des Spa selon la variation de concentration de substrat (Amidon)

D'après les résultats montrés dans la figure 26, on observe une diminution pour toutes les souches environ dans tous les milieux. Dans le 3^{ème} jour une augmentation remarquée au niveau des souches: S1a, S2a et S3a sauf le S4a, elle est enregistré cette augmentation dans le 4^{ème} jour .ces variations reste instable tout long durée d'incubation.

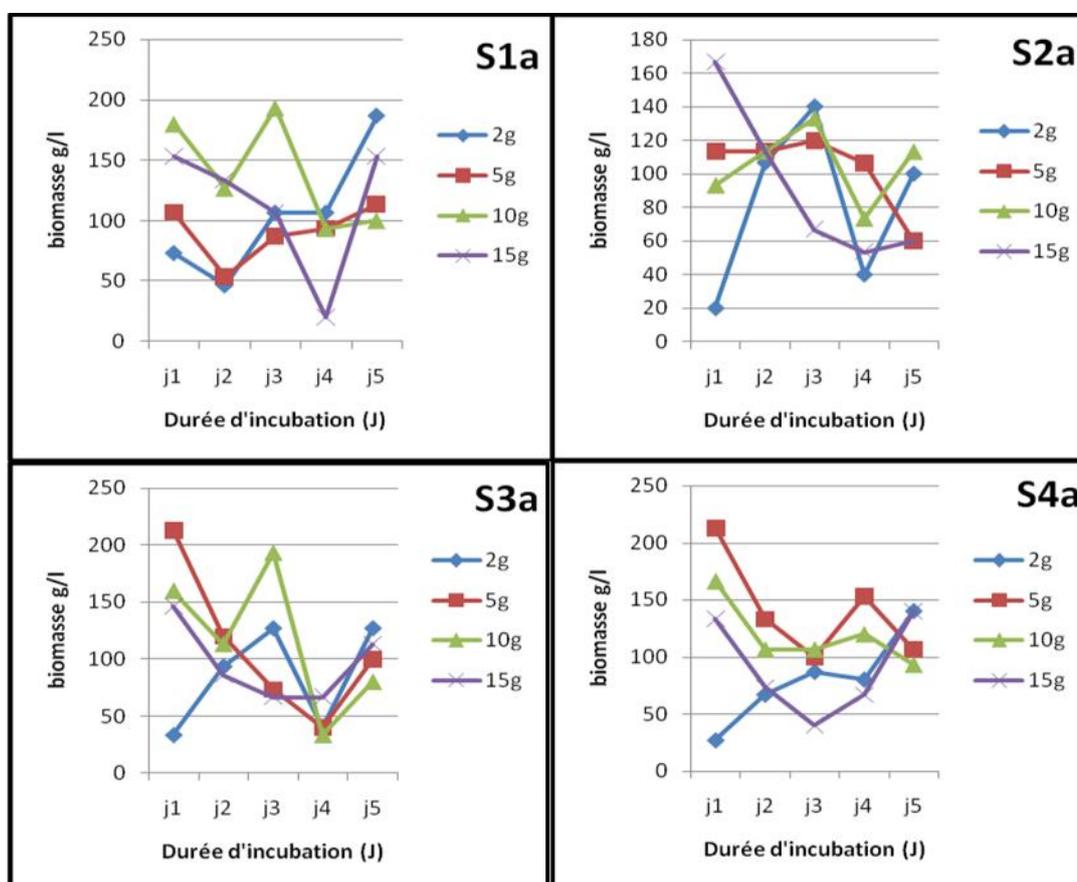


Figure 26: Evolution de la biomasse pendant l'incubation des Spa en fonction de la concentration de substrat initial.

La meilleure production de la biomasse est observée dans les milieux à une concentration de 5g/l pour la souche S3a avec une valeur 213.33g/l.

La biomasse est influencée par la concentration de l'amidon considéré comme source adéquate de carbone nécessaire pour la multiplication levurienne et qui provoque une augmentation de croissance au cours de l'incubation. **Kovalenko et al., (1990)** montrent que la présence de l'amidon dans le milieu de culture favorise la production de la biomasse par *Bacillus mesentericus*. La concentration 10g /l présente le meilleur milieu pour l'obtention du bon rendement de la biomasse, Ceci est en accord avec les résultats trouvés par **Sa-coreie et al., (1981)** ; **Dercova et al., (1992)** ; **Haseltine et al.,(1996)** ; **Lin et al., (1998)** qui préconisent l'utilisation de l'amidon comme source de carbone et d'énergie. Par contre les milieux les plus fortement concentrés (15g/l) restent un obstacle de croissance cellulaire en raison de phénomène d'inhibition (**Prescott, 1995**).

Conclusion

Conclusion

Durant les trois dernières décennies, les microorganismes ont apporté une contribution significative dans certains domaines industriels et en particulier agroalimentaires. Diverses industries dépendent en grande partie de leurs métabolites telle que les enzymes, ce sont les outils-clés des biotechnologies car elles offrent de nombreuses possibilités d'applications dans différents domaines.

Dans le cadre de la production des enzymes protéolytiques et amylolytique par les levures, notre étude comporte deux axes de recherche. Le premier concerne la sélection et la caractérisation des souches levuriennes amylolytique et protéolytiques isolées à partir des milieux extrêmes. La seconde partie est consacrée à la production enzymatiques et leur optimisation par fermentation d'un milieu naturel (sirop de dattes).

Au but de rechercher des levures capables de produire des enzymes, deux prélèvements ont été effectués à partir de deux régions sahariennes «Oued souf et Oued righ». Une analyse des paramètres physicochimiques des échantillons du sol sont effectuées. Celle-ci montre que les deux sites de prélèvement sont pauvres en matières organique, et se caractérisent par un pH basique avec une salinité élevée, ce qui permet de les classer comme des milieux extrêmes pour la survie des levures.

Les cultures des prélèvements sur le PDA ont permis l'isolement des quatre souches leveriennes différentes, toutes ces souches ayant un pouvoir amylasique sur le milieu PDA de 2% d'amidon. Parmi ces dernières, deux souches possèdent un pouvoir protéolytique sur milieu de lait gélosé. L'identification par une étude macroscopique complétée par une étude microscopique assigne les souches appartiennent aux différents genres.

Par ailleurs, le milieu de fermentation, à base de sirop de dattes, est utilisé pour la production des enzymes pour les souches sélectionnées. L'étude de la composition physicochimique et biochimique du sirop de datte a révélé sa richesse en sucres qui peut servir de source de carbone et d'énergie. Cette étude a montré également sa richesse en sels minéraux, avec une acidité titrable et un pH qui lui rends un milieu convenable à la prolifération des levures.

La cinétique de production des enzymes protéolytique montre que le maximum de la production a été observé dans le 5^{ème} jour pour la souche S4p avec une valeur de 3570U dans un milieu acide (pH=4,22). Cependant, dans cette période la biomasse est 120g /l et la concentration des protéines 79,39mg/l.

