

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Aboubekr Belkaid de Tlemcen
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et Sciences de la Terre et de l'Univers
Département de Biologie
Laboratoire de Recherche de Chimie Organique, Substances Naturelles et Analyses (COSNA)



Mémoire

En vue d'obtenir le diplôme de

Master en Science Biologique

Spécialité : Microbiologie fondamentale



Thème

**Contribution à l'étude de l'activité enzymatique de l'invertase extraite
de *Saccharomyces cerevisiae* et *Saccharomyces boulardii***

Présenté par : **Melle Dalila Abdarrahim**
Melle Nabia Bekrit

Soutenu le : 30 juin 2020, devant le jury composé de :

Mr. RAHMOUN Mohamed Nadjib	Maître de Conférences A	Président
Mr. SENOUCI BEREKSI Mohamed	Maître de Conférences B	Examineur
Mme. LEMERINI Wafaa	Maître de Conférences B	Rapporteur

Année Universitaire : 2019-2020

Remerciement

Nous tenons à exprimer notre profonde et sincère gratitude à tous ceux qui, de près ou de loin, ont œuvré pour la réalisation de ce travail.

Notre gratitude s'adresse à notre directrice de mémoire, Mme SEBAA née LEMERINI Wafaa, de nous avoir encadrées, orientées, aidées et conseillées tout au long de la réalisation de ce travail.

On remercie vivement Monsieur RAHMOUN Mohamed Nadjib, Maître de Conférences A, au département de biologie à l'université Aboubekr Belkaid de Tlemcen, qui nous a fait l'honneur d'accepter de présider notre jury.

Nous tenons à remercier également Mr. SENOUCI BEREKSI Mohamed, Maître de Conférences B, au département de biologie à l'université Aboubekr Belkaid de Tlemcen, d'avoir accepté d'examiner ce modeste travail.

Nous remercions aussi tous le personnel du laboratoire de Chimie Organique, Substances Naturelles et Analyses (COSNA) à l'université Aboubekr Belkaid de Tlemcen; essentiellement Mr Djamel BENDIABDALLAH pour ses concours précieux au cours du déroulement de ce travail.

Nous saisissons également cette occasion pour remercier tous les enseignants de notre cursus universitaire du département de biologie ainsi que tous les enseignants de notre parcours scolaire.

Dédicace

Toutes les lettres ne sauraient trouver les mots qu'il faut . . . Tous les mots ne sauraient exprimer la gratitude, l'amour, le respect, la reconnaissance. . . Aussi, c'est tout simplement que nous dédions ce projet de fin d'études...

Grace à l'aide de Dieu j'ai pu réaliser ce modeste travail que je dédie :

A mon père mon exemple éternel qui m'a toujours soutenu et aidé;

A ma très chère mère la source de mes efforts qui m'a donné la tendresse et le courage;

A ma chère sœur et mes chers frères, sur qui j'ai pu compter et me ressourcer d'affection pour continuer ce mémoire;

A mon encadreur Mme Sebaa née Lemerini wafaa que j'admire beaucoup;

A mon amie M^{elle} Abderrahim Dalila pour la gentillesse et la compréhension dont j'ai trouvé en elle;

A toute la famille Bekrit, Benamara;

A tous mes ami(e)s : Maroua, Samah, Abdelhafid, Chems eddine, Amine, Abd elhak, Hamza, Imed, pour tous les moments que nous avons partagés;

A toute la promotion de master Microbiologie Fondamentale 2019/2020;

A toutes les personnes que j'aime.

B. Nabia

Dédicace

Je dédie ce travail aux êtres qui me sont les plus chers :

A celui qui m'a toujours encouragé soutenu durant toutes mes années d'études. Merci pour ton amour et ta confiance totale ...A toi très cher papa;

A celle qui m'a arrosé de tendresse et d'espairs, qui ma bénie par ces prières a toi chère maman;

A la mémoire de ma grand-mère (maternelle) et mon grand père (paternelle);

A mes chères sœurs pour leurs encouragements permanents, et leur soutien moral;

A mes deux petits frères;

A mes cousines chéries qui ont toujours été là pour moi;

A mon entourage familial (la famille Abderrahim et Ghorzi et Belmokhtar);

A mes très chers amis que j'aime beaucoup

A ma motivante, mon binôme, mon amie Bekrit Nabia et sa famille;

A toute la promotion de master Microbiologie Fondamentale 2019/2020;

Et à tous qui me sont chers et me portent dans leurs cœurs.

A. Dalila

Table des matières

Introduction	2
Chapitre I : Rappels théoriques	4
I- <i>Saccharomyces Cerevisiae</i>	5
I.1. Généralités.....	5
I.2. Définition.....	6
I.3. Classification.....	6
I.4. Morphologie.....	7
I.5. Reproduction.....	7
I.6. Caractères biochimiques.....	8
I.7. Conditions de culture.....	9
I.8. Besoins nutritionnels.....	9
I.9. Applications industrielles.....	10
II- <i>Saccharomyces boulardii</i>	11
II .1- Généralités.....	11
II .2- Définition.....	11
II 3- Classification.....	12
II .4- Morphologie, Structure, Composition chimique.....	13
II 5- Les probiotiques.....	13
II .6- Le microbiote intestinale.....	13
III- L'invertase.....	15
III.1- Généralités.....	15
III.2- Définition.....	15
III.3- Source et localisation.....	16
III.4- Structure.....	16
III.5- Le substrat.....	17
III.6- Mode d'action de l'invertase.....	17
III.7- Production de l'invertase par fermentation.....	19
III.8- Facteurs influençant l'activité enzymatique de l'invertase.....	19
III.8.1. Facteurs physicochimiques.....	19
III.8.1. Facteurs chimiques.....	20
III.9- Intérêt et applications de l'invertase.....	20

