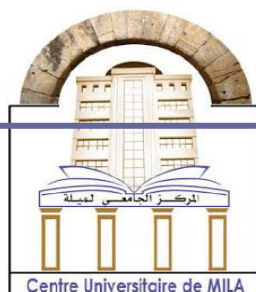


الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et populaire

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche
Scientifique



N ° Ref :.....

Centre Universitaire Abdelhafid Boussouf Mila

Institut des sciences et de la Technologie

Département : Sciences de la nature et de la vie

**Mémoire Préparé en vue de l'obtention du diplôme de
Master**

Domaine : Science de la nature et de la vie

Filière : Sciences biologiques

Spécialité : Biochimie appliquée

Thème :

**Screening, Identification et Activités biologiques
de quelques souches levuriennes.**

Présenté par :

Mekmouche Amina

Brika Helima

Damous Feryal

Devant le jury :

Présidente : RIHANI. L

M.C.A. Centre Universitaire de Mila.

Encadreur : BENSERRADJ. O

M.C.A. Centre Universitaire de Mila.

Examinatrice : AHMED GAID. K

M.C.B. Centre Universitaire de Mila.

Année universitaire 2022_2023



Remerciements

Avant tout, nous tenons en premier lieu, à remercier « Allah », le tout puissant, qui nous a accordés le courage et la patience pour élaborer ce modeste travail.

La réalisation de ce mémoire a été possible grâce au concours de plusieurs personnes à qui nous voudrions témoigner toute nous gratitude.

*Premièrement, C'est avec grand plaisir que nous tenons à exprimer toute notre gratitude à Mme **Benserradj Ouafa** directrice de ce mémoire, pour l'aide et les connaissances qu'elle a pu nous transmettre. Nous la remercions également pour sa présence et la qualité de ses conseils.*

Nos vifs remerciements s'adressent également aux membres de jury qui ont accepté d'évaluer ce travail :

*Dr **Rihani Lamia**, pour nous avoir fait l'honneur d'accepter la présidence de notre jury de soutenance. Qu'elle trouve ici nos sincères sentiments de gratitude et de respect*

*Notre examinatrice, Dr **Ahmed Gaid Kalthoum**, d'avoir honoré et accepté d'examiner ce travail.*

*Un grand merci s'adresse aussi à Mme **Salima Amari** qui nous a vraiment aidées avec leurs précieux conseils.*

Merci à tous les professeurs qui nous ont enseignées durant notre cursus universitaire et à toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail.





Dédicaces

Je remercie tout d'abord « Allah » le tout puissant pour le courage, la patience, la volonté et la santé qu'il m'a donnée pendant toute mes années d'études.

Je dédie ce travail à :

*Mon cher papa **Abdelkrim**, Je voudrais te remercier pour ton amour, ta générosité, ta compréhension... Ton soutien fut une lumière dans tout mon parcours. Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour et le respect que j'ai toujours eu pour toi. Ce modeste travail est le fruit de tous les sacrifices que tu as déployés pour mon éducation et ma formation. Je t'aime papa et j'implore le tout-puissant pour qu'il t'accorde une bonne santé et une vie longue et heureuse.*

*Ma chère maman **Rachida**, Si Dieu a mis le paradis sous les pieds des mères, ce n'est pas pour rien. Affable, honorable, aimable : Tu représentes pour moi le symbole de la bonté par excellence, la source de tendresse et l'exemple du dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager et de prier pour moi. Aucune dédicace ne saurait être assez éloquente pour exprimer ce que tu mérites pour tous les sacrifices que tu n'as cessé de me donner depuis ma naissance, jusqu'à ce jour-là.*

*À mes chères sœurs et frères, **Chaima, sif eddine, Abdraouf, Kenza** et son mari **chouaib**. Je vous souhaite une vie pleine de bonheur et de succès et que Dieu, vous protégez et vous gardez.*

*À mon oncle **Mohamed** et sa famille, mes tantes et leurs enfants, mes amies **Sara** et **Kaouthar** et à toute la famille **Mekmouche** et **kram**.*

Amina





Dédicaces

Je dédie ce travail :

*A ma mère **Fatiha**. Je te dédie ce modeste travail, faible témoignage de ma tendresse et de ma profonde reconnaissance pour tes sacrifices et dévouements. Nous prions le tout puissant pour qu'il t'accorde longévité, santé et bonheur ;*

*A mon cher père **Douadi** qui m'a appris qu'il faut profiter au maximum de la vie et qu'il ne faut jamais oublier nos rêves ;*

كن عالما أو معلما أو متعلما أو محبا و لا تكن خامسا فتهلك

*A mon cher grand-père **Ali** ; à ma tante **Rachida***

*A mes frères **Youcef** et **Hemzza** et à mes sœurs **Amal** ; **Naima** ; **Ilham** et notre petite fille **Amira** ; à la femme de mon frère ;*

*À mes tantes et oncles sur tout **Djamal** et **Amar** ; à mes cousins **Khadidja** ; **Mossaab** et **Zeynab** ;*

*Aux anges de ma famille : **Zeynab** ; **Okba** ; **Khaouthar** ; **Younnes** ; **Allaa** ; **Aicha** et **Sadja** ;*

*A Toute la famille **Brika** ainsi que la famille **Maassoum** pour lesquelles j'éprouve beaucoup d'affection et de respect ;*

Je clos ces remerciements en dédiant ce travail à mes amies que j'ai eu la chance d'avoir à mes côtés, qui m'ont soutenu tout au long de ces années. A Tous ceux que j'aime



Helima



Dédicaces

*Avec tous mes sentiments de respect. Avec l'expérience de ma connaissance, je dédie
ma remise de diplôme et ma joie.*

*À mon paradis, à la prunelle de mes yeux, à la source de ma joie et mon bonheur, ma
lune et le fil d'espoir qui allumer mon chemin, ma moitié, maman **Zahiya***

*À celui qui m'a fait une femme, ma source de vie, d'amour et d'affection, à mon
support qui était toujours à mes côtés pour me soutenir et m'encourager, à mon
prince papa **Zahi***

*À mon frère **Yaakoub** et sa femme **Nardjas** pour leur engagement malgré la distance*

*À la meilleure grande sœur dans le monde **Meriem** qui n'a pas cessée de me conseiller
et soutenir tout au long de mes études*

*À mes adorables sœurs **Hala**, **Fatima** et **Basmala** qui savent toujours comment
procurer la joie et le bonheur pour toute la famille*

*À mon homme de futur, mon fiancé **Lokman** qui était toujours à côté de moi et pour
l'amour qu'il me réserve*

*À ma chère enseignante madame **benserradj ouafa** pour sa disponibilité et ces efforts
déployés tout au long de mon mémoire*

À tout ce qui a participé à ma réussite et à tous qui m'aimer de loin ou de près



Feryal

<u>°C</u> : Degré Celsius	<u>PDA</u> : Potato Dextrose Agar
<u>ADN</u> : Acide deoxyribonucléique	<u>pH</u> : Potentiel d'Hydrogène
<u>ADP</u> : Adénosine Diphosphate	<u>Pi</u> : Phosphate Inorganique
<u>ARNr</u> : Acide ribonucléique ribosomique	<u>S. aureus</u> : <i>Staphylococcus aureus</i>
<u>ATP</u> : Adénosine triphosphate	<u>S</u> : Souche
<u>B. spizizenii</u> : <i>Bacillus spizizini</i>	<u>SCP</u> : Single Cell proteins
<u>B. subtilis</u> : <i>Bacillus subtilis</i> ;	<u>SGA</u> : <i>Stache Glucose Agar</i>
<u>C₂H₅OH</u> : Ethanol	<u>SM</u> : Solution Mère
<u>C₆H₁₂O₆</u> : Glucose	<u>Sp</u> : Espèce
<u>CO₂</u> : dioxyde de carbone	<u>T</u> : Température
<u>CS</u> : Surnageant de culture	<u>TPA</u> : Tween Peptone Agar
<u>E. coli</u> : <i>Escherichia coli</i>	<u>YCB</u> : <i>Yeast Carbon Base</i>
<u>EC</u> : Enzym Commission number	<u>YPG</u> : <i>Yeast Extract Peptone Glucose</i>
<u>H₂O</u> : Eau	<u>YPGA</u> : <i>Yeast Extract Peptone Glucose</i>
<u>H₃O⁺</u> : Hydronium ion	<u>YPMA</u> : <i>Yeast Peptone Maltose Agar</i>
<u>Na Cl</u> : Chlorure de sodium	<u>YPPA</u> : <i>Yeast Peptone Pectin Agar</i>
<u>O₂</u> : Oxygène	<u>YPSA</u> : <i>Yeast Peptone Starch Agar</i>
<u>OH</u> : hydroxyle	<u>YWM</u> : <i>Yeast Water Medium</i>
<u>P. aeruginosa</u> : <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
<u>PAG</u> : Acide Polygalacturonique	
<u>PCR</u> : Polymerase Chain Reaction	

Figure 1 : Cellule levurienne	3
Figure 2 : Structure cellulaire d'une levure	5
Figure 3 : la reproduction asexuée d'une levure par bourgeonnement	6
Figure 4 : Bourgeonnement d'une cellule de levures	6
Figure 5 : Reproduction sexuée d'une cellule levurienne	7
Figure 6 : Les différents domaines d'application des levures	12
Figure 7 : Grignon d'olive des deux wilayas	24
Figure 8 : Technique d'extraction du grignon d'olive	25
Figure 9 : Les étapes de dilutions.....	26
Figure 10 : Ensemencement et incubation des boites de Pétri.....	27
Figure 11 : Purification des levures.....	28
Figure 12 : Culture des levures sur lame microscopique	30
Figure 12 : Test de fermentation des sucres	31
Figure 14 : Solutions de révélation	33
Figure 15 : Réalisation de l'activité antibactérienne.....	35
Figure 16 : Imprégnage des disques par l'inoculum de la levure <i>Candida albicans</i> .	36
Figure 17 : Nombre de souches isolées à partir des trois échantillons.....	37
Figure 18 : Test de fermentation des sucres	46
Figure 19 : Pourcentage de production de l'uréase par les isolats des trois régions..	48
Figure 20 : Pourcentage de la croissance des souches levuriennes à 37°C	52
Figure 21 : Pourcentage de souches résistantes au NaCl	52
Figure 22 : Mise en évidence de la lipase.....	54
Figure 23 : Pourcentage de production de lipase par les levures isolées des trois régions	54
Figure 24 : Mise en évidence de α -amylase	55
Figure 25 : Pourcentage de production de α -amylase par les levures isolées des trois régions	55
Figure 26 : Mise en évidence de la maltase.....	56
Figure 27 : Pourcentage de production de maltase par les levures isolées des trois régions	56
Figure 28 : Mise en évidence de la laccase	57
Figure 29 : Pourcentage de production de laccase par les levures isolées des trois régions	57
Figure 30 : Mise en évidence de la pectinase	57

Figure 30 : Pourcentage de production de la pectinase par les levures isolées des trois régions	58
Figure 32 : Activité anti fongique des souches levuriennes par la technique des disques après incubation à 30°C.	59
Figure 33 : Activités antibactériennes des souches levuriennes par la technique des disques après incubation à 37°C	59
Figure 34 : Mise en évidence de l'activité antibactérienne de la levure S4.	61
Figure 35 : Mise en évidence de l'activité antibactérienne de la Levure S7.	61
Figure 36 : Mise en évidence de l'activité antibactérienne de la souche S13	62
Figure 37 : Mise en évidence de l'activité antibactérienne de la levure S17	63

Tableau 1 : les différentes classes des levures	8
Tableau 2 : Quelques micro-organismes producteurs d' α -amylase	17
Tableau 3 : Différents domaines d'application des α -amylases.	17
Tableau 4 : Domaines d'application des laccases.....	19
Tableau 5 : Quelque exemple sur l'origine microbienne de lipase.....	20
Tableau 6 : Divers domaines d'application des lipases	21
Tableau 7 : Isolement des levures à partir de différents échantillons du grignon d'olive.....	37
Tableau 8 : Caractères macro et microscopiques des souches de levures isolées après une culture de 02 jours à 30°C sur milieu YPGA.	38
Tableau 9 : Caractéristiques microscopiques des souches levuriennes obtenues.....	42
Tableau 10 : Observation microscopique de la filamentation levuriennes.	43
Tableau 11 : Résultat du test d'assimilation des substrats azotés par les isolats de levures.....	45
Tableau 12 : Résultats du test de fermentation des différents sucres par les isolats de levures.....	45
Tableau 13 : Résultats du test d'uréase.	47
Tableau 14 : Résultats de croissance des souches à 37°C et résistance au Na Cl	49
Tableau 15 : Mise en évidence des activités enzymatiques des 16 souches de levures	53
Tableau 16 : Les souches les plus performantes pour la production d'enzymes	58
Tableau 17 : Tableau illustratif de l'activité antifongique des souches levuriennes contre la levure <i>candida albicans</i> après incubation à 30°C.....	60
Tableau 18 : Tableau illustratif de l'activité antimicrobienne des levures avec mesures du diamètre d'inhibition après incubation à 37°C.....	60

Introduction..... 1

Partie 01 : Étude bibliographique

Chapitre 01 : Les levures

1. Définition 3

2. Historique..... 3

3. Habitat..... 4

4. Morphologie et Structure 4

5. Reproduction 5

 5.1. Reproduction asexuée 5

 5.1.1. Bourgeonnement..... 5

 5.1.2. Fission binaire 6

 5.2. Reproduction sexuée 6

6. Classification des levures..... 7

7. Conditions de croissance 8

 7.1. Conditions physico-chimiques de croissance 8

 7.2. Conditions nutritionnelles 9

8. Métabolisme 10

 8.1. Métabolisme oxydatif..... 10

 8.2. Métabolisme fermentaire..... 10

9. Applications des levures en Biotechnologie 11

 9.1. Boissons alcoolisées..... 11

 9.2. Boulangerie..... 11

 9.3. Affinage du fromage 11

 9.4. Recherche biomédicale 12

10. Production des enzymes par les levures 12

Chapitre 02 : Activités biologiques des levures

1. Activités enzymatiques..... 14

 1.1. Généralité sur les enzymes D'origine fongique..... 14

 1.2. Définition des enzymes 15

1.3. Principaux enzymes d'intérêt industriel.....	15
1.3.1. Pectinase	15
1.3.2. Amylase	16
1.3.3. Laccases	18
1.3.4. Lipases	19
1.3.5. Maltase.....	21
2. Activités antimicrobiennes des levures	22

Partie 02 : Matériel et méthodes

1. Échantillonnage.....	24
2. Isolement.....	26
2.1. Préparation des dilutions	26
2.2. Milieu d'isolement	27
2.3. Ensemencement	27
2.4. Purification	27
2.5. Conservation.....	28
3. Identification des levures	28
3.1. Etude des caractères culturaux.....	28
3.2. Etude des Caractères morphologiques	29
3.2.1. L'aspect macroscopique.....	29
3.2.2. L'aspect microscopique	29
3.2.3. Aptitude à la filamentation.....	29
3.3. Etude des caractères biochimiques	30
3.4. Etude des caractères physiologiques.....	31
3.4.1. Résistance au NaCl.....	31
3.4.2. Croissance à 37°C.....	31
3.5. Etude des caractères biotechnologiques.....	31
3.5.1. Mise en évidence des activités enzymatiques	32
3.5.1.1. Détermination de l'activité α amylasique (dégradation de l'amidon).	32
3.5.1.2. Détermination de l'activité de laccase	32
3.5.1.3. Détermination de l'activité de pectinase	32
3.5.1.4. Mise en évidence de l'activité Maltasique	32

3.5.1.5. Détermination de l'activité de lipase..... 33

3.5.2. Mise en évidence de l'activité antimicrobienne des levures 33

3.5.2.1. Mise en évidence de l'activité antibactérienne 34

3.5.2.1.1. Les Bactéries tests..... 34

3.5.2.1.2. Réactivation des bactéries test..... 34

3.5.2.1.3. Préparation de la solution levurienne..... 34

3.5.2.1.4. Sélection des isolats producteurs de substances antibactériennes 34

3.5.2.2. Mise en évidence de l'activité antifongique 35

Partie 03 : Résultats et discussion

Résultats

1. Isolement et purification des souches de levures 37

2. Identification des levures 38

2.1. Caractéristiques morphologiques..... 38

2.1.1. Etude macroscopique..... 38

2.1.2. Etude microscopique 38

2.1.3. Test de filamentation 43

2.2. Caractéristiques biochimiques 44

2.2.1. Assimilation des substrats azotés 45

2.2.2. Fermentation des sucres 45

2.3. Caractéristiques physiologiques 49

2.3.1. Croissance à 37°C et Résistance au Na Cl..... 49

2.4. Caractéristiques biotechnologiques 52

2.4.1. Mise en évidence des activités enzymatiques 52

2.4.2. Activité antimicrobienne..... 58

Discussion65

Conclusion Et Perspectives..... 37

Références bibliographiques.....74

Annexes

Résumés



Introduction

La production d'huile d'olive, possède un impact significatif sur le développement socio-économique de la plupart des pays méditerranéens (**Munir et al, 2016**). L'Algérie fait partie de ces grands pays, après l'Espagne, l'Italie, la Grèce et la Tunisie, qui sont les plus gros producteurs d'huile d'olive par ordre d'importance (**Tsagariki et al, 2007**).

En Algérie, le nombre d'olivier se répartit principalement dans trois régions, dont l'Est occupe la deuxième place avec 20% de la superficie total (Jijel, Skikda, Mila, et Guelma) (**Madr, 2018**). En plus de sa principale production étant l'huile, l'industrie oléicole laisse deux résidus majeurs, un liquide appelé margine et un autre solide appelé grignons d'olive (**Nefzaoui, 1991**).

La plupart des grignons rejetés dans la nature sont considérés comme une source de pollution, Parce qu'ils sont contaminés par des champignons ou libère des substances toxiques dans l'environnement se qui menace la santé humaine (**Bataiche, 2014**). Pour compenser cette pollution, il doit être transformé en produits utiles, notamment dans les pays industrialisés.

L'utilisation des microorganismes pour valoriser ces déchets est une méthode récente au niveau local, mais déjà existe dans les pays développés. Parmi les microorganismes utilisés dans cette valorisation, on cite les champignons qui fermentent les grignons d'olive sur milieux solides pour produire de nombreux composés aromatiques qui intéressent les secteurs de l'alimentation, du cosmétique ou encore de la pharmacie (**Kademi et al, 2003**). Les levures sont des micro-organismes idéaux impliqués aussi dans la valorisation des grignons.

En effet, les levures sont très fréquentes dans différents produits alimentaires, et surtout les produits laitiers. La présence de ces microorganismes dans ces produits riches en lipides, sucres et protéines, est due à ses capacités de produire plusieurs enzymes (**Corbaci et al, 2012**). En plus de ces activités enzymatiques, les levures exercent aussi des activités antimicrobiennes contre les bactéries et les champignons indésirables.

Ces nombreuses activités biologiques rendent les levures prometteuses pour un large éventail d'applications qui ne se limite pas au secteur alimentaire (**Rima et al, 2012**)

Les chercheurs scientifiques s'intéressent à l'étude des caractéristiques biotechnologiques et les activités biologiques des bactéries et des champignons, alors que les levures sont moins décrites, ce qui donne à notre travail un caractère novateur.

L'objectif principal de notre étude consiste à :

- Isoler des levures à partir de grignons d'olive.
- Identifier et évaluer *in vitro* les activités biologiques des souches levuriennes isolées.

Dans ce cadre, notre travail est divisé en 3 parties :

La première partie, présente une étude bibliographique qui est divisé en 2 chapitres : Le premier rapporte des généralités sur les levures, leurs utilisations dans les domaines industriels..., alors que le deuxième focalise sur les différentes activités biologiques de ces microorganismes.

La deuxième partie comporte le matériel et les protocoles utilisés dans la réalisation de cette étude.

La troisième partie est consacrée à la discussion et l'interprétation des résultats obtenus.

Nous terminons par une conclusion générale et une des perspectives possibles pour poursuivre cette recherche.

PARTIE 01 :
ÉTUDE
BIBLIOGRAPHIQUE



Chapitre 01 :
Les levures

1. Définition

Le mot levure vient du mot latin `` levare ", qui signifie « lever ou fermenter », (Oteng Gyang, 1984) et fait référence à sa capacité de produire le dioxyde de carbone dans des conditions anaérobies pour fermenter le pain et fermenter les sucres (Kurtzman et al, 2011a).

Les levures sont des micro-organismes eucaryotes qui peuvent obtenir de l'énergie à partir de réactions d'oxydo-réduction ou de la fermentation de composés chimiques donc elles sont des hétérotrophes. (Kurtzman et al., 2011).

La levure est un champignon caractérisé par sa nature unicellulaire et généralement l'absence d'un véritable mycélium. Certains de ces ascomycètes peuvent former du mycélium ou du pseudomycélium (Kurtzman et al, 2011 et Barnett et al, 2000). Elles sont microscopiques, non photosynthétiques et immobiles (Guiraud et Galzy, 1998) leurs cellules sont généralement ovoïdes (Figure 01) et varient en taille de quelques microns jusqu'à 25 à 30 microns (Merabti, 2006).

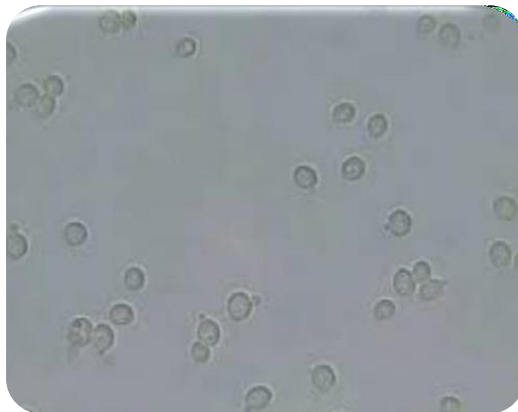


Figure 1 : Cellule levurienne (Belmaziz et Djalal ,2017)

2. Historique

Depuis plusieurs années, les levures ont été les premiers microorganismes utilisés par l'homme comme usines cellulaires dans une variété d'applications et de domaines, notamment dans la production de boissons alcoolisées et de pain par fermentation (Bouix et Leveau, 1991 ; Pol, 1996) ainsi que la production de protéines recombinantes d'intérêt pharmaceutique, divers produits chimiques, et plus récemment, la production de bioéthanol (Lim et al, 2011 ; Martin et al, 2012 ; Neagu et Bahrim, 2012)

Ce sont aussi les premiers micro-organismes à être observés au microscope par **Van Leeuwenhoek Antoni en 1680** qui les a dessinées. Avec les travaux de pasteur (1866-1876) les levures sont identifiées comme agents des fermentations. En 1881, HANSEN Emile rapporte l'isolement de la première souche pure de *Saccharomyces* à partir de moût. D'autres espèces de levures ont ensuite été identifiées de 1950 à 1970 (**BASMAJI, 2005**). La levure est actuellement le matériel d'essai de choix en raison de son double statut microbien et eucaryote (**Pol, 1996**).

3. Habitat

La levure est une espèce omniprésente qui est très répandue dans la nature. On les trouve dans les plantes riches en sucres directement assimilables (**Bouix et Leveau, 1991**). En effet, les milieux riches en sucre tels que les sirops, le miel, les fleurs et de nombreux fruits (pommes, raisins) font partie des milieux privilégiés (**Leclerc, 1975 et Oteng-Gyang, 1984**). Les levures se trouvent sur et dans d'autres organismes, dans l'eau, l'air et le sol (**Leveau et Bouix, 1993 et Pol, 1996**). De plus, le sol est un grand réservoir qui assure la survie dans les mal conditions (**Leclerc, 1975**).

4. Morphologie et Structure

Les levures sont des cellules typiques d'eucaryotes. La structure de ces espèces se diffère de celle des bactéries par sa complexité, notamment en raison de la présence de noyaux cellulaires, de mitochondries, d'appareils de Golgi et de multiples chromosomes. (*Saccharomyces cerevisiae a 16 chromosomes*) (**Labrecque, 2003**) (Figure 02). Les cellules végétatives sont généralement ovales ou sphériques, mais ont d'autres formes spécifiques : pointue, Triangulaire, en forme de citron et même en forme de bouteille. La taille de leurs cellules se diffère de quelques microns à 25-30 microns. Certaines peuvent former des amas cellulaires ou apparaître sous forme filamenteuse à certains stades de leur vie (**Bouix et Leveau, 1991**). Les colonies sont généralement de couleur blanche (rarement roses ou rouges) et régulières (**Guiraud, 1998**).

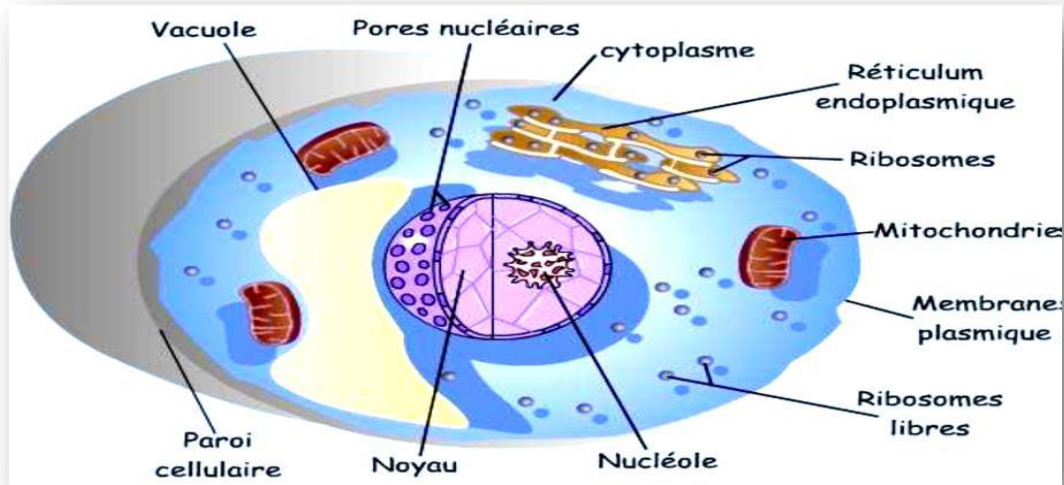


Figure 2 : Structure cellulaire d'une levure (Guery et Mcirdi, 1994).

5. Reproduction

La levure est un champignon qui se reproduit de manière très spécifique. Selon les conditions environnementales (favorables ou défavorables), la levure peut se reproduire via le cycle sexuel (sporulation) (Larpen et Larpen-Gourgaud, 1997), Ou via la reproduction asexuée, qui est le cycle reproducteur dominant (végétatif) chez la plupart des levures (Bonaly, 1991).

5.1. Reproduction asexuée

Elle peut se faire par bourgeonnement ou par fission binaire

5.1.1. Bourgeonnement

La reproduction asexuée se produit par bourgeonnement. De petits amas saillants apparaissent à la surface de la cellule mère, se développent progressivement et se détachent lorsqu'ils atteignent la même taille. Dans le même temps, le noyau de la cellule mère migre vers la périphérie, se dilate, imprègne en partie le bourgeon. Il peut alors se détacher de la cellule mère, y laissant une petite "rayure"(Figure 03et 04). Les cellules filles ainsi générées croissent jusqu'à atteindre environ les deux tiers du diamètre de la cellule mère puis génèrent de nouvelles pousses (Guinet et Godon, 1994).

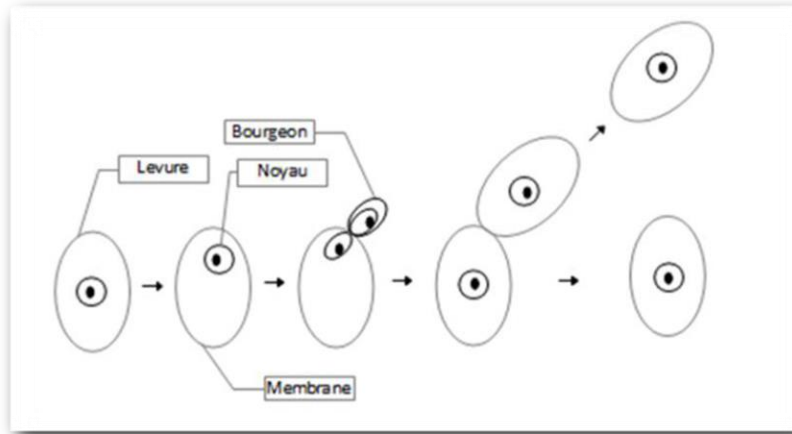


Figure 3 : la reproduction asexuée d'une levure par bourgeonnement (Thuriaux, 2004).



Figure 4 : Bourgeonnement d'une cellule de levures (Klei et al, 2011).

5.1.2. Fission binaire

Ce mode de multiplication végétative se traduit par la formation d'une paroi transversale à l'axe longitudinal de la levure (Figure 04). (Chez le genre *Schizosaccharomyces*) (REZKI-BEKKI, 2014).

5.2. Reproduction sexuée

De plus, les populations de levures subissent un cycle de vie complexe dans lequel on trouve alternativement les cellules haploïdes et diploïdes, et la reproduction sexuée est accomplie par l'accouplement des deux cellules pour former un œuf fécondé. Après différenciation et méiose, un asque à quatre ascospores haploïdes se forme (Figure 05) (Oteng-Gyang, 1984).

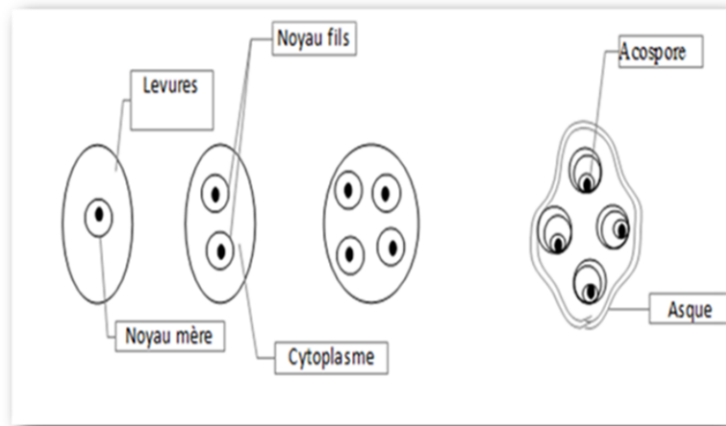


Figure 5 : Reproduction sexuée d'une cellule levurienne (Thuriaux, 2004)

6. Classification des levures

La taxonomie de référence actuelle est celle de (Kreger-Van, 1984), avec des changements significatifs par rapport à la taxonomie précédente de (Lodder, 1971). En particulier, de nouveaux critères taxonomiques sont envisagés pour permettre des enquêtes plus rigoureuses. Il s'agit d'un groupe hétérogène comprenant taxonomiquement environ 60 genres et près de 500 espèces (Kreger-Van, 1984). Les levures sont principalement classées en trois classes :

- **Ascomycètes** : Genres sexués dans lesquels les ascospores (produits de la méiose) sont endogènes et se trouvent dans l'œuf fécondé (asque).
- **Basidiomycète** : Hybrides dans lesquels ou basidiospores (les produits méiotiques) sont exogènes et sont excrétés à l'extérieur de l'œuf fécondé.
- **Deutéromycètes ou levure déficiente** : contrairement aux classes précédentes La reproduction asexuée se fait uniquement par reproduction végétative (genres asexués).

Tableau 1 : les différentes classes des levures (Alphonse et al, 2004).