L'optimisation de l'activité des ces enzymes montre que le maximum de la production (3571U) est enregistré dans le milieu de pH5 et une concentration de caséine de 2 et 5g/l pour la souche S4 dans le 5^{ème} jour. D'autre part le milieu à pH 9 et à une concentration de caséine de 2g/l, c'est un le meilleur pour la biomasse la plus élevé (240g/l). La souche S3 dans le 4^{ème} jour a enregistré le maximum de la production dans les concentrations de caséine de 5g/l avec un pH 5 (280g/l).

A la lumière des résultats obtenu sur l'étude de la cinétique de production des enzymes amylolytiques, le maximum de la production a été observé dans le 4^{ème} jour pour la souche S3 avec une valeur de 3451,308UI dans un milieu acide (pH=4,57). Cependant, dans cette période la biomasse est 40g /l et la concentration des sucre 110,73mg/l. Le pH7 est le plus favorable pour le maximum de la production (4303,012 UI /L) avec une concentration de l'amidon de 2g/l au 5^{ème} jour pour la souche S4, la concentration 5g/l dans un pH5 représente le milieu le plus convenable pour la production d' -amylase (4801,958UI/L) par la souche S2 dans le 5^{ème} jour d'incubation.

La souche S1 présente une meilleure production de la biomasse 193,33g/l dans le 2^{ème} jour avec un pH 9 et une concentration de substrats de 2g/l. Le milieu à une concentration 5g/l pour la souche S3 qui présent le meilleure milieu productrice de la biomasse avec une valeur 213,33g/l et un pH 5 au 1^{er} jour.

Tous ces résultats ouvrent des nouvelles perspectives et recommandations qui doivent être accomplis :

- ✓ Une identification des espèces des souches isolées (par des tests d'assimilation d'autres substrats et par les techniques de la biologie moléculaire).
- ✓ Une purification plus poussée des ces enzymes et l'étude des domaines d'application et son mécanisme d'action.
- ✓ La recherche de nouvelles espèces hyperproductrices d'enzymes ayant un intérêt industriel.

Références

Bibliographiques

Références bibliographiques

- Abd-elfattah, A.C. (1990).** La date et le palmier dattier. Ed Dar El-Talae, Caire.
- Abidi, F., Limam, F., & Marzouki, M.N. (2008).** Production of alkaline proteases by *Botrytis cinerea* using economic raw materials: Assay as biodetergent. *Proc. Biochem.*, 43; 1202–1208.
- Acourene, S. & Tama M. (1997).** Caractérisation physicochimique des principaux cultivars de date de la région des Zibans. *Recherche Agronomique*, N° 1. Ed. INRAA, Alger .59-66p.
- Acourene, S. & Tama M. (2001).** Utilisation des Dattes de Faible Valeur Marchande (Rebuts de Deglet-Nour, Tinissine et Tantboucht) Comme Substrat pour la Fabrication de la Levure Boulangère. *Rev. Energ. Ren. : Production et Valorisation – Biomasse*.1-10.
- Acourene, S., Buelguedj, M., Tama, M., & Taleb, B. (2001).** Caractérisation, évaluation de la qualité de la date et identification des cultivars rares de palmier dattier de la région des Ziban. *Revue Recherche Agronomique*, N° 8, Ed. INRAA, p19-39.
- Ait, H., Leghlimi, S., Dakhmouche, L., Bennamoun, Z., & Meraihi., (2012).** Utilisation de la planification expérimentale pour l'optimisation de la production de l' - amylase par *rhizopus oryzae*. *Rev. Microbiol. Ind. San et Environn.* Vol 6, N°1: 1-17.
- Akacem, O. (2012).** Activité protéolytique des *Pseudomonas* d'origine hospitalière Au niveau des services de réanimation et d'urologie (C.H.U –Tlemcen). Mémoire de master. Université Abou bekr Belkaid – Tlemcen.
- Alais, C. (1975).** Sciences du lait. Principes et techniques laitières. Masson. Paris. P. 108-645.
- Al-Farsi, M., Alasalvar, C., Al-Abid, M., Al-Shoaily K., Al-Amry, M., & Al-Rawahy, F. (2007).** Compositional and functional characteristics of dates, syrups, and their by-products. *Journal of Food Chemistry*, Vol 104, p. 943–947.
- Aline, L.F., Vincent, R., & Plerre, S. (2010).** *Micobiologie du vin. Bases fondamentales et applications.* Ed. TEC & DOC. Lavoisier. Paris. P83.
- Allen, N.H., & Ahearn, D.G. (1987).** Ecology of Aquatic In : Rose A.H., Harrison J.S. (eds), *The yeast*, V1, *Biology of yeast*. 2nd edition Academic Press. London. p: 123- 174.
- Al-Shahib, W., & Marshall, R.J. (2002).** Dietary fibre content of dates from 13 varieties of date palm *Phoenix dactylifera* L. *Inter .J .Food .Sci and Tech.* 37: 719-721.

- Ati abd elouahab, N., (2008).** Microbiologie alimentaire. 4362. Ed 3. Office des publications universitaires Constantine. Alger. 147p.
- Audigie, C.L., Fagerella, J., & Zonszain, F. (1984).** Manipulation d'analyse biochimique. p : 270. Edition Tec et Doc, Lavoisier. Paris.
- Aviron-Violet, P., Baret, J.L., Bertrand, C., Blazy, B., & Bouvier, F. (1982).** Les enzymes : Production et utilisation industrielles. Bordas, Paris. pp. 23; 123; 140–153.
- Ayogu, T. & Amadi, E. (2009).** Amylase Production by *Rhizopus nigricans* Using Mashed Maize. The Internet Journal of Microbiology. Vol. 8 N°1.96-80.
- Baangood, S.M., Shamshad, M.A. (1984).** Chemical Composition of Major Dates Cultivars in the United Arab Emirates. J. In date palm. Vol 3. N°2. P 381-394.
- Bacha, A. (2008).** Production et étude de l'activité de l'invertase produite par la levure *saccharomyces cerevisiae* sur substrat a base de datte. Thèse magister. Technologie alimentaire. Batna. Université el hadj lakhdar. 98p.
- Bancerz, T.M., Attili, D., Carvalho, F.A., & Dasilva, R.E. (2005).** Production of sacharogenic and dextrinogenic Enzymes by *P. camemberti* A 13.36, Journal of Microbiology (Korea), (43):561-568.
- Barnabé, S.(2004).**Hydrolyse et oxydation partielle des boues d'épuration comme substrat pour produire *Bacillus thuringiensis* HD-J. Thèse de doctorat. INRS-ETE, Université du Québec, Canada. 235 p
- Barnali, R. B., Ajit B. K., & Manas D. (2008).**Production and characterization of extracellular protease of mutant *Aspergillus niger* AB100 grown on fish scale. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 24:449–455.
- Battaglino, R.A., Huerg, M., Pulosof, A.M.R., & Bartholomai, G.B.(1991).** Culture requirements for the production of protease by *Aspergillus oryzae* in solid state fermentation. Appl. Microbiol. Biotechnol., 35; 292–296.
- Belguedj, M. (2001).** Caractéristiques des cultivars de dattes dans les palmeraies du Sud-Est Algérien, N° 11, INRAA. El-Harrach , Alger. 289 p
- Belmessikh, A. (2011).** Optimisation de la production de la protéase neutre par *Aspergillus oryzae* sur milieu à base de déchets de tomates. Comparaison entre milieu solide et milieu liquide. Mémoire de magister. Université Mentouri Constantine.