Chapitre II : Matériel et Méthodes	21
I. Principaux réactifs utilisés.....	22
II. Préparation de l'extrait de l'invertase de levure.....	23
II.1. Protocole d'extraction de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	23
II.2. Protocole d'extraction de <i>Saccharomyces boulardii</i>	23
III. Dosage des protéines par la méthode du biuret.....	25
III.1. Principe.....	25
III.2. Préparation de la gamme d'étalonnage.....	25
III.3. Détermination de la concentration protéique des extraits enzymatiques.....	26
IV. Dosage des sucres réducteur.....	28
IV.1. Principe	28
IV.2. Préparation de la gamme d'étalonnage.....	28
V. Détermination de l'activité enzymatique de l'invertase de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> et <i>Saccharomyces boulardii</i>	30
V.1. Détermination de la vitesse initiale de la réaction d'hydrolyse du saccharose par l'invertase	31
V.2. Détermination de l'activité enzymatique volumique.....	31
V.3. Détermination de l'activité enzymatique spécifique.....	32
Chapitre III : Résultats et discussion	34
I. Recherche de l'activité « invertase » dans la préparation enzymatique.....	35
II. Mesure des activités volumique et spécifique de l'invertase dans les deux extraits.....	36
III. Comparaison entre les activités enzymatiques des deux extraits de levures.....	37
IV. Effet du pH et de la température sur l'activité enzymatique.....	38
IV.I. Effet du pH.....	38
IV.II. Effet de la température.....	38
Chapitre 4 : Conclusion et Perspectives	41
Références bibliographiques	43
Annexe	52
I. Préparation du réactif du biuret	53
II. Préparation du tampon acéto-acétique	53
III. Composition du réactif de l'acide 3,5-dinitrosalicyclique (DNSA)	53
IV. Structure du glucose, du fructose et du saccharose	54
Résumés	55

Liste des abréviations

% : Pourcentage

α : Alpha

β : Béta

λ : Lamda (longueur d'onde)

μm : Micro-mètre

$^{\circ}\text{C}$: Degré Celsius

μm : Micro-mètre

(V/V) : Volume/volume (adimensionnel)

A : Absorbance (adimensionnel)

Asn : Asparagine

Asp : Aspartate

BSA : Bovin sérum albumine

CO₂ : Dioxyde de carbone

DNSA : Acide 3,5- dinitrosalicylique

DO : Densité optique

E_a : Energie d'activation

EC : Enzyme Commission

ES : Complexe enzyme-substrat

et al. : et autres auteurs

FAO: *Food and Agriculture Organisation of the United Nations*

g: Gramme

Glu : Glutamate

Kb : Kilobase

KDa Kilodalton

KJ : Kilojoule

KM : Constante de Michaelis

l: Litre

Ln : Logarithme népérienne

M : Concentration molaire (mol/l)

ml: Millilitre

nm: Nanomètre

ORF: Open reading frame

S.boulardii: Saccharomyces boulardii

S.cerevisiae: Saccharomyces cerevisiae

T : Température absolue (K)

t: Temps (seconde, minute ou heure)

T : Température (°C)

Tr : Tour

UI : Unité internationale

Vin : Vitesse initiale

Vmax : Vitesse maximale

Table des figures

Figure 1 : Représentation idéalisée d'une cellule de levure (Thuriaux, 2004).....	5
Figure 2 : <i>Saccharomyce cerevisiae</i> sous microscopie électronique (Tortora et al.2003).....	6
Figure 03 : Micrographie de la <i>SaccharomycesCerevisiae</i> (Tortora et Anagnostakos, 1987)...	7
Figure 04 : Bourgeonnement de l'espèce <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Guiraud et Galzy, 1980)..	7
Figure 05 : Cycle biologique de la levure <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Larpen, 1991).....	8
Figure 06 : Micrographie de la <i>Saccharomyces boulardii</i> (Rampal, 1996).....	12
Figure 07 : Réaction d'hydrolyse du saccharose par l'invertase (Dides et Fabre, 2007).....	16
Figure 08 : Structure du saccharose (Decloux, 2002).....	17
Figure 09 : Mécanisme catalytique de l'invertase de levure (Reddy et Maley, 1996).....	18
Figure 10 : Courbe d'étalonnage pour le dosage des protéines par la méthode du biuret.....	26
Figure 11 : Réduction de l'acide 3,5 dinitro-salicylique par un sucre réducteur lors du dosage de sucre par la méthode DNSA (Maktouf, 2013).....	28
Figure 12 : Droite d'étalonnage pour le dosage des sucres réducteur (Absorbance = 0,0535 X [Sucre inverti] ; $r^2= 0,9976$).....	29
Figure 13 : Cinétique d'hydrolyse du saccharose en présence (◆) et en absence (▲) d'extrait enzymatique de l'invertase de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ([Saccharose]=0,1 M ; dilution de l'enzyme 1/150 (V/V) ; tampon acétate 0,1M - pH4, 6 ; 25°C).....	34
Figure 14 : Cinétique d'hydrolyse du saccharose en présence (●) et en absence (▲) d'extrait enzymatique de l'invertase de <i>Saccharomyces boulardii</i> ([Saccharose]=0,1 M ; dilution de l'enzyme 1/150 (V/V) ; tampon acétate 0,1M - pH4, 6 ; 25°C).....	35
Figure 15 : Cinétique d'hydrolyse du saccharose par l'invertase extraite de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (◆) et de l'invertase extraite de <i>Saccharomycesboulardii</i> (●)([Saccharose]=0,1 M ; dilution de l'enzyme 1/150 (V/V) ; tampon acétate 0,1M - pH4, 6 ;Température :25°C).....	37

