

## ISOLEMENT, PURIFICATION ET CARACTÉRISATION DE L' $\alpha$ -AMYLASE DE LEVURES ISOLÉES À PARTIR DE POMME DE TERRE

S. BESSALEM<sup>1</sup>, F. LARABA-DJEBARI<sup>2</sup> et M. BELLAL<sup>3</sup>

- 1 - Laboratoire de Biologie Cellulaire et Moléculaire Faculté des Sciences Biologiques. USTHB.  
 2 - Laboratoire de la Recherche et Développement sur les Venins. IPA..  
 3 - Département de Technologie des Industries Agro-Alimentaires et Nutrition humaine. INA..

**Résumé :** Quatre souches de levures, *Candida tropicalis* (Ct1, Ct2 et Ct3) et *Candida guilliermondii* (Cg) ont été isolées pour leur activité  $\alpha$ -amylasique (1,4-  $\alpha$ -D-glucan glucanhydrolase, EC 3.2.1.1) à partir de la pomme de terre.

Après avoir étudié les cinétiques de croissance, la localisation de l' $\alpha$ -amylase et le système de régulation des quatre différentes souches, la souche *Candida tropicalis* (Ct1) est considérée comme la meilleure productrice d' $\alpha$ -amylase.

L'activité  $\alpha$ -amylasique de la souche *Candida tropicalis* Ct1 a été isolée et purifiée par précipitation au sulfate d'ammonium et différentes chromatographies (filtration moléculaire et échangeuse d'ions). L'analyse électrophorétique de cette enzyme révèle une homogénéité de la protéine sur gel de polyacrylamide SDS-PAGE. Cette protéine présente une masse moléculaire de 67 500  $\pm$  500 Da.

L'étude cinétique de cette activité révèle un pH optimal de 5,6 et une température optimale de 40°C. L'enzyme reste stable dans la gamme de pH 4,6 à 7,2 et perd totalement son activité à 60°C après 15 minutes d'incubation. L' $\alpha$ -amylase peut être conservée à 4°C pendant 7 jours mais pas au-delà.

**Mots clés:** Isolement, Levures amylolytiques, *Candida guilliermondii*, *Candida tropicalis*,  $\alpha$ -amylase, Production, Purification, Caractérisation.

**SUMMARY :** Four different strains yeasts, *Candida tropicalis* (Ct1, Ct2 and Ct3) and *Candida guilliermondii* (Cg) were screened for  $\alpha$ -amylase activity (1,4-  $\alpha$ -D-glucan glucanhydrolase, EC 3.2.1.1) from potatoes

After study the kinetics growth, the localisation of the  $\alpha$ -amylase and the regulation system in the four strains, the strain *Candida tropicalis* Ct1 was considered as the best producer of  $\alpha$ -amylase.

The culture supernatant of the strain *Candida tropicalis* (Ct1) was purified by ammonium sulfate fractionation, ion-exchange chromatography (DEAE-Sephadex A-50) and gel filtration (Sephadex G-25, Sephadex G-100). The purified  $\alpha$ -amylase was found to be homogenous on sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. The molecular weight of  $\alpha$ -amylases was estimated 67 000  $\pm$  500 Da.

Maximum enzyme activity occurred at 40°C and pH 5.6. The enzyme was stable at 40°C and lost 100 % of activity when it's heated for 15 min at 60°C. The enzyme was stable in the pH range 4.6-7.2 and at 4°C during 7 days.

**Key words:** Isolation, Amylolytic yeasts, *Candida guilliermondii*, *Candida tropicalis*,  $\alpha$ -amylase, Production, Purification, Characterisation.

## INTRODUCTION

Les enzymes amylolytiques dégradent de manière spécifique l'amidon, ses composants, l'amylose et l'amylopectine et ses produits de dégradation (oligosides et dextrine limite). Ces hydrolases interviennent dans les processus de digestion de l'amidon chez l'homme et les animaux. Elles participent dans les phénomènes de maturation, de germination et de transformations technologiques des plantes (en panification, brasserie etc...). Plusieurs d'entre elles sont utilisées dans l'industrie alimentaire, pharmaceutiques et textiles. Les plus importantes de ces enzymes sont l' $\alpha$ -amylase,  $\beta$ -amylase, glucoamylase (l'amyloglucosidase), isoamylase et pullulanase. Pendant longtemps, les chercheurs ont pensé qu'il n'existait pas ou peu de souches de levures capables de dégrader l'amidon. Actuellement, les levures amylolytiques sont considérées comme des micro-organismes industriels particulièrement intéressants. Malheureusement, les travaux effectués jusqu'à ce jour ne sont pas complets du fait que principalement seules des études de mise en évidence ont été réalisées. Quelques amylases de levures n'ont été purifiées et caractérisées. Nous nous sommes alors intéressés aux levures amylolytiques afin d'apporter notre contribution.

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

### 1- Isolement et sélection des levures amylolytiques

Des levures ont été isolées à partir de tranches de pomme de terre. Les colonies de levures une fois isolées sont ensuite conservées sur milieu " Yeast-Malt-Peptone-Starch " dont la composition est la suivante : extrait de levure 3 g, extrait de malt 3 g, peptone chapoteaut 5 g, amidon soluble 10 g, agar 20 g. Le pH est ajusté à 5,5.

L'aptitude des levures isolées à assimiler l'amidon est testée par la méthode de Sandhu et Coll. (1982).

### 2- Identification des levures amylolytiques sélectionnées

L'identification des levures sélectionnées repose sur l'association des méthodes classiques de Lodder (1971) et de la méthode rapide de l'Auxacolor.

### 3- Conditions de cultures des levures sélectionnées

Le milieu de production d'amylase utilisé est: l'extrait de levure 0,5 % - Amidon soluble 0,4 % - Sodium diphosphate et l'acide tartrique à 0,1 M (pH 5,5).

L'effet du glucose et du maltose sur la croissance et l'activité amylasique sont étudiés en utilisant le milieu précédent, sauf que, l'amidon est remplacé par un des deux sucres.

Un inoculum prélevé à partir du milieu de conservation des levures est ensemencé dans une fiole Erlenmeyer de 250 ml remplie au dixième de son volume par le milieu de production. Cette préculture est mise à incuber à 28°C sous agitation jusqu'à atteindre la phase exponentielle (16 à 20 heures).

La préculture ainsi préparée (1 ml) est ensemencée dans des fioles Erlenmeyer d'un litre remplies au dixième de leur volume par le milieu de production. Les cultures sont mises ensuite à agiter à 28°C jusqu'à atteindre la phase stationnaire (32 à 36 heures).