- Ben cheikh, A. (2011).** Les Champignons Accompagnés De L'embryon Du Palmier Dattier. Mémoire d'ingénieur Université Kasdi Merbah – Ouargla.
- Benagga, S. (2014).** Etude bibliographique des caractéristiques physicochimiques et biochimiques de sous produits des dates
- Benahmed, D.A. (2007).** Etude et optimisation d'un processus de fabrication traditionnelle du vinaigre a partir de deux varietes de dattes communes cultivees dans le sud algerien. Mémoire de magister. Université Bougrara Boumerdès.
- 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 de magister. Université Mentouri Constantine.
- Benchabane, A. (1996).** Rapport de synthèse de l'atelier "Technologie et qualité de la datte". In Options méditerranéennes, série A, N° 28. Séminaires méditerranéens. Ed. IAM, Zaragoza, Spain. pp 205-210.
- Benchelah, A.C., & Maka, M.(2008).** Les Dattes, intérêt et nutrition. Phytothérapie (ethnobotanique). 6: 117 -121.
- Benedykt, W., & Katarzyana, P. (2008).**Regulation of bacterial protease activity. Cellular & Molecular Biology Letters, 13: 212-229
- Benhmed, D.A. (2012).**Analyse de aptitude technologique de poudres de datte (phoenix dactylifera .L) améliorées par la spiruline. Etude des propriétés théologiques nutritionnelles et antibactériennes Thèse de doctorat, en Technologie Alimentaire, Université M'hamed Bougara-Boumerdes : 41, 42,102p
- Bennamoun, L., Meraihi, Z., & Dakhmouche, S. (2004).**Utilisation de la planification expérimentale pour l'optimisation de la production de l'a-amylase par *Aspergillus oryzae* *Ahlburg* (Cohen) 1042.72 cultivé sur milieu à base de déchets d'oranges. Journal of Food Engineering 64. 257–264.
- Bensmail, S. (2012).** Optimisation de la production de la protéase acide par *Aspergillus niger* sur milieu solide : purification et caractérisation. Mémoire de magister. Université M'Hamed Bougara de Boumerdès.
- Bensmira, S. (2006).** Isolement et caractérisation de souches fongiques de milieux extrêmes (Sol et Sebka de la région de Biskra) productrices de cellulase thermostable à intérêt industriel. Mémoire de magister.Universite Mentouri- Constantine.

- Bergmeyer, H.U., & Gawekn, K. (1979).** Principes de l'analyse enzymatique. Tech et Doc. Lavoisier. Paris. pp. 17.
- Besbes, S., Drira, L., Blecker, K., Deroanne, C., & Hamadi, A. (2009).** Adding value to hard date (*Phoenix dactylifera* L.): compositional, functional and sensory characteristics of date jam. *J. Food. Chem.* 112: 406-411.
- Bhalla, T. C. & Chatanta, D. K. (2000).** Application of enzymes in food processing biotechnological applications. Asitech publishers Inc. 121-141.
- Bin-shana, S. (1987).** The chemical composition of various types of dates in the P. D. R. Y3J. *date Palm.* Vol 5.N°2. P 493-506
- Boiron, P. (1996).** Organisation et Biologie des champignons. Edition Nathan p.149.
- Boolj, I., Piombo, G., Risterucci, A.M., Coupe M., Thomas, D., & Ferry, M. (1992).** Etude de la composition chimique des dates à different stades de maturité pour la caractérisation variétale de divers cultivars de palmiers dattier (*Phoenix dactylifera* L.). *Fruits.* Vol 47. N° 6. P 667-678
- Botton B., Breton A., Fevre M., Gauthier S., Guy P., Larpent J.P., Reymond P., Sanglier J.J., Vayssier Y., & Veau P. (1999).** Moisissures utiles et nuisibles. Importance industrielle. Masson. 2^{ème} édition Paris. pp. 12-426-34-428-16-41-110
- Botton, B. (1991).** La physiologie des levures Ds: Larpent J.P., *Biotechnologie des levures.* Masson, Milan Barcelone Bonn. Paris. p : 97-127.
- Bouabidi H., & Reynes M., & Rouissi M.B. (1996).** Critères de caractérisation de quelque cultivars de palmier dattier de sud tunisienne. *INRAT,* 69 :73-87.
- Boucherit, Z. (2011).** Production et étude des propriétés de la protéase acide d'un moisissures isolé de sebkha. Mémoire de magister. Université Mentouri Constantine.
- Bouix, M. & Leveau, J. Y. (1999).** Production des enzymes. In Scriban R (Ed) : *Biotechnologie* Ed. Lavoisier. 344-400.
- Bourgeois, C.M., Mescle, J.F., & Zucca, J. (1988).** Microbiologie alimentaire. Aspect microbiologique de la sécurité et de la qualité alimentaire. Tome 1, Ed. Lavoisier, Paris, 9 p.
- Bradford, M.M.(1976).** A rapid and sensitive method for the quantities of protein utilizing the principal of protein dye biding, *Analyt Biochem.* Vol: 72. P 248-254

- Calik, P., Bilir, E., Calik, G., & Ozdamar, T.H. (2002).** Influence of pH conditions on metabolic regulations in serine alkaline protease production by *Bacillus licheniformis*. *Enzyme and Microbial Technology* 31: 685-697.
- Chao, Y. & Wen, L. (2004).** Purification and properties of a maltotrioseproducing alpha-amylase from *Thermobifida Fusca*. *enzyme and Microbial technology*. 35.254-260
- Chatterton, J. R., Vogelsong, K. M., Lu, Y. C., Ellman, A-B. & Hudgens, G-A. (1996).** Salivary -amylase as a measure of endogenous adrenergic activity. *Clin. Physiol J.* 16(4), 344–348.
- Cheftel, J.C., & Cheftel, H., (1977).** Introduction à la biochimie et à la technologie des aliments. Ed. Lavoisier, Vol. 1, Paris: 9-373.
- Chellappan, S., Jasmin, C., Soorej Basheer, M., Elyas, K. K., Sarita Bhat, G., & Chandrnasekaran, M. (2006).** Production, purification and partial characterization of a novel protease from marine *Engyodontium album* BTMFS10 under solid state fermentation. *Process Biochemistry*, 41: 956-961.
- Chi, Z., Ma, C., Wang, P., Li, H.F. (2007).** Optimization of medium and cultivation conditions for alkaline protease production by the marine yeast *Aureobasidium pullulans*. *Bioresour. Technol.*, 98; 534–538.
- Chung, L. & Chong, S. (1995).** Purification and properties of a thermostable alpha amylase from the thermophilic fungus.- *Acta Microbiol. Sin.* (37):102-110.
- Chutmanop, J., Chuichulcherm, S., Chisti, Y., & Srinophakun, P. (2008).** Protease production by *Aspergillus oryzae* in solid-state fermentation using agroindustrial substrates. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 83; 1012–1018.
- Clarke, P.H., & Steel, K.J. (1966).** Rapide and simple biochemical tests for bacterial identification. Academic press. London. P.111
- Cofale, C. (2006)** .Caractérisation des levures de boulangerie. Adopté par Comite de Fabrication de levures de panification de l union européenne, Paris : 1-10
- Coultouly, G. (1991).** Génie enzymatique. Masson éditeur, Paris, France, 244 pages.
- Cuveillier, G. F. (1999).** Réacteurs enzymatiques à enzymes libres. In Scriban R. (Ed) : *Biotechnologie*. Ed. Lavoisier. 401-425.