Liste des tableaux

Tableau 1 : Classification de la levure <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Larpent, 1992).....	6
Tableau 2 : Principales applications de la levure <i>S. cerevisiae</i> (Camoni, 1990).....	10
Tableau 3 : Classification de la levure <i>Saccharomyces boulardii</i>	12
Tableau 4 : Dilutions de la solution mère de la protéine étalon (BSA).....	25
Tableau 5 : Dilutions de l'extrait enzymatique obtenu à partir des deux levures.....	26
Tableau 6 : Activités volumique et spécifique de l'invertase de <i>S.cerevisiae</i> et <i>S.boulardii</i> dans les conditions standards.....	36

Introduction

Depuis la nuit des temps, l'exploitation des microorganismes essentiellement les bactéries et les levures a apporté une contribution significative dans certains domaines industriels. En effet, la biotechnologie prend origine dans la plus haute antiquité; les civilisations mésopotamiennes qui cultivaient des céréales savaient déjà utiliser des levures pour fabriquer des boissons alcoolisées.

En raison de leurs propriétés morphologiques et de leur patrimoine génétique, les levures s'adaptent bien aux conditions industrielles. Elles sont le siège d'une biosynthèse protéique très active, présentant une source précieuse de divers enzymes. Les enzymes sont des catalyseurs de nature protéiques, transformant un substrat en un produit, qui par leur efficacité et leur spécificité, catalysent la quasi-totalité des réactions chimiques dans les organismes vivants.

La souche *Saccharomyces Cerevisiae* plus connue sous le nom de « levure de bière », constituent une source importante de diverses classes d'enzymes utilisées dans le domaine des biotechnologies (Pandey et al., 2009; Blachere, 2009). La levure *Saccharomyces Boulardii* et une souche semblable à *Saccharomyces Cerevisiae*, plus connue et commercialisée sous le nom d'Ultra-levure, utilisée depuis plus de 30 ans dans la prévention et le traitement des désordres gastro-intestinaux (Castan, 2016).

Les potentialités très nombreuses des enzymes semblent encore peu exploitées dans les industries agroalimentaires ou seules les hydrolases sont utilisées d'une façon significative. L'exemple typique est l'invertase qui présente une très grande importance dans la préparation industrielle du sucre inverti. La levure *Saccharomyces Cerevisiae* et *Saccharomyces Boulardii* représentent une source majeure de cette enzyme endocellulaire obtenue par lyse cellulaire.

L'invertase catalyse l'hydrolyse du saccharose en glucose et en fructose, ce mélange est appelée sucre inverti, d'où le nom de l'enzyme. En effet, l'intérêt grandissant vers cette enzyme est justifié par de nombreuses applications industrielles et pharmaceutiques. (Bousmaha et al., 2014).

Dans ce contexte, l'objectif de ce travail est l'étude de l'activité enzymatique de l'invertase extraite de *Saccharomyces Cerevisiae* et *Saccharomyces Boulardii*. Nous avons procédé de la manière suivante :

- ❖ Mise au point d'un protocole d'extraction de l'invertase à partir de deux espèces de levure (*Saccharomyces cerevisiae* et *Saccharomyces Boulardii*).
- ❖ La détermination de la concentration en protéine de l'extrait enzymatique.

- ❖ Détermination des activités enzymatiques (volumique et spécifique) de l'invertase.
- ❖ La comparaison des activités enzymatiques des levures *Saccharomyces cerevisiae* et *Saccharomyces boulardii*.

Chapitre 1.
Rappels Théoriques

I. *Saccharomyces cerevisiae*

I.1. Généralités

Les levures sont des eucaryotes unicellulaires, souvent plus grandes que les bactéries, de formes ovoïdes ou sphériques (1 à 5 micromètres de largeur et 5 à 30 micromètres de longueur) (Lucile et al., 2016). Les levures sont de caractère chimio-hétérotrophe, c'est-à-dire, qu'elles sont capables de tirer leur énergie à partir des réactions d'oxydoréduction ou de fermentation de composés chimiques tels que les sucres. Elles font partie du groupe des champignons (Guiraud et Galzy, 1998; Guiraud, 1996). La représentation d'une cellule de levure est donnée dans la figure 1.

Le terme de levure (du latin *levare* = rendre léger) rappelle ses capacités à « faire lever » les pâtes panifiables (Phaff et al., 1968). En effet, les levures ont l'aptitude à produire le « CO₂ » pendant la fermentation et à lever la surface mousseuse d'un milieu liquide de fermentation (Oteng-gyag, 1984).