### 4- Préparation des extraits enzymatiques

Une fois les fermentations terminées, les cultures sont soumises à une centrifugation de 6000 tours/minutes pendant 10 minutes dans des conditions réfrigérées (4°C). Le surnageant contenant l'enzyme extracellulaire est récupéré et utilisé comme extrait enzymatique brut. Le culot obtenu est gardé pour le dosage de la matière sèche.

## 5- Méthodes analytiques

### a- Mesure de la croissance

La croissance des levures est évaluée par deux méthodes, la turbidimétrie et la méthode du dosage de la matière sèche (Guiraud et Galzy, 1980).

### b- Mesure de l'amidon résiduel

L'amidon résiduel est déterminé par la méthode à l'iode préconisée par Smith et Roe (1949).

### c- Dosage des activités amylasiques:

#### - Dosage de l' $\alpha$ -amylase

L'activité de l' $\alpha$ -amylase est étudiée selon la méthode de Smith et Roe (1949). Cette méthode consiste à suivre la décoloration de l'iode au cours de l'hydrolyse de l'amidon.

#### - Dosage de la glucoamylase

Le glucose libéré par l'action de la glucoamylase est déterminé selon la méthode rapportée par Wilson et Ingledew (1982).

#### - Dosage de la $\beta$ -amylase

L'activité de la  $\beta$ -amylase est étudiée selon la méthode de Bernfeld (1955) rapportée par Sandhu et Coll. (1987). Cette méthode est basée sur la mesure de l'augmentation du pouvoir réducteur (maltose) dans la solution d'amidon soluble.

### d- Dosage des protéines totales

Les protéines sont dosées selon la méthode de Lowry (1951) en utilisant la BSA comme protéine de référence.

## 6- Purification de l'amylase

La purification de l'amylase est effectuée à partir l'extrait enzymatique brut de la souche *Candida tropicalis* Ct1.

Les protéines du surnageant de la culture *Candida tropicalis* (658,8 mg) sont précipitées au sulfate d'ammonium solide à 40 %. Après centrifugation (11 000 tours/minutes pendant 30 minutes dans des conditions réfrigérées), le surnageant obtenu est reprécipité au sulfate d'ammonium solide à 80 %. Le précipité obtenu après centrifugation est dissout

dans un volume minimum de tampon d'acétate d'ammonium à 50 mM (pH 5,5).

La fraction recueillie après la précipitation au sulfate d'ammonium (225 mg) est mise à dialyser contre un tampon acétate d'ammonium 50 mM (pH 5,5), pendant 36 heures à 4°C et sous agitation.

Le dialysât (204,31 mg) est ensuite soumis à une chromatographie échangeuse d'ions sur DEAE-Sephadex A-50 (colonne Pharmacia: 55 x 2,6 cm). Il est élué avec un gradient NaCl 0-0,5 M préparé dans le tampon acétate d'ammonium à 50 mM (pH 5,5). Le débit d'élution est maintenu constant à 24 ml/heure à 4°C.

Les fractions révélant une activité amylasique sont concentrées sur Sephadex G-25.

Les protéines obtenues après concentration sur Sephadex G-25 (12,56 mg) sont soumises à une chromatographie de filtration sur Sephadex G-100 (colonne Pharmacia : 55 x 2,6 cm). Elles sont éluées à un débit de 12 ml/heure avec le tampon acétate d'ammonium à 50 mM (pH 5,5).

Les fractions révélant une activité amylasique sont poolées et lyophilisées.

## 7- Détermination des propriétés physico-chimiques de l' $\alpha$ -amylase purifiée

### a- Influence du pH sur l'activité de l' $\alpha$ -amylase

L'activité de l' $\alpha$ -amylase (5  $\mu$ g) est mesurée en faisant varier le pH du tampon entre pH 2 et pH 10 selon la méthode standard de Smith et Roe (1949).

### b- Détermination du pH de stabilité de l' $\alpha$ -amylase

L' $\alpha$ -amylase purifiée (5  $\mu$ g) est conservée à 30°C pendant 24 heures dans différent tampon à 0,05 M au pH variant de pH 2 à pH 10. L'activité résiduelle de l' $\alpha$ -amylase est ensuite mesurée selon la méthode standard de Smith et Roe (1949).

### c- Influence de la température sur l'activité de l' $\alpha$ -amylase

L'activité de l' $\alpha$ -amylase (5  $\mu$ g) est mesurée à différentes températures variant de 30°C à 60°C pendant 30 minutes dans un tampon acétate de sodium à 0,05 M (pH 5,6). L'activité de l' $\alpha$ -amylase est ensuite mesurée selon la méthode standard de Smith et Roe (1949).

### d- Stabilité thermique de l' $\alpha$ -amylase

L' $\alpha$ -amylase purifiée (5  $\mu$ g) est incubée dans un tampon acétate de sodium 0,05 M (pH 5,6) à des températures comprises entre 30°C et 60°C pendant des temps variables (0 à 30 minutes). Après refroidissement, l'activité résiduelle de l' $\alpha$ -amylase est ensuite mesurée selon la méthode standard de Smith et Roe (1949).

### e- Stabilité de l' $\alpha$ -amylase à 4°C

La stabilité de l' $\alpha$ -amylase est déterminée par incubation à 4°C l'enzyme (5  $\mu$ g) dans un tampon acétate de sodium à 0,05 M (pH 5,6) pendant 2 mois. L'activité résiduelle est ensuite déterminée selon la méthode standard de Smith et Roe (1949).

### f- Détermination de la masse moléculaire de l' $\alpha$ -amylase par SDS-PAGE

L'extrait enzymatique brut, la fraction issue de la chromatographie filtration sur Sephadex G-100 et les marqueurs protéiques dénaturés sont séparés par électrophorèse (Phast-System, Pharmacia) sur un gel de polyacrylamide à 12,5 %. La révélation des bandes est effectuée après une coloration au nitrate d'argent.

Les protéines marqueuses utilisées sont des marqueurs à faible poids moléculaire (LMW) contenant la Phosphorilase b : 94 000 ; Bovine sérum albumine : 67 000 ; Ovalbumine: 43 000; Carbonic anhydrase : 30 000 ; Soy bean trypsin inhibitor : 20 100 et  $\alpha$ -lactalbumine: 14 400.