- Dercova, K., Augustin, J., & Krajcova, D. (1992).** Cell growth and α -amylase production characteristics of *Bacillus subtilis*. *Folia Microbiol.* 37(1) : 17-23.
- Devshony, S., & Eteshola, E., & Shani, A. (1992).** Characteristics and some potential applications of date palm (*Phoenix dactylifera* L) seeds and seed oil. *Journal of the American oil chemists' society (JAOCS)*, 69.595-597
- Dhouibi, M.H., & Jemmazi, A. (1995).** Utilisation combinée de *Bacillus thuringiensis* et d'*habrobracon hebetor* Say (Hym. Braconidae) pour lutter contre la pyrale des dattes *Ectomyelois ceratoniae* Zeller dans les dépôts de stockage. V2 .pp : 15-25
- Djekrif-Dakhmoche, S., Gheribi-Aoulini, Z., Meraihi, Z., & Bennamoun, L. (2006).** Application of statistical design to the optimization of culture medium for α -amylase production by *Aspergillus niger* ATCC 16404 grown on orange waste powder. *Journal of Food Engineering*, 73: 190-197
- Djerbi, M. (1994).** Récolte des dattes. Précis de phéniciculture, FAO, Tunis, 101-109.
- Djouab, A. (2007).** Contribution à l'identification des constituants mineurs de la datte Mech-Degla. Essai de valorisation par incorporation dans une recette de margarine allégée. Mémoire de Magister. Option génie alimentaire, Université de Boumerdès. 24 p.
- Doucet, J., & Multon, J.L. (1992).** Les sucres. Les édulcorants et les glucides de charge dans les I.A.A. Ed. Lavoisier, Paris, 264 p.
- Dowson, V.H. W., & Aten, A. (1963).** Composition et maturation. Récolte et conditionnement des dattes. Ed. FAO, Rome, 10-43 : 229-243.
- Drapron, R. (1961).** Etat actuel de nos connaissances sur l'action des amylases en panification biscotterie et biscuiter. N. t82.69-80.
- Drouiche, A. (2008).** Impact des eaux du rejet sur la qualité des eaux de lanappe libre d'Oued Souf. Memoire magister. Université badji-Mokhtar-ANNABA. P184
- Dubey, A.K., Suresh, C., Kavitha, R., Karanth, N.G., & Umesh-Kumar, S. (2000).** Evidence that the glucoamylases and α -amylase secreted by *Aspergillus niger* are proteolytically processed products of a precursor enzyme. - *FEBS Lett.*, 2000, 471(2), 251-255.
- Dubois, M., Gills, K. A., Hamilton, J.K., Rebers, P. S., Smith F. (1956).** Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical chemistry*, 28:350-356.

- Durand, G., & Monson, P. (1982).** Les enzymes: production et utilisations industrielles. Bordas. Paris. P. 36-153.
- Elibol, M., & Moreira, A.R. (2005).** Optimizing some factors affecting alkaline protease production by a marine bacterium *Teredinobacter turnirae* under solid-state fermentation. *Process Biochemistry*, 40: 1951-1956.
- EL-Ogaidi, A.K.H. (1987).** Dates and Microbial Biotechnology Regional Project for Palm and Dates Research Centre in the Near East and North Africa. Ed. Al watan printing, Baghdad : 13-151.
- EL-Ogaidi, A.K.H. (2000).** Le palmier dattier science technologique Agronomique et industrielle. Ed. Dar ezahran, Oman, 410 p.
- Estanove, P. (1990).** Note technique : Valorisation de la datte. In : Options méditerranéennes, série A, N°11. Systèmes agricoles oasiens. Ed. CIHEAM. pp 301-318.
- Fao, H. (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.
- Favier, J.C., & Ireland, R.J., & Laussucq, C., & Feinberg, M. (1993).** Répertoire général des aliments. Table de composition des fruits exotiques, fruits de cueillette d'Afrique. Tome III, Ed. ORSTOM , Lavoisier, INRA. 27-28 p.
- Fedrick I.J., Aston J.W., Nottingham S.M., & Dulley J.R. (1986).** The effect of a neutral fungal protease on cheddar cheese ripening. *New Zealand J. Dairy Sci Technol.* 21: 9-19.
- Fernani, L. (2002).** Obtention et caractérisation d'une protéase coagulant le lait à partir de grains de melon. Thèse de magister. Université de Boumerdés. P 69.
- Fogarty, W. M. & Kelly, C. T. (1990).** Recent advances in microbial amylases m. *Microbial enzymes and biotechnology.* Fogarty W. M. et Kelly C. T 2nd edition Elsevier Applied science, London. 71-133.
- Frazier, W.C. (1967).** Food microbiology. Academic presse. London. P. 3-429.
- Ganesh Kumar, C., Malik, R.K., Tiwari, M.P. (1998).** Novel enzyme-based detergents : an Indian perspective. *Curr Sci (Bangalore)* 75: 1312-1318.

- García-Gómez, M.J., Huerta-Ochoa, S., Loera-Corral, O., & Prado-Barragán, L.A. (2009).** Advantages of a proteolytic extract by *Aspergillus oryzae* from fish flour over a commercial proteolytic preparation. *Food Chem.*, 112; 604–608.
- Guerin, B., & Gauthier, A., & Orthieb, J. (1982).** Série de synthèse bibliographique. Les sirops (saccharose, glucose, fructose et autre édulcorants): valeur technologique et utilisation. Ed. APRIA, n^o 18, Paris, 123 p
- Guilliermond, A. (2003).** Yeasts: Culture, identification & microbiology. Watchmaker Publishing; 448 P.
- Guiraud, J. (1998).** Microbiologie alimentaire. Dunod, Paris. p : 310-321.
- Gupta, R., Beg, Q.K., & Lorenz, P. (2002).** Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 59: 15-32.
- Hajji, M., Rebai, A., Gharsallah, N., Nasri, M. (2008).** Optimization of alkaline protease production by *Aspergillus clavatus* ES1 in *Mirabilis jalapa* tuber powder using statistical experimental design. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 79; 915–923.
- Hamad, A., & Mustapha, A.L., & El Kahtani M.S. (1982).** Possibility of utilizing dates syrups as sweetening and flavoring agent in ice cream making. Proceeding of the First Symposium on the Date Palm. Saudi Arabia 23-25 Mars, pp 544-549
- Hameed, A., Keshavarz, T., & Evans, C. (1999).** Effect of dissolved oxygen tension and pH on the production of extracellular protease from a new isolate of *Bacillus subtilis* K2, for use in leather processing. *Journal of Chemical technology and Biotechnology* 74: 5-8.
- Hames, B. D., Hooper, N. M., & Houghton J. D. (2006).** L'essentiel en biochimie. Ed BERTI Editions, Paris, P.413.
- Hammer, E., Krowas, D., Schafer, A., Specht, M., Franche, W., & Schauer, F. (1998).** Isolation and characterisation of a Dibenzofuran-Degrading Yeast : Identification of Oxidation and Ring Cleavage Products. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64, p: 2215-2219.
- Harrigan, W.F. (1998).** Laboratory methods in food microbiology. Third Edition. Gulf Professional Publishing; 532 P.
- Harrigon, W.F., & Mc lace, M.E. (1976).** Laboratory methods in food and dairy microbiology. *Sci. Food Agric. London. Academic Press.* 32, p : 1145-1150.