Classes	ordres	Familles	Sous familles	Genres
Ascomycètes	Endomycétales	Spermophthoraceae Saccharomycetaceae	Shizosaccharomycetoideae Nadsonioidae Lipomycetoideae Saccharomycetoideae	<i>Shizosacchomyces</i> <i>Hanseniaspora</i> <i>Lipomyces</i> <i>Debaryomyces</i> <i>Hansenula</i> <i>Kluyveromyces</i> <i>Pichia</i> <i>Saccharomyces</i> <i>Coccidiascus</i>
Basidiomycètes	Ustilaginales Tremellales	Filobasidiaceae Levures à téliosporés Sirobasidiaceae Tremellaceae		<i>Filobasidium</i> <i>Leucosporidium</i> <i>Sirobasidium</i> <i>Tremella</i>
Deuteromycètes	Blastomycétales	Cryptococcaceae Sporobolomycetaceae	Cryptococcoideae Rhodotoruloideae Trichosporoideae	<i>Brettanomyces</i> <i>Candida</i> <i>Cryptococcus</i> <i>Torulopsis</i> <i>Rhodotrula</i> <i>Trichosporon</i> <i>Sporobolomyces</i>

7. Conditions de croissance

La levure doit trouver les éléments nécessaires à la synthèse cellulaire et des conditions physico-chimiques favorables dans le milieu extérieur pour se maintenir, se développer et se reproduire.

7.1. Conditions physico-chimiques de croissance

- **Oxygène**

Toutes les levures peuvent se développer en présence d'oxygène, mais les levures strictement anaérobies n'existent pas. Certaines levures sont strictement aérobies, comme *Rhodotorula*. D'autres sont des anaérobies aérobies facultatifs, préférant le métabolisme fermentaire (ex. *Saccharomyces*) ou respiratoire (ex. *Candida*, *Kluyveromyces*) (Bouix et Leveau, 1991).

- **Température**

La température normale nécessaire à la bonne croissance des levures est de 25 à 30 °C. En effet, il existe des levures psychrophiles, mésophiles et thermophiles (50°C chez *Candida slooffii*, *Saccharomyces telluris*) (**Bourgeois et Larpent, 1996**).

- **pH**

La levure a tendance à coloniser les milieux acides (sa membrane cellulaire est imperméable aux ions H_3O^+ et OH^- , et son métabolisme acidifie davantage le milieu. La levure vit donc dans la plage de pH de 2,4 à 8,6 (**Bourgeois et Larpent, 1996**). Cependant, **Phaff et ses collaborateurs (1978)** ont noté que la plupart des levures connues, ont une bonne croissance à des pH proches de 3.

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

La plupart des souches ne peuvent pas pousser en dessous d'une activité de l'eau de 0,90. En général, les levures résistent mieux à la pression osmotique que les bactéries en accumulant des polyols comme osmoprotecteurs (bétaine, glycérol). Par conséquent, certaines espèces sont osmophiles mais ont un métabolisme lent. Ces levures sont dites (xérotolérants) tolérantes à la sécheresse (**Bourgeois et Larpent, 1996**).

7.2. Conditions nutritionnelles

- **Source de carbone**

Cette source possède une grande importance pour les levures car elle fournit l'énergie nécessaire à l'activité cellulaire et la formation des composants cellulaires. La levure utilise souvent des glucides, en particulier des monosaccharides (par exemple glucose, fructose), des disaccharides (par exemple maltose, saccharose) et des trisaccharides (par exemple maltotriose) comme principales sources de carbone et d'énergie (**Rezki I-Bekki, 2014**). Certaines autres levures utilisent des sources de carbone non conventionnelles. Elles peuvent oxyder les acides organiques (acide citrique, acide lactique, etc.) et les alcools (éthanol, glycérol) (**Oteng,gyang, 1984**).

- **Source d'azote**

La plupart des levures peuvent assimiler diverses sources d'azote organique (peptones, extrait de levure, glutamine, purines, bases pyrimidiques, etc.). L'extrait de levure est un stimulateur majeur de la croissance microbienne, en particulier de la

levure (Deak, 2006) et est une source inorganique pour la biosynthèse d'acides aminés, de protéines, d'acides nucléiques et de vitamines (Deak, 2006). Pratiquement toutes les levures peuvent utiliser l'azote minéral tel que les sels d'ammonium utilisés dans les milieux (Bourgeois, 1996). Contrairement à *Hansenula* et *Citeromyces*, certains genres de levures ne peuvent pas utiliser de nitrates : *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Pichia* et *Debaryomyces*. (Bourgeois, 1996).

- **Minéraux, oligoéléments et vitamines**

La levure a également besoin de sels minéraux et d'oligo-éléments pour sa croissance, mais à de très faibles concentrations (Larpent et Sanglier., 1992). De plus, d'autres facteurs comme les vitamines (biotine, thiamine, acide pantothénique) qui interviennent dans les réactions enzymatiques comme les coenzymes sont indispensables (Botton et al. 1990).

8. Métabolisme

8.1. Métabolisme oxydatif

Ce type de métabolisme nécessite la présence d'oxygène et une concentration limitée de substrats pour éviter un basculement métabolique vers la production d'éthanol et d'autres co-métabolites, Dans ces conditions, le glucose est oxydé via la glycolyse, le cycle de citrate et les voies de phosphorylation oxydative. (Rose et Harrison, 1971 et Van Dijken et Scheffers, 1986).

Ce métabolisme, conduisant à la formation de CO₂ et HO, est très actif et énergétique et permet aux levures de rester vivantes, de synthétiser de la matière organique et de produire de la biomasse (X) avec des rendements cellulaires élevés (Lai, 2010). Dans ce cas, l'oxydation des sucres est complète et le bilan énergétique théorique de cette voie métabolique est donné par cette équation :



8.2. Métabolisme fermentaire

Dans la vie anaérobie, la levure peut fermenter le glucose en éthanol et en dioxyde de carbone tout en produisant du glycérol et certains acides et esters (Leyral et Vierlin, 2007 et Lai, 2010). Le rendement de conversion de la biomasse à partir du glucose est

5 fois inférieur et l'ATP produit est 18 fois inférieur par rapport aux conditions aérobies (Hencké, 2000). L'équation globale de la fermentation est :



9. Applications des levures en Biotechnologie

La levure est utilisée par l'homme depuis des milliers d'années dans une grande variété d'applications fondamentales et industrielles dans les domaines de la science, de l'alimentation, de la médecine et de l'agriculture. La levure est traditionnellement impliquée dans la fermentation de nombreux aliments et produits tels que le cidre, la bière, le saké le vin, les produits de boulangerie, le fromage, les saucisses et autres aliments fermentés. Les procédés industriels utilisent depuis longtemps les levures dans la production d'éthanol carburant, de protéines unicellulaires (SCP) pour l'alimentation animale, ou encore d'enzymes industrielles, de vaccins et de caroténoïdes (Djekrif, 2016 ; Buzzini, 2000 ; Jacob, 1997). (Figure 06).

9.1. Boissons alcoolisées

Le rôle traditionnel de la levure est dans la production de boissons alcoolisées, dont la production est basée sur la fermentation alcoolique, dans laquelle les sucres simples sont fermentés en éthanol. Ils sont impliqués dans la production de vin et de bière (Coulibaly et al, 2014). *Saccharomyces cerevisiae* est la levure la plus couramment utilisée (Leveau et Bouix, 1993).

9.2. Boulangerie

Une autre utilisation ancienne est la cuisson du pain. Le dioxyde de carbone libéré lors de la fermentation augmente le volume de la pâte et lui donne une texture plus légère (Dali et Hamame, 2016). La levure la plus utilisée est *Saccharomyces cerevisiae* (Simon et Meunier, 1970 et Cofalec, 2006).

9.3. Affinage du fromage

Les levures sont impliquées dans l'affinage du fromage car elles ne peuvent pas utiliser les acides organiques comme source d'énergie ou de carbone (Larpent, 1991). La consommation de l'acide lactique produit par les bactéries lactiques à partir du composant du lait permet de réduire l'acidité du caillé (Leveau et Bouix, 1993).

9.4. Recherche biomédicale

Aujourd'hui, les levures sont largement utilisées dans la recherche biomédicale en raison de leur double statut de microbes et d'eucaryotes. En effet, à la différence aux bactéries, les levures peuvent produire des protéines glycosylées. La levure génétiquement modifiée produit des antigènes de surface du virus de l'hépatite B utilisés dans les vaccins contre l'hépatite. Certains D'autres produisent de l'albumine sérique humaine, des facteurs de croissance, des hormones et d'autres protéines utilisées dans le domaine biomédical (Walker, 2009 et Rezki-Bekki, 2014).

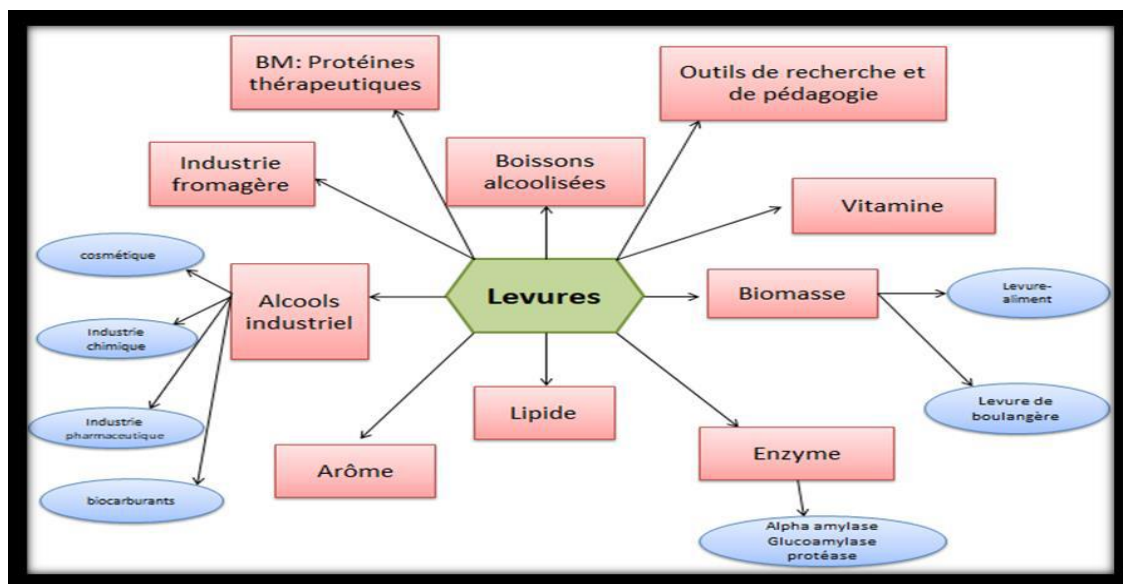


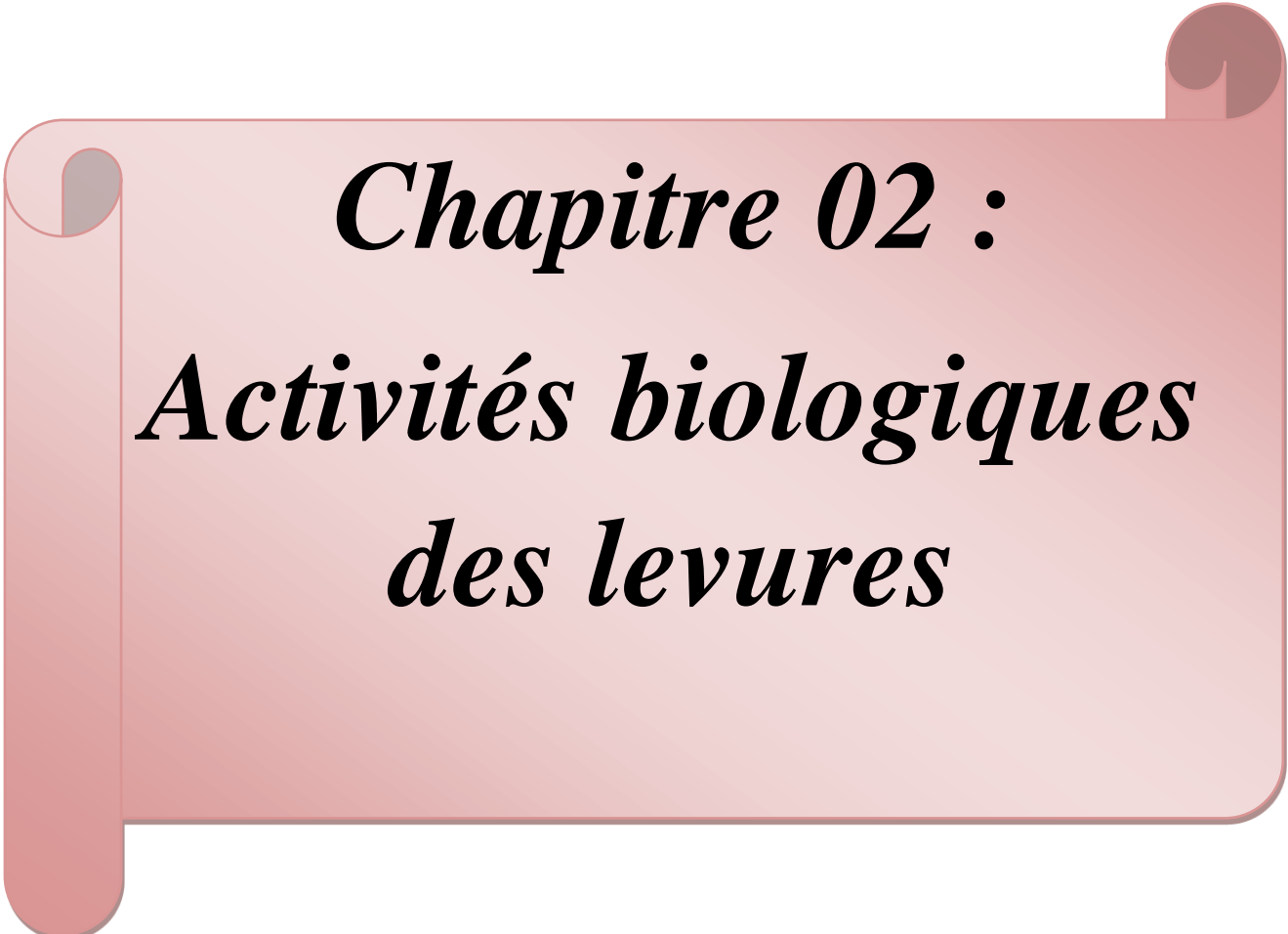
Figure 6 : Les différents domaines d’application des levures (Bourat, 1992).

10. Production des enzymes par les levures

Selon Reiss, 2007, le marché mondial des enzymes industrielles a augmenté de 6,5 % chaque année. Dans certains pays, la production d'enzymes représente plus de 30 % de l'industrie biochimique nationale comme c'est le cas dans la Finlande. En 2015, les lipases représentaient 38,5 % du marché mondial, suivies des amylases avec 30,5 %. (Morvan, 2010).

En tant qu'usine de cellules, la levure est actuellement la source la plus utilisée pour un large éventail d'applications de l'industrie biotechnologique. (Singh *et al*, 2015). Elle constitue l'une des sources importantes d'enzymes commerciales en raison de sa capacité polyvalente et de ses faibles exigences permettant de donner des grandes quantités de biomasse à faible coût. (Pol, 1996).

Les enzymes de levure sont de plus en plus utilisées dans l'industrie agro-alimentaire, pour accélérer les processus et réduire les coûts énergétiques du produit final. La recherche de nouvelles enzymes de levure avec des applications industrielles potentielles continue de croître. Des levures telles que *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae* et *Hansenula polymorpha* sont actuellement utilisées pour la production industrielle de protéines et d'enzymes, y compris des protéines pharmaceutiques. **(Johnson et Echavarri-Erasum, 2011).**

A decorative red scroll graphic with rounded corners and a vertical strip on the left side, resembling a rolled-up document. The text is centered on the scroll.

Chapitre 02 :
Activités biologiques
des levures

La levure est un composant important de la microflore de nombreux aliments. Ces microbes sont généralement abondants dans les produits laitiers, suggérant qu'ils sont bien adaptés aux substrats riches en protéines, lipides, sucres et acides organiques. Cette large diffusion est due à la production d'activités enzymatiques protéolytiques et lipolytiques extracellulaires par la souche de levure et à l'assimilation et/ou la fermentation du sucre. (Corbaci *et al*, 2012).

Un certain nombre des activités biologiques diverses, y compris une activité antibactérienne contre les bactéries et les champignons indésirables, rendent la levure prometteuse pour une large gamme d'applications, non limitées au secteur alimentaire (Rima *et al*, 2012).

1. Activités enzymatiques

1.1. Généralité sur les enzymes D'origine fongique

Depuis longtemps, Les enzymes jouent un rôle principal dans les tentatives de l'homme d'utiliser les systèmes biologiques à des objectes diverses. Elles sont utilisées dans : la fabrication des fromages, la boulangerie, la brasserie, la production d'antibiotique, et dans la fabrication de produits de base comme l'indigo, le cuir, et le lin. Elles se trouvent également dans les domaines de l'industrie textiles, l'industrie alimentaire et des boissons, jus de fruit en passant par le café et le thé et le vin. Aussi la production de détergents et de papier (Kavanaghe, 2018). Les enzymes d'origine microbienne sont extraites de bactéries ou des champignons fermentés. Les enzymes microbiennes représentent environ 90% de toutes les enzymes produites commercialement, les sources les plus connues d'enzymes microbiennes sont *Rhizopus nerveus*, *Bacillus licheniformis*, *Aspergillus niger* (Al-Zuhair et Taher, 2016).

L'arsenal enzymatique fongique est composé d'enzymes hydrolytiques, oxydatives et ligninolytiques, largement utilisées dans les biotechnologies industrielles et environnementales (Mtibaa, 2019). Les enzymes d'origines fongiques restent toujours les outils clés de la biotechnologie et reflètent de plus en plus l'importance et le rôle infini des moisissures dans les différents applications alimentaires, le genre *Aspergillus* (*Aspergillus awamori*, *A. niger* , *A. oryzae*) est un bon exemple de production des amylases , la cellulase, l'invertase, la pectinase et des protéases considérés comme des

catalyseurs biologiques en glucoserie , brasserie et pour la fabrication de boisson (Zhang *et al*,2018).

1.2. Définition des enzymes

Les enzymes sont des catalyseurs biologiques qui accélèrent les réactions biochimiques dans les organismes vivants ils peuvent également être extraits des cellules et ensuite utilisés pour catalyser un large éventuel de processus commercialement important (Robinson, 2015)

Elles sont très spécifiques à la fois dans les réactions qu'elles catalysent et dans le choix des réactifs appelées substrat, ces molécules sont des protéines et présentent tous les propriétés d'une protéine ainsi les traitements de ces enzymes influencer par la température, pH ou autre agents dénaturant qui peut entraine une perte totale de l'activité catalytiques (Bhatia, 2018). Alors que ces protéines catalytiques peuvent accélère fabuleusement la vitesse d'une réaction, jusque à 10¹⁹ fois, il faut tout fois garder à l'esprit que la majorité de ces enzymes est d'origine microbienne majoritairement fongiques (Durand, 2017).

1.3. Principaux enzymes d'intérêt industriel

1.3.1. Pectinase

Les pectinases (EC 3.2.1.15) forment un groupe unique, complexe et hétérogène d'enzymes différentes. Elles agissent particulièrement sur les substrats pectolytiques, notamment les polymères de pectine représentant les polysaccharides primaires de la paroi cellulaire primaire et de la lame médiane de la paroi végétale. Cet effet est résumé par le clivage de l'acide polygalacturonique (PGA) en acide monogalacturonique, ouvrant les liaisons glycosidiques et réduisant ainsi l'adhérence intracellulaire et la rigidité des tissus (Fogarty et Kelly, 1983). Cela entraîne à son tour une dégénérescence de la paroi cellulaire, une rupture cellulaire et donc des symptômes de macération (Bateman et Basham, 1976).

De nombreuses pectinases sont produites par des bactéries, des champignons et des levures. Certaines souches de levure telles que *Saccharomyces cerevisiae* peuvent produire de la pectinase (Radoi *et al*, 2005 ; Sieiro *et al*, 2003 ; Blanco *et al*, 2002; Gainvors *et al*, 2000). Cette enzyme est utilisée dans différent procédés industriels

tels que : l'industrie des pâtes et des papiers, La clarification des jus de fruits et l'assouplissement des fibres dans l'industrie du textile.

Les bactéries produisent essentiellement de la pectate lyase, bien que la présence de pectinase soit parfois détectée chez certaines bactéries : *Leuconostoc sp.* LLn1 (**Bekhouché et al, 2006**), *Erwinia carotovora* (**Basset et al, 2000**), *Bacillus sp.* RK9 (**Fogarty et Kelly, 1983**), *Pseudomonas marginalis* CFBP 1287 (**Membre et Burlot, 1994**).

On les retrouve également dans les plantes, notamment les fruits, et participent à leur maturation. Ils sont également identifiés dans le règne animal car ils sont présents dans les insectes tels que la salive gélifiée des pucerons (**Guo et al, 2006**), les nématodes (**Popeijus et al, 2000**), ou les sucs digestifs des escargots

Ces enzymes sont répertoriées comme les enzymes les plus importantes dans le domaine industriel (**Kashyap et al, 2001**), Parce qu'ils sont utilisés fréquemment et diversement. Citons par exemple la pectinase acide qui est utilisée pour l'extraction et la clarification des jus de fruits (**Rombouts et Pilnik, 1986**) et les pectinases alcalines font l'objet d'une large utilisation dans le décapage des fibres de ramie (**Cao et al, 1992**).

1.3.2. Amylase

L' α -amylase (EC 3.2.1.1) est une endo-1,4- α -D-glucane glucohydrolase. Cette enzyme se trouve chez les animaux, les plantes et les micro-organismes et catalyse l'hydrolyse des liaisons α -1,4 glycosidiques dans les polysaccharides tels que l'amidon, le glycogène et certains oligosaccharides (**Pinto et al, 2020**).

Industriellement, les α -amylases sont principalement isolées à partir de sources bactériennes et fongiques (Tableau 02). (**Ferreira et al., 2021**), Parce que les micro-organismes produisent de grandes quantités d' α -amylase (**Wang et al, 2020**).

Tableau 2 : Quelques micro-organismes producteurs d' α -amylase

Micro-organisme	Espèces	Références
Levures	<i>Clavispora lusitaniae.</i>	Dakhmouche-Djekrif, 2016.
	<i>Pichia pastoris.</i>	Wang et al, 2019.
	<i>Cryptococcus flavus</i>	Barros et al, 2009.
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Martínez et al, 2016.
Moisissures	<i>Bacillus licheniformis.</i>	Fincan et al, 2021.
	<i>Bacillus megaterium.</i>	Shofiyah et al, 2020.
	<i>Pseudoalteromonas sp.</i>	Sanchez et al, 2019.
	<i>Bacillus subtilis.</i>	Zheng et al, 2021.
	<i>Pseudomonas.</i>	Kizhakedathil et C, 2021.
Bactéries	<i>Phohiota microspora.</i>	Janičková et Janeček, 2020.
	<i>Aspergillus niger.</i>	Avwioroko et al, 2018.
	<i>Trichoderma harizianum</i>	Kalia et al, 2021.
	<i>Aspergillus oryzae</i>	Melnichuk et al, 2020.
	<i>Serendipita indica.</i>	Janičková et Janeček, 2020.

L'alpha-amylase, l'une des enzymes industrielles les plus importantes, a une large gamme d'applications industrielles (Tableau 03). Elle représente environ 30 % de la production mondiale d'enzymes (**Fincan et al, 2021**). C'est une enzyme généralement inductible qui est généralement induite en présence d'amidon ou de ses hydrolysats (**Prajapati et al, 2015**).

Tableau 3 : Différents domaines d'application des α -amylases.

Industries	Applications	Références
Biocarburants	-Développement de biocarburants de première génération pour la production de bioéthanol	Oner, 2006
Détergents	-Augmente le pouvoir blanchissant. -Décomposition des résidus d'amidon tels que pommes de terre, sauces, crèmes et chocolats.	Gupta et al, 2003
Boissons	-Fabrication d'alcool éthylique, de boissons gazeuses et de jus de fruits. -Achat de bière dite peu colorée, qui ne contient pas de dextrine.	Mamo et al, 1999
Environnement	-Traitement des eaux usées pour l'élimination de l'amidon	Malhotra et al, 2002

Sucrerie	-Une simple opération d'extraction et de raffinage du saccharose de la betterave ou de la canne élimine les traces d'amidon gênant le raffinage. -Préparation de sirop sucré à base de féculé de maïs et sirop de chocolat.	Van der maarel et al, 2002 et Martin et al, 2003
Textile, la tannerie, de la papeterie	-Découpage de tissus, papeterie, tannerie	Teodoro et al, 2000
Biscuiterie et Planification	-Régulation de l'activité diabétique de la farine de blé - Formation de miettes molles dans la boulangerie.	Pandey et al, 2000 ; Malhotra et al, 2002

1.3.3. Laccases

La laccase (EC 1.10.3.2, p-diphénol oxydase) est une oxydoréductase de type ligninase bleue qui peut dégrader la lignine (**Madhavi et Lele 2009, Camarero et al, 2005**). Elle représente un ensemble d'enzymes spécifiquement impliquées dans le brunissement enzymatique des fruits et légumes (**Nicolas et al, 2003**)

Elles appartiennent à une famille de protéines multicuivres qui utilisent l'oxygène pour oxyder de nombreux composés phénoliques par des mécanismes radicalaires (**Jeanneau, 2005**).

Ces enzymes sont produites par des cellules eucaryotes telles que des champignons, des plantes et des insectes (**Mayer et Staples, 2002**). La laccase, en revanche, est produite par les ascomycètes, les champignons imparfaits et les basidiomycètes dans les champignons en général, et est particulièrement abondante dans de nombreux champignons de la pourriture blanche qui dégradent la lignine (**Kunamneni et al, 2007**).

Les laccases fongiques ont un potentiel redox plus élevé que celui des laccases végétales ou bactériennes jouent un rôle dans la morphogénèse, l'interaction fongique plante-pathogène/ hôte, la sporulation la défense contre le stress, la production des pigments, la formation de corps de fructification et la délignification (la biodégradation de la lignine) (**Bajai, 2017**).

Les laccases font une source importante et potentiellement intéressante d'enzymes par leur abondance et leur diversité (**Levavasseur, 2007**). De nombreuses applications industrielles de la laccase ont été proposées, notamment la boulangerie, le papier, la synthèse organique, l'environnement, l'alimentation, la pharmacie et la nanobiotechnologie (Tableau 04). (**Kunamneni et al, 2007**).

Tableau 4 : Domaines d'application des laccases

Industries	Application
Industries des textiles, des colorants, de la pâte à papier	-La décoloration (dégradation des colorants, décoloration) utilisant des systèmes médiateurs. (Camarero et al, 2005, Baldrian, 2004, Knutson et Ragauskas, 2004 et Schliephake et al, 2000). -Les systèmes laccase/médiateur sont utilisés dans l'industrie du papier pour décomposer la lignine lors de l'extraction de la pâte, en évitant l'utilisation de produits chimiques chlorés (Srebotnik et Hammel, 2000).
Industrie pharmaceutique	-la fabrication de plusieurs produits pharmaceutiques importants tels que : B. Médicaments anticancéreux et ajoutés à certains cosmétiques pour réduire la toxicité. (Couto et Herrera, 2006). -utilisée dans des préparations dermatologiques contenant des protéines qui éclaircissent la couleur de la peau (Golz-Berner et al, 2004).
Industrie alimentaire	-Améliore la qualité des boissons telles en éliminant sélectivement les dérivés phénoliques. (Minussi et al, 2002). -La laccase est également utilisée dans la cuisson de certains aliments (Selinheimo et al, 2006) -Peut être utilisé pour stabiliser certains produits périssables contenant des huiles végétales (Morozova et al, 2007).

1.3.4. Lipases

Les lipases appartiennent à une classe d'hydrolases spécifiques de l'hydrolyse des graisses en acides gras et en glycérol aux interfaces eau lipides. Ils peuvent également inverser les réactions dans les milieux non aqueux et sont abondants dans la nature (**Singh et al, 2017**). En 1856, Claude Bernard découvre que la lipase est une enzyme

du suc pancréatique qui hydrolyse les gouttelettes d'huile insolubles et les transforme en produits solubles (**Sangeetha et al, 2010**).

Les lipases sont omniprésentes dans la nature et jouent des rôles physiologiques importants dans le métabolisme des lipides. On les trouve dans de nombreux organismes (**Gilham et Lehner, 2005**).

Les lipases microbiennes sont obtenues à partir de champignons, de levures et de bactéries. La plupart des lipases microbiennes sont extracellulaires et ces lipases présentent des avantages significatifs par rapport aux autres lipases et sont plus courantes (Tableau05). Les micro-organismes qui produisent ces enzymes sont faciles à modifier génétiquement et ont des propriétés et des caractéristiques particulières différentes. (**Gonçalves Filho et al, 2019**).

Tableau 5 : Quelque exemple sur l'origine microbienne de lipase.

Origine	Exemples	Références
Levures	<p><i>Candida rugosa</i> et <i>Candida cylindracea</i> sont productrice de la lipase extracellulaire</p> <p>Quelques espèces du genre <i>Geotrichum</i> sont des producteurs des lipases pour la plupart extracellulaires.</p> <p><i>Trichosporon sp.</i></p> <p><i>Yarrowia lipolytica</i> produit des lipases extracellulaires et liées aux cellules.</p> <p><i>Candida parapsilosis</i> CBS 604 synthétise des lipases liées aux cellules.</p> <p><i>Cryptococcus sp.</i> S-2 produit des lipases extracellulaires</p>	<p>Li et Zhang, 2005</p> <p>Vakhlu et Kour, 2006</p> <p>Kamini, 2000</p>
Bactéries	<p><i>Pseudomonas aeruginosa</i> tolérante aux solvants produit une lipase extracellulaire</p> <p><i>Geobacillus sp</i> TW1 thermophile capable de produire une lipase extracellulaire</p>	<p>Ruchi et al, 2007</p>

La lipase est considérée comme le groupe important de produits biotechnologique qui connaît la croissance la plus rapide, Récemment une grande

attention a été accordée aux lipases fongiques qui sont relativement stables et sont capables de catalyser une grande variété de réactions pour divers application industrielles (**Konwar et Sagar, 2018**).

Ce sont un groupe important d'enzymes de valeur industrielle en raison de leur polyvalence. Ils peuvent être utilisés comme enzymes hydrolytiques ou comme catalyseurs et synthèse organique. Par conséquent, ses domaines d'application sont très larges et diversifiés (Tableau 06) (**Fickers et al, 2008 et Gupta et al, 2015**).

Tableau 6 : Divers domaines d’application des lipases

Industries	Application	Référence
Industrie des cosmétiques et de la parfumerie	La production de mono- et diacylglycérols qui sont utilisés comme tensioactifs et arômes.	(Ximena Zottig, 2016)
Industrie alimentaire	Le développement de la saveur des produits carnés, des produits de boulangerie et d'autres traitements alimentaires tels que le traitement du beurre de cacao.	(Guerrand, 2017).
Industrie pharmaceutique	La synthèse de médicaments tels que les anti-inflammatoires non stéroïdiens et certains antibiotiques vitaminiques.	(Lagrari, 2019)
Industrie des détergents	Aident à éliminer les taches et les traces d'huile et de graisse. Utilisées à la fois dans la lessive et la vaisselle.	(Guerrand, 2017)

1.3.5. Maltase

La maltase (EC3.2.1.20) est une α -glucosidase spécialisée (α -D-glucose de l'extrémité non réductrice du substrat) (**Andriotis et al, 2016**), C'est une enzyme ubiquitaire présente dans tous les tissus (**Scheen et al,2008**): les plantes, les vertébrés, les champignons , les bactéries, les moisissures et les levures comme *Isaria fumosorosea* (**Linxia et al., 2015**) ;*Cordyceps brongniartii* (**Sasaki et al, 2015**), *Moesziomyces*

antarcticus (Wang et al, 2015) *Grosmanniac lavigera* (Riken et al, 2016) et *Candida sp.* (Boukail et Maazi, 2015), son substrat préféré est le maltose (Choi et al, 2013)

La maltase est une hydrolase glycolytique amylolytique permet l'obtention du Glucose provenant de l'extrémité non réductrice du substrat oligosaccharidique ou polysaccharide (Nawaz et al, 2015).