## RÉSULTATS

### 1- Isolement et identification des levures amylolytiques

L'isolement de levures à partir de pomme de terre a permis d'isoler 35 souches. Quatre de ces souches se sont révélées positives au test d'assimilation d'amidon. Grâce à la clé dichotomique de Lodder (1971) et à la méthode Auxacolor, les levures sélectionnées ont été identifiées comme appartenant aux espèces suivantes: *Candida tropicalis* désignée comme Ct1, Ct2 et Ct3 et *Candida guilliermondii* désignée comme Cg.

### 2- Détermination du type d'activité amylosynthétique au cours de la croissance des levures amylolytiques

Les taux croissance des différentes souches de levures ont été déterminés à partir des courbes de croissance correspondantes (figure 1).

Les deux souches de *Candida tropicalis* Ct1 et Ct3 sont particulièrement intéressantes vue leur taux de croissance relativement élevé qui est respectivement de 0,231 et 0,206 h<sup>-1</sup>. Les taux de croissance des souches *Candida tropicalis* Ct2 et *Candida guilliermondii* Cg sont presque du même ordre de grandeur (0,163 et 0,173 h<sup>-1</sup>) (tableau I).

L'étude des trois types d'activités amylosynthétiques ( $\alpha$ -amylase,  $\beta$ -amylase et glucoamylase) a montré que les quatre souches de levures sélectionnées possèdent uniquement une activité  $\alpha$ -amylasique dont la sécrétion est extracellulaire.

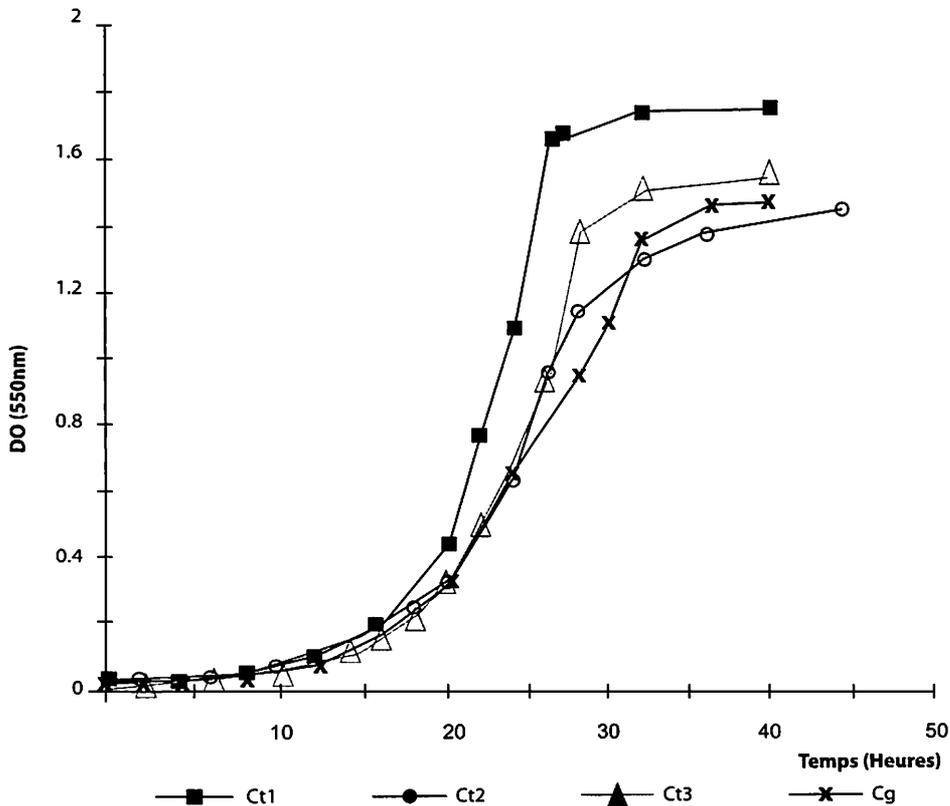
Les plus fortes activités de type  $\alpha$ -amylase ont été observées chez les souches *Candida tropicalis* Ct1 (36,9 u/ml) et Ct3 (34,95 U/ml). Les deux autres souches *Candida tropicalis* Ct2 et *Candida guilliermondii* Cg ont des activités plus faibles. Une plus forte variation de pH chez ces même souches a été également constatée (tableau I).

Les résultats obtenus montrent que les deux souches *Candida tropicalis* Ct1 et Ct3 hydrolysent plus de 90 % de l'amidon et possèdent de forte concentration en biomasse.

Les souches *Candida tropicalis* Ct2 et *Candida*

*guilliermondii* Cg hydrolysent plus de 70 % d'amidon avec un taux de biomasse plus faible par rapport aux deux précédentes souches (tableau I).

#### Etude des cinétiques de croissance des souches de levures sélectionnées.



**Figure 1 :** Courbes de croissance des souches *Candida tropicalis* (Ct 1, Ct 2 et Ct 3) et *Candida guilliermondii* (Cg) cultivées sur milieu Extrait de levure-Amidon-tampon sodium diphosphate et l'acide tartrique (0,1 M, pH 5,5) à 28°C et sous agitation.

**Tableau I :** Détermination de la croissance, l'amidon résiduel et l'activité  $\alpha$ -amylasique des quatre levures sur milieu " Extrait de levure - amidon soluble - tampon sodium diphosphate et l'acide tartrique " à 0,1 M pH 5,5.

	Taux de croissance h <sup>-1</sup>	Densité optique finale	pH final	Matière sèche g/l	Activité $\alpha$ -amylasique u/ml	Amidon résiduel g/l	Taux d'amidon consommé%
<i>Candida tropicalis</i> Ct1	0,231	1,74	5,7	1,844	36,9	0,318	92,05
<i>Candida tropicalis</i> Ct2	0,163	1,45	6	1,636	10,33	1,05	73,75
<i>Candida tropicalis</i> Ct3	0,206	1,56	5,8	1,736	34,95	0,376	90,6
<i>Candida guilliermondii</i> Cg	0,173	1,48	6	1,632	12,6	1,182	70,45

### 3- Etude de l'influence des sucres sur la croissance et l'activité amylasique extracellulaire :

Les taux de croissance chez les souches de levures *Candida tropicalis* (Ct1, Ct2 et Ct3) et *Candida guilliermondii* Cg sont très voisins pour les sources de carbone provenant soit du glucose ou soit du maltose. Quand il s'agit de l'amidon comme source de carbone, le taux de croissance et de biomasse est toujours plus faible (tableau II).

D'après ces résultats, il est constaté qu'en présence de glucose, l'activité  $\alpha$ -amylase extracellulaire chez les souches Ct1, Ct2, Ct3 et Cg est quasiment nulle. Cependant, lors de la croissance de ces souches sur maltose, la biosynthèse de l'enzyme représente plus de 70 % du maximum obtenu après culture sur amidon soluble (tableau II).