La structure des levures diffère de celle des bactéries par la présence d'un noyau, d'une mitochondrie, d'un appareil de Golgi et d'un chromosome (*Saccharomyces Cerevisiae* possède 16 chromosomes) (Iarpent, 1990).

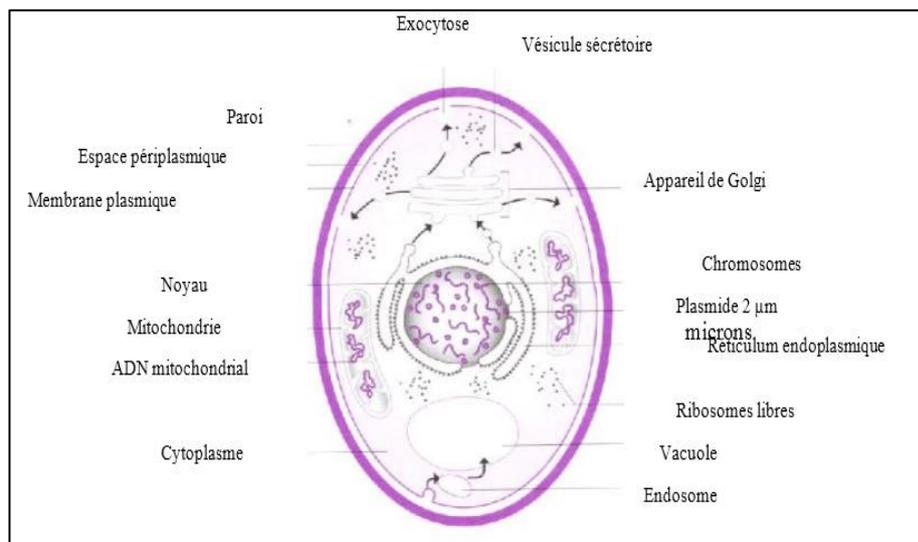


Figure 1 : Représentation idéalisée d'une cellule de levure (Thuriaux, 2004).

I.2. Définition

La levure boulangère *Saccharomyces Cerevisiae* est l'un des organismes les plus étudiés aux laboratoires à travers le monde. L'espèce *Saccharomyces Cerevisiae* dont le nom systématique fait référence au sucre « saccharose » et aux champignons « myces » (Tortora *et al.*, 2003). Ce sont des organismes qui présentent une grande affinité pour le saccharose. Le terme *cerevisia* provient du nom d'une bière « Cervoise » fabriquée à partir de cette levure (Loiez, 2003).

La simplicité de l'organisation unicellulaire de cette levure ainsi que sa croissance rapide font d'elle le modèle expérimental le plus commode (Benziane, 2017).

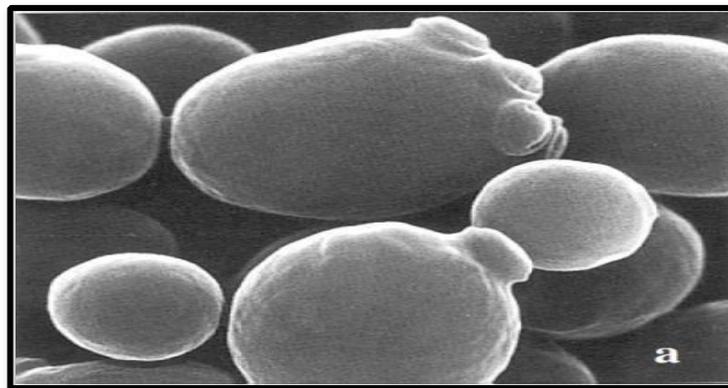


Figure 2 : *Saccharomyces cerevisiae* sous microscopie électronique (Tortora *et al.*, 2003)

I.3. Classification

La levure *Saccharomyces Cerevisiae* peut être classée comme c'est indiqué dans le tableau suivant :

Tableau 1: Classification de la levure *Saccharomyces cerevisiae* (Larpent, 1992).

Règne	Protistes-eucaryotes
Classe	Ascomycetes
Sous classe	Hémiascomycetes
Ordre	Endomycétales
Famille	Saccharomyceteceae
Sous famille	Saccharomycetoideae
Genre	<i>Saccharomyces</i>
Espèce	<i>Saccharomyces Cerevisiae</i>

I.4. Morphologie

La levure *Saccharomyces Cerevisiae* est une cellule sphérique ou ovoïde ou allongée, de taille très variable (de 3 à 10 μm ou de 4 à 14 μm). D'autres cellules peuvent être cylindriques et peuvent avoir une taille plus grande, jusqu'à 20 μm de longueur ou plus (Goffeau et al., 1996). La micrographie de l'espèce *Saccharomyces Cerevisiae* est donnée dans la figure suivante.