La Maltase est un biocatalyseur pour les réactions biochimiques internes. Elle est utilisée en biotechnologie pour catalyser des réactions biologiques. Dépolymérisation des macromolécules et leur synthèse spécifique et leur efficacité (Yapi et al, 2008). Chez l'homme, la maltase joue un rôle important dans diverses industries :

- **Industrie Alimentaire :** Oligosaccharides et monosaccharides alimentaires connaissent un développement important dû à sa capacité à favoriser la croissance des bactéries intestinales humaines ou animales, ils sont utilisés dans la préparation de beaucoup de nourriture (bonbons, chewing-gum, boissons, fromage) (Bombeck et al, 2016).

-**Industrie des détergents :** Les enzymes sont utilisées dans les produits de nettoyage pour éliminer les taches et décomposer les lipides et les protéines des aliments (Vanhanen et al, 2000) de nouvelles façons pour la protection de l'environnement et des allergènes sont additionnés aux détergents (Grbavčić et al, 2015).

2. Activités antimicrobiennes des levures

Les antibiotiques et les bactériocines ont été découverts dans la première moitié du XXe siècle, mais des principes équivalents n'ont pu être démontrés chez la levure que dans les années 1960 (Pommier, 2003). En 1963, Bevan et Makover ont observé pour la première fois que certaines souches de *Saccharomyces cerevisiae* pouvaient tuer d'autres levures de la même espèce (Bevan et Makover, 1963). Ils ont émis l'hypothèse que ces levures « tueuses » ou « killer » sécrétaient des toxines qui provoquaient la mort des souches sensibles, identifiant ainsi trois phénotypes de souches killer (tueuses).

-Killer(K): Cette souche résiste à la toxine qu'elle produit.

-Neutre(N): Cette souche ne produit pas de toxine et elle est résistante.

- Sensible(S): La souche ne produit pas de toxines et est sensible aux toxines.

Ce phénomène est appelé «killer» (**Izgu et al, 2004 ; Polonelli et Conti, 2009**) et il n'est pas limité au genre *Saccharomyces* mais se produit également chez d'autres levures (**Kurtzman, 1984 ; Polonelli et Morace, 1986 ; Schmitt et Breinig, 2002**). Les levures tueuses sont caractérisées par la production et la sécrétion de substances de nature protéique ou glycoprotéique dans le milieu (**Schmitt et Reiter, 2008**), appelées les toxines killer (**Wickner, 1986 ; Radler et Schmitt, 1987**) ; Ces substances possèdent des effets antifongiques et antibactériens (**Suzzi et al, 1995 ; Magliani et al, 1997**). Ces propriétés rendent ces substances potentiellement utiles dans le domaine de la protection et du traitement des infections pathogènes, en particulier contre la levure *Candida albicans* (**Walker et al, 1995**).

PARTIE 02 :
MATÉRIEL ET
MÉTHODES

Notre étude expérimentale a été réalisée au niveau des laboratoires SNV du Centre Universitaires Abdelhafid Boussouf Mila. Elle précise sur l'isolement et l'identification de quelques levures provenant des grignons d'olives, puis l'étude de leurs activités biologiques (propriétés enzymatiques et antimicrobiennes).

1. Échantillonnage

Les échantillons ont été prélevés et isolés à partir des effluents des moulins d'olive.

Les déchets d'olives (grignons d'olive) utilisés dans cette étude ont été obtenus en décembre 2022 à partir d'un moulin d'huile d'olive. Ce grignon est de type brut, provenant d'une huilerie algérienne située dans les régions Minar Zarreza et Lantiya wilaya de Mila et la région El Milia wilaya de Jijel (Nord Est de l'Algérie).

Après avoir sécher à l'ombre, ces échantillons sont recueillis aseptiquement dans des sachets stériles et transportés au laboratoire où l'analyse microbiologique a été effectuée (Figure 07).



Figure 7 : Grignon d'olive des deux wilayas

- **Grignon d'olive**

C'est un sous-produit obtenu lors de l'extraction de l'huile d'olive. Il contient la majeure partie de la matière sèche de l'olive et est principalement composé de l'exocarpe du fruit (peau), du mésocarpe (la pulpe de l'olive) et de l'endocarpe (coque et amande). En outre, il peut également contenir une certaine quantité d'eau végétale, qui à son tour contient les constituants hydrosolubles des olives. Celles-ci varient en fonction du système d'extraction (Figure 08) utilisé (Nefzaoui, 1987)

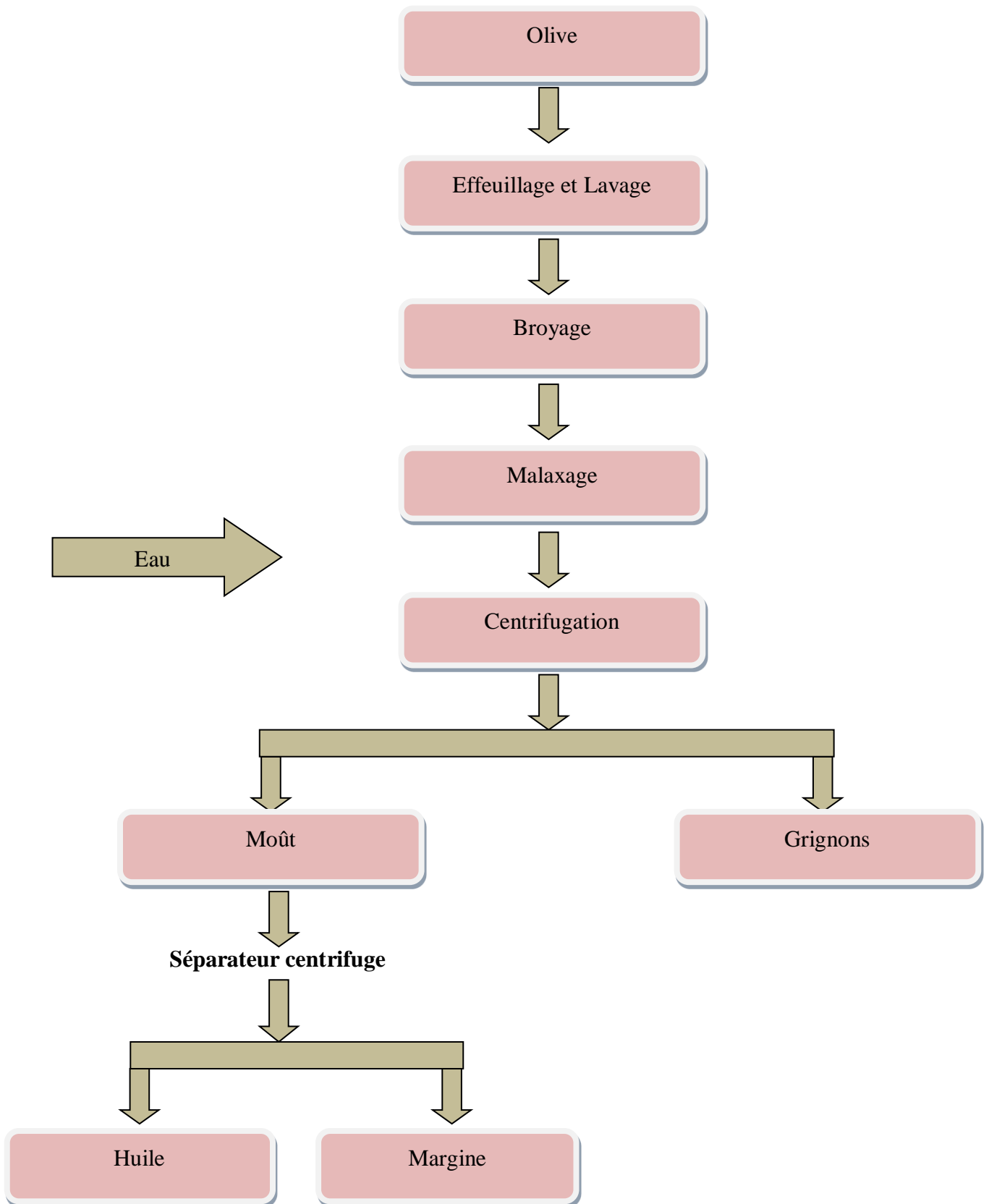


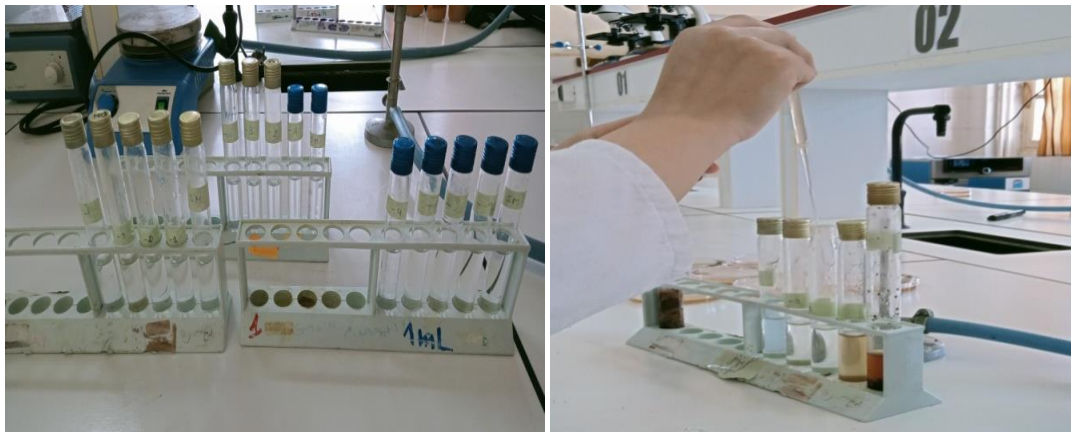
Figure 8 : Technique d'extraction du grignon d'olive (Sekour, 2012).

2. Isolement

Il a été réalisé par la méthode de suspension- dilutions (Davet et Rouxel, 1997)

2.1. Préparation des dilutions

La préparation des dilutions consiste, tout d'abord, à préparer la solution mère de chaque échantillon. Cette dernière a été préparée, en ajoutant 1g (de sol ou de grignon d'olive brute) dans 9 ml d'eau physiologique stérile, suivi, d'une agitation pendant 10 min. A partir de cette solution, des dilutions décimales ont été préparés par l'ajout successif de 1 ml de la solution à 9 ml d'eau physiologique stérile jusqu'à l'obtention de la dilution de 10^{-4} (Figure09).



(A)

(B)



(C)

Figure 9 : Les étapes de dilutions

2.2. Milieu d'isolement

Le milieu utilisé pour l'isolement des levures est le milieu YPGA (*Yeast extract Peptone Glucose*) additionné d'antibiotique après leur stérilisation pour inhiber la croissance des bactéries voir (Annexe 1).

2.3. Ensemencement

L'ensemencement a été fait en surface, par étalement de 0,1ml de chaque dilution avec un râteau (**Hammer et al, 1998**) sur le milieu d'isolement YPGA (Annexe 1). Les boîtes de Pétri ont été ensuite incubées à 30°C pendant 03 jours (Figure10).



(A)

(B)



(C)

Figure 10 : Ensemencement et incubation des boîtes de Pétri

2.4. Purification

La purification des isolats a été faite par stries d'épuisement sur milieu YPG agar (Annexe 1). L'incubation a été réalisée à 30°C pendant 72 h. Les aspects macroscopiques et microscopiques ont été ensuite examinés afin de vérifier la pureté de la souche.

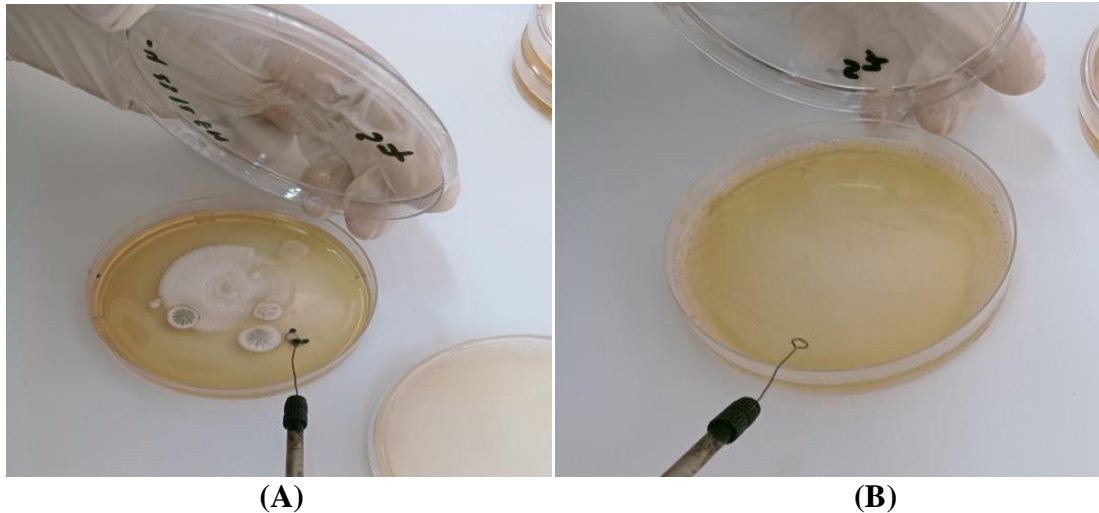


Figure 11 : Purification des levures

2.5. Conservation

Afin de conserver nos souches pour les prochains testes nous avons préparé des pré-cultures de chaque isolat dans le bouillon liquide (YPG), une fois les levures sont bien poussées on les ensemence dans des tubes à essais contenant le milieu YPGA (Annexe1) solide incliné, ce milieu contient le glucose comme seule source de carbone, cela peut réduire le risque de modification de mode de la croissance (**Scheda et al, 1966**). Les tubes sont ensuite stockés à une température de 4°C. Les cultures restent en vie dans un intervalle d'environ 4 mois.

3. Identification des levures

L'identification des levures isolées repose sur la détermination de différentes propriétés culturelles, morphologiques, physiologiques et biochimiques et biotechnologiques.

3.1. Etude des caractères cultureux

Dans un premier temps, les souches levuriennes ont été réactivées par ensemencement sur milieu YPGA (Annexe 1) et incubés à 30°C pendant 48h. Les colonies ont été observées pour décrire leur aspect (brillant ou terne, visqueux), leur forme (contour régulier ou irrégulier, convexe ou concave), leur couleur, etc.

3.2. Etude des Caractères morphologiques

3.2.1. L'aspect macroscopique

L'observation de l'aspect macroscopique de la colonie permet de donner une Caractérisation des isolats. Les identifiants macroscopiques sont ceux déclarés par **Guiraud (1998)** et **Joffine et Leyral (2006)** :

- Surface : lisse, rugueuse, sèche,
- Forme de la colonie : Ronde, irrégulière, régulière, ponctuée, etc.
- Taille de la colonie : En mesurant le diamètre
- Couleur de la colonie : rose, blanche etc.
- Hauteur: convexe, concave, plate, etc.
- Opacité : opaque, translucide, transparent, etc.

3.2.2. L'aspect microscopique

Cette étude a pour le but d'examiner la morphologie cellulaire telle que la forme et la taille des levures, et leur mode de reproduction végétative. L'examen a été réalisé à l'état frais sous microscope optique au grossissement x 40 et x 100 avec l'huile à immersion, les frottis ont été préparés à partir de colonies fraîches bien isolées sur milieu YPG agar (**Bourgeois et Leveau, 1980**).

3.2.3. Aptitude à la filamentation

Une exploration systématique de la capacité de filamentation a été observée à partir de cultures sur lames de verre. Pour cela, le milieu YPGA (Annexe1) a été placé sur une lame stérile dans une boîte de Pétri. Une fois le milieu durci, les levures à testés ont été ensemencées puis les lames ont été incubées dans des boîtes de Pétri modérément humidifiées avec de l'eau stérile pour éviter le dessèchement du milieu.

L'observation microscopique a été réalisée après 2-3 jours d'incubation (grossissement $\times 40$ ou $\times 100$). Par conséquent, les limites de la culture, sa formation de filaments ainsi que sa fréquence et sa ramification ont été observées et enregistrées.

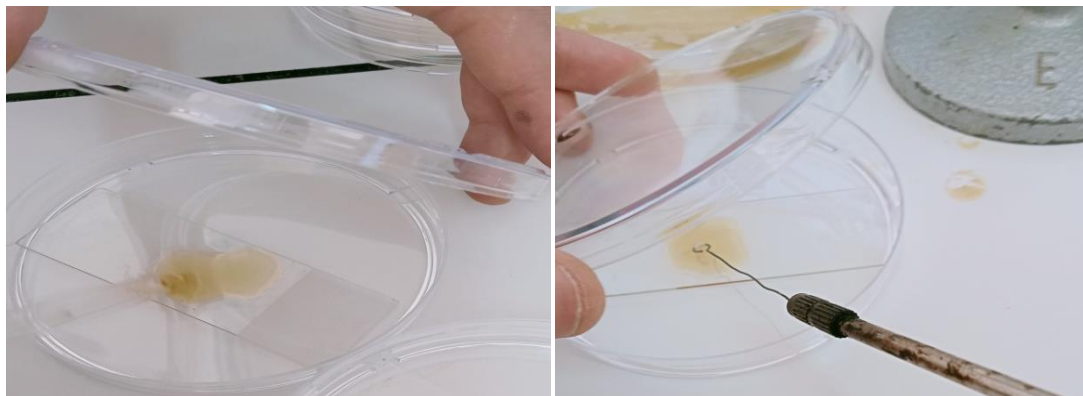


Figure 12 : Culture des levures sur lame microscopique

3.3. Etude des caractères biochimiques

➤ Assimilation de substrats azotés

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

➤ Fermentation des sucres

Les sucres testés sont : D-glucose, D-galactose, D-maltose et D-saccharose. La solution de base utilisée pour la fermentation des sucres est l'YWM (*Yeast Water Medium*) (Annexe 2) (0,5% d'extrait de levure dans l'eau). Le milieu a été réparti en tubes à essai, à raison de 9 ml par tube, et chaque tube reçoit une cloche de Durham. Les sucres à tester ont été mis séparément dans chaque tube, l'ensemble a été ensuite autoclavé à

120C°, pendant 20 min. Après refroidissement, les milieux ont été ensemencés et portés à l'incubation à 30°C pendant 72h à 3 semaines. Les tubes ont été examinés chaque jour pour voir le pourcentage de gaz dégagé dans la cloche (**Berber, 2013**).



Figure 13 : Test de fermentation des sucres

➤ **Test d'uréase**

L'activité uréase de levure a été mise en évidence dans le milieu Christensen (Annexe 02). L'uréase convertit l'urée en ammoniac, provoquant ainsi une augmentation du pH qui vire l'indicateur coloré. Une réaction est considérée positive se manifeste par une coloration rose vif à rouge du milieu après 3 à 7 jours d'incubation à 30°C.

3.4. Etude des caractères physiologiques

3.4.1. Résistance au NaCl

L'étude de l'osmophilie des levures a été réalisée sur milieu YPGA (Annexe 1) additionné de 1% NaCl. L'incubation a été faite pendant 3 à 7 jours à 30°C. La croissance des levures sur ce milieu est considérée comme un résultat positif.

3.4.2. Croissance à 37°C

Les levures ont été testées pour leur capacité à se développer à une température de 37 °C. Les souches ont été inoculées sur milieu YPGA (Annexe 1) et les boîtes de Pétri ont été incubées à 37°C pendant 5 jours. Une croissance significative qui se produit dans le milieu indique un résultat positif.

3.5. Etude des caractères biotechnologiques

3.5.1. Mise en évidence des activités enzymatiques

La production d'enzymes est déterminée qualitativement sur des milieux solides. Les enzymes testées sont : α -amylase, pectinase, laccase, lipase et maltase.

3.5.1.1. Détermination de l'activité α amylasique (dégradation de l'amidon)

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

Après 5 jours d'incubation à 30°C, les boîtes ont été inondées avec une solution de Lugol 1 (Annexe 4). L'apparition d'une zone claire autour de la colonie est considérée comme un résultat positif (les souches sont considérés comme producteurices d' α -amylase à l'inverse, les zones contenant de l'amidon se colorent en brun. Ainsi, les isolats présentant des zones claires d'hydrolyse

3.5.1.2. Détermination de l'activité de laccase

Le milieu utilisé pour la mise en évidence de cette activité est SGA (*Strache Glucose Agar*) (Annexe 3)

Après 5 jours d'incubation à 30°C la zone a été détectée directement sans utilisation de détecteur. La présence de l'enzyme laccase est reconnue par la formation d'un anneau jaune.

3.5.1.3. Détermination de l'activité de pectinase

Le milieu utilisé pour la mise en évidence de cette activité est l'YPPA (*Yeast Peptone Pectin Agar*).

Les souches pectinolytique ont été sélectionnées sur le milieu YPPA (*Yeast Peptone Pectin Agar*) (Annexe 3). Après incubation à 30°C pendant 3 à 5 jours, les boîtes ont été recouvertes par une solution lugol 2 (Annexe 4) et laissées à température ambiante pendant 20 minutes.

L'apparition d'un halo clair autour de la colonie indique une dégradation de la pectine (Bennamoun, 2017).

3.5.1.4. Mise en évidence de l'activité Maltasique

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

Afin de visualiser l'activité maltasique des souches repiquées, les boîtes ont été couvertes avec la solution de Rouge Congo (Annexe 04) à 1% pendant 20 minutes permettant au colorant de se fixer (Figure 14). L'excédent de colorant non fixé a été éliminé et remplacé par une solution de NaCl (5N) (Annexe 02) pendant 30 minutes. Finalement, le NaCl a été éliminé et les boîtes rincées délicatement à l'eau distillée.

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

3.5.1.5. Détermination de l'activité de lipase

Le milieu utilisé pour la mise en évidence de cette activité est : **TPA** (*Tween Peptone Agar*) (Annexe 3).

L'ensemencement a été fait par la méthode de stries à partir des cultures levuriennes jeunes. Les boîtes sont incubées à 30°C pendant 3 à 7 jours

La zone a été détectée directement sans utilisation de détecteur. La présence d'un halo clair autour des colonies indique une activité lipolytique.



Figure 14 : Solutions de révélation

3.5.2. Mise en évidence de l'activité antimicrobienne des levures

3.5.2.1. Mise en évidence de l'activité antibactérienne

3.5.2.1.1. Les Bactéries tests

Pour l'activité antibactérienne, l'extrait des quatre souches levuriennes isolées ont été testées vis à-vis cinq bactéries. Il s'agit des bactéries à Gram négatif *Escherichia coli* (ATCC 25922) ; *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), et des bactéries à Gram positif *Bacillus subtilis* (ATCC 10987); *Bacillus spizizini* (ATCC 6633) et *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923).

3.5.2.1.2. Réactivation des bactéries test

A partir du tube de conservation les cinq bactéries test ont été revivifiées dans des bouillons nutritifs. Une culture bactérienne jeune a été obtenue après incubation à 37°C pendant 24 heures.

3.5.2.1.3. Préparation de la solution levurienne

Les levures utilisées dans le test des activités antibactériennes sont les souches : S4, S7, S13 et S17.

Ces quatre souches levuriennes ont été cultivées dans le bouillon YPG (Annexe 5) pendant 48 h à 30 °C. Le Surnageant de culture (CS) a été obtenu par centrifugation à 6 000 g pendant 10 minutes.

3.5.2.1.4. Sélection des isolats producteurs de substances antibactériennes

Le test de l'activité antibactérienne des extraits obtenus consiste à rechercher leurs effets antagonistes sur le développement des espèces bactériennes. Avant de commencer le technique, des disques de 6 mm de diamètre ont été préparés à partir du papier Wattman N°1, et stérilisés. Les boîtes contenant le milieu Muller-Hinton (MH) ont étéensemencées par les bactéries à l'aide d'un écouvillon à partir d'une suspension bactérienne équivalente à 0.5 Mac Farland. Ensuite, les disques en papier ont été chargés par 20µl des différents surnageant de culture des quatre levures testées (CS) (Figure 15). Les boîtes ont été ensuite mises au réfrigérateur pendant 4h pour permettre la pré-diffusion des substances bioactives (Tortorano *et al*, 1979) ; puis incubées à 30°C et à 37°C pendant 24 heures, les zones d'inhibitions ont été mesurées.



(A)

(B)



(C)

Figure 15 : Réalisation de l'activité antibactérienne

3.5.2.2. Mise en évidence de l'activité antifongique

Les propriétés inhibitrices des surnageant de culture des quatre Souches de levure ont été évaluée par rapport à la levure *Candida albicans* (ATCC 10231)

Les surnageants de culture des levures sélectionnées obtenus, ont été testés pour leur activité antifongique contre la levure *Candida albicans* par la méthode des disques. Des boîtes Pétri contenant le milieu de culture sabouraud (Annexe 5), ont étéensemencées avec la levure *Candida albicans* par des stries à l'aide d'un écouvillon. Ensuite, des disques imprégnés avec 20ul des surnageant des levures testées ont été déposés sur les boîtesensemencées. Les boîtes ont été incubées à 30°C. Les zones d'inhibition ont été mesurées après 48 à 72h d'incubation.

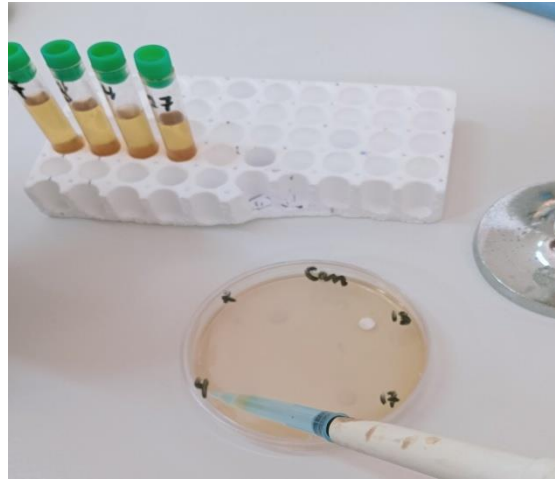


Figure 16 : Imprégnage des disques par l'inoculum de la levure *Candida albicans*

PARTIE 03 :
RÉSULTATS ET
DISCUSSION

Résultats



1. Isolement et purification des souches de levures

L'isolement des levures à partir de grignon d'olives de trois régions a permis l'obtention de dix-sept souches levuriennes. Ces souches ont donné une bonne croissance sur le milieu YPGA, après l'incubation à 30 °C pendant 2 à 7 jours (Tableau 07). Nous avons continué le travail avec seize souches car une souche a été contaminée par les moisissures.

Tableau 7 : Isolement des levures à partir de différents échantillons du grignon d'olive

Origine	Dilutions	Code de la Souche
Grignon d'olive Mila (Lantia)	10^{-2}	S12
	10^{-3}	S2, S8, S9, S10, S11
	10^{-4}	S6, S13, S14, S15, S16, S17
Grignon d'olive Mila (Minar Zarreza)	10^{-3}	S5
	10^{-4}	S3, S4, S7
Grignon d'olive Jijel (El Milia)	10^{-2}	S1

Nous remarquons que la plupart des souches ont été isolées à partir de grignons d'olive de la région de Mila (12 souches pour Lantia et 4 souches pour Minar zarreza) tandis qu'une seule souche a été isolée à partir de grignons d'olive de la région (El Milia) de Jijel (Figure 17).

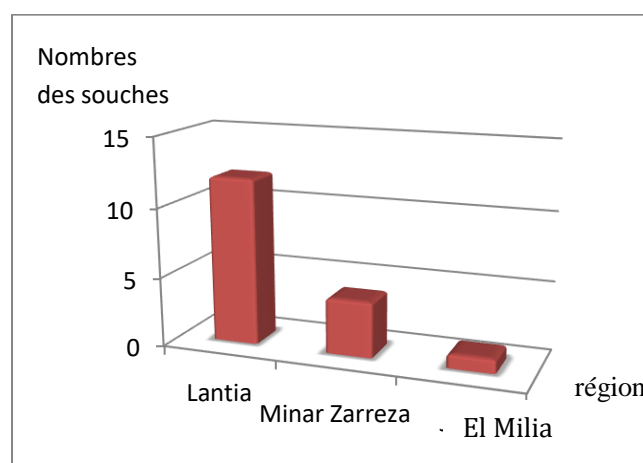


Figure 17 : Nombre de souches isolées à partir des trois échantillons

2. Identification des levures

Nous avons commencé notre étude par des cultures sur milieu solide pour déterminer l'aspect des cultures des souches, leur morphologie, leur couleur, l'organisation particulière des cellules (mode de reproduction qui peut se faire par scissiparité ou par bourgeonnement). Dans ce dernier cas, la disposition des bourgeons sur la cellule mère (formation de bourgeons unipolaires, bipolaires ou multipolaires) est remarquable.

2.1. Caractéristiques morphologiques

2.1.1. Etude macroscopique


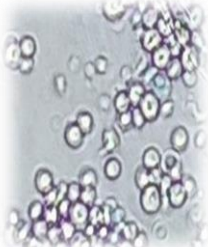
Des études macroscopiques de colonies de souches préalablement isolées nous ont permis de faire une présélection en fonction de leurs caractéristiques morphologiques telles que la forme, la couleur et l'aspect qui sont des paramètres importants dans la pré-identification des levures.


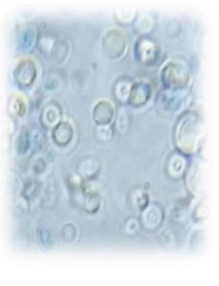


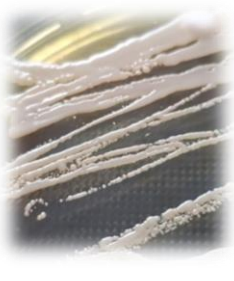


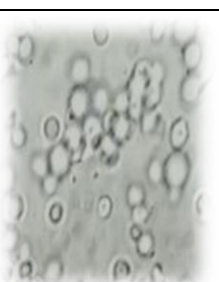

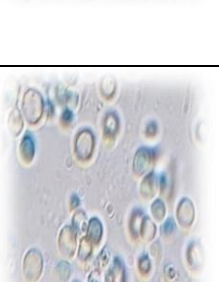


2.1.2. Etude microscopique




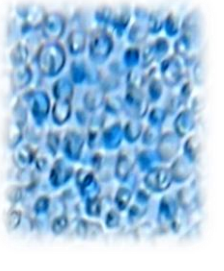

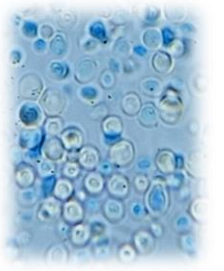

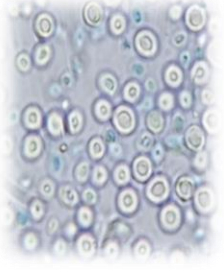

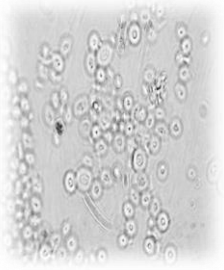

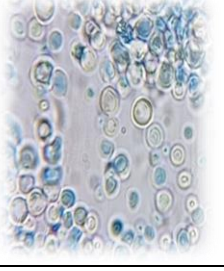
L'observation microscopique des lames réalisées avec des colonies de souches nous a permis de définir les formes suivantes : ovale, allongé, cylindrique... et le mode de reproduction : bourgeonnement (mono latéral, bi latéral ou multilatéral) ou scissiparité.