### 4- Purification de l' $\alpha$ -amylase extracellulaire de la souche *Candida tropicalis* Ct1:

La souche *Candida tropicalis* Ct1 sélectionnée parmi les quatre souches est la meilleure productrice d'activité  $\alpha$ -amylasique dans nos conditions choisies. C'est pourquoi nous avons procédé à l'isolement et la purification de cette enzyme.

La précipitation au sulfate d'ammonium (40 % puis 80 %) du surnageant de la culture *Candida tropicalis* Ct1 a permis d'éliminer une partie des protéines contaminantes, d'obtenir une activité de 76,55 % par rapport à l'activité initiale et de multiplier par un facteur 2,24 l'activité spécifique de l'extrait (tableau III).

Le profil chromatographique sur DEAE-Sephadex A-50 de l'extrait brut précipité au sulfate d'ammonium révèle trois pics d'absorption bien distincts les uns des autres. Le test d'activité  $\alpha$ -amylasique des différentes fractions montre que cette dernière se retrouve dans le pic 2 (figure 2).

La chromatographie sur Sephadex G-100 de la fraction  $\alpha$ -amylasique concentrée révèle deux pics d'absorption. Le test d'activité  $\alpha$ -amylasique pratiquée sur les deux fractions ont montré que seul le premier pic d'élution contenait l' $\alpha$ -amylase (figure 3).

Tableau II : Détermination de la croissance et l'activité  $\alpha$ -amylasique des souches de levure sur différentes sources carbonées.

Souches	Amidon soluble					Glucose					Maltose				
	$\mu$ h <sup>-1</sup>	DO finale	pH final	M.S g/l	Activité u/ml	$\mu$ h <sup>-1</sup>	DO finale	pH final	M.S g/l	Activité u/ml	$\mu$ h <sup>-1</sup>	DO finale	pH final	M.S g/l	Activité u/ml
<i>Candida tropicalis</i> Ct1	0,231	1,74	5,7	1,844	36,9	0,394	2,04	5,8	1,995	0	0,377	1,937	5,8	1,923	27,52
<i>Candida tropicalis</i> Ct2	0,163	1,45	6	1,636	10,33	0,22	1,785	6	1,849	0	0,21	1,537	6	1,786	7,85
<i>Candida tropicalis</i> Ct3	0,206	1,56	5,8	1,736	34,95	0,306	1,965	5,8	1,955	0	0,246	1,868	5,9	1,852	25,16
<i>Candida guilliermondii</i> Cg	0,173	1,48	6	1,632	12,6	0,246	1,823	6,1	1,835	0	0,214	1,733	6,1	1,796	9,46

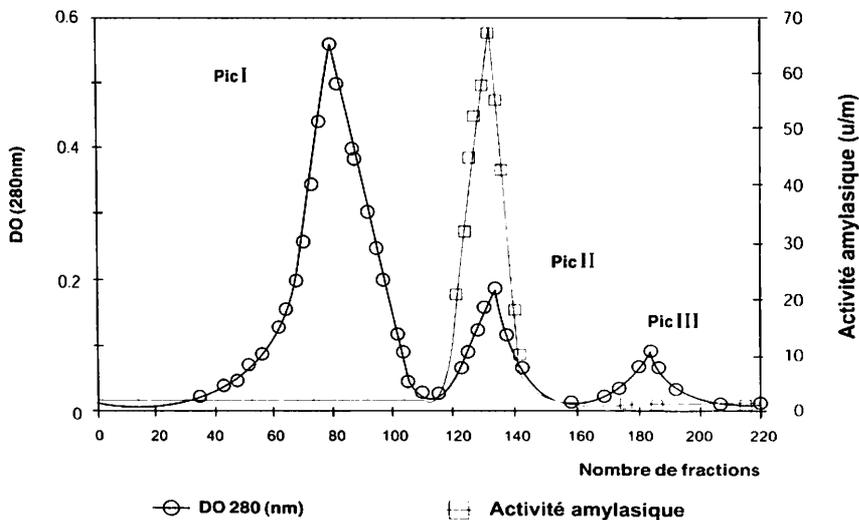
$\mu$  : taux de croissance, DO : densité optique, M.S : matière sèche.

**Tableau III** : Différentes étapes de purification de l' $\alpha$ -amylase extraite de la souche *Candida tropicalis* Ct1.

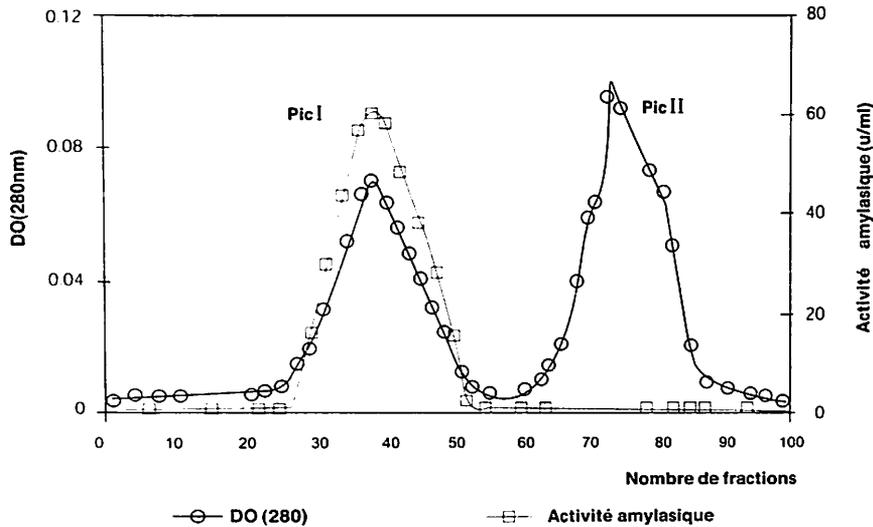
Étapes de la purification	Volume total ml	Activité totale U	Protéine totale mg	Activité spécifique U/mg de protéine	Rendement %	Degré de purification Fois
Extrait brut (surnageant de la culture Ct1)	600	22104	658,8	33,55	100	1
Précipitation au sulfate d'ammonium 40-80%	15	16921,5	225	75,2	76,55	2,24
Dialyse	15	16656,3	204,31	81,52	75,35	2,42
Echangeuse d'ion (fractions poolées)	75	4830	15	322	21,85	9,59
Concentration sur G-25	3,8	4214,10	12,56	335,51	19,06	10
Gel filtration (fractions poolées)	50	2976,5	2,5	1190,6	13,5	35,48

82

Revue semestrielle, n°9 Décembre 2001



**Figure 2** : Chromatographie échangeuse d'ions sur DEAE-Sephadex A-50 et détermination de la fraction contenant l' $\alpha$ -amylase, (Colonne 2,5 x 56 cm, gradient Na Cl 0 à 0,5 M/l pH 5,5 préparé dans le tampon d'éluion acétate d'ammonium 50 mM pH5,5. Débit d'éluion : 24 ml/heure).