- Haseltine, C., Rolfsmeier, M., & Blum, P. (1996).** The glucose effect and regulation of alphaamylase synthesis in the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *J. Bacteriol.* 178 (4): 945-950
- Haussner, K., Hilgendor, P., Hofbauer, C., Demeester, J. & Lauwers, A. (1996).** New international F.I.P. method for the determination of the activity of *Aspergillus oryzae* proteases. *Pharmazie.* 51 (12): 946-50.
- Hencké, S. (2000).** Utilisation alimentaire des levures. Diplôme de Docteur: Pharmacie. Nancy I: Université Henri Poincaré. 188p.
- Henk, J., Zwir, E., & Rik, L. (2003).** Caroténoïdes et flavonoïdes contre le stress oxydatif. *Arômes Ingrédients Additifs.* 44: 42-45
- Higgins David, R., Cregg James, M. (1998).** *Pichia* Protocols. *Methods in molecular biology.* Vol 103. Humana Press Inc; 130 P.
- Hugues, C. (2009).** Etude des champignons de la forêt dense humide consommés par les populations du nord du Gabon. Thèse Doctrat. Université d'Ouagadougou Burkina-Faso .46p
- Ibrahim, M.A., & Khallil, H.N.M. (1997).** Le palmier dattier protection et production. Ed Iskandaria : 432 – 627.
- Igarashi, k., Hatada, Y., Hagihara, H., Saeki, K., Takaiwa, M., Uemura, T., Ara, K., Ozaki, K., Kawai, S., Kobayashi, T. & Ito, S. (1998).** Enzymatic properties of a novel liquefying - amylase from an alkalophilic isolate and entire nucleotide and amino acid sequences. *Applied and Environmental Microbiology.* 64(9) : 3282-3289.
- Joo, H.S., & Chang, C.S. (2005).** Production of protease from a new alkalophilic *Bacillus* sp. I-312 grown on soybean meal: optimization and some properties. *Proc. Biochem.,* 40; 1263–1270.
- Joyeaux, A. (1982).** Les préparations industrielles d'enzymes. In Durand G., Monson P. (Ed) : *Les enzymes, production et utilisation industrielles.* Ed. Gauthier-Villard. 23-36.
- Kanimozhi, M., Midhusha, J, Gayathri, N., & Subashkumar, R. (2014).** Optimization and Production of -Amylase from Halophilic *Bacillus* Species Isolated from Mangrove Soil Sources. *Journal of Applied & Environmental Microbiology* 2.3. 70-73.
- Kavanagh, K. (2005).** *Fungi: biology and application.* Second Edition. Wiley; 384 P

- Kembhavi, A.A., Kulkarni, A., & Pant, A. (1993).** Salt-tolerant and thermostable alkaline protease from *Bacillus subtilis* NCIM no. 64. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 38: 83-92.
- Khadraoui, A. (2006).** *Eaux et Sols en Algérie (Gestion et impact sur l'environnement)*. Ed. EMPAC, Constantine, Algérie, 392 p.
- Khalil, K.E., Abd-El-Bari, M.S., Hafiz, N.E., & Ahmed, E.Y. (2002).** Production, evaluation and utilization of date syrup Concentrate (Dibis). *Egypt. J. Food Sci*, 30(2): 179-203.
- Kovalenko, E. A., Koltukova, N. V. & Strel'china, T.V. (1990).** Characteristics of hydrolase biosynthesis in *Bacillus mesentericus* growth on various media. *Prikl Biokhim* 26(4) : 528-533.
- Kumar, C.G., & Takagi, H.(1999).** Microbial alkaline proteases: From a bioindustrial viewpoint. *Biotechnology Advances* 17: 561-594.
- Kumar, D., Jain, V. K., Shanker, G., & Srivastava, A. (2003).** Citric acid production by solid state fermentation using sugarcane bagasse, *Process Biochemistry*, 38: 1731-1738.
- Kumar, D., Savitri., Thakur, N., Verma, R., & Bhalla, T.C. (2008).** Microbial proteases and application as laundry detergent additive. *Res. J. Microbiol.*, 3(12); 661–672.
- Larpent, J.(1991).** *biotechnologie des levures*. masson, paris. Milan barcelone bonn.426p.
- Laxman, R.S., Sonawane, A.P., More, S.V., Rao, B.S., Rele, M.V., Jogdand, V.V., Deshpande, V.V., Rao, M.B. (2005).** Optimization and scale up of production of alkaline protease from *Conidiobolus coronatus*. *Proc. Biochem.*, 40; 3152–3158.
- Lazim, H., Mankai, H., Slama, N., Barkallah, I., & Limam, F. (2009).** Production and optimization of thermophilic alkaline protease in solid-state fermentation by *Streptomyces* sp. CN902. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 36: 531-537.
- Leclerc ,H.(1975).** *Microbiologie générale*, doin éditeurs, Paris. p : 28
- Leclerc, H., & Meyer, A., & Deiana, J. (1995) .** *Cours de microbiologie générale*. Nouveau programme. Biosciences et Techniques. doin éditeurs, Paris. p : 73-92.
- Leveau, J.Y., & Bouix, M. (1999).** Les moisissures. In:Florent J . (Ed.). *Microbiologie industrielle*. Les microorganismes d'intérêt industriel. Ed .Lavoisier. p: 112-168.