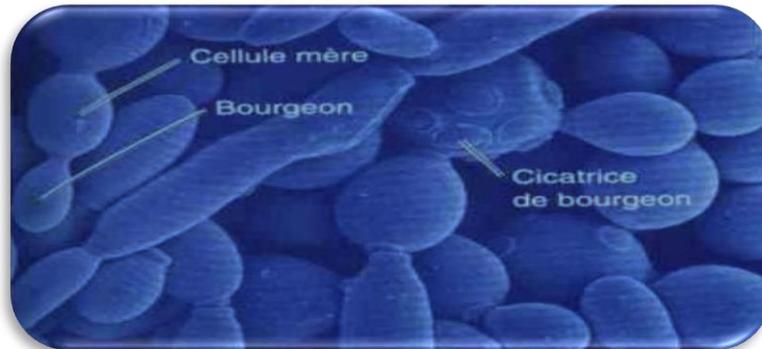


Figure 3 : Micrographie de l'espèce *Saccharomyces Cerevisiae* (Tortora et Anagnostakos, 1987).

I.5. Reproduction

Le cycle cellulaire de la levure *S. cerevisiae* comprend deux modes de reproduction (Herskowitz, 1988).

I.5.1. La reproduction asexuée

C'est le mode de reproduction dont lequel une cellule donne naissance à une autre cellule semblable par prolifération cellulaire ou par bourgeonnement comme le montre la « figure 4 », (Kreger–Van, Rij, 1984). Au cours de la formation du bourgeon, le cytoplasme reste réuni au cytoplasme de la levure mère, le noyau de celui-ci grossit et se déplace vers le bourgeon. La membrane nucléaire étrangle le noyau de telle manière que la moitié de celui-ci demeure dans la cellule mère et l'autre passe dans la cellule fille, tandis que la membrane cellulaire se referme autour de chaque noyau en donnant ainsi deux levures semblables. Il est possible d'observer une cicatrice à l'endroit de la formation du bourgeon (Guiraud et Galzy, 1980).

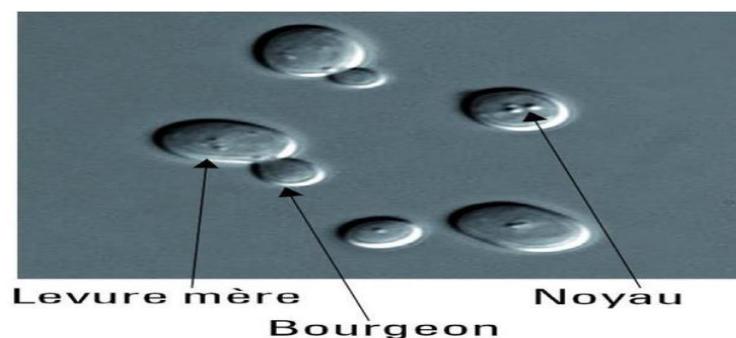


Figure 4 : Bourgeonnement de l'espèce *Saccharomyces cerevisiae*.

I.5.2. La reproduction sexuée

La reproduction sexuée s'effectue par conjugaison des deux cellules donnant naissance à un zygote. Le zygote subit une méiose où les quatre noyaux haploïdes forment quatre ascospores, produisant par la suite des cellules haploïdes (**Bouix et Leveau, 1993; Bourgeois et Larpent, 1996**). La conjugaison se produit dans un temps allant de 6 à 8 heures (**Larpent, 1991**).

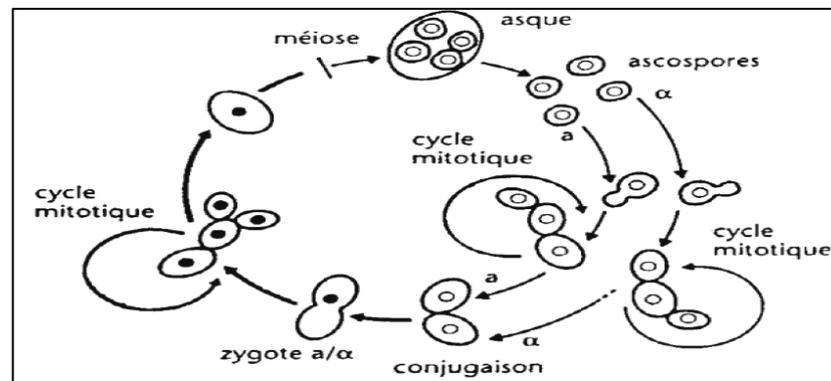


Figure 5 : Cycle biologique de la levure *Saccharomyces cerevisiae*.

Dans sa phase haploïde, la levure a un total de 16 chromosomes. En effet, le genre *Saccharomyces* est le premier organisme eucaryote dont le génome ait été complètement séquencé (**Jaime, 2008**). Elle apparaît comme l'un des organismes modèles parmi les plus utilisés en génétique grâce à sa rapidité de développement, ses populations importantes et son bas coût de propagation (**Castan, 2016**).

I.6. Caractères biochimiques

Selon (**Guiraud et Galzy, 1998**), l'espèce *Saccharomyces cerevisiae* possède les caractéristiques biochimiques suivantes:

- Température de croissance optimale : 30°C ;
- pH de croissance optimal : 4,5 ;
- Mode respiratoire : aérobie ou anaérobie facultatif ;
- Mode de reproduction : sexué et asexué ;
- Fermente le glucose, le galactose, le maltose et le saccharose ;
- Fermentation variable pour le tréhalose et le raffinose ;
- Ne fermente pas le lactose ;
- Fermente le glucose, le galactose, le maltose, le saccharose et le Raffinose ;
- Fermentation variable pour le tréhalose ;
- Ne fermente pas le lactose.