**Figure 3 :** Chromatographie de filtration sur Sephadex G-100 et détermination de la fraction contenant l' $\alpha$ -amylase. (Colonne 2,5 x 56 cm, Tampon d'élution acétate d'ammonium 50 mM pH 5,5. Débit d'élution : 12 ml/heure).

L'étude des résultats fait apparaître que la purification a permis une augmentation de l'activité spécifique de 33,55 U/mg dans l'extrait enzymatique brut à 1190,6 U/mg dans le produit final, c'est à dire qu'elle a augmenté 35,48 fois. Il est constaté à la fin de la purification que 13,5 % de l'activité initiale est récupérée (tableau III).

La purification de l'extrait brut de la culture *Candida tropicalis* Ct1 a permis d'éliminer toutes les protéines contaminantes contenues dans l'extrait brut de départ pour ne garder que l'enzyme recherchée. Ceci a été vérifié par séparation électrophorétique sur gel de polyacrylamide (figure 4).

La masse moléculaire de l' $\alpha$ -amylase déterminée par électrophorèse SDS-PAGE est estimée à  $67\ 000 \pm 500$  Da.

### 5- Détermination des propriétés physico-chimiques de l' $\alpha$ -amylase purifiée

#### a- Influence du pH sur l'activité de l' $\alpha$ -amylase

La variation de l'activité  $\alpha$ -amylasique de la réaction en fonction du pH donne une courbe en cloche avec un optimum à pH 5,6. L'activité de l' $\alpha$ -amylase diminue à 27 % et 50 % de l'activité maximale à pH 4 et pH 7, respectivement. Les pH d'arrêt de la réaction sont voisins des pH 3 et pH 8 (figure 5).

#### b- Détermination du pH de stabilité de l' $\alpha$ -amylase

Les résultats obtenus montrent que le pH de stabilité de l' $\alpha$ -amylase se situe entre 4,6 et 7,2 et qu'au pH très extrême l'activité s'annule (figure 6).

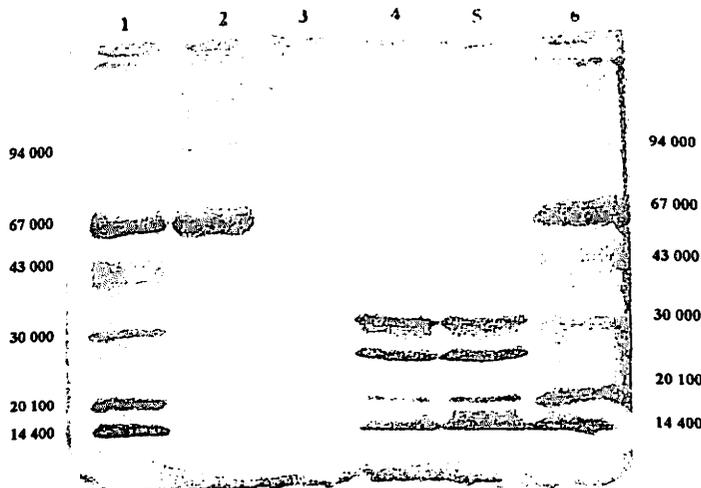
#### c- Influence de la température sur l'activité de l' $\alpha$ -amylase

Les résultats obtenus montrent que l'activité de la réaction augmente pour atteindre une valeur optimale à 40°C. Au-dessus de 40°C, l'activité décroît rapidement pour atteindre 30 % d'activité maximale à 50°C et une activité quasiment nulle à 60°C (figure 7).

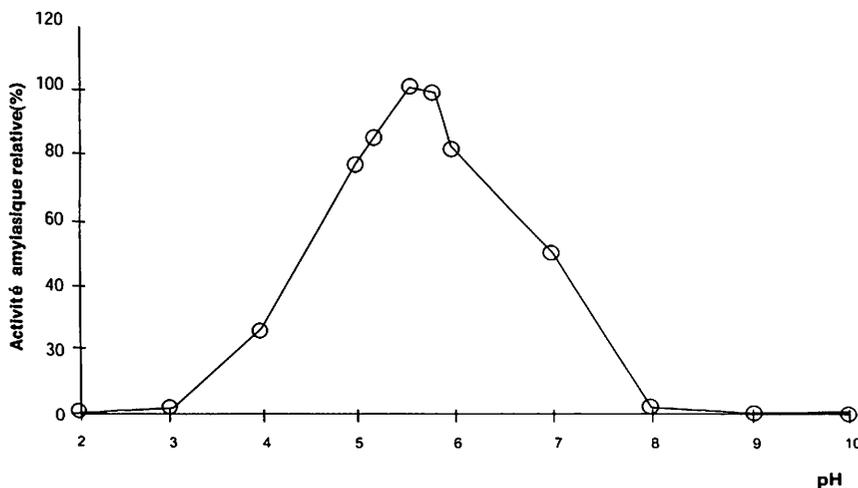
**d- Stabilité thermique de l' $\alpha$ -amylase**

Il apparaît d'après les résultats qu'à 40°C, aucune perte d'activité n'a été observée. L'inactivation de l' $\alpha$ -amylase aux tempéra-

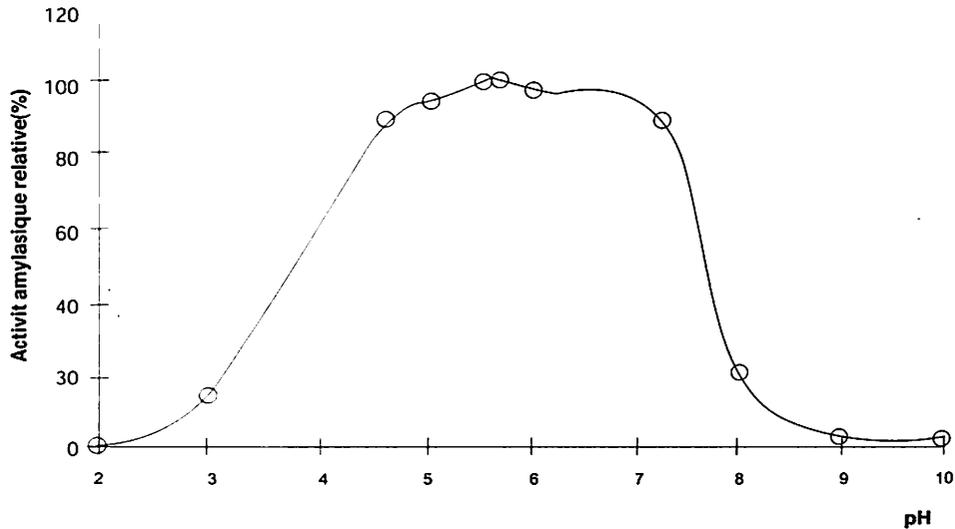
tures élevées apparaît à partir de 50°C. Après un traitement de 15 minutes à 60°C, il y'a une perte d'activité de l'ordre de 96 % (figure 8).