- Lin, L.L., Chayau, C.C. & Hsu, W. H. (1998).** Production and properties of a raw –starch degrading amylase from the thermophilic and alkaliphilic *Bacillus* Sp. Ts-23. *Biotechnol. App. Biochem.* 28(1): 61-68.
- Lupien, J. (1995).** Le lait et les produits laitiers dans la nutrition humaine. Organisation des Nations pour l'Alimentation et l'Agriculture. Rome. 272p.
- Madigan, M., & Gohn, M. (2007).** biologie de microorganisms.11édition:pearson éducation. paris. 480p.
- Mala, B.R., Aparna, M.T., Mohini, S.G., Vasanti, V.D. (1998).** Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiol Mol Biol Rev.* 62: 597-635.
- 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.
- Mansouri, A., Guendez E., Kokkalou E., & Kefalas P. (2005).** Phenolic profile and antioxidant activity of Algerian ripe date palm (*Phoenix dactylifera*).*Food.Chem.*89:411-420.
- Mathieu, D. (2005).** Etude de la production des protéases alcalines par *Bacillus* licheniformis en utilisant des boues d'épuration municipales comme substrat. Mémoire de Métrise. INRS-Eau Université du Québec, Canada.
- Merabti, R. (2006).** Isolement et caractérisation de souches levuriennes amylolytiques à partir de sol saharien algérien. Mémoire de magister. Université Mentouri-Constantine.
- Meunier, N. (1999).** Évaluation du potentiel de production de protéases bactériennes à partir des boues d'épuration municipales. Mémoire de maîtrise. INRS-Eau, Université du Québec, Canada. 168 pages.
- Mimouni, Y. (2009).** Mise au point d'une technique d'extraction de sirops de dattes ; comparaison avec les sirops à haute teneur en fructose (HFCS) issus de l'amidonnerie. Mémoire de magister. Université kasdsi merbah ouargla.
- Moodie, P. (2001).** Traditional baking enzymes-proteases. *Enzyme Development Corporation.* 212 :736-1580.

- Moosavi-Nasab, M., Radi, M., & Jouybari, A. (2010).** Investigation of enzyme modified cheese production by two species of *Aspergillus*. *African Journal of Biotechnology*, 9(4): 508-511.
- Morvan, J. (2010).** Marché européen des enzymes dans les applications alimentaires .M55B. <http://www.frost.com>.
- Mukherjee, A. K., Adhikari H., & Rai S.K. (2008).** Production of alkaline protease by a thermophilic *Bacillus subtilis* under solid-state fermentation (SSF) condition using *Imperata* cylindrical grass and potato peel as low-cost medium: characterization and application of enzyme in detergent formulation. *Biochemical Engineering Journal*, 39: 353-361.
- Multon, J.L., (1982).** Conservation et Stockage Des Grains et Graines et Produits Derivés- Céréales, oléagineux, protéagineux, aliments pour animaux. *Technique & Documentation Lavoisier*, Paris, pp. 576
- Multon, J.L. (1992).** Le sucre, les sucres, les édulcorants et les glucides dans les I.A.A. Ed. Lavoisier, Paris, 264 p.
- Multon, J.L., & Lapatre, F. (1984).** Additifs et auxiliaires de fabrication dans les industries Agroalimentaires. Ed APRIA, Paris : 53 – 276
- Munier, P. (1973).** Le palmier dattier, techniques agricoles et productions tropicales .Ed Maison Neuve et Larosse, paris, pp 221-25-28-31-32-40-48-141-142-221-367-143-174.
- Murthy, P.S., & Naidu, M.M. (2010).** Protease production by *Aspergillus oryzae* in solid-state fermentation utilizing coffee by-products. *World Appl. Sci. J.*, 8(2); 199-205
- Nathalie, M. (1999).** Évaluation du potentiel de production de protéases bactériennes à partir de boues d'épuration municipales. Mémoire de Maître ès sciences. Université du Québec INRS-Eau.
- NF V 05-101. (1974).** Détermination de l'acidité titrable.
- Nixon, R.W., & Carpenter, B. (1978).** Dates in United States, United States Department of Agriculture Information, Bulletin Prepared by Science and Education Administration, pp. 44 – 45.
- Nouadri, T. (2011).** L' -amylase de *Penicillium camemberti* PL21: Production, Purification, Caractérisation et Immobilisation. Diplôme de Doctorat. Université Mentouri, Constantine.143p.

Noui, Y. (2007). Caractérisation physico-chimique comparative des deux tissus constitutifs de la pulpe de datte Mech-Degla. Mémoire de Magister en génie alimentaire, Université de Boumerdès.33p.

Noui, Y. (2001). L'optimisation de la production de la biomasse « *saccharomyces cerevisiae* » cultivé sur un extrait de datte. Mémoire d'ingénieur. Département d'agronomie. Batna. 62p.

Oh, Y. S., Shih, I.L., Tzeng, Y. M., & Wang, S. L. (2000). Protease produced by *Pseudomonas aeruginosa* K-187 and its application in the deproteinization of shrimp and crab shell wastes. *Enzyme and Microbial Technology*, 27: 3-10.

Osiewacz Heinz, D. (2002). Molecular biology of fungal development. Marcel Dekker, INC. New York. Basel; 608P.

Oteng-Gyang, K.(1984).Introduction à la microbiologie alimentaire dans les pays chauds. Technique & Documentation Lavoisier, Paris. 8, p : 43-51 Cité par Benaouida, K. 2008. Etude de l'alpha amylase de levure isolée d'un écosystème extrême (sole environnant des sources thermales) et cultivées sur un milieu à base de lactosérum. Diplôme de magistère, Université Mantouri Constantine,100 p.

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

Panchal, C. (1990). Yeast strain selection. Marcel Dekker (ed.) USA. 189p.

Pandey, A., Nigam, P., Soccol, C. R., Soccol, U.T., Singh, D. & Mohan, R. (2000). Advances in microbial analyses. *Biotechnol. appl. Biochem.* 31(2): 135-152.

Paranthman, R., Alagusundaram, K., & Indhumathi, J. (2009). Production of protease from rice mill wastes by *Aspergillus niger* in solid-state fermentation. *World Journal of Agricultural Sciences*, 5 (3): 308-312.

Park, C.S., Chang, C.C., Kim J.Y., Ogrydziak, D.M., Ryui D.D.Y. (1997). Expression, secretion, and processing of rice Alpha-amylase in the yeast *Yarrowia lipolytica*. - *J. Biol. Chem.*, 272(11):6876-6881.

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

- Pelmont, J. (1995).** Enzymes catalyseurs du monde vivant. Presses Universitaire de Grenoble. Sciences Technologie Médecine, Grenoble. Paris. P. 619-655.
- Penasse, L. (1974).** Les enzymes cinétiques et mécanisme d'action. Masson. Paris. P. 58-86.
- Peppler, H. J., & Perlman, D. (1979).** Microbial technology. Academic press. San Francisco. P.42-60.
- Phaff, H.J. & Starmer, W.T. (1987).** Yeast associated with Plants, Insects and Soil In : Rose A.H., Harrison J.S. (eds), The yeast, VI, Biology of yeast. 2nd edition Academic Press. London. p: 123- 174.
- Pochon, J., Tardieux, P. (1962).** Techniques d'analyse en microbiologie du sol. Edition la tournelle. St. Mandé. 110 - 111.
- 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.
- Prescott, L., Harley, J.P., & Klein, D.A. (1995).** Microbiologie, 2^{ème} Édition. De Boeck-Wesmael, Bruxelles, Belgique, 1014 pages.
- Purves, W.K., Orians, G.H., & Heller, H.C. (1994).** Le monde vivant. Traité de biologie. Sciences/ Flammarion. 1224p.
- Rao, M. B., Tanksale, A. M., Ghatge, M.S., & Deshpande, V.V. (1998).** Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 62 (3): 597-653.
- Reddy, L.V., Wee, Y.J., Yun, J.S., & Ryu, H.W. (2008).** Optimization of alkaline protease production by batch culture of Bacillus sp. RKY3 through Placket Burman and response surface methodological approaches. Bioresource Technology, 99: 2242-2249.
- Refice, Z., Abdelkrim, S., & Messaoudi, S. (2011).** Optimisation d'un milieu de culture à base de dattes pour la production de levure boulangère «Saccharomyces cerevisiae» et le dénombrement de la flore fongique. diplôme d'Ingénieur. Contrôle de Qualité et Analyses. Université Mohamed Khider. Biskra. 79p.
- Richards, L.A. (1969).** Diagnostic and improvement of saline and alkaline soils. Agr. Handbook.
- Robert, D., & Vian, B. (2004).** Element de biologie cellulaire. Doin Ed3. PP 33-69.