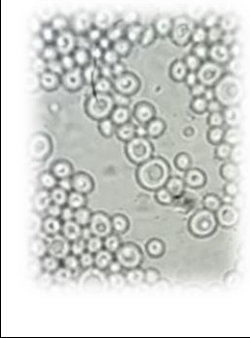

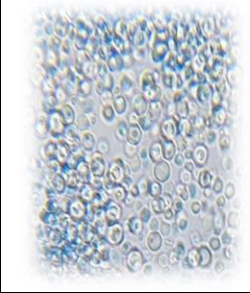

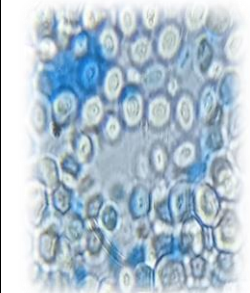
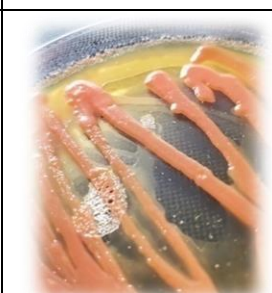
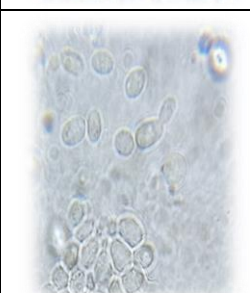
Le tableau 08 récapitule les principales caractéristiques macroscopiques et microscopiques des souches isolées

Tableau 8 : Caractères macro et microscopiques des souches de levures isolées après une culture de 02 jours à 30°C sur milieu YPGA.

Souche	Aspect macroscopique		Aspect microscopique	
	Critère	Image	Critère	Image
S ₁	<ul style="list-style-type: none"> -Forme : ronde -surface : granuleuse, brillante, bombée et crémeuse -couleur : cantaloup -taille : 2-2,5 mm 		<ul style="list-style-type: none"> -Forme: ronde petite et grande -Type de division : Bourgeonnement mono, bi et multilatéral 	

S ₂	<p>-Forme : ronde -surface : lisse, brillante, bombée et crémeuse -couleur : blanche - taille : 3-3,5 mm</p>		<p>- Forme : ronde petite et grande -Type de division : Siessiparité et Bourgeoisement mono,bi et Multilatéral</p>	
S ₃	<p>-Forme : ronde -surface : lisse, brillante, bombée et crémeuse -couleur : blanche -taille : 2-2,5 mm</p>		<p>- Forme : ronde et grande -Type de division : Bourgeoisement monolatéral</p>	
S ₄	<p>-Forme : ronde -surface : lisse, brillante, plate et crémeuse -couleur : blanche -taille : 0,5 - 1 mm</p>		<p>- Forme: ovoïdes allongées grande -Type de division : Bourgeoisement mono et multilatéral</p>	
S ₅	<p>-Forme : ronde -surface : lisse, brillante bombée et crémeuse -couleur : blanche -taille : 0,7- 1 mm</p>		<p>- Forme: ronde petite et grande -Type de division : Bourgeoisement mono,bi et multilatéral</p>	
S ₆	<p>-Forme : ronde -surface : granuleuse, matte, bombée et crémeuse -couleur : blanche -taille : 1,5- 2 mm</p>		<p>- Forme : ronde petite et grande -Type de division : Bourgeoisement mono et bilatéral</p>	
S ₇	<p>-Forme : ronde -surface : granuleuse, matte, bombé et crémeuse -couleur : blanche -taille : 2-2,5 mm</p>		<p>- Forme: ovoïdes allongées grande -Type de division : Siessiparité et Bourgeoisement multilatéral</p>	

S ₈	<p>-Forme : ronde -surface : lisse, brillante, bombée et crémeuse -couleur : cantaloup -taille : 1,5-2 mm</p>		<p>- Forme: ronde, petite et grande -Type de division : Bourgeoisement monolatéral</p>	
S ₉	<p>-Forme : ronde -surface : lisse, brillante, bombée et crémeuse -couleur : blanche -taille : 1-1,5 mm</p>		<p>- Forme : ronde petite et grande -Type de division : Sicciparité et Bourgeoisement monolatéral</p>	
S ₁₀	<p>-Forme : ronde -surface : lisse, brillante, bombé et crémeuse -couleur : crème -taille : 3,5- 4 mm</p>		<p>- Forme : ronde petite et grande -Type de division : Bourgeoisement mono,bi et multilatéral</p>	
S ₁₁	<p>-Forme : ronde -surface : lisse, brillante, Bombée et crémeuse -couleur : saumon claire -taille : 1,5 - 2 mm</p>		<p>- Forme : ronde petite et grande -Type de division : Bourgeoisement mono,bi et multilatéral</p>	
S ₁₂	<p>-Forme : ronde -surface : granuleuse, matte, Bombée et crémeuse -couleur : blanche -taille : 2- 2,5 mm</p>		<p>- Forme : Ronde, petite et grandes -Type de division : Bourgeoisement mono,bi et multilatéral</p>	
S ₁₃	<p>-Forme : ronde -surface : lisse, brillante, bombée et crémeuse -couleur : blanche -taille : 2- 2,5 mm</p>		<p>- Forme : ronde petite et grande -Type de division : Bourgeoisement mono,bi et multilatéral</p>	

S ₁₄	-Forme : ronde -surface : lisse, brillante, bombée et crémeuse -couleur : blanche -taille : 1-1,5 mm		- Forme : ronde petite et grande -Type de division : Bourgeoisement mono bi et multilatéral	
S ₁₅	-Forme : ronde -surface : lisse, brillante, bombée et crémeuse -couleur : blanche -taille : 0,5- 1 mm		- Forme : ronde petite et grande -Type de de division : Bourgeoisement mono, bi et multilatéral	
S ₁₆	-Forme : ronde -surface : granuleuse, brillante, plate et crémeuse -couleur : rose foncé -taille : 1,5- 2 mm		- Forme : ronde et grande -Type de de division : Bourgeoisement multilatéral	
S ₁₇	-Forme : ronde -surface : lisse, brillante, plate et crémeuse -couleur : corail -taille : 2- 2,5 mm		- Forme : ronde et grande -Type de division : Bourgeoisement mono et multilatéral	

➤ D'après les résultats de l'aspect macroscopique représenté dans le tableau :

-La taille des colonies levuriennes comprise entre 0,81 à 3,98mm.

- La plupart des souches possèdent en commun la forme ronde, couleur blanche, surface lisse, crémeuse, brillante et bombé.

Cependant, des différents aspects sont représentés par les souches :

- ✓ **S1** et **S16** : forment des colonies granuleuses avec des couleurs différentes (cantaloup et rose foncé respectivement)

- ✓ **S4** et **S17** : forment des colonies plates mais avec des couleurs différentes (blanche et corail respectivement).
- ✓ **S6**, **S7** et **S12** forment des colonies mattes et granuleuses.
- ✓ **S8**, **S10** et **S11** forment des colonies qui se diffèrent seulement dans la couleur (cantaloup, crème et saumon claire respectivement)

Globalement les souches qui présentent des caractéristiques macroscopiques similaires, possèdent des caractéristiques microscopiques similaires. Les cellules présentant des formes arrondies à ovales sont immobiles (Tableau 09).

Le mode de reproduction constaté chez les souches isolées est le bourgeonnement (Mono, bi ou multilatéral).



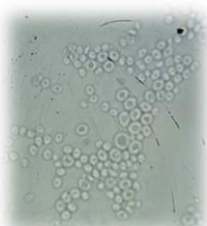
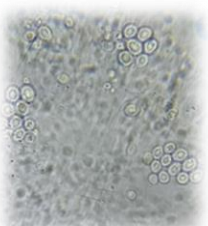
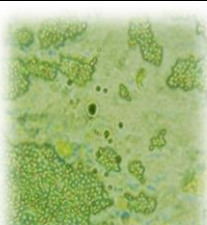
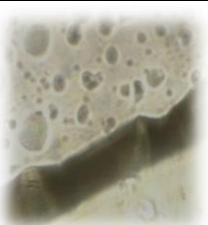
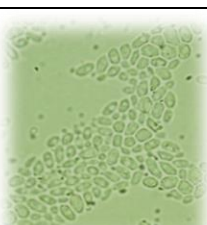
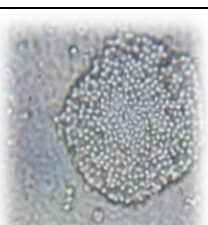
Tableau 9 : Caractéristiques microscopiques des souches levuriennes obtenues.

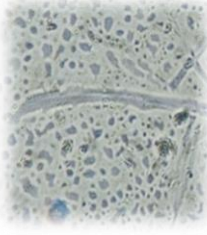
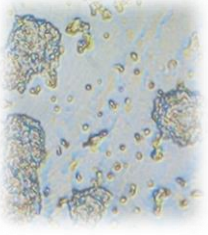
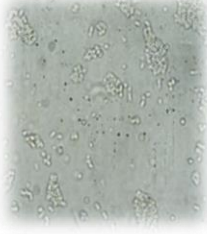

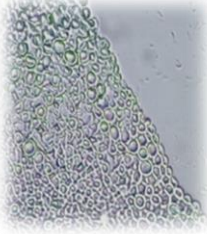
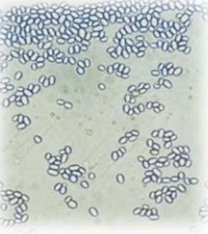
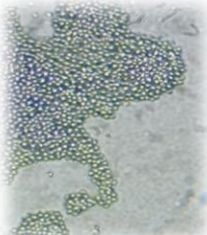
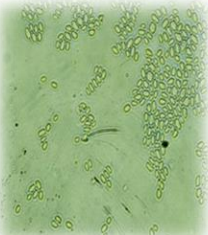
Forme	Souche
-Ronde	S1, S2, S3, S5, S6, S8, S9, S10, S11, S12, S13, S14, S15, S16 et S17.
-Ovale à allongé	S4 et S7
Taille	Souche
-Grande	3, 4, 7,16 et 17
-Petites et grandes	1, 2, 5, 6, 8, 9, 10, 11,12, 13, 14 et 15
Division	Souche
-Bourgeonnement mono,bi et multilatéral	1, 5, 10, 11, 12, 13,14 et 15
-Bourgeonnement mono et bilatéral	6
-Bourgeonnement mono et multilatéral	4, 17
-Bourgeonnement multilatéral	16.
Bourgeonnement monolatéral	3 et 8.
Sicssiparité et Bourgeonnement mono,bi et multilatéral	2
Sicssiparité et Bourgeonnement multilatéral	7
Sicssiparité et Bourgeonnement monolatéral	9

2.1.3. Test de filamentation

Les levures ont un appareil végétatif réduit à une seule cellule. Dans certaines conditions de culture, ces cellules s'arrangent en files, mimant le mycélium des champignons. Il y a une apparition des filaments mycéliens ou pseudo mycélien chez Certaines levures. On constate aussi l'absence de mycélium chez d'autres souches (Tableau 10).

Tableau 10 : Observation microscopique de la filamentation levuriennes.

Code des souches	Présence de Filamentaion	Aspect microscopique (grossissement x 40et\ou x 100)	Code des souches	Présence de Filamentaion	Aspect microscopique (grossissement x40 et\ou x 100)
S1	-		S10	+	
S2	-		S11	-	
S3	-		S12	-	
S4	-		S13	-	

S6	+		S14	-	
S7	-		S15	+	
S8	-		S16	-	
S9	-		S17	-	

(+) : présence ; (-): absence)

Le test de filamentation sur le milieu YPGA révèle la présence des filaments chez les souches S6, S15 et S10 alors que on note l'absence des filaments chez les autres souches.

2.2. Caractéristiques biochimiques

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

Les tests physiologiques permettent de bien nous orienter vers une identification plus précise des souches levurières isolées. Les tests réalisés sont : fermentation des sucres, assimilation des substrats azotés et le test d'uréase.

2.2.1. Assimilation des substrats azotés

Tous les résultats d'assimilation de divers substrats azotés sont résumés dans le tableau 11. Les résultats positifs correspondent à la formation de colonies autour de certains disques.

Tableau 11 : Résultat du test d'assimilation des substrats azotés par les isolats de levures

Substrats azotés	Code de la souche																
	S ₁	S ₂	S ₃	S ₄	S ₆	S ₇	S ₈	S ₉	S ₁₀	S ₁₁	S ₁₂	S ₁₃	S ₁₄	S ₁₅	S ₁₆	S ₁₇	
Alanine	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
A. glutamique	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
A. Aspartique	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
tryptophane	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

(+) : présence ;(-): absence).

D'après les résultats présentés dans le tableau 11, il ressort que les souches isolées sont incapables d'assimiler les substrats azotés testés.

2.2.2. Fermentation des sucres

Un test de fermentation est considéré comme positif lorsque le gaz reflète dans la cloche et donc : la cloche flotte, les bulles d'air se forment dans le tube (Figure 18).

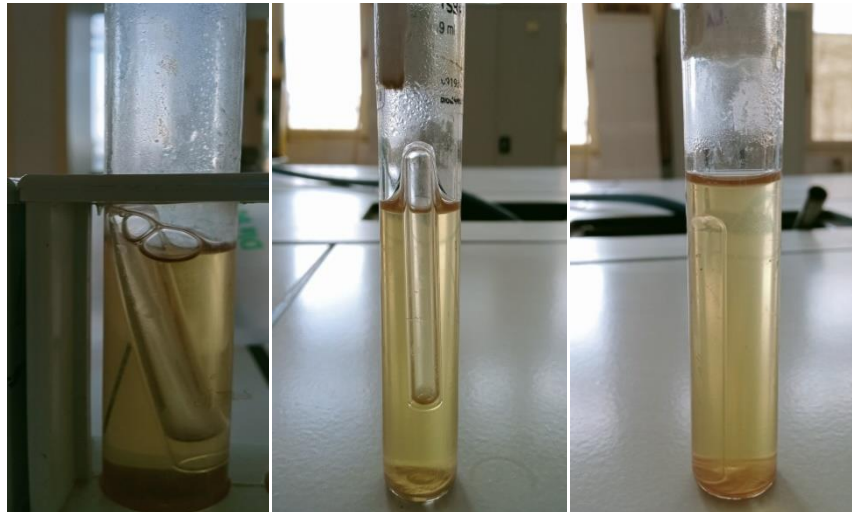
Les résultats de la fermentation des sucres sont regroupés dans le tableau 12.

Tableau 12 : Résultats du test de fermentation des différents sucres par les isolats de levures

Fermentation des sucres	S ₁	S ₂	S ₃	S ₄	S ₆	S ₇	S ₈	S ₉	S ₁₀	S ₁₁	S ₁₂	S ₁₃	S ₁₄	S ₁₅	S ₁₆	S ₁₇

Galactose	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-
Lactose	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Glucose	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-
Saccharose	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-

(+ : Bonne fermentation ; ++ : très bonne fermentation ; -: absence de fermentation).



(++)

(+)

(-)

Figure 18 : Test de fermentation des sucres





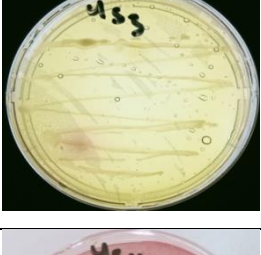
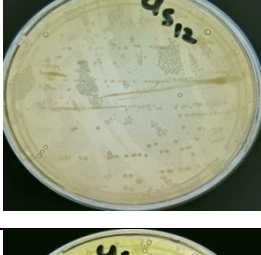
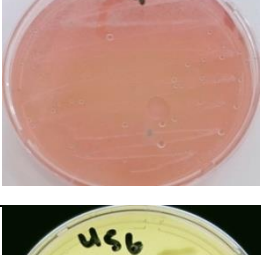

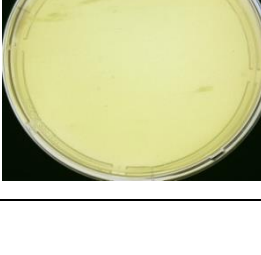

De ce tableau, il ressort que (après 5 jours d'incubation):





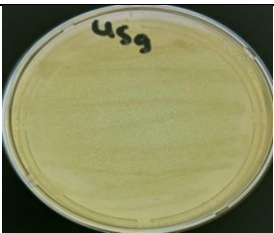

- Les souches S15 et S7 sont capables de fermenter : le galactose, le lactose et le glucose et incapables de fermenter le saccharose.
- Les souches S8, S12, S16 et S17 sont incapables de fermenter tous les sucres.
- Les souches S1 et S14 fermentent uniquement le galactose et S2 fermente uniquement le glucose.
- Les souches S4 et S13 fermentent uniquement le galactose et le glucose
- Les souches S3 et S4 sont les seuls qui forment des bulles d'air dans le tube avec flotteur de la cloche lors de fermentation de glucose et S11 lors de fermentation de saccharose

2.2.3. Test de l'uréase

Après l'incubation des souches sur le milieu Christensen (Figure 23), pendant 3 à 7 jours à 30°C, les résultats sont mentionnés dans le tableau 13.

Tableau 13 : Résultats du test d'uréase.

Souche	Test	Photo	Souche	Test	Photo
S1	+		S10	+	
S2	-		S11	-	
S3	-		S12	-	
S4	+		S13	-	
S6	-		S14	-	

S7	-		S15	-	
S8	+		S16	+	
S9	-		S17	+	

L'étude a montré que six souches sont productrices de cette enzyme et après des révélations une coloration rose vif à rouge se traduit par la décomposition de l'urée par les souches S1, S4, S8, S10, S16, et S17 en le transformant en ammoniac ou/et en carbonate d'ammonium, cet indicateur coloré est dû à une alcalinisation du milieu. Tandis que les autres souches, ne peuvent pas dégrader l'urée d'où le résultat est négatif, et aucune dégradation de couleur a été remarquée. Elles sont réparties selon l'origine comme suit : 66.6% de région de Lantia, 16.7% de Minar Zarreza et 16.7% de Jijel (figure 19).

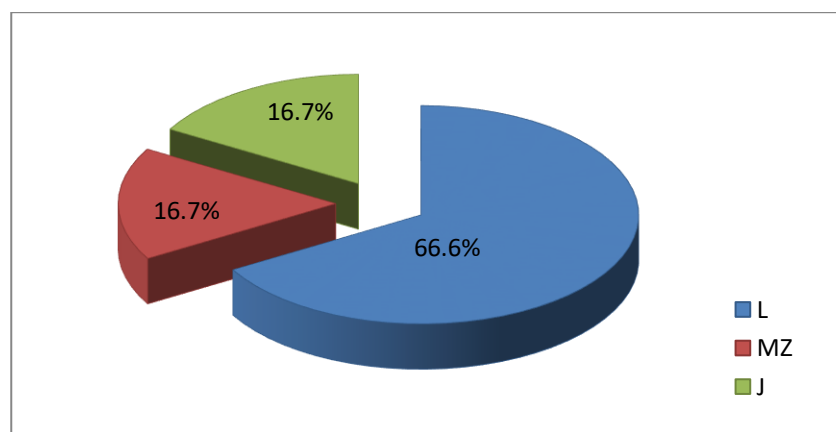


Figure 19 : Pourcentage de production de l'uréase par les isolats des trois régions

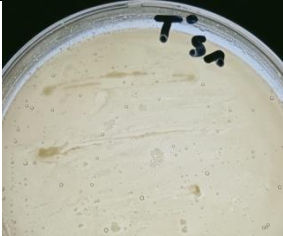

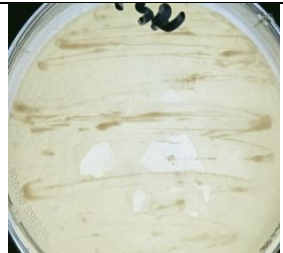





2.3. Caractéristiques physiologiques









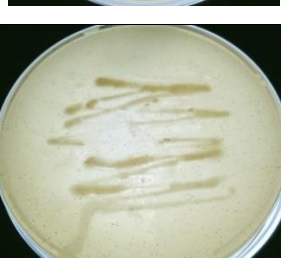
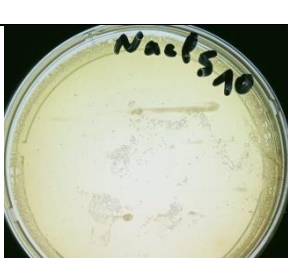

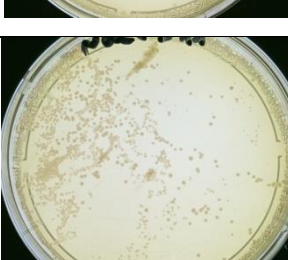
2.3.1. Croissance à 37°C et Résistance au Na Cl













Pour la croissance à 37°C les souches ont été cultivées sur milieu YPGA à une température de 37°C pendant 3 à 7 jours.

Pour la résistance au Na Cl, L'incubation a été faite pendant 3 à 7 jours à 30°C sur le milieu YPGA additionné avec 1% de Na Cl. Les résultats sont présentés dans le tableau 14.

Tableau 14 : Résultats de croissance des souches à 37°C et résistance au Na Cl

Souche	T (37C°)	Photo	Na Cl	Photo
S1	-		+	
S2	-		+	
S3	-		+	
S4	-		+	

S6	+		-	
S7	-		+	
S8	-		+	
S9	+		+	
S10	+		-	
S11	+		+	

S12	+		-	
S13	+		+	
S14	-		-	
S15	+		-	
S16	+		+	
S17	+		+	

(+) test positif, (-) test négatif

Pour le test de la Croissance des souches à 37°C, neuf souches ont été réussies à croître sous cette température (S6, S9, S10, S11, S12, S13, S15, S16, S17) et les autres (S1, S2, S3, S4, S7, S8, S14) n'ont pas pu se développer (Figure 20)

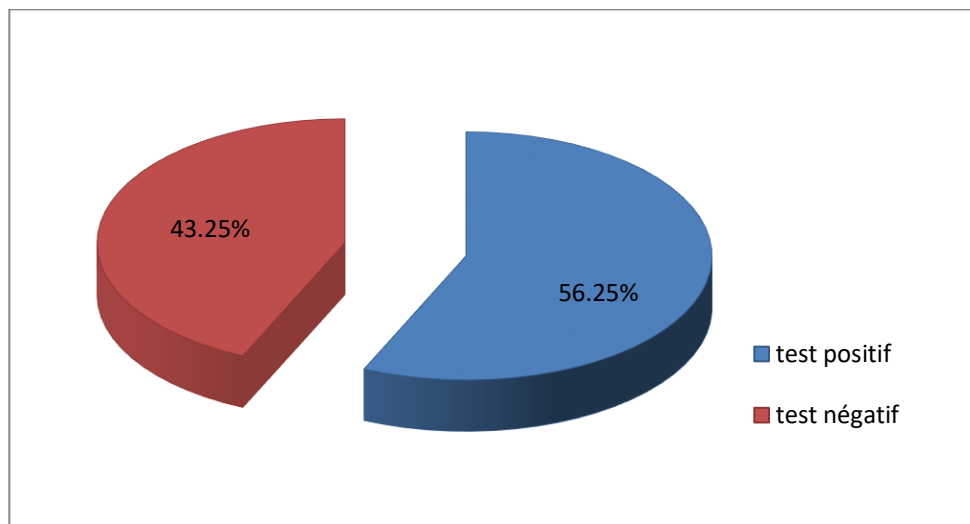


Figure 20 : Pourcentage de la croissance des souches levuriennes à 37°C

Pour la résistance au NaCl, les cinq souches (S6, S10, S12, S14, S15) n'ont pas pu se développer avec 1% de la concentration d'NaCl, onze souches (S1, S2, S3, S4, S7, S8, S9, S11, S13, S16, S17) ont été réussies à résister au NaCl (Figure 21)

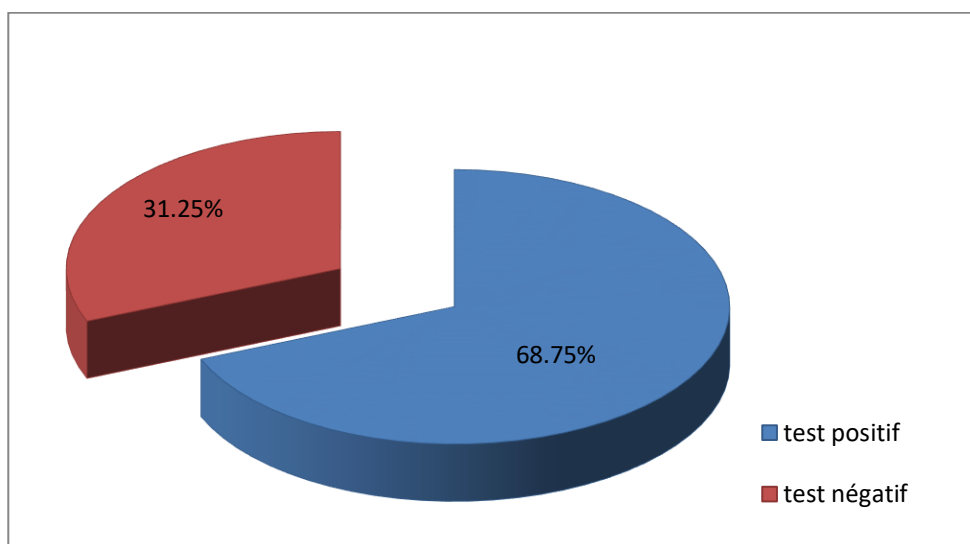


Figure 21 : Pourcentage de souches résistantes au NaCl

2.4. Caractéristiques biotechnologiques

2.4.1. Mise en évidence des activités enzymatiques

16 souches de levure ont été isolées de grignon d'olive, sur la base de leurs potentialités à produire, la lipase, l' α -amylase, la maltase, la pectinase et la laccase. Les levures ont été cultivées sur des milieux solides et spécifiques (appropriés pour chaque enzyme) et incubées à 30°C pendant 5 jours.

Après observation et révélation, les résultats sont rapportés dans le tableau 15 et les figures (annexe6).

Tableau 15 : Mise en évidence des activités enzymatiques des 16 souches de levures

Souches	Lipase	Amylase	Maltase	Laccase	Pectinase
S1	+	+	+	-	+
S2	+	+	+	+	-
S3	+	-	-	-	-
S4	+	+	+	+	+
S6	+	+	+	+	-
S7	+	+	+	+	+
S8	+	+	+	-	+
S9	-	-	-	-	-
S10	-	+	-	-	-
S11	+	+	+	-	-
S12	-	+	+	-	+
S13	+	+	+	+	+
S14	+	-	+	+	-
S15	-	+	+	+	-
S16	+	-	+	+	-
S17	+	+	+	+	-

(+ :Test positif, - :Test négatif)

D'après le tableau : 75% des levures isolées ont été productrices de lipase, 75% de l' α -amylase, 81.25% de la maltase, 56.25% de la laccase et 37.5% de la pectinase. Les capacités des différentes souches sélectionnées à produire ces principales enzymes, ont ensuite été évaluées.

D'après notre étude, les différentes souches sélectionnées ont montré une grande capacité d'activité enzymatique à savoir :

- **Lipase** : l'étude a montré que 12 souches sont productrices de cette enzyme, elles montrent après révélation l'apparition d'une zone claire autour des colonies (Annexe 6). Elles sont réparties selon l'origine comme suit : 66.6% de la région de Lantia, 25% de Minar Zarreza et 8.33% de Jijel (Figure 22 et 23).

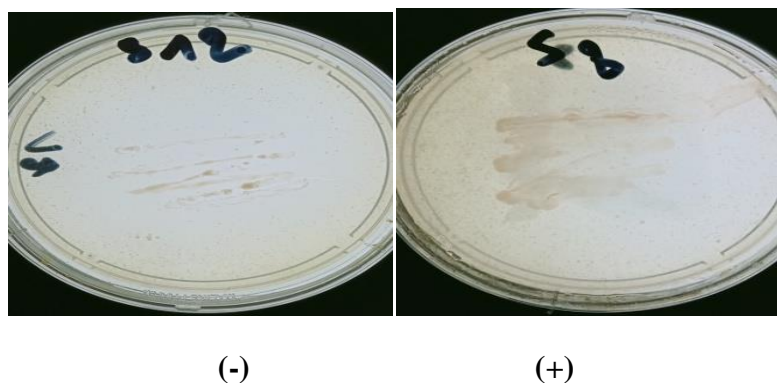


Figure 22 : Mise en évidence de la lipase

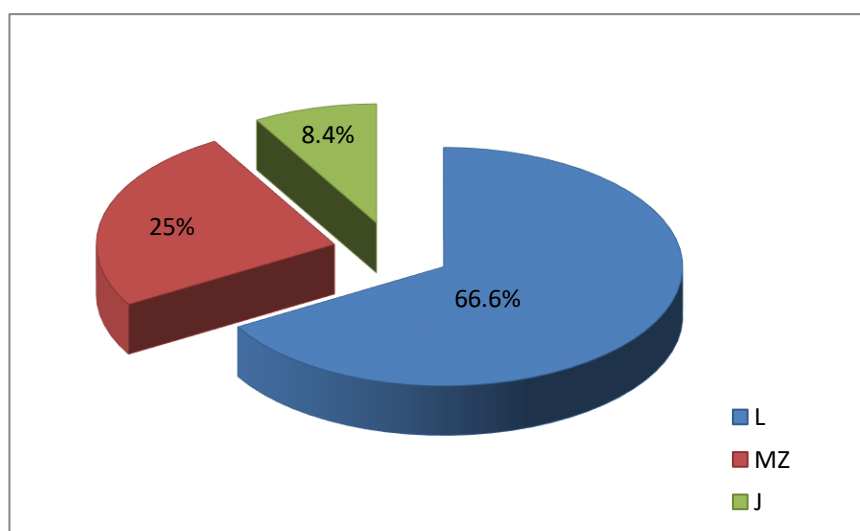


Figure 23 : Pourcentage de production de lipase par les levures isolées des trois régions

- **α -amylase** : l'étude a montré que 12 souches sont productrices de cette enzyme, elles montrent après révélation avec lugol des zones claires (annexe 6). Elles sont réparties selon l'origine comme suit : 75% de région de Lantia, 16.6% de Minar Zarreza et 8.4% de Jijel (Figure 24 et 25).