**figure 4 :** Electrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de dodécyl sulfate de sodium. **Piste 1 et 6 :** marqueurs de protéine LMw, **piste 2 :** **piste 3 :** fraction  $\alpha$ -amylasique issue de la chromatographie filtration sur Sephadex G 100, **piste 4 et 5** extrait brut de la culture *Candida tropicalis*(Ct 1). **Marqueurs de protéine LMW :** Phosphorylase b : 94 000 ; Bovine sérum albumin : 67 000 ; Ovalbumine : 43 000 ; Carbonic anhydrase 30 000 ; Soy bean trypsin inhibitor : 20 100 et  $\alpha$ -lactalbumine : 14 400.

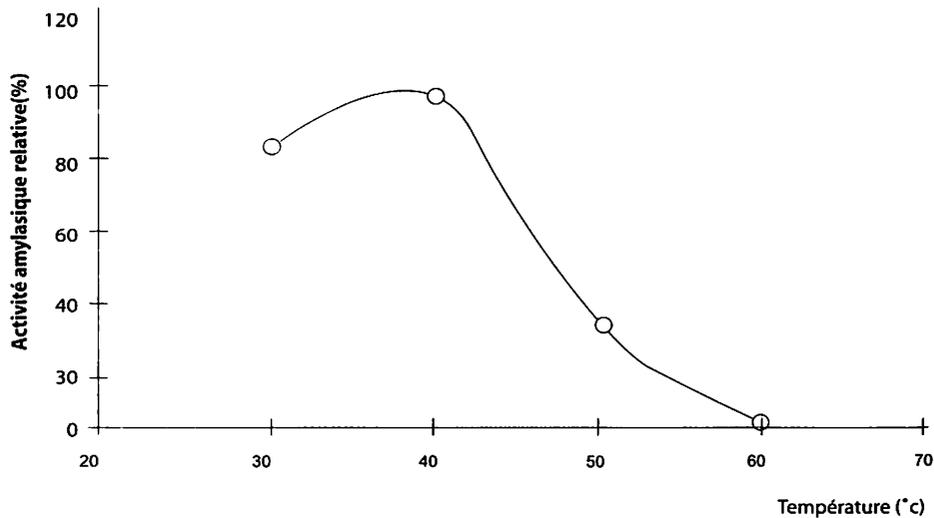


**Figure 5 :** Détermination du pH optimum de l'activité de l' $\alpha$ -amylase purifiée issu de la souche *candida tropicalis* ct 1. Conditions de réactions : amidon soluble 1,2%, enzyme (5 $\mu$ g), température 40°C pendant 30 min, pH2-6 : Tampon acétate de sodium, pH 5,7-5,9 : tampon phosphate sodium, pH 7-10 : tampon Tris-HCL.



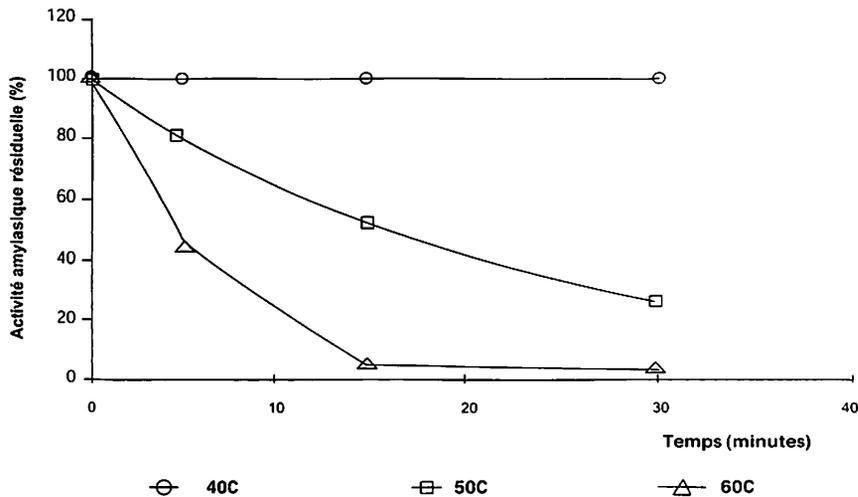
**Figure 6 :** Détermination du pH de stabilité de l'activité de l' $\alpha$ -amylase purifiée issue de la souche *Candida tropicalis* Ct 1.

Conditions de réactions : amidon soluble 1,2%, enzyme (5 $\mu$ g), température 40°C pendant 30 min, pH 2-6 : tampon acétate de sodium, pH 5,7-7,9 : tampon phosphate sodium, pH 7-10 : tampon Tris-HCL).



**Figure 7 :** Détermination de la température optimale de l'activité de l' $\alpha$ -amylase purifiée issue de la souche *Candida Tropicalis* Ct 1.

conditions de réactions : amidon soluble 1,2 %, enzyme ( 5 $\mu$ g ), température 30-40-50-60 °C pendant 30 min, tampon acétate de sodium 0,05 M ( pH 5,6 ).



**Figure 8 :** Détermination de la stabilité thermique de l' $\alpha$ -amylase purifiée issue de la souche *Candida tropicalis* Ct 1  
**Conditions de réactions :** amidon soluble 1,2% enzyme (5 $\mu$ g), température 40°C pendant 30 min, tampon acétate de sodium 0,05 M (pH 5,6).

**e- Stabilité de l' $\alpha$ -amylase à 4°C**

Toute l'activité de l' $\alpha$ -amylase est conservée à 4°C pendant 7 jours. Après 15 jours et 30 jours, il y'a une perte d'activité respectivement de 50 % à 80 %. La perte d'activité est pratiquement totale après 60 jours (figure 9).