- Rodeheaver, D.P & Wyah, R. D. (1984).** effet of decreased feed intake on serum and pancreatic on of broiler chickens. *Avian Dis.* , 28 (3) : 662-668.
- Rodríguez-Zaragoza M., E. & Steinberger, Y. (2005).** Vertical distribution the free living Amoeba Population in soil under desert shrubs in the Ngev. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(4), p: 2053-2060.
- Rygg, G.L. (1977).** Date development, Handing, and Packing in the United States Agriculture. Research service agriculture, Handbook (482), USAD, Washington DC: 3-9.
- Saci, A. (2012).** Production d'alpha-amylase par *Streptomyces* sp. Optimisation d'un milieu de production à base de déchets d'orange. Mémoire de magister. Université Mentouri. Constantine. 92p.
- Sa-Correia, I. & Van Uden, N. (1981).** Production of biomass and amylases by the yeast *Lipomyces Kononenkoa* in starch limited continuous culture. *European J. Microbiol. Biotechnol.* 13 : 24-280.
- Samrat, C., Abhijit, K., Chandrakant, K., Kakasaheb, M., & Balasaheb, C. (2009).** Isolation and characterization of novel α -amylase from marine *Streptomyces* sp. D1. *Journal of Molecular Catalysis B : Enzymatic* 58 : 17–23
- Sandhya, C., Sumantha, A., Szakacs, G., Pandey, A. (2005).**Comparative evaluation of neutral protease production by *Aspergillus oryzae* in submerged and solid-state fermentation. *Proc. Biochem.*, 40; 2689–2694.
- Santamaria, R.I., Del, G., Saab, G., Rodriguez, M. E., Sobren, X., & Lopez, M. (1999).** Alcoholysis reactions from starch with alpha-amylases. *FEBS lette.* 452(3) : 346-350.
- Sawaya, W.N., Khalil, J.K., Khatcha-Dourian, H.A., Safi, W., & Mashadi, A.S. (1983).** 'Sugars, Tannins and Some Vitamins Contents of Twenty Five Date Cultivars Grown in Saudi Arabia at the Khalal (Nature Color) and Tamer (Ripe) Stages', *The First Symposium on the Date Palm*, King Fayçal University Al Hassan, Kingdom of Saudi Arabia, pp. 468 – 478.
- Schomburg, D., & Salzmann, M. (1991).** *Enzyme Hand book* 4. Classe 3: Hydrolases. Springer-Verlag (ed). Berlin Heidelberg. Germany. p: 1-12.
- Scriban, R. (1999).** *Biotechnologie*. 5^{ème} édition. Techniques et Documentation – Lavoisier (éd.). Paris.p : 401-409.

- Shata Hoda, M.A. (2005).** Extraction of milk-clotting enzyme produced by solid-state fermentation of *Aspergillus oryzae*. Polish Journal of Microbiology, 54 (3): 241-247.
- Siboukeur, O. (1997).** Qualité nutritionnelle, hygiénique, et organoleptique du jus de dattes. Memoire de Magister en sciences agronomiques, INA, El Harrach, Alger: 1-106.
- Siboukeur, O., Mati, A., & Hesses, B., (2005).** Amélioration de l'aptitude à la coagulation du lait cameline (*camelus dromedarius*) : utilisation d'extraits enzymatiques coagulants gastriques de dromadaires. Cahiers d'études et de recherches francophone/ Agriculture N° 05. Vol : 14. P 473-8, Septembre-Octobre.
- Sicard, P. (1982).** Applications industrielles des enzymes. In Durand G et Monson P. (Ed) ; Les enzymes production et utilisation industrielles. Ed. Gauthier –Villars. 121-164.
- Siezen R. J. (1988).** Enzyme engineering in de zuivel. Nizo-Nieuws. 22 (10): 21-25.
- Simon, P., & Meunier, R.(1970).** Microbiologie industrielle et génie biochimique. Masson ET Cie, Editeurs. Paris Vie : 31-47, 385-411.
- Singh, A., Ghosh, V. K., & Ghosh, P. (1994).** Production of thermostable acid protease by *Aspergillus niger*. Lett. Appl. Microbiol. 18 (3): 177-180.
- Siso, M.I., Murado, M.A, Franco, J.M., Miro, N.J., & Gonzalez, .M.P. (1998).** Microfungus yeast mixed cultures in the degradation of amylaceous wastes: Interactions affecting amylolytic activity. Biotechnology Letters. (10)6:431-436.
- Srinubabu, G., Lokeswari, N., Jayaraju, K. (2007).** Screening of nutritional parameters for the production of protease from *Aspergillus oryzae*. E-J. Chem., 4(2); 208-215.
- Stéphanie, V. (2005).** Immobilisation d'Enzymes dans des Hydroxydes Doubles Lamellaires. Réalisation de Biocapteurs pour la détection de polluants organiques. Université Blaise Pascal. Ecole doctorale des sciences fondamentales. Thèse doctorat.
- Stivaletta, N., Barbieri, R., Picard, C., & Bosco M. (2009).** Astrobiological significance of the sabkha life and environments of southern Tunisia. Planetary space sci. 57: 597- 605.
- Sumantha, A., Deepa, P., Sandhya, C., Szakacs, G., Soccol, C.R., & Pandey, A. (2006).** Rice bran as a substrate for proteolytic enzyme production. Brazilian Archives of Biology and Technology, 49 (5): 843-851.