La levure *S. cerevisiae* se distingue essentiellement par sa teneur en protéine, en acides aminés, ainsi qu'en vitamines du groupe «B» (**Bacha, 2008**).

I.7. Conditions de culture

La croissance d'un micro-organisme peut être considérée comme une série d'interaction entre les cellules et l'environnement (**Bouix et Leveau, 1993**). Parmi ces conditions, on peut citer :

- **La température** : La température convenable pour la culture de la levure *S. cerevisiae* se situe entre 25 °C et 35 °C, ce sont des mésophiles (**Larpen et Gourgoud, 1985**).
- **Le pH** : L'espèce *S. cerevisiae* se développe d'avantage dans un milieu faiblement acide et dans lequel la plupart des bactéries ne se développent pas. Elle préfère un milieu de pH compris entre 4 et 4,5 (**Revuz, 1979**).
- **La pression osmotique** : Il s'agit d'une espèce osmophile qui se développe dans des milieux de forte concentration en sucres et en sel mais avec un métabolisme ralenti contrairement à d'autres espèces (**Noui, 2001**).
- **Aération** : Cette levure est capable de se développer en milieu anaérobique et aérobique (**Alguilera et al., 2006**).

I.8. Besoins nutritionnels

La levure boulangère *S. cerevisiae* est auxotrophe pour certaines molécules qui lui sont nécessaires. Ces molécules sont considérées comme les principales sources énergétiques pour cette levure.

- **L'eau** : représente 75% du poids total cellulaire. Elle doit être en grande quantité dans le milieu (**Bacha, 2008**).
- **L'azote** : Il joue un rôle capital pour la croissance de la levure, il entre dans la constitution des molécules simples et des macromolécules essentielles au fonctionnement cellulaire. Toutes les levures sont capables d'utiliser l'azote sous forme d'ions d'ammonium « NH_4^+ » et d'urée « $\text{O}=\text{C}(\text{NH}_2)_2$ » pour la synthèse des protéines, des acides nucléiques et des vitamines (**Larpen, 1990**). Selon **Bourgeois et Larpen (1996)** la levure *S. cerevisiae* est incapable d'assimiler le nitrate « NO_3^- ».
- **Le carbone** : La levure boulangère utilise les glucides simples (hexoses) et les disaccharides mais elle est incapable d'utiliser les pentoses.

➤ **Les oligo-éléments** : Il s'agit des métaux nécessaires pour le développement et la reproduction des levures. Ils jouent un rôle déterminant dans l'activation de certaines réactions enzymatiques ainsi que dans la synthèse de certaines vitamines et coenzymes (**Bourgeois et Larpent, 1996**).

I.9. Principales applications de la levure *Saccharomyces Cerevisiae*

La levure de boulangerie est caractérisée par une production rapide de dioxyde de carbone « CO₂ » à partir des sucres. Aussi, cette levure représente un moyen biotechnologique pour la production de protéines d'intérêt commercial et elle est considérée comme un outil de criblage de nouveaux médicaments (**Goffeau et al., 1996**).

Les principales applications de la levure *S. cerevisiae* sont résumées dans le tableau suivant :

Tableau 2 : Principales applications de la levure *S. cerevisiae* (**Camoni, 1990**).

Produits de <i>S. Cerevisiae</i>	Applications
Alcool et CO ₂	Fabrication du pain et de la bière
Ethanol	Fabrication des solvants
Glycérol	Chimie des plastiques et industrie pharmaceutique
Protéines alimentaires issues des mélasses et divers déchets alimentaires	Aliments pour humain et bétail
Invertase	Confiserie

II. *Saccharomyces Boulardii*

II.1. Généralités

Saccharomyces boulardii est une souche tropicale de levure. Cette levure est semblable à *Saccharomyces cerevisiae*, par plusieurs propriétés taxinomiques, métaboliques et génétiques. Sa position taxonomique est discutée, certains auteurs pensant qu'elle constitue une souche de *S. cerevisiae* d'autres pensant qu'elle constitue une espèce distincte. Les recherches sur son ADN tendent à la placer comme une variété de *S. cerevisiae* (**Van der Aa Kühle et Jespersen, 2003**).

C'est uniquement la *Saccharomyces boulardii* qui, dans une préparation de levure brevetée, est utilisée avec efficacité comme probiotique (**Sazawal et al., 2006**). Cette levure est utilisée dans des traitements préventif et thérapeutique de la diarrhée et d'autres troubles gastro-intestinaux causés par l'utilisation des agents antimicrobiens. Elle présente de multiples caractéristiques qui en font d'elle un agent probiotique potentiel. En effet, c'est une levure qui résiste lors de son passage par le tractus gastro-intestinal. La température idéale pour son activité est de 37 °C qui correspond parfaitement avec la température du bon fonctionnement de notre organisme. Cette levure, *in vitro* et *in vivo*, bloque la croissance de nombreux agents pathogènes microbiens (**Czerucka et al., 2007**).

La *S. boulardii* est parmi les souches de levures qui ont fait l'objet de très nombreuses études cliniques. Ces études ont démontrés sa grande efficacité en cas de diarrhées (réduction de la fréquence) et après la prise d'antibiotiques (prévention de la diarrhée associée à l'antibiothérapie). Elle favorise le réensemencement et la croissance des germes utiles, tel que les saprophytes, en inhibant celle des germes nuisibles (**Rodrigues, 2000; Kamm, 2004; Olivier, 2009**).