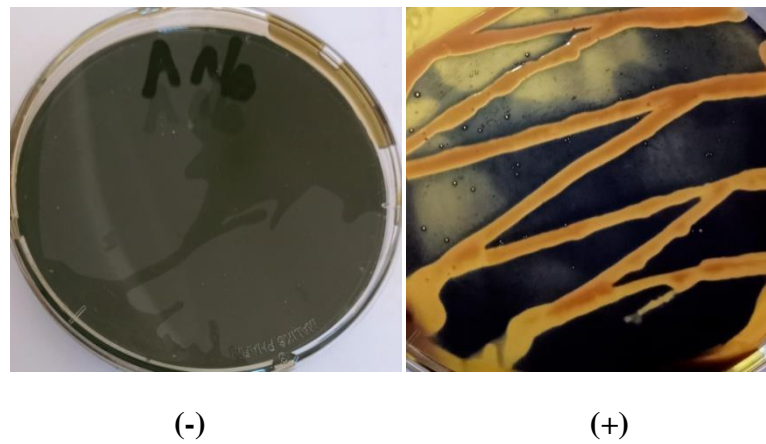


Figure 24 : Mise en évidence de α -amylase

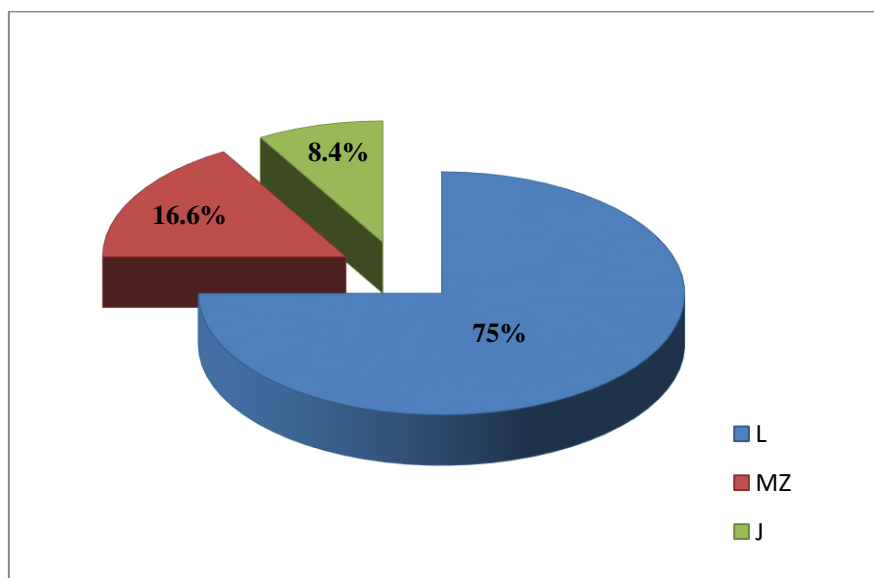


Figure 25 : Pourcentage de production de α -amylase par les levures isolées des trois régions

- **Maltase** : l'étude a montré que 13 souches sont productrices de cette enzyme et après révélation avec rouge Congo, elles montrent des zones claires de forme d'anneau (annexe 6). Elles sont réparties selon l'origine comme suit : 77% de région de Lantia, 15.4% de Minar Zarreza et 7.6% de Jijel (figure26 et 27).

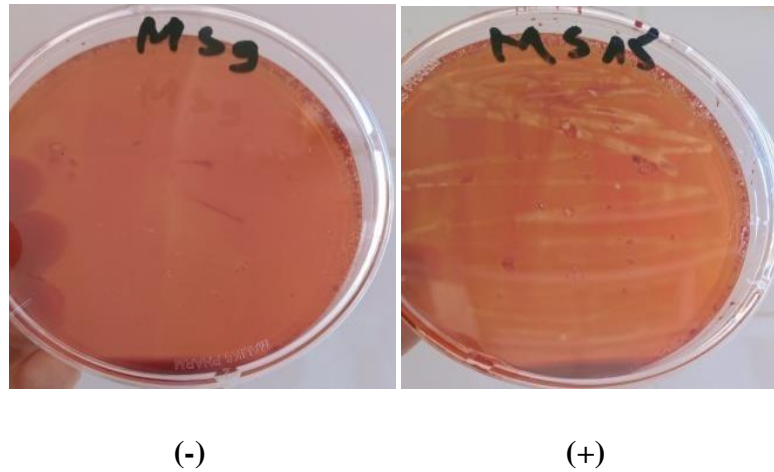


Figure 26 : Mise en évidence de la maltase

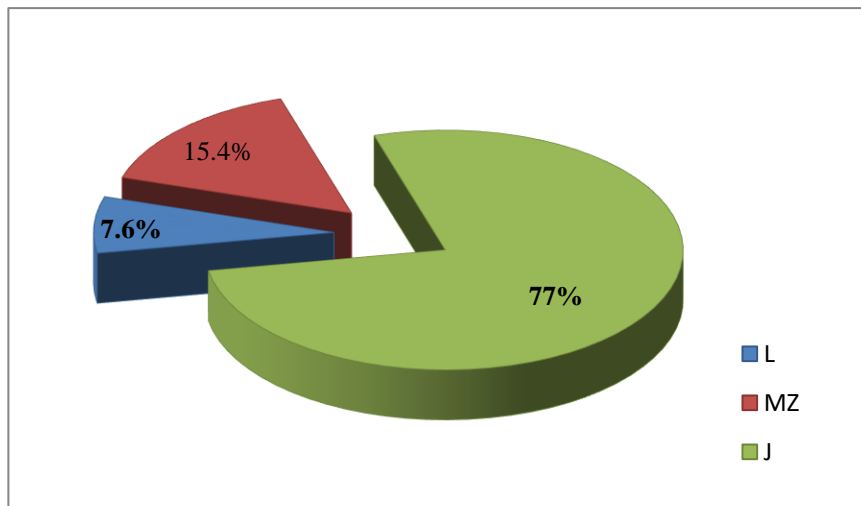
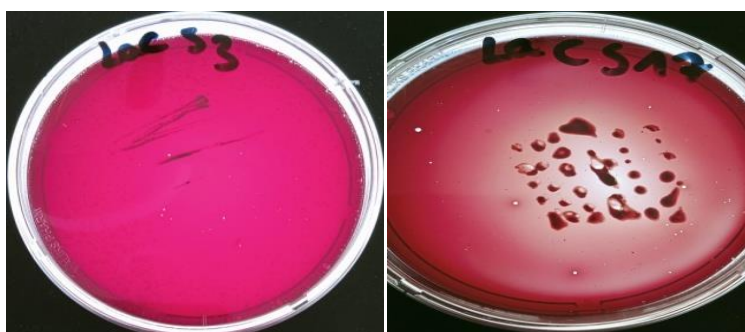


Figure 27 : Pourcentage de production de maltase par les levures isolées des trois régions

- **Laccase:** l'étude a montré que 9 souches sont productrices de cette enzyme, après la révélation un anneau jaune a été formé (annexe 6). Elles sont réparties selon l'origine comme suit : 77.8% de région de Lantia, 22.2% de Minar Zarreza et 0% de Jijel (figure 28 et 29).



(-)

(+)

Figure 28 : Mise en évidence de la laccase

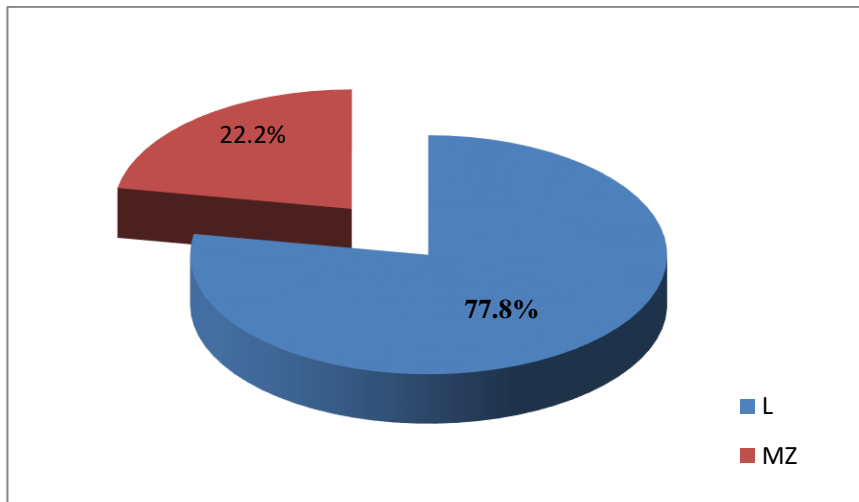


Figure 29 : Pourcentage de production de laccase par les levures isolées des trois régions

- **Pectinase** : l'étude a montré que 6 souches sont productrices de cette enzyme et après révélation des zones claires ont été apparues (Annexe 6). Elles sont réparties selon l'origine comme suit : 50% de région de Lantia, 33.3% de Minar Zarreza et 16.7% de Jijel (Figure 30 et 31).



(-)

(+)

Figure 30 : Mise en évidence de la pectinase

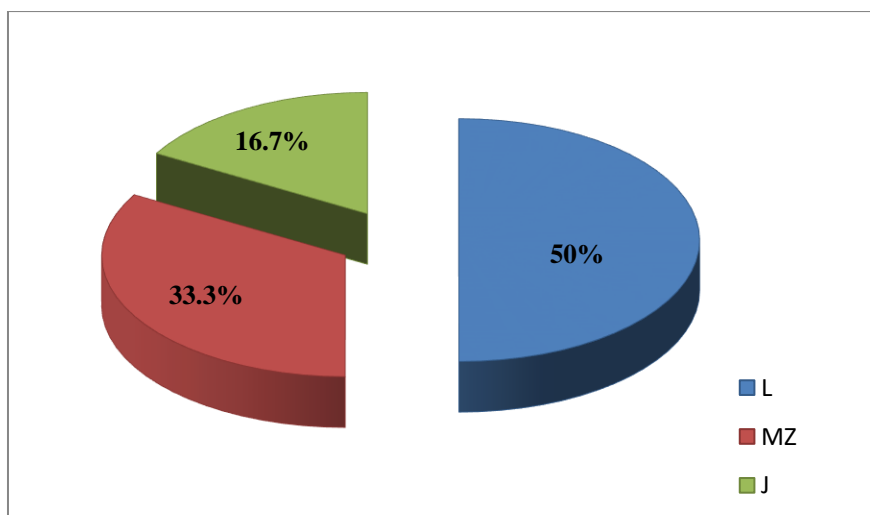


Figure 31 : Pourcentage de production de la pectinase par les levures isolées des trois régions

➤ **Sélection des souches les plus performantes pour la production d'enzymes**

Nous avons soigneusement sélectionné 4 souches qui représentent une grande capacité de production d'enzymes : S4, S7, S13 et S17 (tableau 16).

Tableau 16 : Les souches les plus performantes pour la production d'enzymes

Code des Souches	Performance enzymatique
S4, S7, S13	Capable de produire toutes les enzymes : lipase, α -amylase, maltase, laccase et pectinase
S17	Présente 04 activités enzymatiques : lipase, α -amylase, maltase et laccase

2.4.2. Activité antimicrobienne

L'activité antimicrobienne des levures a été estimée en termes de diamètre de la zone d'inhibition autour des disques contenant les solutions leuvuriennes à tester utilisé en tant que source de composés inhibiteurs vis-à-vis six (06) germes pathogènes dont Cinq (05) bactéries Gram négatif *Escherichia coli* (ATCC 25922) ; *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) , et des bactéries à Gram positif *Bacillus subtilis* (ATCC 10987) ; *Bacillus spizizini* (ATCC 6633) et *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) et une levure *Candida albicans* (ATCC 10231)

D'après les résultats de l'activité enzymatique ; nous avons sélectionnés 4 souches levuriennes (4, 7, 13,17) qui sont capables de produire toutes les enzymes recherchées pour tester leurs activités antimicrobiennes.

Après incubation des cultures microbiennes à 30°C pour l'activité antifongique et à 37°C pour l'activité antibactérienne, les résultats sont représentés dans les figures 33 et 34.



Figure 32 : Activité anti fongique des souches levuriennes par la technique des disques après incubation à 30°C.

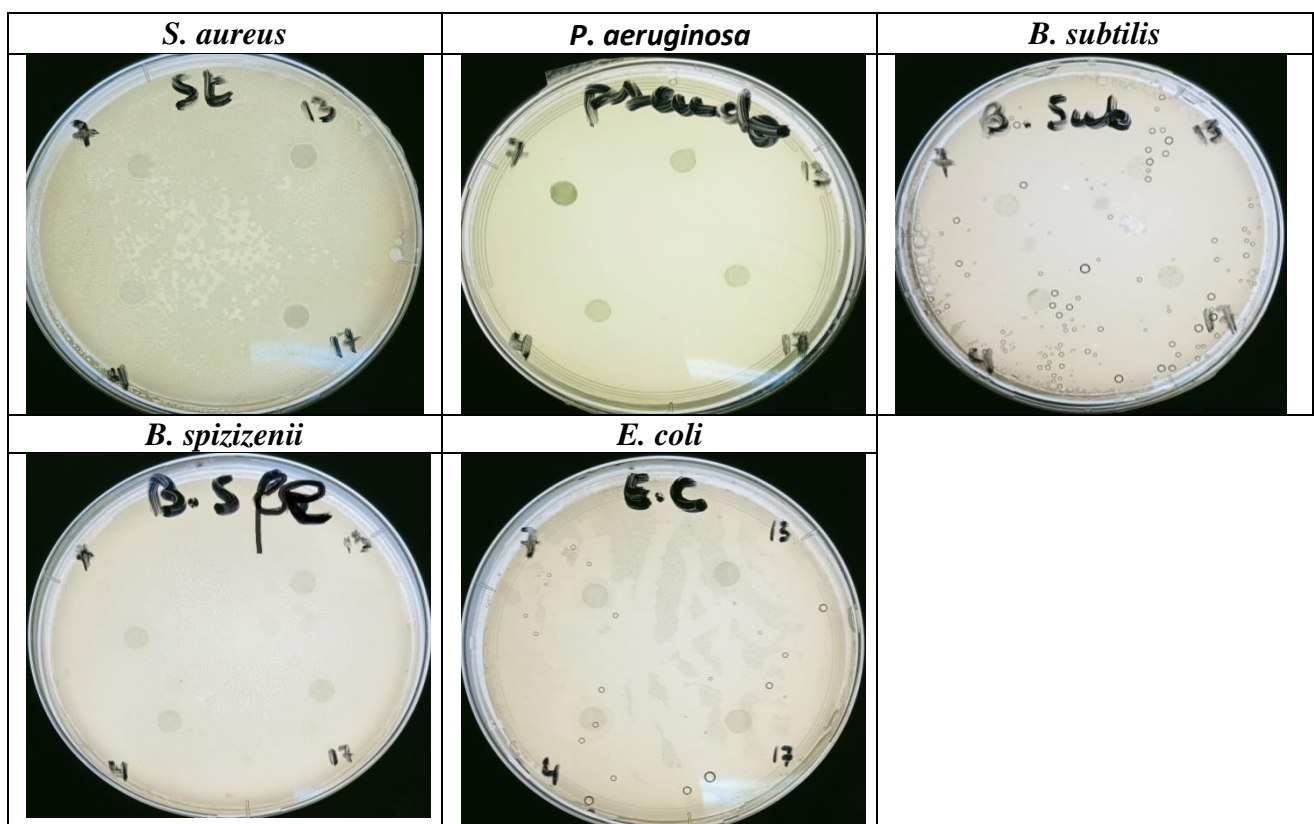


Figure 33 : Activités antibactériennes des souches levuriennes par la technique des disques après incubation à 37°C

Les zones d'inhibition autour des disques, ont été mesurées aussi et mentionnées dans les tableaux 17 et 18.

Tableau 17 : Tableau illustratif de l'activité antifongique des souches levuriennes contre la levure *Candida albicans* après incubation à 30°C.

Activité antifongique	
levure	<i>Candida albicans</i>
Souches	
S4	—
S7	—
S13	—
S17	—

Toutes les levures ne possèdent pas un effet inhibiteur contre la levure *Candida albicans* (aucune zone d'inhibition n'a été marquée) donc ne présentent pas une activité antifongique.

Tableau 18 : Tableau illustratif de l'activité antimicrobienne des levures avec mesures du diamètre d'inhibition après incubation à 37°C.

Tests	Activité antibactérienne				
Bactéries	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S.aureus</i>	<i>B.subtilis</i>	<i>B.spizizenii</i>	<i>E.coli</i>
S ₄	—	—	—	+11,70 mm	+11,27 mm
S ₇	+9,03mm	—	—	+13,37 mm	+10,60 mm
S ₁₃	+10,10mm	+9,86mm	—	+10,85 mm	+12,83mm
S ₁₇	—	—	+8,72 mm	+8,04mm	+12,59mm

(-) test négatif (+) test positif

L'effet antibactérien de chaque levure a été représenté dans les graphes suivants (Figures 34, 35, 36et 37) :

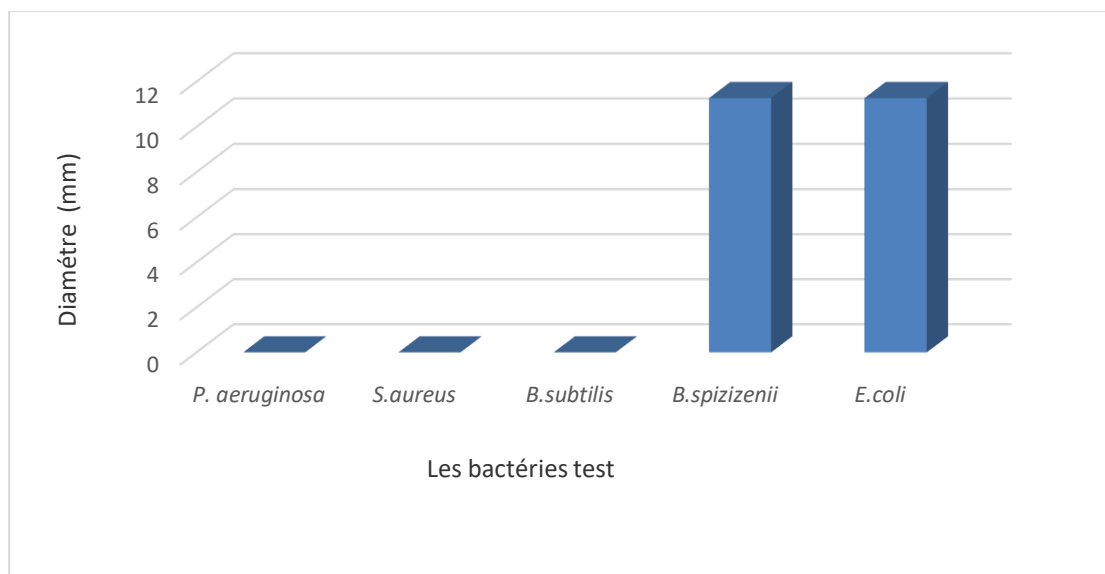


Figure 34 : Mise en évidence de l'activité antibactérienne de la levure S4.

La souche S4 : Après 24h d'incubation, nous avons observé l'apparition d'une zone claire autour des disques imbibés par l'extrait bioactif de la souche 4, dont le diamètre de la zone d'inhibition diffère selon les bactéries utilisés dans le test.

La plus grande zone d'inhibition marquée par cette souche est de 11,70mm contre la *B.spizizenii* suivi par un diamètre de 11,27mm contre *E.coli*. Par contre aucune zone n'a été marqué contre les 3 bactéries qui restent (*P.aeruginosa* , *S. aureus* et *B. subtilis*).

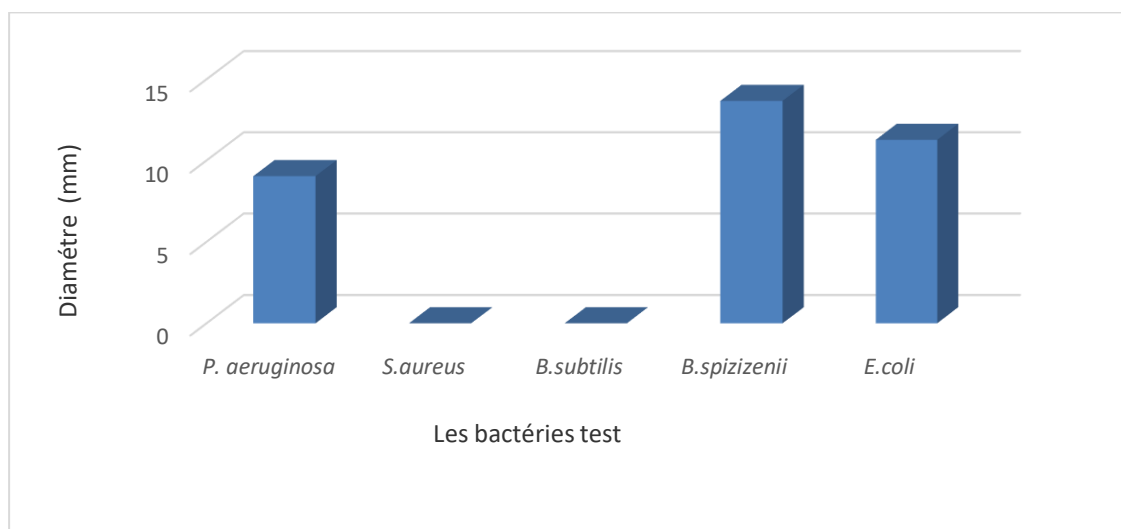


Figure 35 : Mise en évidence de l'activité antibactérienne de la Levure S7.

La souche S7 : D'après les résultats mentionnés dans la figure 36, le plus grand diamètre marqué par cette souche est dans le cas de *B. spizizenii* (13,37mm) suivi par *E.coli* (10,60mm) et dernièrement *P. aeruginosa* (9,03mm). Aucun effet n'a été observé avec *S. aureus* et *B. subtilis*.

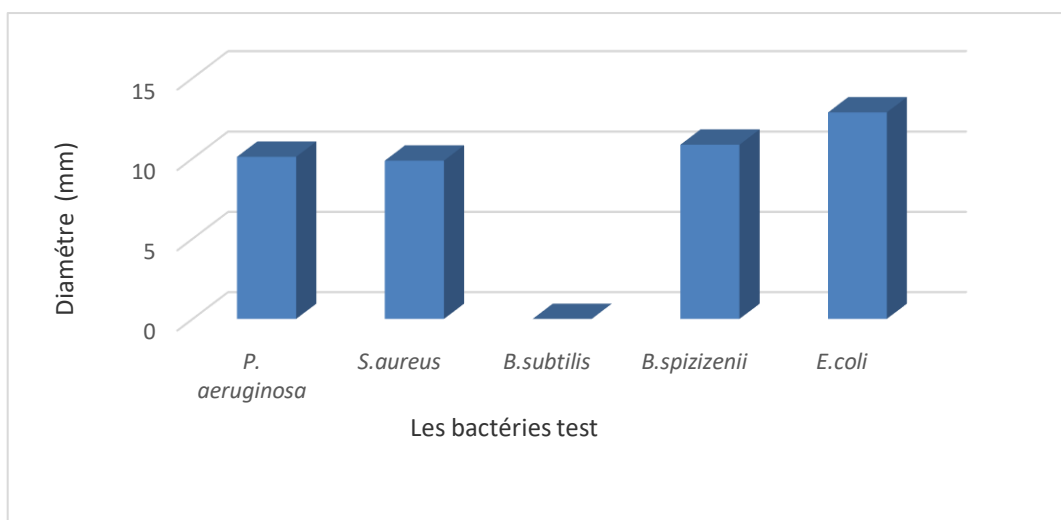


Figure 36 : Mise en évidence de l'activité antibactérienne de la souche S13

La souche S13 : La plus grande activité a été enregistrée vis-à-vis *E. coli* par une zone d'inhibition de 12,83mm. Elle présente aussi un pouvoir antibactérien avec une zone d'inhibition de 10,85mm vis-à-vis *B. spizizenii* ; 10,10mm contre *P. aeruginosa* et dernièrement un diamètre de 9,86mm contre *S. aureus*. Par contre elle ne présente aucun effet contre *B. subtilis*.

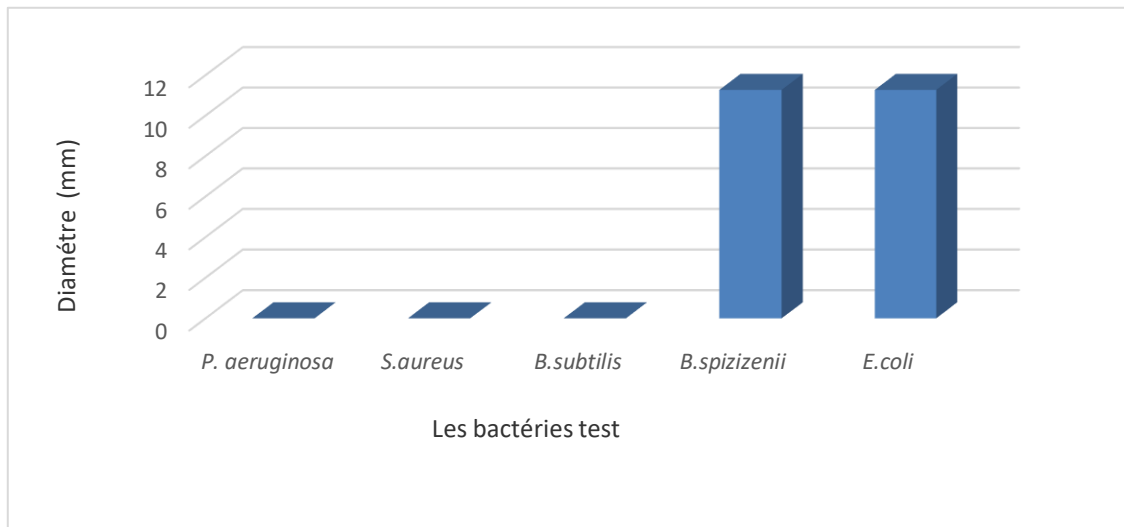


Figure 37 : Mise en évidence de l'activité antibactérienne de la levure S17

La souche S17 : D'après les résultats, la plus grande zone d'inhibition marquée par cette souche est enregistrée contre *E. coli* par un diamètre de 12,59mm, cette souche présente aussi une faible activité contre *B. spizizenii* et *B. subtilis* (8,04mm et 8,72 mm respectivement) et elle n'a aucun effet contre les bactéries *S. aureus* et *P. aeruginosa*.

Discussion



Un lot de souches de levures a été isolé à partir de trois échantillons de grignons d'olive de trois régions (Minar Zarreza et Lantiya wilaya de Mila et la région El Milia wilaya de Jijel (Nord Est de l'Algérie) en utilisant le milieu YPGA à 30°C pendant 3 jours, Le nombre total de ces isolats a été estimé à 16 souches. De par sa composition riche en cellulose, en matière grasse, en matière azotée et en matière minérale constitue une bonne source d'isolement de levures.

Les résultats ont révélé des variations significatives dans la distribution des souches de levures en fonction des régions géographiques, indiquant que l'environnement géographique, les conditions climatiques et géologiques du sol peuvent influencer la diversité des levures présentes dans les grignons d'olive.

Nos résultats s'accordent avec ceux de **Bataïche (2014)** qui a isolé 25 souches levuriennes à partir de grignons d'olive variété algérienne « *Chemlal* ».

Des études antérieures ont utilisé des produits pour l'isolement des levures à partir de différents échantillons. Douze souches de levure ont été isolées à partir de blé dur dans des régions arides (désert du Sahara, Algérie). (**Djekrif, 2016**). Vingt souches de levures de différents types isolées de sols de palmeraie (dattes, oliviers, vignes) et de sols steppiques (**Bennamoun, 2017**). Cinq souches de levures ont été isolées du désert du Sahara algérien (palmeraie de Biskra) et purifiées sur milieu PDA. (**Merabti, 2006**).

Labrani (2015) a isolé 15 souches de levure de deux biotopes de la région de Constantine (Nord-Est Algérien).

Les souches isolées du grignon d'olive présentent des caractéristiques morphologiques différentes. L'observation microscopique apporte des informations supplémentaires sur la morphologie des souches de levures, dont la taille peut être un indicateur de la croissance et du développement des levures, mais la couleur varie considérablement et peut être due à des pigments spécifiques produits par la levure, ou à des différences dans la composition chimique de ce microorganisme. Les résultats enregistrés dans cette étude, concordent avec ceux rapportés par BENAOUIDA (2008), MERABTI (2006) qui montrent une diversité dans la forme microscopique des levures isolées à partir de différents types de sols prélevés de diverses régions algériennes et à partir de certains bioproduits.

L'étude des caractères morphologiques des différentes souches a montré des cellules arrondies, de taille petite à grande, isolées les unes des autres avec un mode de division par bourgeonnement. Ces observations confirment la définition proposée par **Guiraud en 1998** qui distingue les levures des autres microorganismes comme faisant partie du groupe des champignons, par leur caractère unicellulaire ; et par celle de **Bonaly en 1991** qui, proposait dans son livre que généralement les levures présentent une reproduction asexuée par bourgeonnement et que cela constitue leur principal mode de multiplication pour la majorité.

La filamentation peut être un mécanisme de survie utilisé par la levure dans des conditions défavorables ou un stress environnemental (**Finkel et Mitchell, 2011**) la différenciation des levures aux processus de réponse au stress. Ces raisons peuvent expliquer la formation des filaments par 3 souches seulement (S6, S15, S10) dans notre étude.

La filamentation peut également être affectée par divers facteurs, notamment : composition du milieu, conditions de croissance et autres effets environnementaux. Il est important de noter que la capacité à former des filaments peut varier même au sein d'une même espèce de levure (**Sudbery, 2011**).

La caractérisation morphologique et biochimique des souches suggère leur variation taxonomique. Les caractères morphologiques et biochimiques peuvent être utiles pour l'identification préliminaire des souches de levures, mais ils ne sont généralement pas suffisants pour une identification précise. La classification et l'identification des levures nécessitent souvent une combinaison de différentes approches, y compris des caractères morphologiques, biochimiques, physiologiques et moléculaire.

Cependant des analyses supplémentaires, y compris des tests physiologiques, biochimiques et biotechnologiques, peuvent être nécessaires pour donner une caractérisation plus détaillée de la souche de levure isolée. Les résultats obtenus à partir des tests biochimiques et physiologiques réalisés sur les 16 souches de levures, montrent que ces derniers présentent des caractéristiques biochimiques différentes dont toutes les souches ne possèdent pas la capacité d'assimiler les substrats azotés. L'azote est un élément essentiel dans la biosynthèse des protéines et des acides nucléiques, en fait, de nombreux chercheurs (**Beopoulos, 2009 ; Pan et al, 2009 ;**

Mirabaghri *et al*, 2012 ; Virginia *et al*, 2014 ; Sitepu *et al*, 2014 ; Wang *et al*, 2015 ; Polburee *et al*, 2015 ; Cavonius *et al*, 2015; Capus *et al*, 2016), ont découvert que les cellules ne peuvent plus se répliquer lorsque l'azote est épuisé. Cependant, le carbone continue d'être absorbé par la cellule, il convertit les substrats internes (carbones) en acides gras et en triglycérols, qui sont immédiatement stockés dans les corps lipidiques. Cela permet à cette catégorie de levure de survivre à de longues périodes de famine dans des niches sèches et pauvres en nutriments. De plus, les lipides de stockage peuvent être plus tolérants aux conditions de séchage que les glucides de stockage en raison de leur hydrophobicité. (Poli *et al*, 2014).

Les tests physiologiques montrent que les 16 souches possèdent des caractéristiques physiologiques différentes dont 6 souches (S1, S4, S8, S10, S16, et S17) transforment l'urée en ammoniac, 9 souches réussissent à se croître à la température de 30°C (S6, S9, S10, S11, S12, S13, S15, S16, S17) et 5 souches résistent au NaCl (S6, S10, S12, S14, S15). Remram et Mana (2016) ont testé deux souches *Cryptococcus sp* et *Candida sp* par trois tests, les résultats montrent que les isolats ne peuvent pas se développer sous 37°C, et ne poussent pas sur des cultures avec 1% de la concentration d'Na Cl tandis que cette souche *Cryptococcus sp* possédait la capacité de dégrader l'urée.