- Sumantha, A., Larroche, C., & Pandey, A. (2006).** Microbiology and industrial biotechnology of food-grade proteases: a perspective. *Food Technol. Biotechnol.*, 244; 211–220.
- Sumitani, J. I., Tottori, T., Kawaguchi, T., & Arai, M. (2000).** New type of starch – binding domain : the direct repeat motif in the C-terminal region of *Bacillus* sp. n°195 -amylase contributes of starch degrading. *Biochem.* 350,477-484.
- Tari, C., Genckal, H., & Tokatl, F. (2006).** Optimization of a growth medium using a statistical approach for the production of an alkaline protease from a newly isolated *Bacillus* sp. L21. *Proc. Biochem.*, 41; 659–665.
- Tatsinkou, F.B., Taveai, F., & Ndjouenkeui, R. (2005).** Production and partial characterization of a thermostable amylase from ascomycetes yeast strain isolated from starchy soils. *African Journal of Biotechnology* .4 (1), p: 14-18.
- Thapa, N., Pal, J., & Tamang J.P. (2006).** Phenotypic identification and technological properties of lactic acid bacteria isolated from traditionally processed fish products of the Eastern Himalayas. *Int J Food Microbiol.* 1; 107(1): 33-8.
- Thys, R.C.S., Guzzon, S.O., Cladera-Olivera, F., Brandelli, A. (2006).** Optimization of protease production by *Microbacterium* sp. in feather meal using response surface methodology. *Proc. Biochem.*, 41; 67–73.
- Tibor, D. (2007).** Hand book of food spoilage yeasts. 2^{end} Ed. DNLM. New York. 350P.
- Tremacoldi, C. R., Watanabe, N. K. and Carmona E. C. (2004).** Production of extracellular acid proteases by *Aspergillus clavatus*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 20: 639-642.
- Tsuyoshi, N., Fudou, R., Yamanaka, S., Kozaki, M., Tamang, N., Thapa, S., & Tamang J.P. (2004).** Identification of yeast strains isolated from marcha in Sikkim, a microbial starter for amylolytic fermentation. *International Journal of Food Microbiology*. 99. p: 135-146.
- UI-Haq, I., Roheena, A., Ashraf, H., & Shah, A.H. (2002).** Isolation and Screening of Fungi for the biosynthesis of Alpha Amylase. *Biothechnology.*, 1 (2-4), p: 61-66.
- Ulacio, D., Perez, C., & Pineda Y.J. (1997).** Mycoflora in tobacco plant roots (*Nicotiana tabacum*) in portuguesa state, Venezuela. *Bioagro.*, 9(1), p: 3-11.

- Ul-Haq I., Mukhtar H., Daudi S., Sikander A., & Quadeer M. A. (2003)** Production of proteases by a locally isolated mould culture under lab conditions. *Biotechnology* 2 (1): 30-36.
- Vidyarthi, A.S., Tyagi, R.D., Valéro, J.R., & Surampalli, R.Y. (2002).** Studies on the production of *Bacillus thuringiensis* based biopesticides using wastewater sludge as a raw material. *Water Research* 36 (19): 4850-4860.
- Vishwanatha, K. S., Appu, Rao A. G., & Singh, S. A. (2009).** Characterization of acid protease expressed from *Aspergillus oryzae* MTCC 5341. *Food Chemistry*, 114: 402-407
- Wang, J., & Wan, W., (2009).** Experimental design methods for fermentation hydrogen production: A review. *International Journal of Hydrogen Energy*, 34: 235-244.
- Wang, R., Law, Sing, R. C., & Webb, C. (2005).** Protease production and condition by *Aspergillus oryzae* in flour fermentation. *Process Biochemistry*, 40: 217-227.
- Wang, R., Law, R.C.S., & Webb, C., (2005).** Protease production and conidiation by *Aspergillus oryzae* in flour fermentation. *Proc. Biochem.*, 40; 217–227.
- Wilkesman, J., & Kurz, L. (2009).** Protease Analysis by Zymography: A review on techniques and patents. *Recent Patents on Biotechnology*, 3: 175-184.
- Yahiaoui, K. (1998).** Caractérisation physico-chimique et évolution du brunissement de la datte « D-N » au cours de la maturation. Mémoire de Magister. I.N.A. El-Harrach. Alger.66p.
- Zoubiri, L. (2012).** Production d'alpha amylase par des moisissures cultivées sur milieu à base de rebuts de dattes. Thèse de magister en biotechnologie alimentaire. Constantine. Université Mentouri.104p.

Annexes

ANNEXES
Annexe 1: Potato Dextrose Agar (PDA)

Pomme de terre	250 g
Glucose	20 g
Agar	15 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.

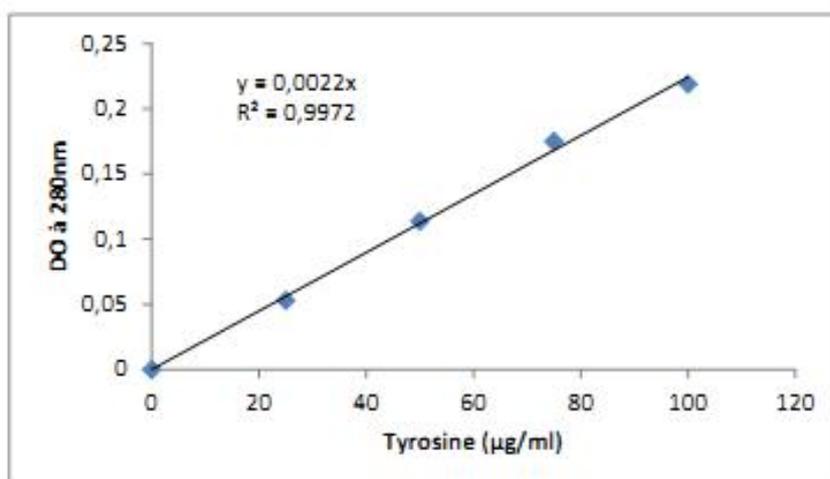
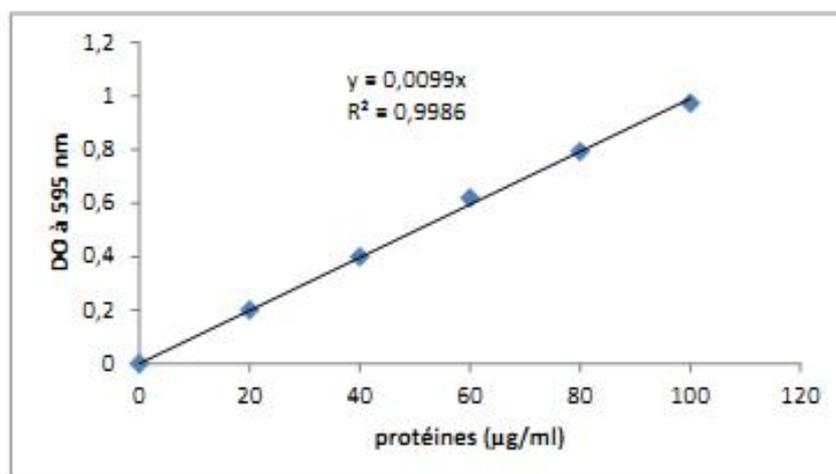
Annexe 2 : Milieu de lait gélosé

Poudre de lait	5g
Eau distillée	50 ml

- Stérilisé à 120°C pendant 30 minutes.(1)

Agar	5g
Eau distillée	50 ml

- Stérilisé à 120°C pendant 30 minutes.(2)
- Mélangé 1+2 et couler dans des boites de pétrie.

Annexe 3: Courbe d'étalonnage de tyrosine**Annexe 4: Courbe d'étalonnage de SAB****Annexe 5: Courbe d'étalonnage de glucose.**