II.2. Définition

La *Saccharomyces Boulardii* appartient au groupe des cellules eucaryotes simples tels que les champignons et les algues, et diffère des probiotiques (*cf.* Paragraphe II.5 de la partie « rappels théoriques ») bactériens qui sont des procaryotes (**Czerucka et al., 2007**).

L'espèce *Saccharomyces Boulardii* est une souche de levure semblable à *Saccharomyces Cerevisiae* (**Castan, 2016**), elle est d'origine naturelle (**Gilbert, 1987**), isolée pour la première fois, en 1923 par le scientifique français « Henri Boulard » en Indochine à partir de la peau de litchis et des mangoustans (**Goulet, 2009**).

Cette levure appartient à la classe des *Saccharomycètes* et à l'ordre des *Saccharomycetales* (Alis et Jespersen, 2003). Seules quelques différences dans certaines caractéristiques taxonomiques, phylogénétiques et métaboliques, par rapport à l'espèce *Saccharomyces Cerevisiae*, sont à signaler. Les différences majeures sont une température optimale de croissance plus élevée, environ 37°C, qui correspond à la température du corps humain et une meilleure résistance au milieu acide de l'estomac (Castan, 2016).

Actuellement, la levure *Saccharomyces Boulardii* est commercialisée sous le nom d'Ultra-levure et utilisée depuis plus de 30 ans dans la prévention et le traitement des désordres gastro-intestinaux (Castan, 2016). La micrographie de l'espèce *Saccharomyces boulardii* est donnée dans la figure 6.

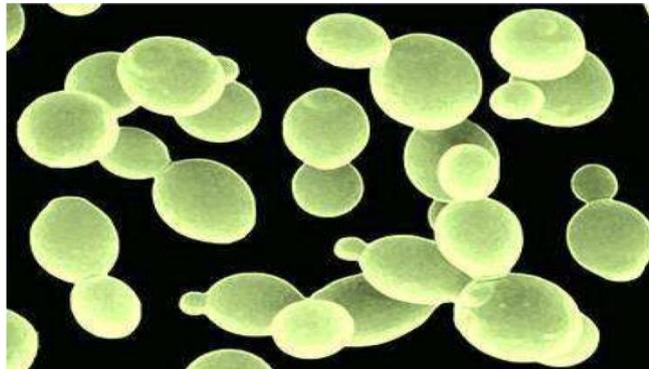


Figure 6 : Micrographie de *Saccharomyces boulardii* (Rampal, 1996).

II.3. Classification

La levure *Saccharomyces Boulardii* peut être classée comme c'est indiqué dans le tableau suivant :

Tableau 3: Classification de la levure *Saccharomyces boulardii*.

Règne	Fungi
Embranchement	Ascomycota
Sous embranchement	Saccharomycotina
Classe	Saccharomycetes
Ordre	Saccharomycetale
Famille	Saccharomycetaceae
Genre	<i>Saccharomyces</i>
Espèce	<i>Saccharomyces boulardii</i>

II.4. Morphologie, Structure et Composition biochimique

La levure *Saccharomyces boulardii* est une cellule ellipsoïdale, ovale et parfois sphérique. Ses dimensions sont en moyenne de 8 à 12 microns sur le plus grand axe et de 4 à 6 microns sur le petit axe. La paroi cellulaire est de structure polysaccharidique constitué essentiellement de glucanes et de mannanes. Le cytoplasme est particulièrement riche en acides aminés, en vitamines du groupe B (thiamine, riboflavine, acide nicotinique, pyridoxine, acide pantothénique) et contient de nombreux enzymes (Gilbert, 1987).

II.5. Les probiotiques

L'organisation mondiale « *Food and Agriculture Organisation of the United Nations (FAO)* » a adopté, en 2002, comme définition des probiotiques, il s'agit de micro-organisme vivant qui lorsqu'il est administré en quantité adéquate exerce un effet bénéfique sur la santé de l'hôte (Bultel, 2017).

Le terme probiotique est un mot grec qui signifie « en faveur de la vie ». Les constituants de base peuvent être des bactéries ou/et des levures, ayant un effet bénéfique sur la santé de l'être humain et des animaux (Lily et Stillwell, 1965). Ces constituants peuvent être trouvés dans certains aliments, tels que les produits laitiers fermentés, les compléments alimentaires ou les médicaments sous forme lyophilisés (Faure et al., 2013).

Les probiotiques sont utilisés en thérapie alternative pour le traitement de la gastro-entérite infectieuse ou dans la prévention et la guérison de la diarrhée associée aux antibiotiques, qui est une complication fréquente du traitement antimicrobien des patients hospitalisés (Fooks et Gibson, 2002).