Pour une identification précise des souches de levures, il est généralement nécessaire de recourir à des méthodes complémentaires, telles que l'analyse de l'ADN (séquençage de gènes spécifiques, PCR, séquençage de l'ARNr, etc.).

Un screening a été réalisé sur milieu solide (Boite de Pétri) pour la mise en évidence de 05 enzymes à savoir : Alpha-amylase, Pectinase, Lipase, Maltase et Laccase. Les souches testées ont été cultivées sur un milieu à base de substrat inductible pour chaque enzyme. Ces milieux solides sont incubés à 30°C pendant 3 à 5 jours. Les résultats ont montré que tous les isolats sont producteurs d'enzymes

Selon Gana *et al*, (2014), les microorganismes représentent une bonne source de biomolécules telles que les enzymes qui revêtent une grande importance commerciale et industrielle, ce qui a conduit à l'isolement de microorganismes importants du point de vue biotechnologique. Ajoutant à cela que les levures se sont révélées être de bonnes sources d'enzymes. De plus, Banakar et Thippeswamy (2012) ont rapporté que les

microorganismes sont actuellement la principale source d'enzymes industrielles, dont 50% proviennent de champignons filamenteux et de levures.

La mise en évidence des activités enzymatiques, montre que les souches S4, S7 et S13 peuvent produire toutes les enzymes (α -amylase, lipase, laccase, pectinase et la maltase). Cela souligne le potentiel de ces souches levuriennes dans des domaines tels que l'industrie alimentaire et la production d'enzymes spécifiques.

Ces résultats enregistrés, concordent avec ceux rapportés par **Aichour (2017)** qui a montré que deux souches levuriennes *Meyerozyma guilliermondii* et *Clavispora lusitaniae* ABS7 isolées d'écosystèmes arides, région de Biskra, Sud Algérien peuvent produire différentes enzymes (Amylase, Protease, Maltase, Cellulase et Pectinase).

D'autre part **Dali et Hamame (2016)** ont étudié les activités α -amylase, maltase, pectinase et cellulase chez la levure *Clavispora lusitaniae* isolée à partir de grains de blé de régions aride (Biskra).

En 2017, **Bennamoun** a collecté près d'une vingtaine de souches distinctes de levures du sol de la Wilaya El-M'gheir d'El-Oued. Ces souches ont ensuite été identifiées et les résultats ont montré qu'il existait deux souches appartenant à l'espèce *Clavispora lusitaniae*, deux souches appartenant à l'espèce *Cryptococcus magnus* et 12 souches appartenant à *Meyerozyma guilliermondii*. La levure *Meyerozyma guilliermondii* a démontré une activité lipase et estérase. De plus, une souche d'*Aureobasidium pullulans* a présenté une gamme d'activités enzymatiques, notamment la pectinase, l'amylase, l'estérase, la protéase et la lipase. Enfin, trois souches de *Yarrowia lipolytica* se sont avérées avoir une activité enzymatique pour la lipase et l'estérase.

Selon la littérature, la production d'amylase extracellulaire a déjà été rapportée chez *Arxula adenivorans*, *Candida japonica*, les espèces *Filobasidium capsuligenum* et plusieurs souches de levure appartenant aux genres *Lipomyces*, *Saccharomycopsis* et *Schwanniomyces* (**Sujeeta et al, 2017**). D'autre part, **Merabti (2006)**, a pu identifier des souches de levure du genre *Lipomyces* sp. Isolat capable de produire une activité amylolytique élevée sur milieu PDA à une concentration de 1 %.

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

D'autre part, un grand nombre de levures sont des productrices actives de lipase (**Das, 2004**). **Bataiche (2014)** a isolé 116 souches de levures à partir des produits laitiers et grignon d'olive et qui sont positives à la production de lipase extracellulaire. Ceci du probablement à la richesse de ces produits en matière grasse. Des espèces de levures telles que *Candida*, *Kluyveromyces* et *Pichia* ont été rapportées comme étant de bons producteurs de lipase isolés du lait cru (**Cocolin et al, 2002**).

L'activité antimicrobienne a été aussi étudiée dont les propriétés inhibitrices de nos souches levuriennes ont été testées contre différents microorganismes (bactéries Gram positif et Gram négatif et la levure *Candida albicans*) par la méthode des disques qui est une technique permettant d'avoir une idée préliminaire sur la capacité d'un extrait à inhiber la croissance microbienne.

Le surnageant de culture (CS) des 4 levures isolées a été testé comme source de composé inhibiteur.

Nous avons testé cette activité sur le milieu Muller-Hinton préconisé pour les tests d'activité antibactérienne, parce qu'il permet une meilleure diffusion des substances bioactives et la gélose de Sabouraud pour la recherche de l'activité anti *Candida albicans*

Les résultats de l'activité antibactérienne obtenus montrent que les quatre souches levuriennes présentent une activité plus au moins considérable contre quelques bactéries test , et aucune activité n'a été observée contre certaines bactéries.

Nos résultats vont dans le même sens que ceux obtenus par (Younis, et al, 2017) qui ont étudiés les propriétés inhibitrices des souches de *C. kefyr* en les testant contre divers micro-organismes, dont des bactéries Gram-positif et Gram-négatif. *C. kefyr* a montré une forte activité antibactérienne contre *Escherichia coli* (20 mm), une faible activité antibactérienne contre *Staphylococcus aureus* (8 mm) et pas d'activité contre *Pseudomonas aeruginosa*.

Les résultats négatifs enregistrés envers certaines bactéries tests peuvent être probablement dû à la résistance de ces dernières aux antibiotiques.

Cependant, Aucun effet inhibiteur à l'égard de la levure *Candida albicans* n'a été détecté pour l'ensemble des isolats de levures testés.

Ces résultats négatifs des levures isolées sur les microorganismes test peuvent être également expliqués par l'absence de récepteurs spécifiques aux substances bioactives produites par ces levures chez ces microorganismes. Cependant, d'après **Heard et Fleet (1987)**, l'utilisation des conditions optimales ne garantit pas un criblage efficace des levures killer : parce que la caractéristique principale de leurs substances bioactives est la spécificité. Par conséquent, le choix de la souche cible est essentiel pour la détection des levures à activité antimicrobienne.

Une autre hypothèse possible, est que la quantité de ces substances synthétisées par les isolats de levures ne soit pas suffisante pour atteindre le seuil d'inhibition, à savoir la CMI de chaque microorganisme test utilisé (**De Oliva Neto et al, 2004**). Par ailleurs, ces souches cibles, peuvent produire des substances hydrolytiques ou dénaturantes qui inhibent l'action des agents bioactifs des isolats de levures même si ceux -ci sont produits en quantités suffisamment importantes (**Perry et al, 2004 ; Madigan et Martinko, 2007**). Une équipe de chercheurs (**Vadkertiova et Slavikova, 2007**) approuve nos résultats par une démonstration qui étaye une plus faible activité chez les genres levuriens isolés du sol.

D'autre part, **Golubev et Golubeva (2004)** rapportent que les souches de levures productrices d'antifongiques sont beaucoup plus fréquentes dans un écosystème où la densité des populations levuriennes est relativement élevée, de sorte que la concurrence est plus intense.



Conclusion Et Perspectives

Cette étude a pu répondre aux différents objectifs d'isolement, d'identification et d'évaluation in vitro les activités biologiques des levures

L'isolement des levures à partir de trois échantillons des grignons d'olives des régions suivantes : Mila (lantia et minar zarreza) et Jijel sur le milieu YPGA à 30°C pendant 03 jour, a permis l'obtention d'un lot de 17 souches : 70.58% des isolats ont été isolés à partir de Lantia, 23.52% proviennent de Minar zarreza et 5.90% sont d'origine Jijel (El Milia), les travaux se sont poursuivis avec seulement 16 souches, car une souche (S5) a été contaminée .

L'identification des souches a été réalisée par l'étude des caractères morphologiques et physiologiques.

L'étude des caractères culturels sur milieu solide YPGA montre quelques colonies possèdent en commun la forme ronde à ovale, surface lisse, crémeuse, brillante et bombé et une taille comprise entre 0,81 à 3,98mm.

Après une croissance sur milieu YPGA, l'examen microscopique a montré que la morphologie des cellules est variable et le mode de reproduction végétatif se fait par bourgeonnement pour la totalité des souches, avec une sicssiparité pour les S2 , S7et S9.

Le résultat du test de filamentation sur milieu YPGA révèle la présence des filaments chez les souches S6, S15 et S10. Par contre, les autres souches sont incapables de développer des filaments mycéliens.

Pour les caractères biochimiques différentes sources ont été utilisées : pour la fermentation: galactose, lactose, glucose et le saccharose , les résultats montre que: les souches S15 et S7 sont capable de fermenter le galactose et le lactose et le glucose et incapables de fermenter le saccharose ; Les souches S8, S12, S16 et S17 sont incapables de fermenter les sucres ; Les souches S1 et S14 fermentent uniquement le galactose et S2 fermente uniquement le glucose ; Les souches S4 et S13 fermentent uniquement le galactose et le glucose ; Les souches S3 et S4 fermentent le glucose et S11 fermente le saccharose.

Pour l'assimilation des substrats azotés, il ressort que toutes les souches isolées sont incapables d'assimiler les substrats azotés testés.

Pour le test de l'uréase, après incubation des souches sur le milieu Christensen pendant 3 à 7 jours à 30°C, les résultats montrent que 6 souches (S1, S4, S8, S10, S16, et S17) peuvent dégrader l'urée.

Concernant les caractères physiologiques, les deux tests réalisés ; Croissance à 37°C (les souches ont été cultivées sur milieu YPGA à une température de 37°C) et le test de la résistance au NaCl (l'incubation a été faite pendant 3 à 7 jours à 30°C sur le milieu YPGA additionné avec 1% NaCl), montrent que neuf souches ont été réussies à croître sous cette température (S6, S9, S10, S11, S12, S13, S15, S16, S17), pour le deuxième test, les résultats montrent que, Onze souches (S1, S2, S3, S4, S7, S8, S9, S11, S13, S16, S17) ont été réussies à résister au NaCl.

D'une part, un screening a été réalisé sur milieu solide (Boîte de Pétri) pour la mise en évidence de 05 enzymes à savoir : lipase, α -amylase, maltase, laccase et pectinase. Les souches testées ont été cultivées sur un milieu à base de substrat inductible pour chaque enzyme. Ces milieux solides ont été incubés à 30°C pendant 3 à 5 jours. Les résultats ont montré que la majorité des isolats de la flore étudiée sont productrices d'enzymes.

D'après ces résultats nous avons sélectionné quatre souches à base de la grande diversité pour la production d'enzymes : les souches S4, S7, S13 (capable de produire toutes les enzymes étudiées) et S17 (présente 04 activités enzymatiques : lipase, α -amylase, maltase et laccase) pour tester leurs activités antimicrobiennes.

L'activité antibactérienne des surnageants de culture des quatre souches levuriennes sélectionnées ont été testées vis-à-vis cinq bactéries. Il s'agit des bactéries à Gram négatif *E. coli* (ATCC 25922) ; *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), et des bactéries à Gram positif *Bacillus subtilis* (ATCC 10987) ; *Bacillus spizizini* (ATCC 6633) et *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) . Les résultats de l'activité antibactérienne obtenus montrent que les quatre souches levuriennes présentent une activité plus ou moins considérable contre quelques bactéries testées ; et aucune activité n'a été observée contre certaines bactéries.

Les surnageants de culture des levures sélectionnées obtenus, ont été testés pour leur activité antifongique contre la levure *Candida albicans* (ATCC 10231). Les résultats obtenus ont montré que toutes les levures ne possèdent pas une activité

inhibitrice contre la levure *candida albicans* (aucune zone d'inhibition n'a été marquée) donc ne présentent pas une activité antifongique.

Au terme de cette étude, nous fixons certains points comme perspectives :

- Identification des souches
- Etude de la production quantitative, en fermentation liquide ou solide, des enzymes révélées par les levures isolées
- Optimisation du milieu de production à base de déchets alimentaires et industriels, pour un meilleur rendement et un faible coût.
- Purification des enzymes produites, pour un usage alimentaire ou pharmaceutique
- Recherche chez ces levures d'autres enzymes d'intérêt, pouvant ouvrir à d'autres applications industrielles.



Références bibliographiques

A

- **Aichour, N.H. (2017).** Etude des hydrolases chez les levures. Purification et caractérisation de l' α -amylase chez *Clavispora lusitaniae* ABS7. Mémoire de Master Département : Biochimie et Biologie Moléculaire et Cellulaire
- **Alphonse, M ; Jose, D ; Bernarda. (2004).** Cours de microbiologie générale avec problèmes et exercices corrigés. Ed. Wolters Kluwer, France, p: 430.
- **Al-Zuhair, S et Taher, H. (2016).** Supercritical Fluids technology in lipase Catalyzed Processes. 6000 Broken Sound Parkway NW, suite 300. CRC Press Taylor and & francis Groupe. 152 Pages.
- **Andriotis Vasilios, M. E ; Gerhard, S; Robbie ,W; Robert, A; Field and Alison Smith,M. (2016).** The maltase involved in starch metabolism in barley endosperm is encoded by a single gene. 11(3): 151-642.
- **Avwioroko, O. J; Anigboro, A. A; Unachukwu, N. N & Tonukari, N. J. (2018).** Isolation, identification and in silico analysis of alpha-amylase gene of *Aspergillus niger* strain CSA35 obtained from cassava undergoing spoilage. Biochemistry and Biophysics Reports, 14, 35-42.

B

- **Baldrian, P. (2004).** Purification and characterization of laccase from the white-rot fungus *Daedalea quercina* and decolorization of synthetic dyes by the enzyme. Appl. Microbiol. Biotechnol. 63 (5). 560-563.
- **Banakar, S; Thippeswamy, B. (2012).** Isolation, production and partial purification of fungal extracellular pectinolytic enzymes from the forest soils of Bhadra Wildlife Sanctuary, Western Ghats of Southern India. Journal of Biochemical Technology 3(5):S138-143.
- **Banakar, S; Thippeswamy, B. (2012).** Isolation, production and partial purification of fungal extracellular pectinolytic enzymes from the forest soils of Bhadra Wildlife Sanctuary, Western Ghats of Southern India. Journal of Biochemical Technology 3(5):S138-143.
- **Barnett, J.A; Payne, R.W and Yarrow, D. (2000).** Yeast: Characteristics and identification. Third edition 2000,. Cambridge University Press, 752.-758.
- **Barros, M. C ; do Nascimento Silva, R ; Ramada, M. H. S ; Galdino, A. S; de Moraes, L. M. P; Torres, F. A. G & Ulhoa, C. J. (2009).** The influence of N-

glycosylation on biochemical properties of Amy1, an α -amylase from the yeast *Cryptococcus flavus*. Carbohydrate Research, 344(13), 1682-1686.

- **Basmaji, M.F. (2005)**. Caractérisation de la protéine Knr4 et recherche de ses partenaires fonctionnels pour la compréhension de son rôle dans la synthèse pariétale chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Thèse de Doctorat, Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse, France.
- **Basset, A; Khush, R. S; Braun, A; Gardan, L; Boccard, F; Hoffmann, I. A et Lemaitre, B. (2000)**.The phytopathogenic bacteria *Erwinia carotovora* infects *Drosophila* and activates an immune response. Proc Natl Acad Sci USA 97(7): 3376-81.
- **Bataïche, I. (2014)**. Recherche de nouvelles potentialités de *Yarrowia lipolytica*, isolé de différents milieux naturels pour des applications biologiques. Thèse de doctorat. Microbiologie, Université Frères Mentouri Constantine1.
- **Bateman, D.F and Basham, H.G. (1976)**. Degradation of plant cell walls and membranes by microbial enzymes. Physiology of Plant-Pathogen Interactions ,4: 316-35.
- **Bekhouche, F ; Bonnin, E ; Boulahrouf, A ; Levaux, J.Y. (2006)**. Production d'enzyme polygalacturonase par des souches microbiennes isolées du lait cru et des olives noires et vertes.Canadian Journal of Microbiology, 52: 658- 663.
- **Belda, I; Lorena, B .C; Javier, R; Eva, N; Domingo, M; Antonio, S. (2016)**.Selection and use of pectinolytic yeasts for improving clarification and phenolic extraction in winemaking. International journal of food microbiology. 223(45): 1–8.
- **Belmaziz, M et Djalal, F. (2017)** .Analyses microbiologiques, biochimiques et biotechnologiques des levures issues du cépage Cinsault cultivé dans la commune Ben Abdelmalek Ramdane .Université Abdelhamid Ibn Badis-Mostaganem.PP :110
- **Benaouida, K. (2008)**. Etude de l'alpha amylase de levures isolées d'un écosystème extrême (sol environnant des sources thermales) et cultivées sur un milieu à base de lactosérum. Mémoire Magistère. Université Mentouri. Constantine, p : 104.
- **Bennamoun, L. (2017)**. Isolement, sélection de souches levuriennes de sols arides sahariens (El-M'gheir) productrices de polygalacturonase: Purification et caractérisation enzymatique Thèse de Doctorat, département biochimie et microbiologie appliquée Université Mentouri. Constantine.

- **Beopoulos, A. (2009).** Ingénierie génétique de la levure oléagineuse *Yarrowia Lipolytica* pour la production de lipides. THÈSE. L'Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement (Agro Paris Tech).
- **Berber, N. (2013).** Essai d'Identification Moléculaire (PCR-ITS-RFLP) et Caractérisation Biotechnologique des levures indigènes dans les vignobles de la plaine de Ghriss, El Keurt (Mascara) Cépage de raisin: Cinsault, mémoire de Master en biotechnologie Alimentaire. Ed. Université Abd El Hamid Ibn Badis de Mostaganem.
- **Bevan, E.A et Makover, M. (1963).**The physiological basis of the killer character in yeast.In: Genetics Today, XI Int.Congr. Gen. (Geerts S.J. ed.), Pergamon Press, Oxford.pp:202-203.
- **Bhatia, S. (2018).**Introduction to enzymes and their application, Iop publishing, (2), 1-3.Bispo A., Guellier C., Martin E., Sapijanskas J., Soubelet H., et Chenu C., (2016).Les sol : Intégrer leurs multifonctionnalité pour une gestion durable. 504 pages.
- **Blanco, P; Thow, G; Simpson, C. G; Villa, T. G; and Williamson, B. (2002).** Mutagenesis of key amino acids alters activity of a *Saccharomyces cerevisiae* endopolygalacturonase expressed in *Pichia pastoris*. FEMS Microbiology Letters. 210(2): 187-191.
- **Bombeck, P.L ; Aurore, R et Jacques, H. (2016).** L'utilisation de l'hydrolyse enzymatique pour la production de nanocellulose dans une stratégie de bioraffinage forestier intégré (synthèse bibliographique). Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement. 20(4) : 310-31.
- **Bonaly, R. (1991).** Morphologie et reproduction asexuée des levures Dr : Larpent J.P., Biotechnologie des levures. Masson, Milan Barcelone Bonn. Paris. PP: 4-18.
- **Botton, B ; Breton, A ; Fever, M ; Gauthier, S ; Guy, P ; Larpent, J.P ; Raymond, P ; Sanglier, J .J ; Vayssier, Y ; Veau, P. (1990).** Moisissures utiles et nuisibles d'importance industrielle. 2ème édition. Masson. Collection Biotechnologies, p : 34-381.
- **Bouix, M et Leveau, J.Y. (1991).** Les levures .Techniques d'analyse et de contrôle dans les industries agroalimentaires, édition 2 Lavoisier-Tec & Doc, Paris. 3. PP : 206-229.
- **Bouix, M et Leveau, J.Y. (1991).** Les levures .Techniques d'analyse et de contrôle dans les industries agroalimentaires, édition 2 Lavoisier-Tec & Doc, Paris. 3. PP : 206-229.

- **Bouix, M. et Leveau, J.Y. (1991).** Les levures .Techniques d'analyse et de contrôle dans les industries agroalimentaires, édition 2 Lavoisier-Tec & Doc, Paris. 3. PP : 206-229.
- **Boukail, H. A et Maazi, A. (2015).** α -glucosidase thermostable de la levure *Candida* sp. : Production, purification et caractérisation. Mémoire de Master. Spécialité : Analyse Protéomique et Santé. Département : Biochimie/ Biologie Cellulaire et Moléculaire. Université des Frères Mentouri Constantine.
- **Bourat, G. (1992).** Propriétés des micro-organismes, traité génie des procédés. Journal de technique de l'ingénieur, Paris. Volume 6.
- **Bourgeois, C. M et Larpent, J. P. (1996).** Microbiologie alimentaire. Tome II aliment fermenté et fermentations alimentaires. Ed. Tec. et Doc. Lavoisier, Paris. : 100-450.
- **Bourgeois, C., M., Leveau, J., Y. (1980),** Techniques d'analyse et de contrôle dans les industries agro-alimentaires, Volume 3 : Le contrôle microbiologique, Collection Sciences et techniques agro-alimentaires, 331p
- **Bourgeois, C.M et Larpent, J. P. (1996).** Microbiologie alimentaire. Tome II aliment fermentés et fermentations alimentaires. Ed. Tec. et Doc. Lavoisier, Paris. P : 100-450.
- **Buzzini, P. (2000).** An optimization study of carotenoid production by *Rhodotorula glutinis* DBVPG 3853 from substrates containing concentrated rectified grape must as the sole carbohydrate source. Journal of industrial microbiology and biotechnology, 24: 41-45.

C

- **Camarero, S .L .D; Martinez, M .J; Martinez, A .T. (2005).** Lignin-derived compounds as efficient laccase mediators for decolorization of different types of recalcitrant dyes. Applied and Environmental Microbiology, 71(4): 1775-1784.
- **Cao, J; Zheng, L and Chen, S. (1992).**Screening of pectinase producer from alkalophilic bacteria and study on its potential application in degumming of rammie. Enzmologie . Microbiologie. Technologie , 14 : 1013-1016.
- **Capus, A ; Monnerat, M ; Ribeiro, C.L; De Souza, W ; Martins, J.L. Sant'Anna, C. (2016).**Application of high-content image analysis for quantitatively estimation lipid accumulation in oleaginous yeasts with potential for use in biodiesel production. Bioresource technology.309-317.

- **Cavonius, L; Fink, H; Kiskis, J; Albers, E; Undeland, I; Enejder, A. (2015).** Imaging of lipids in microalgae with coherent anti-stokes Raman scattering microscopy. *Plant Physiol.* 167, 603–616.
- **Choi Hyejeong, M. A ; Donati, R ; Parini, D ; Melis, R ; Gatti, N ; Bresolin, G.S; et Comi, G. P. (2013).** Molecular characterisation of GSD III subjects and identification of six novel mutations in AGL. *Human mutation.* 20(6) : 480–480
- **Cocolin, L; Aggio, D; Manzano, M; Cantoni, C; Comi, G. (2002).** An application of PCR- pDGGE analysis to profile the yeast populations in raw milk. *International Dairy Journal,* 12, p: 407–411.
- **Cofalec. (2006).** Caractérisation des levures de boulangerie. Adopté par Comité de fabrication de levures de panification de l'union Européenne. Paris. : 1-10.
- **Combina, M; Martos, M.A; Zubreski, E.R; Garro, O. A; Hours, R.A. (2012).** Isolation of a yeast strain able to produce a polygalacturonase with maceration activity of cassava roots. *Food Sci. Technol, Campinas,* 33(2): 332-338.
- **Corbaci, C et Yalcin, H. T. (2012).** Isolation and characterization of yeasts associated with Turkish-style homemade dairy products and their potential as starter cultures. *African Journal of Microbiology Research.* 6(3), 534-542.
- **Coulibaly, W.H; N'guessan, K.F; Coulibaly, I et al. (2014).** *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 18(2) : 209-219
- **Couto, S.r; Herrera, J.l.t. (2006).** Industrial and biotechnological applications of laccases: A review. *Biotechnol Advances.* 24: 500–513.

D

- **Dakhmouche-Djekrif, S. (2016).** Production et caractérisation de l'amylopullulanase de la levure *Clavispora lusitaniae* ABS7 isolée de blé cultivé et stocké en zones arides.
- **Dali, N.S ; Hamame, A. (2016).** Recherche de levures productrices d'enzymes glycolytiques exocellulaires thermostables : Production (sur boîte de Pétri et en batch) et Caractérisation des enzymes produites. Mémoire du Master, université Mentouri Constantine. PP : 9-11
- **Davet, P. et Rouxel, F. (1997).** Détection et isolation des champignons du sol. (edn) INRA.Paris. P190.
- **De Oliva Neto, P ; Ferreira, M.A et Yokoya, F. (2004).** Screening for yeast with antibacterial properties from an ethanol distillery. *Bioresource Technology* 92:1-6.

- **Deak, T. (2006).** Chapitre 8: environmental Factors. Influencing yeasts, in yeast handbook: biodiversity and ecophysiology of yeasts, Carlos rosa, gabor peter (eds.). Springer Verlag Berlin Heidelberg. P: 155-174.
- **Djekrif, D. S. (2016).** Production et caractérisation de l'amylopullulanase de la levure *Clavispora lusitaniae* ABS7 isolée de blé cultivé et stocké en zones arides. Thèse de Doctorat. Département de Biochimie et Biologie Moléculaire et Cellulaire / Laboratoire de GMA. Université Mentouri Constantine.
- **Durand, J. (2017).** Approches multiples d'ingénierie pour l'utilisation d'enzymes hydrolytique comme outils de synthèse, thèse de doctorat : ED SEVAB : ingénieries microbienne et enzymatiques, de l'université de Toulouse. 241 p

F

- **Ferreira, A; Cahú, T ; Xu, J ; Blenow, A & Bezerra, R. (2021).** A highly stable raw starch digesting α -amylase from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) viscera. Food Chemistry, 354, 129513.
- **Fickers, P ; Destain, J ; Thonart, P. (2008).** Les lipases sont des hydrolases atypiques : principales caractéristiques et applications. Biotechnol Agron Soc Environ. 119-130.
- **Fincan, S. A; Özdemir, S; Karakaya, A; Enez, B; Mustafov, S. D; Ulutaş, M. S & Şen, F. (2021).** Purification and characterization of thermostable α -amylase produced from *Bacillus licheniformis* So-B3 and its potential in hydrolyzing raw starch. Life Sciences, 264, 118639.
- **Finkel, J. S et Mitchell, A. P. (2011).** Genetic control of *Candida albicans* biofilm development. Nature Reviews Microbiology. 9(2): 109-118.
- **Fogarty, M.V and Kelly, C.T. (1983)** In Microbial Enzymes and Biotechnology. ed. Fogarty, M.W. London & New York: Elsevier Applied Science Publishers. p. 131-182

G

- **Gainvors, A; Nedjaoum, N; Gognies, S; Muzart, M; Nedjma, M; and Belarbi, A. (2000).** Purification and characterization of acidic endo-polygalacturonase encoded by the PGL1-1 gene from *Saccharomyces cerevisiae*. FEMS Microbiology Letters. 183(1): 131- 135.
- **Gana, S. k and Gana, M.L. (2014).** Algerian Yeast Strains: Isolation, Identification and Production of Single Cell Protein from Whey with Strain *Candida kefyr*,

International Journal of Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics vol. 4, no. 3, pp. 160-165.

- **Gilham, D & Lehner, R. (2005).** Techniques to measure lipase and esterase activity in vitro. *Methods*. 36: 139-147.
- **Golubev, W.I; Golubeva, E.W. (2004).** Yeast fungi in steppe and forest phytocenoses of the Prioksko-terrasny biosphere reserve. *Mykologi Phytopathologia* **38**:20-27.
- **Golz-Berner, K; Walzel, B; Zastrow, L; Doucet, O. (2004).** Cosmetic and dermatological preparation containing copperbinding proteins for skin lightening. International Patent Application W02004017931.
- **Gonçalves, F. D; Gonçalves, S; ZanellaGuidini, C. (2019).** Lipases: sources, immobilization methods, and industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103:7399– 7423.
- **Grbavčić, S; Darka, M; Mirjana, R.S; Mirjana, A; Marina, Š; Ivanka, K and Zorica, K.J. (2015).** Development of an environmentally acceptable detergent formulation for fatty soils based on the lipase from the indigenous extremophile *Pseudomonas Aeruginosa* Strain. *Journal of Surfactants and Detergents*. 18(3) : 383-95.
- **Guerrand, D. (2017).** Lipases industrial applications: focus on food and agroindustries. *OCL*, 24(4), D403:1-7.
- **Guery, B et Mcirdi, K. (1994).** Levure. Autodidactique. Ed Quillet, Volume Biologie-Géologie, (5) : pp.71-163.
- **Guinet, R ; Godon, B. (1994).** La panification Française. Cachan : Tec & Doc Lavoisier, p : 521.
- **Guiraud, J.P. (1998).** Microbiologie alimentaire.(Ed).Dunod.Paris:310-321.
- **Guiraud, J, P. (1998).** Microbiologie alimentaire. Techniques d'analyse microbiologiques. Ed. DUNOD. Paris : 163 -505.
- **Guiraud, J.P. (1998).** Microbiologie alimentaire Ed. Dunod. P: 320-652.
- **Guo, G; Liu, Y; Yang, J. and Ma, X. (2006).** Identification, activity and function determination of several salivary enzymes secreted by *Macrosiphum avenae*. *Acta Entomologica Sinica*, 49: 768–774.
- **GUPTA, R ; GIGRAS, P ; MOHAPATRA, H et al. (2003).** Microbial α - amylases: a biotechnological perspective. *Process biochem*. 38 :1599 -1616.

- **Gupta, R; Arti, K; Poonam, S; Yogesh, S. (2015).** Molecular and functional diversity of yeast and fungal lipases: Their role in biotechnology and cellular physiology. Progress in Lipid Research.

H

- **Hammer, E. Krowas, D. Schafer, A. Specht, M. Franche, W et Schauer, F. (1998).** Isolation and characterization of a Dibenzofuran- Degrading Yeast: Identification of oxidation and ring cleavage products. Appl. Env. Microbiol. 64:2215-2219.
- **Heard, G.M; Fleet, G.H. (1987).** Occurrence and growth of killer yeasts during wine fermentation. *Applied and environmental Microbiology* 53:2171-2174.
- **Hencké, S. (2000).** Utilisation alimentaire des levures. Diplôme de Docteur: Pharmacie. Université Henri Poicare - Nancy I.

I

- **Izgu, F; Altınbay, D et Derinel, Y; (2004).** Immunization of the industrial fermentation starter culture strain of *Saccharomyces cerevisiae* to a contaminating killer toxin-producing *Candida tropicalis*. Food Microbiology .21:635-640.

J

- **Jacob, A. and Rendleman, J.r. (1997).** Enhancement of cyclodextrin production through use of debranching enzymes. Biotechnology and applied biochemistry. 26(1): 51-61.
- **Janíčková, Z & Janeček, Š. (2020).** Fungal α -amylases from three GH13 subfamilies : Their sequence-structural features and evolutionary relationships. International Journal of Biological Macromolecules, 159, 763-772.
- **Jeanneau, A. (2009).** Etude sur la laccase de *Pycnoporus cinnabarinus*. DEA, 2005.
- **Joffin, J. N. Leyral, G. (2006).** *Microbiologie technique*, Tome1 : Dictionnaire des techniques, 4ème édition. Edition CRDP d'aquitaine.
- **Johnson, E. A and Echavarri, C. E. (2011).** Part II, Chapter 3: Yeast biotechnology in Kurtzman C. P., Fzll J. W. and Boekhout T. (eds). The yeast. A taxonomic study. Fifth edition. Elsevier. 1: 21-45.
- **Johnson, E. A and Echavarri, C. E. (2011).** Part II, Chapter 3: Yeast biotechnology in Kurtzman C. P., Fzll J. W. and Boekhout T. (eds). The yeast. A taxonomic study. Fifth edition. Elsevier. 1: 21-45.