**DISCUSSION**

La différence de croissance entre les quatre souches sélectionnées, notamment en ce qui concerne le taux de croissance pourrait être lié aux capacités qu'ont chacune des souches à s'adapter et à utiliser les éléments nutritifs du milieu.

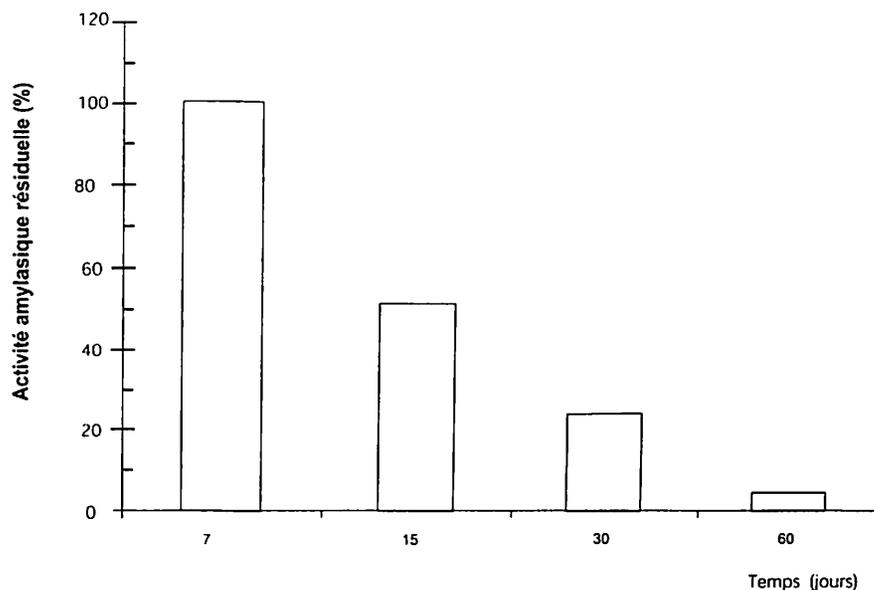
Les taux de croissance élevés des souches *Candida tropicalis* Ct1 et Ct3 dénotent une bonne assimilation du substrat utilisé. Les plus faibles taux de croissance obtenus peuvent être dus aux paramètres physico-chimiques, liées aux caractéristiques du milieu de culture et aux conditions de culture.

La mesure de l'activité  $\beta$ -amylasique et glucoamylasique est quasiment nulle chez les quatre souches de levures. En revanche, la mesure de l'activité  $\alpha$ -amylasique chez les

quatre souches a permis de constater que l'hydrolyse de l'amidon était très rapide se traduisant par une perte brutale de la coloration à l'iode. Cette décoloration ne peut s'expliquer que par une attaque à l'intérieur de la chaîne d'amidon. Selon Moulin (1977) et Bergmann et Coll. (1988), ce schéma est généralement considéré comme étant caractéristique d'une endoenzyme, c'est à dire une  $\alpha$ -amylase.

La présence d' $\alpha$ -amylase extracellulaire chez *Candida tropicalis* a été également signalée par De Mot et Coll. (1984). Par contre, Sandhu et Coll. (1987) ont noté que sur milieu Yeast Nitrogen Base-amidon soluble, une souche de *Candida tropicalis* excrète une  $\alpha$ -amylase et une  $\beta$ -amylase extracellulaire. Azoulay et Coll. (1980) ont constaté que sur milieu à base de manioc, une souche de *Candida tropicalis* produit une  $\alpha$ -amylase intracellulaire.

Ces différences semblent provenir de la variabilité du patrimoine génétique des souches utilisées mais aussi des plusieurs conditions expérimentales employées et des différents milieux de croissance utilisés.



**Figure 9 :** Détermination de la stabilité de l'activité  $\alpha$ -amylasique issue de la souche *Candida tropicalis* C1 au cours de la conservation à 4°C.

**Conditions de réactions :** amidon soluble 1,2%, enzyme (5 $\mu$ g), température 40°C pendant 30 min, tampon acétate de sodium 0,05 M (pH 5,6).

Le taux de croissance sur milieu contenant glucose ou maltose chez toutes les levures est généralement nettement supérieure par rapport à l'amidon. La structure de l'amidon serait certainement un facteur limitant la vitesse de croissance. Certaines souches telles que *Pichia burtonii* (Moulin, 1977), *Filobasidium capsuligenum* (De Mot et Verachtert, 1985) et *Saccharomycopsis fibuligera* (Gogoi et Coll., 1987) montrent également que l'amidon n'est pas aussi bien utilisé par rapport au glucose et au maltose.

L'activité  $\alpha$ -amylasique légèrement supérieure en culture sur amidon qu'en culture sur maltose semble montrer que l'amidon est inducteur. Par contre, le glucose accélère la croissance mais réprime la synthèse d'amylase. D'après Sen et Charkrabarty (1984), l'inhibition de la biosynthèse d' $\alpha$ -amylase par des sucres facilement métabolisables est observée généralement chez tous les micro-organismes produisant des enzymes extracellulaires.

Les différentes étapes de purification utilisées ont permis d'éliminer les protéines contaminantes contenues dans l'extrait enzymatique brut et de récupérer des fractions contenant une activité  $\alpha$ -amylasique.

De Mot et Coll. (1985) ont obtenu dans les mêmes conditions que les nôtres une  $\alpha$ -amylase purifiée à partir d'une souche *Filobasidium capsuligenum* avec un rendement d'activité de 38,3 % et une activité spécifique qui a augmenté 216 fois par rapport à l'initiale. Wilson et Ingledew (1982) ont obtenu une  $\alpha$ -amylase purifiée à partir de la souche *Schwanniomyces alluvius* avec un rendement de 17,1 % et une activité spécifique qui n'a augmenté que de 16 fois.

Il semblerait que la faible activité spécifique notée dans notre cas peut être due en partie à la perte d'une plus grande quantité d'activité au cours du processus de purification.

Une purification élevée des extraits enzymatiques permettant d'obtenir des préparations riches en enzymes amylasiques et sans perte d'activité est très difficile, car la labilité des enzymes, leur faible concentration et la présence de multiples substances contaminantes ou dénaturantes constituent des inconvénients majeurs.

Le profil électrophorétique en gel de polyacrylamide SDS-PAGE et la forme du pic issu de la chromatographie filtration sur Sephadex G-100 montrent que l' $\alpha$ -amylase obtenue à partir de la souche *Candida tropicalis* Ct1 est homogène. Cependant, il est important de signaler, qu'il existe de nombreux exemple de protéines homogènes dans un test et hétérogène dans un autre.

L'électrophorèse a permis également d'estimer la masse moléculaire de l'enzyme à  $67\ 000 \pm 500$  Da. De Mot (1990) a rapporté pour les  $\alpha$ -amylases des levures ont des masses moléculaires comprises entre 38 000 et 80 000 Da.

La diminution d'activité de l' $\alpha$ -amylase due aux variations de pH voisin du pH optimal est due probablement à une modification de l'ionisation du substrat et/ou à la modification de l'ionisation de l'enzyme. Ceci a pour conséquence de modifier l'affinité de l'enzyme pour son substrat. Par contre, la perte d'activité totale de l' $\alpha$ -amylase dans les pH extrêmes correspond à une dénaturation et une ionisation irréversible de l'enzyme.

Les valeurs optimales de pH pour la plupart des  $\alpha$ -amylases de levures sont de l'ordre de 3,5 à 6,3. Moulin (1977) a déterminé un pH optimum de 4 pour un extrait enzymatique brut de *Candida tropicalis*, alors qu'Azoulay et Coll (1980) ont noté un pH optimum de 5,6. Le pH optimal d'une enzyme donnée n'est pas une constante physique rigide et fixe. Il est susceptible de varier avec son origine, avec le substrat et sa concentration, la durée de la réaction et la présence de substance associée.

La diminution d'activité de l' $\alpha$ -amylase constatée aux températures supérieures à l'optimales est due à l'inactivation de l'enzyme par dénaturation. D'après Pelmont (1993), au-delà de la température optimale, il y'a rupture des liaisons non covalentes, désagrégation des structures secondaires et tertiaires. Ce phénomène est irréversible ou partiellement réversible si la dénaturation s'effectue dans des conditions particulièrement douces.

La température optimale d'activité des  $\alpha$ -amylases des levures est généralement située entre 40 et 50°C. Néanmoins, des activités  $\alpha$ -amylases ayant une température optimale supérieure à 60-70°C sont sécrétées par *Candida antarctica* (De Mot, 1990), *Lipomyces starkeyi* (Kelly et Coll., 1985) et *Saccharomycopsis fibuligera* (De Mot et Verachtert, 1985).

## CONCLUSION

L'étude que nous avons entreprise montre qu'il serait possible d'utiliser ces souches amylolytiques directement sur amidon, par exemple sur les déchets et les sous produits d'une usine de transformation de pomme de terre.

Ces applications ne prendront néanmoins leur plein effet que dans la mesure où certains aspects de la production des amylases et la caractérisation biochimique de ces levures seront parfaitement maîtrisés.

Il serait intéressant d'envisager la possibilité d'utiliser l' $\alpha$ -amylase de *Candida tropicalis* Ct1 sous forme immobilisée ou bien utiliser les cellules entières (levures) comme biocatalyseurs. Ceci permettrait d'éviter les étapes d'extraction, purification et fixation de l'enzyme.

## REMERCIEMENTS

A l'ensemble des chercheurs et techniciens du service de Parasitologie-Mycologie de

l'Institut Pasteur d'Algérie et plus particulièrement le professeur Belkaid M. ; Mme Kellou D. ; Melle. Bencherifa S. et Mme Mehzoul D.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- **AZOULAY E., JOUANNEAU F., BERTRAND J.C., RAPHAEL A., JANSSENS J. and LEBEAULT J.M., (1980).** Fermentation methods for protein enrichment of cassava and corn with *Candida tropicalis*. Applied and Environmental Microbiology 39, 1, pp.41-47.
- **BERGMANN F.W., ABE J.I. and HIZUKURI S., (1988).** Selection of micro-organisms which produce raw-starch degrading enzymes. Applied Microbiology and Biotechnology 27, pp.443-446.
- **DE MOT R., ANDIES K. and VERACHTERT H., (1984).** Comparative study of starch degradation and amylase production by Ascomycetous yeast species. Systematic Applied Microbiology 5, 1, pp.106-118.
- **DE MOT R. and VERACHTERT H., (1985).** Purification and characterisation of extracellular amylolytic enzymes from the yeast *Filobasidium capsuligenum*. Applied and Environmental Microbiology 50, 6, pp.1474-1482.
- **DE MOT R., (1990).** Conversion of starch by yeasts. In De Mot R. and Verachttert H. "Yeast-Biotechnology and biocatalysis". Systematic Applied Microbiology 5, pp.421-432.
- **GOGOI B.K., BEZBARUAH R.L., PILLAI K.R. and BARUAH J.N., (1987).** Production, purification and characterisation of an  $\alpha$ -amylase produced by *Saccharomycopsis fibuligera*. Journal of Applied Bacteriology 63, pp.373-379.
- **GUIRAUD J. et GALZY P., (1980).** L'analyse microbiologique dans les industries alimentaires. Edition usine nouvelle, Paris, pp.53-98.
- **KELLY C.T., MORIARTY M.E. and FOGARTY W.M., (1985).** Thermostable extracellular  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase of *Lipomyces starkeyi*. Applied Microbiology and Biotechnology 22, pp.352-358.
- **LODDER J., (1971).** The yeasts, a taxonomic study. Edition North Holland, Amsterdam, Londres, pp.34-107.
- **LOWRY O.H., ROSEBROUGH N.J., FARR A.L. and RANDALL R.J., (1951).** Protein measurement with the Folin phenol reagent. J.Biol.Chem. 193, 265-275.
- **MOULIN G.J., (1977).** Etude de l'activité amylasique de quelques levures. Mémoire de Docteur Ingénieur- Université des Sciences et Techniques du Languedoc, p 140.
- **PELMONT J., (1993).** Enzymes. Edition Office des Publications Universitaires, p 605.
- **SANDHU D.K., VILKHU K.S. and SONI S.K., (1987).** Production of  $\alpha$ -amylase by *Saccharomycopsis fibuligera* Syn. *Endomycopsis fibuligera*. Journal of Fermentation and Technology 65,4, pp. 387-394.
- **SEN S. and CHARKRABARTY S.L., (1984).** Amylase from *Lactobacillus cellobiosus* isolated from vegetable wastes. Journal of Fermentation and Technology 62,5, pp.407-413.
- **SMITH B.W. and ROE J.H.J., (1949).** A photometric method for the determination of  $\alpha$ -amylase in blood urine with use of the starch iodine color. J.Biol.Chem. 7, p.53.

- **WILSON J.J. and INGLEDEW M., (1982).**  
Isolation and characterisation of  
*Schwanniomyces alluvius* amylolytic enzymes.  
Applied and Environmental Microbiology  
44, 2, pp.301-307.