K

- **Kademi, A ; Ismaili-Alaoui, M et Houde, A. (2003).** Des arômes synthétiques...au naturel. Centre de Recherche et de Développement sur les aliments Saint Hyacinthe, Québec.
- **Kalia, S; Bhattacharya, A; Prajapati, S. K & Malik, A. (2021).** Utilization of starch effluent from a textile industry as a fungal growth supplement for enhanced α -amylase production for industrial application. *Chemosphere*, 279, 130554.
- **Kamini, N.R.T; Fujii, T; Kurosu, H. I. (2000).** Production, purification and characterization of an extracellular lipase from the yeast, *Cryptococcus sp.* S-2. National Research Institute of Brewing, 36: 317–324.
- **Kashyap, D .R; Vohra, P. K; Chopra, S and Tewari, R. (2001).** Applications of pectinase sin the commercial sector: areview. *Bioresource Technology* , 77 : 215-227.
- **Kavanagh, K. (2018).** Fungi: Biology and Application. 111 River street, Hoboken, Nj 07030, USA. Wiley Biackwell.392 Pages.
- **Kizhakedathil, M. P. J & C, S. D. (2021).** Acid stable α -amylase from *Pseudomonas balearica* VITPS19—Production, purification and characterization. *Biotechnology Reports*, 30, e00603.
- **Kleil, V; Veenhuis, M; Brul, S; Klis, F.M; De GrootP, W.J; Wally, H; Müller,W.H; van, D ; Boekhout, T. (2011).** Cytology, Cell Walls and Septa: A Summary Knop M. Yeast cell morphology and sexual reproduction—A short overview and some considerations. *Comptes Rendus Biologies.*;334(8–9), p: 599-606.
- **Knutson, K et Ragauskas, A. (2004).** Laccase-mediator biobleaching applied to a direct yellow dyed paper. *Biotechnol. Prog.*,20 (6): 1893 -1896.
- **Kreger-Van Rij, N.J. (1984).** The yeast, a Taxonomic Study, Elsevier Biomedical Suarit, R., Gopal, P-K, et Sherped, M-G, 1988.Evidence for a glycosidic linkage between chitin and glucan in the cell wall of *Candida albicans*. *J. Gen. Microbial*, 134. PP: 359 - 368.
- **Kunamneni, A ; Ballesteros, F. J ; Plou, M. A. (2007).** Fungal laccase a versatile enzyme for biotechnological applications ; Departamento de Biocatálisis, Instituto de catálisis y Petroleoquímica, la SCCI, Madrid, Espagne, 233
- **Kurtzman, C. P. (1984).** Synonymy of the yeast genera *Hansenula* and *Pichia* demonstrated through comparisons of deoxyribonucleic acid relatedness. *Antonie van Leeuwenhoek*. 50(3): 209-217.<https://doi.org/10.1007/BF02342132>.

- **Kurtzman, C.P. (2011a).** Discussion of Teleomorphic and Anamorphic Ascomycetous Yeasts and Yeast-like Taxa. In: C.P. Kurtzman., J.W. Fell., T. Boekhout (Eds), the Yeasts, a Taxonomic Study. Elsevier, London, pp. 304.
- **Kurtzman, C.P; Jack, W.F; Teun, B and Vincent, R. (2011).** Chapitre 7: Method for isolation, phenotypic characterization and maintenance of yeasts. The yeasts, a taxonomic study. Volume1, Fifth edition. Elsevier, p. 87-111.

L

- **Labbani ,F.Z. K. (2015).** Activité « Killer » chez des levures isolées des sols du Nord-Est Algérien : Purification, caractérisation et effet sur les souches de levures indésirables. Thèse de doctorat. Microbiologie appliquée . Constantine, Université des frères Mentouri.
- **Labrecque, M.H. (2003).** Etude de la capacité de deux souches de levures à dégrader le xylène, Mémoire pour l'obtention du grade de maître des sciences. Faculté des sciences de l'agriculture et de l'alimentation. Ed, Université Laval. p : 19-24.
- **Lagrari, C. (2019).** Production améliorée des lipases à partir du *Rhizopus oryzae* NRRL 1526 en utilisant la biomasse lignocellulosique dans un milieu de fermentation liquide. Mémoire en sciences de l'eau, Université du Québec
- **Lai, Q. P. (2010).** Utilisation des levures non-Saccharomyces en oenologie: études des interactions entre *Torulasporea delbrueckii* et *Saccharomyces cerevisiae* en cultures mixtes. Thèse de Doctorat, Université de Toulouse.
- **Larpent, G. M ; Sanglier, J.J. (1992).** Biotechnologies. Principes et méthodes, p : 574-581.
- **Larpent, J. P. (1991).** Biotechnologie des Levures Ed. Masson, Paris. 426.
- **Larpent, J.P ; Larpent, G.M. (1997).** Mémento technique de microbiologie. 3ème édition, Technique et documentation Lavoisier, Paris. PP : 217- 240.
- **Leclerc, H. (1975).** Microbiologie générale, Doin éditeurs, Paris. p : 28.
- **Levasseur, L. (2007).** Suivi simultané de la consommation d'oxygène et de la Consistance des pâtes de farine de blé à l'aide d'un pétrin Instrumenté (le sitoxygraphe) : tentative d'explication Biochimique et rhéologique. Application à l'ajout de Laccases. Thèse de doctorat en sciences alimentaires. Université Paris VII et Paris XI.
- **Leveau, J.Y et Bouix, M. (1993).** Microbiologie industrielle. Les micro-organismes d'intérêt industriel. Lavoisier TEC et DOC, Paris. 08 : 2-92.

- **Leveau, J.Y et Bouix, M. (1993).** Microbiologie industrielle: les micro-organismes d'intérêt industriel. Ed. Tec & Doc Lavoisier. PP : 612.
- **Leyral, G ; Vierlin, E. (2007).** Microbiologie et toxicologie des aliments: Hygiène et sécurité alimentaires.Eds, Wolters Kluwer, Amsterdam, p : 287.
- **Li, H and Zhang, X. (2005).**Characterization of thermostable lipase from thermophilic *Geobacillus* sp. TW1. *Protein Expr Purif*.
- **Lim, S.H.A.D ; Ryu, J.M.B ; Lee, H ; Jeon J.H ; Sok, D.E and Choi E.S. (2011).**Ethanol fermentation from Jerusalem artichoke powder using *Saccharomyces cerevisiae* KCCM50549 without pretreatment for inulin hydrolysis. *Bioresour Technol*, 102: pp. 2109–2111.
- **Linxia, L; Jun, Z; Chuan, C; Jitao, T; Chengshu, W and Duqiang, L. (2015).** Structure and biosynthesis of fumosorinone, a new protein tyrosine phosphatase 1B inhibitor firstly isolated from the entomogenous fungus *Isaria fumosorosea*. *Fungal genetics and biology*, 81(7) : 191-200.
- **Lodder, J. (1971).**The yeasts. A taxonomie study. North Rolland Publishing Company, Amsterdam, London.

M

- **Madhavi, V; Lele, S.S. (2009).** « Laccase propertes, use », *BioResource* 4(4),1694-717. 1694
- **Madigan, M ; Martinko, J. (2007).***Brock-Biologie des micro-organismes*. 11^{ème}édition. Pearson Education.France.1047p.
- **MADR. (2018).** Statistiques Agricoles 2018 Direction des statistiques agricoles et des systèmes d'information, Ministère d'agriculture et de développement Rural Algérie
- **Magliani, W ; Conti, S ; Gerloni, M ; Bertolotti, D et Polonelli, L. (1997).** Yeast killer systems. *Clinical microbiology reviews*. 10(3): 369-400.
- **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 α -amylase from a thermophilic *Bacillus*. *Enzyme and microbial technology*. (25) : 433-438.
- **Martin, C; Galbe, M; Wahlbom, C.F; Hahn-Hagerdal, B and Jonsson, L.F. (2012).**Ethanol production from enzymatic hydrolysates of sugarcane bagasse using

recombinant xylose utilizing *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme MicrobTechnol*, 31: pp. 274–282.

- **Martínez, J. L; Meza, E; Petranovic, D & Nielsen, J. (2016).** The impact of respiration and oxidative stress response on recombinant α -amylase production by *Saccharomyces cerevisiae*. *Metabolic Engineering Communications*, 3, 205-210.
- **Martos, M.A; Emilce R; Zubreski; Oscar, A; Garro; and Roque, A; Hours. (2013).** Production of Pectinolytic Enzymes by the Yeast *Wickerhamomyces anomalus* Isolated from Citrus Fruits Peels. *Biotechnology Research International*, Article ID 435154, 7 pages.
- **Mayer, A.M and Staples, R.C. (2002).** Laccase: new functions for an old enzyme. *Phytochemistry* , 60: 551-565.
- **Melnichuk, N; Braia, M. J; Anselmi, P. A; Meini, M.-R & Romanini, D. (2020).** Valorization of two agroindustrial wastes to produce alpha-amylase enzyme from *Aspergillus oryzae* by solid-state fermentation. *Waste Management*, 106, 155-161.
- **Membre, J.M and Burlot, P.M. (1994).** Effects of temperature, pH, and NaCl on growth and pectinolytic activity of *Pseudomonas marginalis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 60: 2017–2022.
- **Merabti, R. (2006).** Isolement et caractérisation de souches levuriennes amylolytiques à partir de sol saharien algérien. Thèse de Magistère. Spécialité: Biochimie et microbiologie appliquée .Université des Frères Mentouri Constantine. pp :85
- **Merín, M. G; María, C. M; Kalliopi, R; Luca, C et Vilma, I. M.de Ambrosini. (2015).** Characterisation of pectinase activity for enology from yeasts occurring in *Argentine bonarda* grape. *Brazilian journal of microbiology*. 46(3): 815–823.
- **Miner, J; Rusan, M; Ammar, R; Albalasmeh, A. M. (2016).** Treated Olive Mill Waste water Effects on Soil Properties and Plant Growth. *Water Air Soil Pollut.* p: 227-135.
- **Minussi, R.c; Pastore, G.m, Duran, N. (2002)** Potential applications of laccase in the food industry. *Trends Food Sci Technol*; 13: 205-216.
- **Mirabagheri, M; Nahvi, I; Emtiazi, G; Mafakher, L et Darvishi, F.(2012).** Taxonomic characterization and potential biotechnological applications of *yarrowia lipolytica* isolated from meat and meat products. *Jundishapur journal of microbiology*. 5(1): 346-351.
- **Morozova, O.v; Shumakovich, G.p; Gorbacheva, M.a; Shleev, S.v; Yaropolov, A.i. (2007).** Laccases "bleu". *J Biochem*.72 (10): 1136-1150.

- **Morvan, J. (2010).** Marché européen des enzymes dans les applications alimentaires. M55B. <http://www.frost.com>.
- **Moubasher, A.H; Mady, A.I; Nemmat, A.H; Hassan A.G. (2016).** Enzyme producing capabilities of some extremophilic fungal strains isolated from different habitats of Wadi El-Natron, Egypt : Cellulase, xylanase and pectinase. European journal of biological research. 6(2): 103–111.
- **Moubasher, H; Wahsh, S.S ; Abo El-Kassem, N. (2010).** Purification of pullulanase from *Aureobasidium pullulans*. Microbiology, p: 79; 759 – 766.
- **Mtibaa, R. (2019).** Isolement et étude de souches fongiques thermotolérantes productrices de laccases à partir de sols des régions arides du sud de Tunisie : Essais d'application en bioremédiation. Thèse. Génie Biologie. Sfax. Université de Sfax, Ecole Nationale d'Ingénieurs de Sfax. 169 Pages.

N

- **Naumov, G. I; Yu Shalamitskiy, M et Naumova, E. S. (2016).** New family of pectinase genes PGU1b–PGU3b of the pectinolytic yeast *Saccharomyces bayanus var uvarum*. In doklady biochemistry and biophysics. 467:89–91. Springer,
- **Nawaz, M. A; Asad, K; Afsheen, A; Roberta, M; Shah, A.U.Q et Antonio, M. (2015).** Continuous degradation of maltose: improvement in stability and catalytic properties of maltase (α glucosidase) through immobilization using agar-agar gel as a support. Bioprocess and biosystems engineering. 38(4) : 631-38.
- **Neagu, C.B and Bahrim G. (2012).** Comparative study of different methods of hydrolysis and fermentation for bioethanol obtaining from inulin and inulin rich feedstock. Food Industry, 13: pp. 63– 68.
- **Nefzaoui, A. (1987).** contribution à la rentabilité de l'oléiculture par la valorisation optimale des sous-produits. Séminaire sur l'économie de l'olivier (CEE, CIHEAM, TUNISIE), Tunis.
- **Nefzaoui, A. (1991).** valorisation des sous-produits de l'olivier. Options Méditerranéennes. Séries A. Séminaires Méditerranéens. 16 :101-108.
- **Nicolas, J ; Billaud, C ; Rouet Mayer, M.A. Et Philippon, J. (2003).** Enzymatic browning. 1. Biochemical aspects. In Encyclopaedia of food science, food technology and nutrition. Caballero, B., Trugo, L. et Finglas, P. M., eds., Academic Press. London, 1: pp 678-686.

O

- **ÖNER, E.T. (2006).** Optimization of ethanol production from starch by an amylolytic nuclear petite *Saccharomyces cerevisiae* strain. *Yeast*. 23: 849-856.
- **Oskay, M; and Yalçın, H.T. (2015).** Screening of Yeast Strains for Pectinolytic Activity: Effects of Different Carbon and Nitrogen Sources in Submerged Fermentations. *OnLine Journal of Biological Sciences*, 15 (3): 89.96.
- **Oteng-Gyang, K. (1984).** Introduction à la microbiologie alimentaire dans les pays chauds. Edition Technique et documentation, Paris.
- **Oteng-Gyang, K. (1984).** Introduction à la microbiologie alimentaire dans les pays chauds. *Technique & Documentation Lavoisier*, Paris, p : 8:43-51.
- **Oteng-Gyang, K. (1984).** Introduction à la microbiologie ans les pays chauds. Ed. Lavoisier. Paris, P: 43-46.
- **Oteng-Gyang, K. (1984).** Introduction à la microbiologie dans les pays chauds. Ed. Lavoisier. Paris. PP: 43-51.

P

- **Pagani, D. M., Daiane, H ; Gustavo, VB. P; Karine de Oliveira Alves, Paula, T. D, Caroline, F. de Oliveira ; Zélia, MM. A. (2016).** Susceptibility to antifungal agents and enzymatic activity of *Candida haemulonii* and *Cutaneotrichosporon dermatis* isolated from soft corals on the Brazilian reefs. *Archives of microbiology*. 45(2): 1–9.
- **Pan Li, X. (2009).** Isolation of the oleaginous yeasts from the soil and studies of their lipidproducing capacities. *Biotechnol*. 47(2): 215-220.
- **Pandey, A; Nigam, P; Soccol, C.R; Soccol, V.T; Singh, D; Mohan, R. (2000).** Advances in microbial amylases. *Biotechnol. Appl. Biochem*. 31: 135–152.
- **Perry, J.J; Staley, J.T et Lory, S. (2004).** *Microbiologie*. Edition Dunod.Paris.891p.
- **Phaff, H; William, T; Starmer, H et Kricher, J. (1978).** Evolution and Speciation of host plant specific. *Widmer Tanner, F.A. Loewus*. PP: 137- 149.
- **Pinto, É. S. M; Dorn, M & Feltes, B. C. (2020).** The tale of a versatile enzyme : Alpha-amylase evolution, structure, and potential biotechnological applications for the bioremediation of n-alkanes. *Chemosphere*, 250, 126202.
- **Pol, D. (1996).** Travaux pratiques de biologie des levures. Guide de laboratoire.ellipses edition marketing S.A, Paris. 15: 20-38, 42-57, 141-151.
- **Pol, D. (1996).** Travaux pratiques de biologie des levures. Pellipse, édition marketing, 158. pp. 21-151.

- **Pol, D. (1996).** Travaux pratiques de biologie des levures. Pellisepse, édition marketing. 158. PP : 21-151.
- **Polburee, P; Yongmanitchal, W; Lertwattanasakul, N; Ohashi, T; Fujiyama, K; Limtong, S. (2015).** Charaterization of oleaginous yeasts accumulating hight levels of lipid when cultivated in glycerol and their potential for lipid production from biodiesel-derived crud glycerol. British mycological society. 1194-1204.
- **Poli, J.S; Lützhøft, H.C.H; Karakashev, D.B; Valente, P; Angelidaki, I. (2014).**An environmentally friendly fluorescent method for quantification of lipid contents in yeast. Bioresour. Technol. 151, 388–391.
- **Polonelli, L et Conti, S; (2009).**Candida albicans Methods and protocols. Chapter 11, Biotyping of Candida albicans and other fungi by yeast killer toxins sensitivity.HumanaPress.499:97-115.
- **Polonelli, L et Morace, G. (1986).** Reevaluation of the yeast killer phenomenon. *Journal of Clinical Microbiology.* 24(5) : 866-869.
- **Pommier, S; (2003).** Dynamique de populations microbiennes en culture mixte : étude expérimentale en bioréacteur à membranes et modélisation du phénomène killer chez Saccharomyces cerevisiae. Thèse de doctorat. L'institut national polytechnique de Toulouse.
- **Popeijus, H; Overmars, H.A; Jones, J; Blok, V.C; Goverse, A; Helder, J; Schots, A ; Bakker, J; and Smant, G. (2000).**Degradation of plant cell walls by a nematode. Nature, 406: 36-37.
- **Prajapati, V. S; Trivedi, U. B & Patel, K. C. (2015).** A statistical approach for the production of thermostable and alklophilic alpha-amylase from Bacillus amyloliquefaciens KCP2 under solid-state fermentation. 3 Biotech, 5(2), 211-220.

R

- **Radler, F et Schmitt, M. (1987).** Killer toxins of yeasts: inhibitors of fermentation and their adsorption.*Journal of food protection.* 50(3): 234-238. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-50.3.234>.
- **Radoi, F; Kishida, M; and Kawasaki, H. (2005).** Endo-polygalacturonase in Saccharomyces wine yeasts: effect of carbon source on enzyme production.FEMS Yeast Research. 5(6-7): 663-8.
- **REMRAM, Z ; MANA, Y.(2016).** Isolement et caractérisation des levures oléagineuses, à partir de différents sols en Algérie. Mémoire de Master. Spécialité :

Microbiologie/ Biotechnologie des Mycètes. Département : microbiologie. Université des Frères Mentouri Constantine.

- **Reski-Bekki, M.A. (2014).** Production de métabolites par les levures: caractérisation et identification des aromes et des alcools. Thèse de doctorat, Université d'Oran. Algérie.
- **Riken, Y; Stephen, A; Joseph, J; Brian, L; Strom, S. L; Douglas, W; Pherson M.c; Srdan ,G; Acimovic, K. D and Klepzig. (2016).** Effects of *grosmannia clavigera* and *leptographium longiclavatum* on western white pine seedlings and the fungicidal activity of alamo, arbotect, and tree-age, 25(2) : 256-652.
- **Rima, H; Steve, L et Ismail, F. (2012).** Antimicrobial and probiotic properties of yeasts: from fundamental to novel applications. *Frontiers in microbiology*. 3: 421
- **Robinson, P.K. (2015).** enzymes: principales and biotechnological application, 59, 1-41.doi:10.1042/bse0590001
- **Rombouts, F.M and Pilnik, W. (1986).** Pectinases and other cell-wall degrading enzymes of industrial importance. *Symbiosis* ,2 :79-89.
- **Rose, A.H; Harrison, J. S. (1971).**The yeast. Vol. 4, 2ème édition, p: 297.
- **Ruchi, G; Anshu, G; Khare, S.K. (2007).** Lipase de la souche *Pseudomonas aeruginosa* tolérante aux solvants : optimisation de la production par la méthodologie et l'application de la surface de réponse. *Bioresour Technol*, 99: 4796–4802.

S

- **Sanchez, A. C; Ravanal, M. C; Andrews, B. A & Asenjo, J. A. (2019).** Heterologous expression and biochemical characterization of a novel cold-active α -amylase from the Antarctic bacteria *Pseudoalteromonas* sp. 2-3. *Protein Expression and Purification*, 155, 78-85.
- **Sangeetha, R; Geetha, A; Arulpandi, I. (2010).**Concomitant production of protease and lipase by *Bacillus licheniformis* VSG1: production, purification and characterization, *Braz. J. Microbiol.* 41 .179–185.
- **Sasaki, F; Toshizumi, M; Yutaka, T and Takashi, Y. (2015).** Note on cordyceps *brongniartii* Shimazu collected from the wild in Japan. *Mycoscience*, 48(5) : 312-315
- **Scheda, R et Yarrow, D; (1966).** The instability of physiological properties used as criteria in the taxonomy of yeast. *Arch Microbiol* 55(3):209-225.
- **Scheen, A; PaquoNicolas, T; Van, G and Luc, F. (2008).** Inhibition des recepteurs CB1

- **Schliephake, K; Mainwaring, D.E; Lonergan, G.T; Jones, I.K et Baker, W.L. (2000)** Transformation and degradation of the disazo dye Chicago Sky Blue by a purified laccase from *Pycnoporus cinnabarinus*. *Enz. Microb. Technol*, 27 (1-2): 100-107.
- **Schmitt, M. J et Breinig, F. (2002).** The viral killer system in yeast: from molecular biologie to application. *FEMS microbiologie reviews*, 26(3),257-276 <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2002.tb00614.x>.
- **Schmitt, M. J et Reiter, J. (2008).** Viral induced yeast apoptosis. *Biochimica Etbiophysica Acta (BBA)-Molecular cell research*.1783(7) :1413-1417. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2008.01.017>.
- **Sekour, B. (2012).** Phyto protection de l'huile d'olive vierge par ajoute des plantes végétales Univ Boumerdes.
- **Selinheimo, E; Kruus, K; Buchert, J; Hopia, A; Autio, K. (2006).** Effects of laccase, xylanase and their combination on the rheological properties of wheat doughs. *Journal of Cereal Science*, 43: 152- 159.
- **Shofiyah, S. S; Yuliani, D; Widya, N; Sarian, F. D; Puspasari, F; Radjasa, O. K; Ihsanawati & Natalia, D. (2020).** Isolation, expression, and characterization of raw starch degrading α -amylase from a marine lake *Bacillus megaterium* NL3. *Heliyon*, 6(12), e05796
- **Sieiro, C; Poza, M; Vilanova, M; and Villa, T. G. (2003).** Heterologous expression of the *Saccharomyces cerevisiae* PGUI gene in *Schizosaccharomyces pombe* yields an enzyme with more desirable properties for the food industry. *Applied and Environmental Microbiology*. 69(3): 1861-1865.
- **Sikander, A; Hameedullah, R; Ikram, A.H. (2010).**Production of an extracellular lipase from *Candida lipolytica* and Parameter significance analysis by plackett-burman design. *Engineering in Life Sciences*.10: 465–473.
- **Simon, P et Meunier, R. (1970).** *Microbiologie industrielle et génie biochimique*. Masson ET Cie, Editeurs. Paris VIe. p: 31-47, 385-411.
- **Singh, B et Satyanarayana, T. (2015).**Fungal phytases: characteristics and amelioration of nutritional quality and growth of non-ruminants.*Journal of animal physiology and animal nutrition*. 99(4) : 646-60.
- **Singh, M; Chandraveer, T.A. (2017).** Isolation and screening of lipases producing microorganisms from natural sources, *Indian J. Ecol*. 44 (1) 19–23.

- Sitepu, I.R; Garay, L.A; Sestric, R; Levin, D; Block, D.E; German, J.B; Boundy-Mills, K.L. (2014). Oleaginous yeasts for biodiesel: current and future trends in biology and production. *Biotechnology Advances* 32: 1336-1360
- Srebotnik, E; Hammel, K.E. (2000). Degradation of nonphenolic lignin by the laccase/1- hydroxybenzotriazole system. *J. Biotechnol.* 81 (2-3): 179-188.
- Sudbery, P. E. (2011). Growth of *Candida albicans hyphae*. *Nature Reviews Microbiology.* 9(10): 737-748.
- Sujeeta, K.M; Shikha, M; Khushboo, S. (2017). Isolation and Screening of Amylase Producing Fungi. *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci* 6(4): 783-788.
- Suzzi, G; Romano, P; Ponti, I et Montuschi, C. (1995). Natural wine yeasts as biocontrol agents. *Journal of Applied Bacteriology.* 78(3): 304-308. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1995.tb05030.x>.

T

- Teodoro, C.E.D; Martins, M.L.L. (2000). Culture conditions for the production of thermostable amylase by *Bacillus sp.* *Brazilian Journal of Microbiology.* (31):28-302.
- Thuriaux, P. (2004). Les organismes modèles de la levure. Ed. Belin. P: 15- 27, 42-44.
- Tortorano, A.M; Cabrini, E ; Viviani, M.A. (1979). Sensibilité *in vitro* des levures à cinq antibiotiques. Comparaison de deux méthodes CMI en gelose et méthode des disques. *Bull Soc Fr Myc Med.* 8: 69-74.
- Treichel, H; Oliveira, D; Mazutti, M.A; Luccio, M.D et Oliveira, J.V.(2010). A Review on Microbial Lipases Production. *Food biop. Technol.*3:182_196.
- Tsagaraki, E; Lazarides, H. N; Petrostos, K. B. (2007). Olive mill wastewater treatment. In: *Utilization of By-products and Treatment of Waste in the Food Industry* Springer US .p: 133-157.

V

- Vadkertiova, R., Slavikova, E. (2007). Killer activity of yeasts isolated from natural environment against some medically important *Candida* species. *Polish Journal of Microbiology* 56:39-43.
- Vakhlu, J et Kour, A. (2006). Yeast lipases: enzyme purification, biochemical properties and gene cloning. *Electronic Journal of Biotechnology* ISSN: 0717-3458 by Pontificia Universidad Católica de Valparaíso – Chile: 69-85.

- **Van Der Maarel, M.J; Van der Veen, B; Uitdehaag, J.C.M ; Leemhuis, H et Dijkhuizen, L. (2002).** Properties and applications of starch converting enzymes of alpha amylase family. *Biotechnol.* 94: 137-55.
- **Van Dijken, J.P; Scheffers, W.A. (1986).** Redox balances in the metabolism of sugars by yeasts. *Journal of the Federation of European Microbiological Societies (FEMS) Reviews*, 32, p: 199-224.
- **Vanhanen, L ; Alastair, B . R; Geoffrey, P .S and Sue ,M. (2000).** Effect of Cooking on the Soluble and Insoluble Oxalate Content of Some New Zealand Foods. *Journal of Food Composition and Analysis* 13(3):201-206.
- **Virginia, P; Adalgisa, M; Catrina, R; Silvana, V. (2014).** Oleaginous yeasts from Uruguay and Antarctica as renewable raw material for biodiesel production. *American journal of bioscience.* 2(6): 251-257.

W

- **Walker, G. M; Mcleod, A. H et Hodgson, V. J. (1995).** Interactions between killer yeasts and pathogenic fungi. *FEMS Microbiology Letters.* 127(3): 213-222. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1995.tb07476.x>.
- **Walker, G.M. (2009).** Yeasts. University of Abertay Dundee, Dundee, Scotland. *Elsevier Inc.* 1174-1187
- **Wang, X.U. Z; Lewis, L; Scott, A; Weber, R and Xiaoping, Z. (2015).** Two new native β -glucosidases from *Clavispora nr1 y-50464* confer its dual function as cellobiose fermenting ethanologenic yeast. *Plos one.* 11(3) : 151-293
- **Wang, Y; Gong, Z; Yang, X; Shen, H; Wang, Q; Wong, J; Zhao, Z. (2015).** microbial lipid production from pectin-derived carbohydrate by oleaginous yeasts. *Process biochemistry.* 50: 1097-1102.
- **Wang, Y; Hu, H; Ma, J; Yan, Q; Liu, H & Jiang, Z. (2020).** A novel high maltose-forming α -amylase from *Rhizomucor miehei* and its application in the food industry. *Food Chemistry*, 305, 125447
- **Wang, Y; Zhao, N ; Ma, J ; Liu, J ; Yan, Q & Jiang, Z. (2019).** High-level expression of a novel α -amylase from *Thermomyces dupontii* in *Pichia pastoris* and its application in maltose syrup production. *International Journal of Biological Macromolecules*, 127, 683-692.
- **Wickner, R. B. (1986).** Double-stranded RNA replication in yeast: the killer system. *Annual review of biochemistry.* 55(1): 373-395.

x

- **Ximena, Z. (2016).** Caractérisation in silico, biophysique et enzymatique d'une nouvelle lipase alcalinophile provenant d'une souche d'*Aneurini bacillus thermoaerophilus*. Thèse de doctorat en Biologie Cellulaire et Moléculaire. Université du Québec.

y

- **Yapi, A et Russell, E ; Patrice, Y. (2008).** Caractérisation biochimique et applications potentielles des glucosidases et de l' α -galactosidase du suc digestif de la larve de *Rhynchophorus Palmarum* (Curculionidae). *Mémoire Online*, 46(6) : 541-46
- **Younis, G; Awad, A; DawodR, E; et Yousef, N. E; (2017).** Antimicrobial activity of yeasts against some pathogenic bacteria. *Veterinary world*.10 (8): 979.

z

- **Zhang, Y; Shudong, H; Benjamin, S.K. (2018).** Enzymes in food bioprocessing-novel food enzymes, Applications, and related techniques current opinion in food science. 19(2).30-35.
- **Zheng, T ; Li, J & Liu, C. (2021).** Improvement of α -amylase to the metabolism adaptations of soil bacteria against PFOS exposure. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 208, 111770



Annexes

Annexe 1 : Milieu d'isolement et de conservation des souches

➤ **YPGA** (*Yeast Extract Peptone Glucose Agar*)

Utilisé pour la conservation de la souche. Il contient le glucose comme source de carbone

- Extrait de levure : 10g
 - Peptone : 20g
 - Glucose : 20g
 - Agar: 15g
 - Eau distillée : 1000ml
- pH = 5.4

Stérilisation à 120°C pendant 20 min.

Annexe 2 : Milieux d'identification et des tests

➤ **Milieu YCB** (*Yeast Carbon Base*)

- Glucose : 20g
 - KH₂PO₄ : 1g
 - MgSO₄ : 0,5g
 - Agar : 20g
 - Eau distillée : 1000ml
- pH = 5.4

Stérilisation à 120°C pendant 20 min.

➤ **Milieu YWM** (*Yeast Water Medium*)

- Extrait de levure : 10g
- Eau distillé : 1000ml

Stérilisation à 120°C pendant 20 min.

➤ **L'eau physiologique**

- Chlorure de sodium : 9g
- Eau distillée : 1000ml

Stérilisation à 120°C pendant 20 min.

➤ **Test d'uréase**

Milieu Christensen :

- Peptone : 1g
- Glucose : 1g
- Chlorure de sodium : 5g
- Phosphate monopotassique : 2g
- Urée : 20g
- Rouge de phénole : 16mg
- Agar : 20g
- Eau distillée : 1000ml

pH = 5.4

Les six premiers ingrédients sont dissous dans 100ml d'eau distillée, ensuite le liquide obtenu a été stérilisé par filtration en utilisant des filtres dont les pores de ces derniers ont un diamètre de 0,45mm. Pour l'Agar, il a été dissocié dans les 900ml d'eau distillée et subit une stérilisation à 120°C pendant 15min, Puis rajouté à la première préparation (**Guiraud, 1998**)

Annexe 3 : Milieux de la mise en évidence des activités enzymatiques

➤ **Détermination de l'activité maltase**

YPMA (*Yeast Peptone Maltose Agar*)

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

pH = 5.4

Stérilisation à 120°C pendant 20 min.

➤ **Détermination de l'activité alfa amylase**

YPSA (*Yeast Peptone Starch Agar*)

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

- Agar : 20g
- Eau distillée : 1000ml
pH = 5.4

Stérilisation à 120°C pendant 20 min.

➤ **Détermination de l'activité pectinase**

YPPA (*Yeast Peptone Pectin Agar*)

- Extrait de levure : 15g
- Peptone : 20g
- Pectine : 20g
- Agar : 20g
- Eau distillée : 1000ml
pH = 5.4

Stérilisation à 120°C pendant 20 min.

➤ **Détermination de l'activité lipase**

TPA (*Tween Peptone Agar*)

- Peptone : 10 g
- Na Cl : 0,1 g
- CaCl₂, 2H₂O : 20 g
- Tween 20 : 10ml
- Agar : 20 g
- Eau distillée : 1000 ml
pH = 5.4

Stérilisation à 120°C pendant 20 min.

➤ **Détermination de l'activité laccase**

SGA (*Stache Glucose Agar*)

- Amidon de pomme de terre : 40g
- Glucose : 20g
- Bleu de promophénol : 0,2%

- Agar : 20g
- Eau distillée : 1000ml

Stérilisation à 120°C pendant 20 min.

Annexe 4 : Préparation des réactifs révélateurs

➤ **Lugol 1 : pour le milieu YPSA**

- Iodure de potassium : 2 g
- Iode métalloïde I₂ : 1 g
- Eau distillée : 100 ml

➤ **Lugol 2 : pour le milieu YPPA**

- Di-iodure (I₂) : 1g
- D'iodure de potassium (KI) : 5g
- Eau distillée : 330ml

➤ **Rouge Congo pour les milieux YPMA**

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

Annexe 5 : Milieux de la mise en évidence de l'activité antibactérienne et antifongique

➤ **Milieu YPG (*Yeast Extract Peptone Glucose*)**

- Extrait de levure : 10g
- Peptone : 20g
- Glucose : 20g
- Eau distillée : 1000ml
pH = 5.4

Stérilisation à 120°C pendant 20 min.

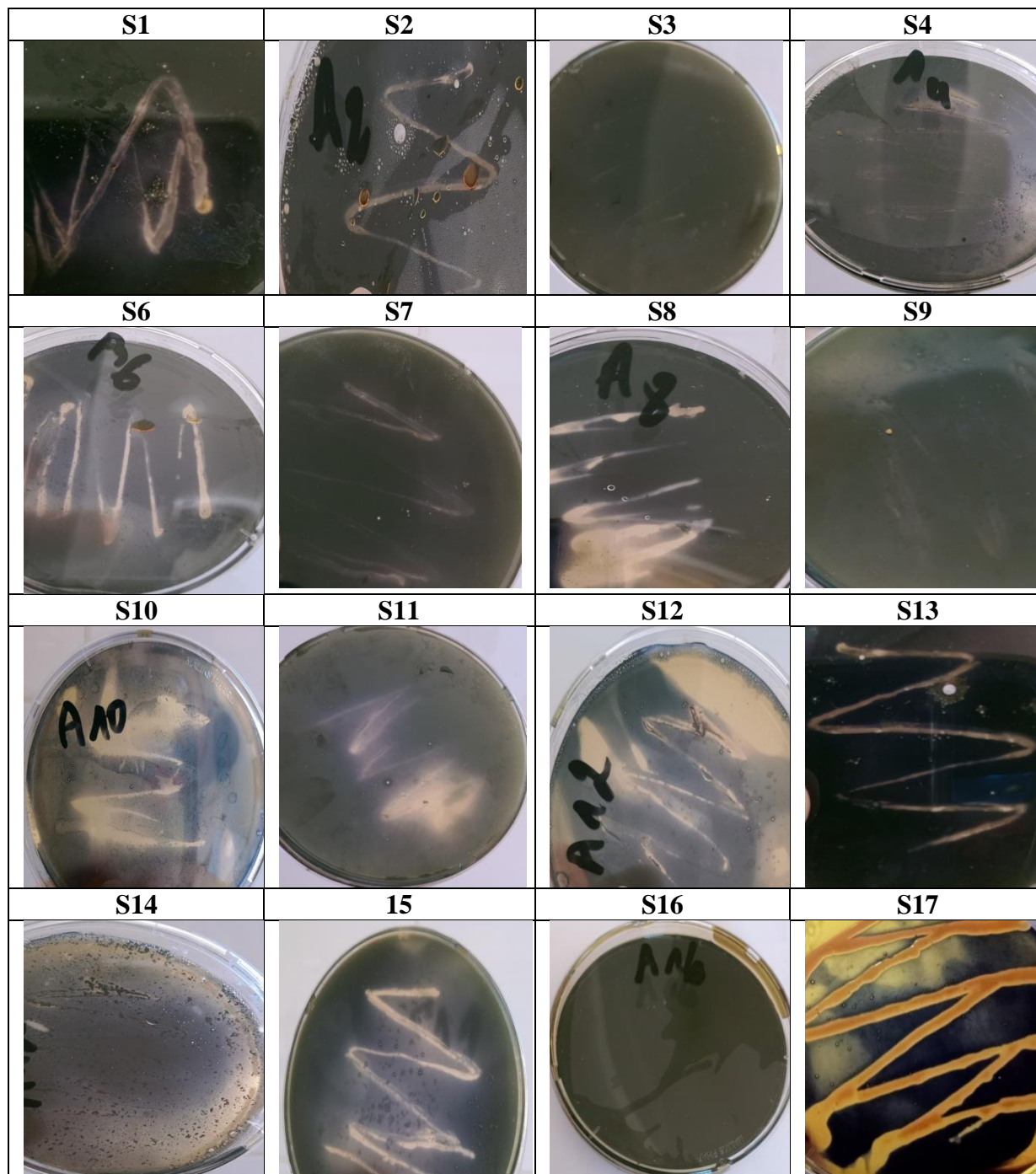
➤ **Sabouraud**

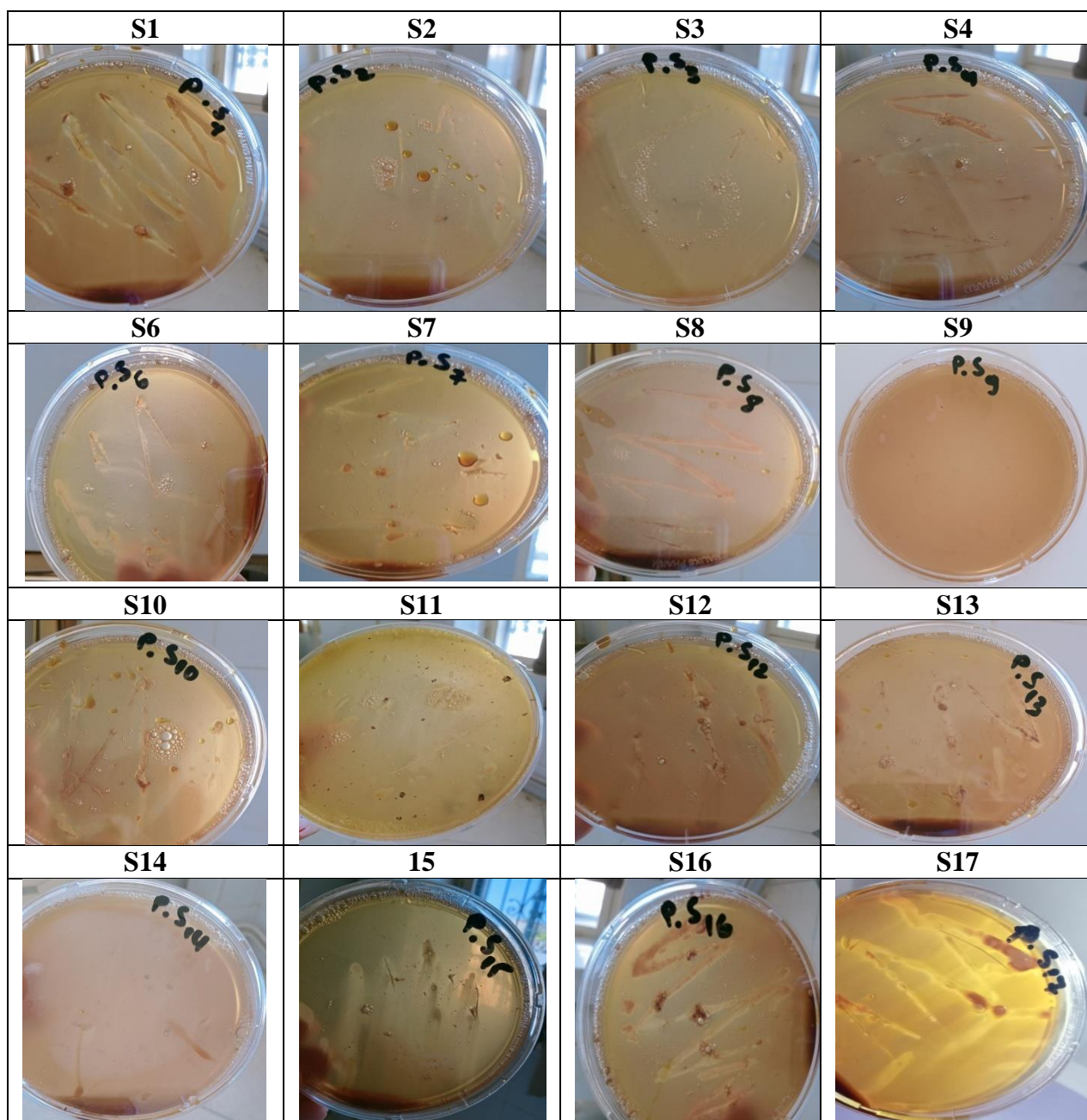
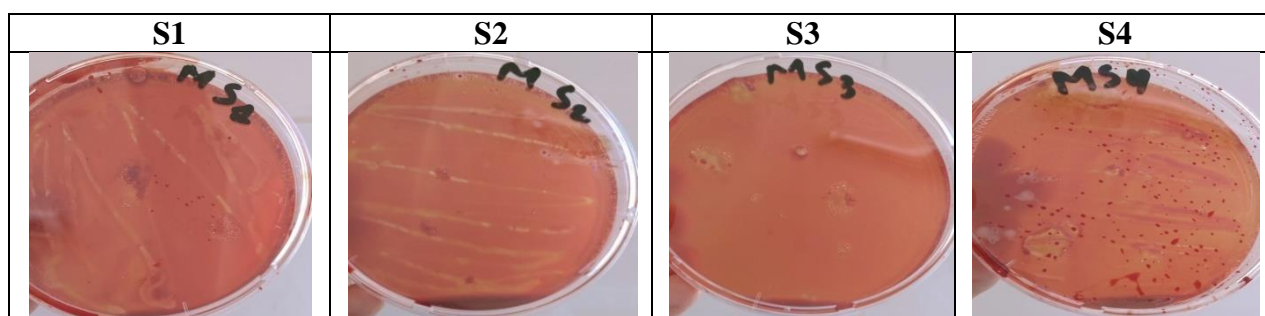
- Peptone : 10g
- Glucose : 20g
- Agar : 15g
- Eau distillée : 1000ml

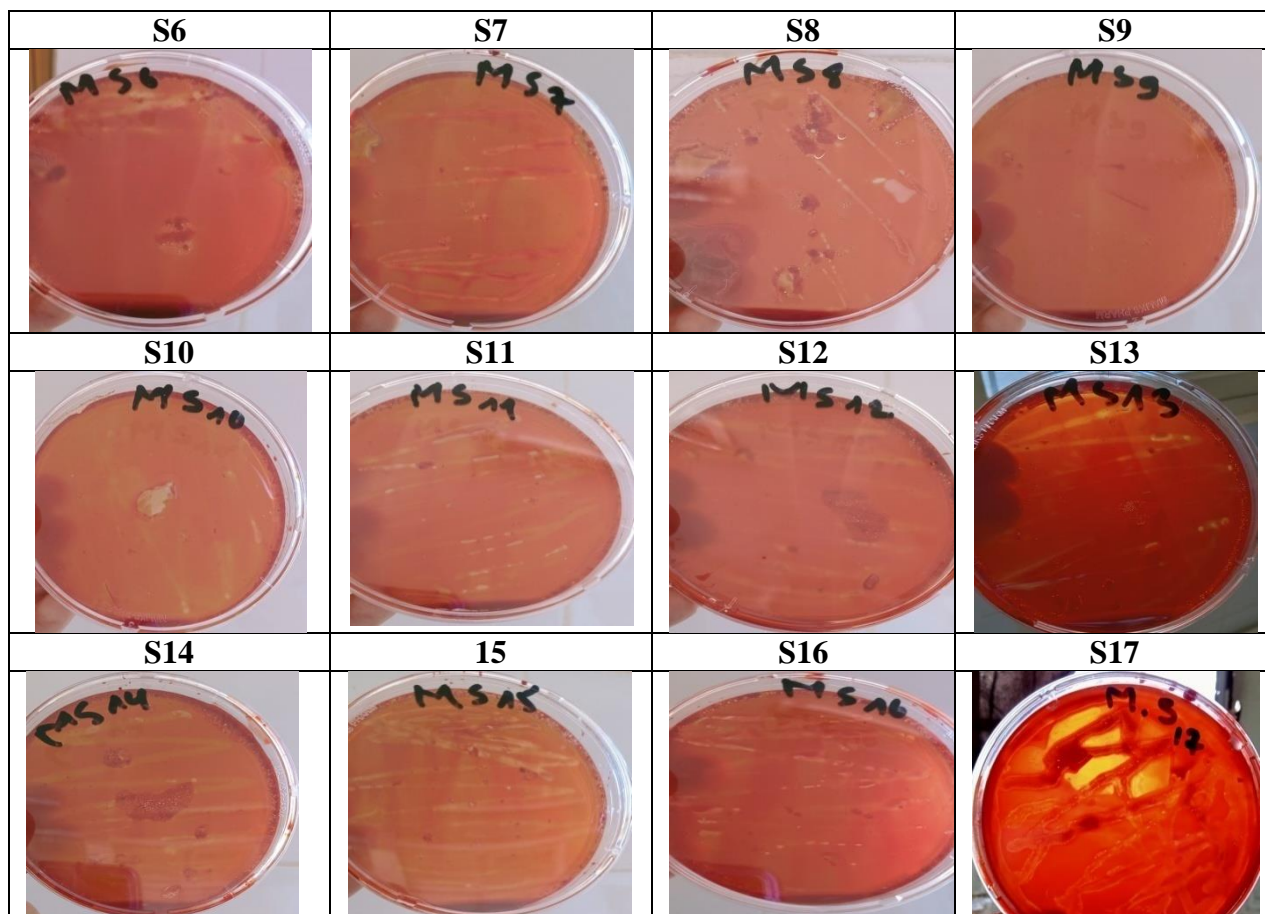
Stérilisation à 120°C pendant 20 min.

Annexe 6 : Résultats de la mise en évidence des activités enzymatiques

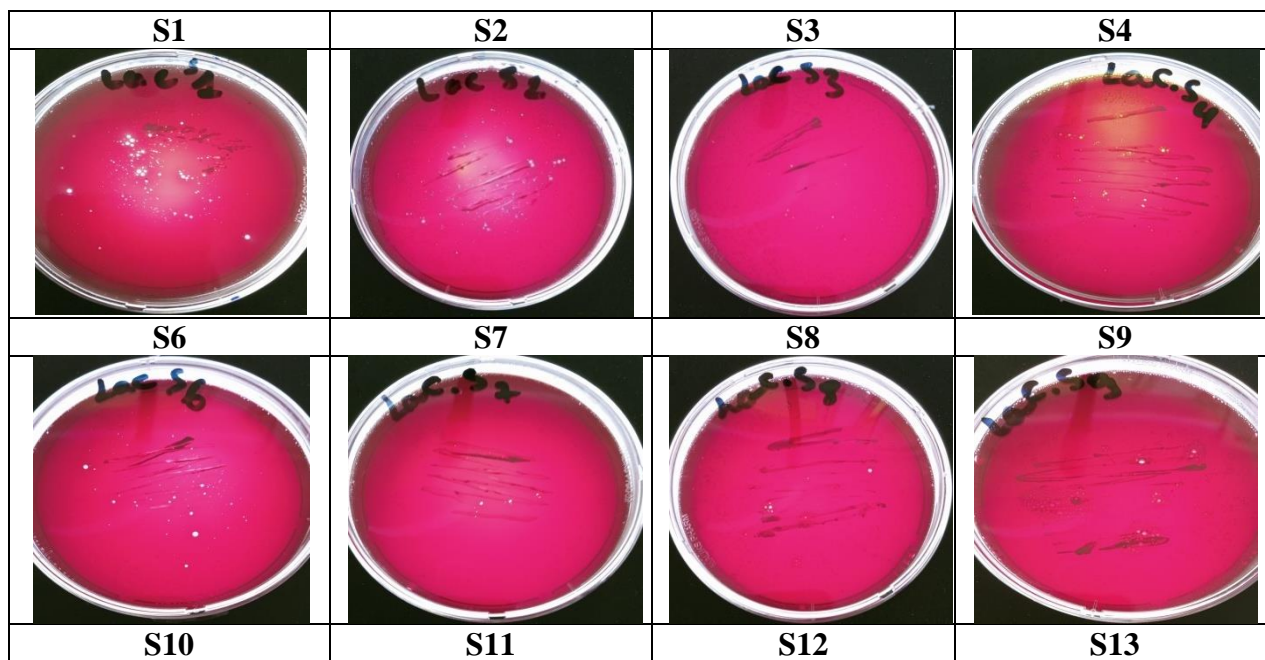
➤ α -amylase

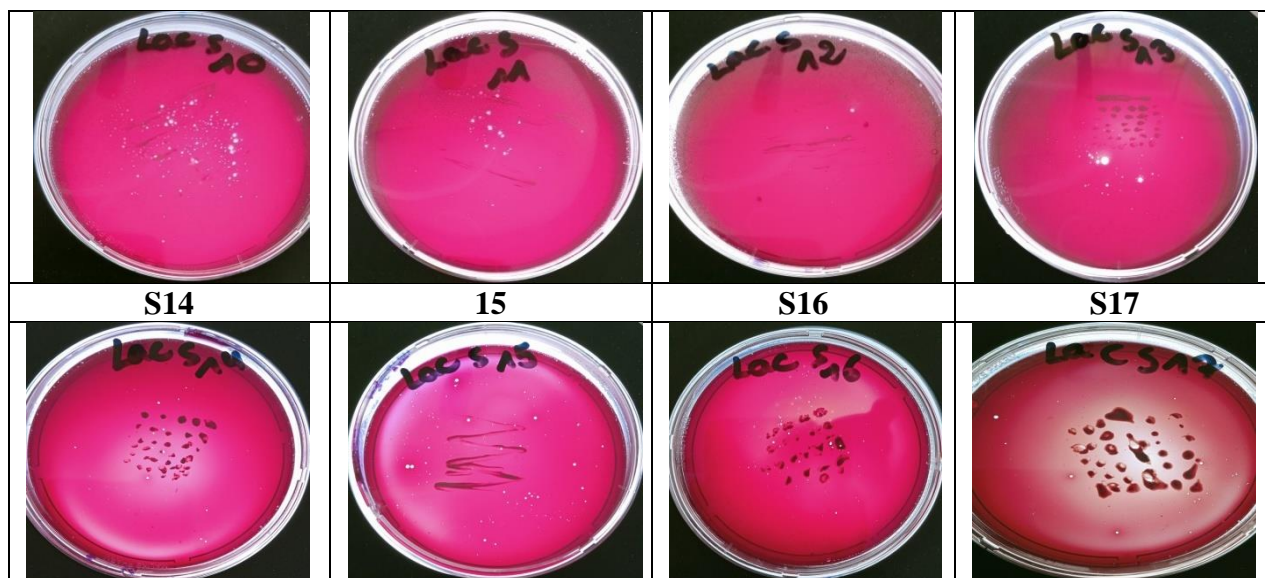


➤ **Activité pectinase**➤ **Activité Maltase**

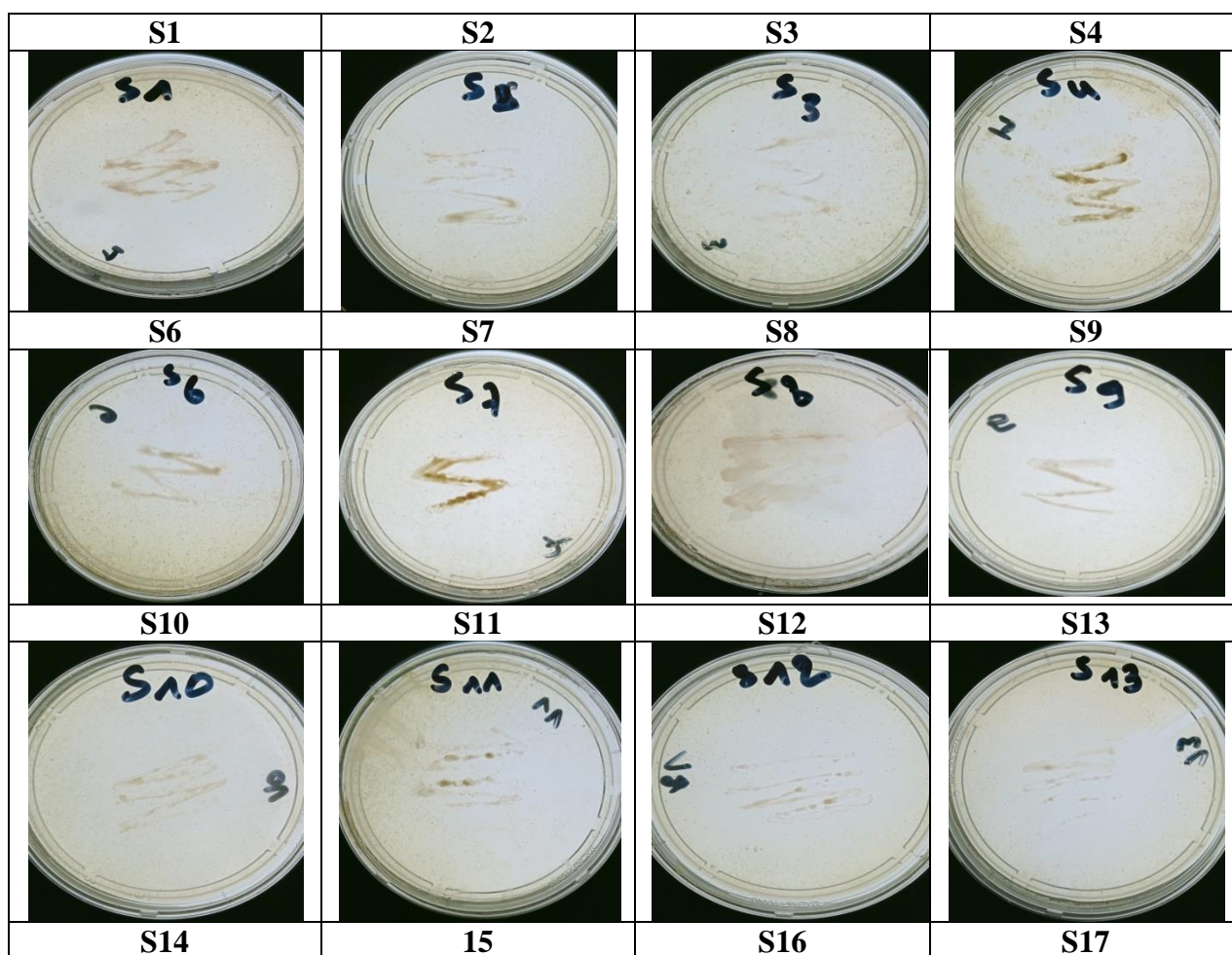


➤ **Activité Laccase**





➤ Activité Lipase







Résumés

In this study, we are interested in the isolation, identification and study of the biological activities of some yeast strains. The isolation was carried out using olive pomace harvested from two cities: Mila and Jijel

These microbial niches allowed the isolation of 16 strains which show good growth on YPGA medium at 30°C. Their identification was carried out by the study of morphological, cultural, biochemical, physiological, and biotechnological characters. According to the results obtained, most of the strains present different macro and microscopic characteristics as well as the results of the filamentation test under a microscope showed the ability of only 3 strains to form filaments. For nitrogen assimilation, it appears that the isolated strains are incapable of assimilating all the nitrogenous substrates tested, on the other hand these yeasts have different capacities for the fermentation of the sugars used (D-glucose, D-galactose, D- maltose and D-sucrose) and for the conversion of urea into ammonia, the best urease production of which is marked by strain 1. For the two physiological tests, the results obtained for growth at 37°C and resistances to NaCl show that: nine strains were successful in growing under this temperature and eleven strains were successful in resisting NaCl. The enzymatic potential of the isolates was also studied and evaluated to produce 05 different activities by the growth of yeasts on different substrates. The enzymes studied are α -amylase, pectinase, lipase, maltase and laccase. The results showed that the best performing strains for each enzyme are: α -amylase: S17, maltase: S1, lipase: S8, laccase: S17 and pectinase: S16.

According to the results of the enzymatic activity and the tests of the physiological characters, we selected 4 yeast strains (4, 7, 13, and 17) to study in vitro their antimicrobial activities against 5 bacteria and yeast by the disk diffusion method on solid agar at a temperature of 37°C for antibacterial activity and 30°C for antifungal activity. The results obtained show that most of the yeast strains have different sensitivities against the microorganisms used.

Keywords: Isolation, Identification, Yeasts, enzymatic activity, antimicrobial activity

في هذه الدراسة، نهتم بعزل وتعريف ودراسة الأنشطة البيولوجية لبعض سلالات الخميرة. أجريت العزلة باستخدام ثفل الزيتون المحصود من ولايتين: ميله وجيجل

سمحت هذه المنافذ الميكروبية بعزل 16 سلالة، والتي أظهرت نموًا جيدًا في الوسط YPGA عند 30 درجة مئوية. تم تحديد هويتهم من خلال دراسة الخصائص المورفولوجية والزراعية والكيميائية الحيوية والفيزيولوجية والبيوتكنولوجية. وفقًا للنتائج التي تم الحصول عليها، معظم السلالات لها خصائص عينية ومجهرية مختلفة، كما أظهرت نتائج اختبار تشكل الخيوط تحت المجهر قدرة 3 سلالات فقط على تكوين خيوط. لامتناس النيتروجين، يبدو أن السلالات المعزولة غير قادرة على استيعاب جميع الركائز النيتروجينية المختبرة، ومن ناحية أخرى فإن هذه الخمائر لها قدرات مختلفة لتخمير السكريات المستخدمة (د-جلوكوز، د-جالاكتوز، د-مالتوز و د. -السكروز) ولتحويل اليوريا إلى أمونيا، حيث أن السلالة 1 هي الأفضل لإنتاج لليوريا. بالنسبة للاختبارين الفيزيولوجيين، أظهرت النتائج التي تم الحصول عليها للنمو عند 37 درجة مئوية ومقاومة كلوريد الصوديوم أن: تسع سلالات كانت ناجحة في النمو تحت هذه الحرارة وإحدى عشرة سلالة كانت ناجحة في مقاومة كلوريد الصوديوم. كما تم دراسة وتقييم الإمكانيات الأنزيمية للعزلات لإنتاج 05 نشاطات مختلفة من خلال نمو الخمائر في وسائط زراعية مختلفة. الإنزيمات التي تمت دراستها هي α -amylase و pectinase و lipase و maltase و laccase. أظهرت النتائج أن أفضل السلالات أداء لكل إنزيم هي: α -amylase: S17، maltase: S1، lipase: S8، laccase: S17 و pectinase: S16.

وفقًا لنتائج النشاط الأنزيمي واختبارات الصفات الفيزيولوجية، اخترنا 4 سلالات خميرة (4، 7، 13، 17) لدراسة نشاطها المضاد للميكروبات في المختبر ضد 5 بكتيريا وخميرة بطريقة الانتشار القرصي على سطح الجيلوز عند درجة حرارة 37 درجة مئوية للنشاط المضاد للبكتيريا و 30 درجة مئوية للنشاط المضاد للفطريات. أظهرت النتائج أن معظم سلالات الخميرة لها حساسيات مختلفة تجاه الكائنات الحية الدقيقة المستخدمة.

الكلمات المفتاحية: العزلة، التحديد، الخمائر، النشاط الأنزيمي، النشاط المضاد للميكروبات

Présenté par :
Mekmouche Amina
Damous Feryal
Brika Helima

Date de soutenance : 25/06/2023

Mémoire de fin de cycle pour l'obtention du diplôme de Master en Biochimie appliquée

Intitulé : Screening, identification et activités biologiques de quelques souches levuriennes.

Résumé :

Dans cette étude, nous sommes intéressées à l'isolement, l'identification et l'étude des activités biologiques de quelques souches levuriennes. L'isolement a été réalisé à partir de grignon d'olive récoltés de deux wilayas : Mila et Jijel

Ces niches microbiennes ont permis l'isolement de 16 souches qui présentent une bonne croissance sur milieu YPGA à 30°C. Leur identification a été réalisée par l'étude des caractères morphologiques, culturels, biochimiques, physiologiques, et biotechnologiques. Selon les résultats obtenus, la plupart des souches présentent des caractéristiques macros et microscopiques différentes ainsi que les résultats du test de filamentation sous microscope a montré la capacité de 3 souches seulement à former des filaments. Pour l'assimilation d'azote, il ressort que les souches isolées sont incapables d'assimiler tous les substrats azotés testés, par contre ces levures présentent des capacités différentes pour la fermentation des sucres utilisés (D-glucose, D-galactose, D-maltose et D-saccharose) et pour la conversion de l'urée en ammoniac dont la meilleure production d'uréase est marquée par la souche 1. Pour les deux tests physiologiques, les résultats obtenus pour la croissance à 37°C et la résistance au NaCl montrent que : neuf souches ont été réussies à croître sous cette température et onze souches ont été réussies à résister au NaCl. Le potentiel enzymatique des isolats a été aussi étudié et évalué pour produire 05 activités différentes par la croissance des levures sur différents substrats. Les enzymes étudiées sont α -amylase, pectinase, lipase, maltase et laccase. Les résultats ont montré que les souches les plus performantes pour chaque enzyme sont : α -amylase : S17, maltase : S1, lipase : S8, laccase : S17 et pectinase: S16.

D'après les résultats de l'activité enzymatique et les tests des caractères physiologiques, nous avons sélectionnés 4 souches levuriennes (4, 7, 13,17) pour étudier *in vitro* leurs activités antimicrobiennes vis-à-vis 5 bactéries et une levure par la méthode de diffusion en disque sur gélose solide à une température de 37°C pour l'activité antibactérienne et de 30°C pour l'activité antifongique. Les résultats obtenus montrent que la plus part des souches levuriennes présentent des sensibilités différentes contre les microorganismes utilisés.

Mots clés : Isolement, Identification, Levures, activité enzymatique, activité antimicrobienne

Jury d'évaluation :

Présidente : Mme. RIHANI. L

Encadreur : Mme. BENSERRADJ. O

Examinatrice : Mme. AHMED GAID. K

M.C.A. Centre Universitaire de Mila.

M.C.A. Centre Universitaire de Mila.

M.C.B. Centre Universitaire de Mila

Année universitaire 2022/2023