II.6. Le microbiote intestinal

Les probiotiques règlent la composition et l'activité de la flore intestinale. Ils ont un effet protecteur par la limitation de la colonisation, la reproduction et l'adhérence des bactéries pathogènes. Le microbiote intestinal, appelé anciennement flore intestinale, se définit comme l'ensemble des microorganismes présents dans l'écosystème digestif et assurant des relations symbiotiques avec l'hôte. Les souches probiotiques d'origine humaine sont considérées comme les plus compatibles avec le tractus intestinal humain. En effet, le tube digestif héberge une multitude de bactéries, de virus et d'*Archaea* (micro-organismes similaires aux bactéries par leur taille et leur structure mais radicalement différents par leur organisation moléculaire. On pense maintenant qu'ils constituent un groupe ancien qui est intermédiaire entre les bactéries et les eucaryotes).

Parmi tous ces micro-organismes microbiens, les bactéries forment le groupe le plus largement représenté. On peut donc considérer que le microbiote intestinal correspond à l'ensemble des bactéries qui colonisent notre tractus digestif (**Quevrain et Seksik., 2013**).

Avec l'énorme développement que connaît les techniques d'analyses en biologie moléculaire, la représentation du microbiote intestinal est basée sur la séquence de gènes et non plus seulement sur des caractéristiques morphologiques et métaboliques telles que : la coloration de Gram, la fermentation des sucres ou encore la présence d'enzymes spécifiques (**Cinquin, 2005; Campeotto et al., 2007**).

III. L'invertase

III.1 Généralités

Les enzymes sont des macromolécules globulaires (**Bacha, 2008**). Ils sont solubles en phase aqueuse. Leur utilisation, en biotechnologie, nécessite leur immobilisation, ce qui les rend souvent plus stables et permet, du fait de leur état fixé, leur utilisation et leur réutilisation sous forme de colonne d'enzymes (bioréacteur) ou de film fixés à des capteurs (biocapteurs) (**Burnstein, 2000**).

Les enzymes sont, par définition, les catalyseurs biologiques des réactions chimiques *in vivo*. Elles sont dotées d'une efficacité et d'une spécificité fonctionnelle remarquables et interviennent dans toutes les réactions métaboliques énergétiquement possible (biosynthèse, dégradation, régulation et reproduction) (**Mouranche et Costes, 1985**). Lorsque leur fonctionnement est perturbé, elles peuvent être à l'origine de déséquilibres qui conduisent à des pathologies variées (**Wallach, 1997**).

Actuellement, la majorité des enzymes fabriquées industriellement sont d'origines microbiennes (**Wallach, 1997**). En effet, les levures synthétisent et sécrètent plusieurs enzymes telle que la β -fructosidase (invertase) qui est l'une des premières enzymes caractérisées par Persoz en 1833 (**Pol, 1996; Bacha, 2008**).

L'invertase présente un grand intérêt historique dans le développement de l'enzymologie, du fait que la plus part des premières recherches sur la cinétique d'action des enzymes sont effectuées sur l'activité de l'invertase de levure (**Javillier et al., 1964**).

III.2. Définition

Une large variété de microorganismes produit l'invertase (**Bousmaha et al., 2014**). Le nom systématique de l'invertase est la β -D-fructofuranosidase fructohydrolase (E.C.3.2.1.26) (**kaplan et al., 1997**). Elle appartient à la famille des glycosides hydrolase dans la classification basée sur la séquence des enzymes actives sur les glucides (**Cantarel et al., 2009**).

Elle est généralement extraite de *Saccharomyces Cerevisiae*. Cette enzyme catalyse la réaction d'hydrolyse de la liaison glycosidique « α - 1 \rightarrow 4 » entre les molécules « α -D-Glucose » et « β -D-fructose » du Saccharose en libérant des monosaccharides (**Barkikova et al., 1991**). L'enzyme se trouve sous forme endo ou exo-cellulaire (**Dides et Fabre, 2007**). En industrie alimentaire, l'invertase est surtout utilisée pour la production de sucre inverti à partir du saccharose.

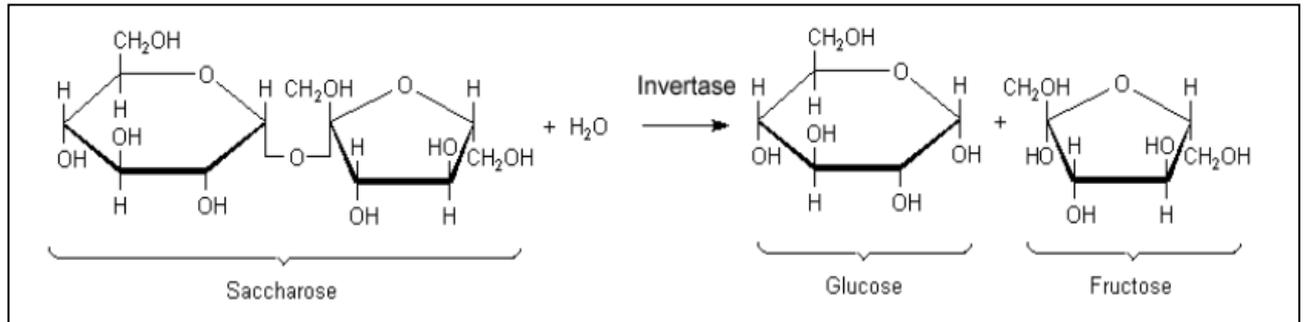


Figure 7 : Réaction d'hydrolyse du saccharose par l'invertase (Dides et Fabre, 2007).

III.3. Source et localisation

Un grand nombre de microorganismes produit l'invertase en utilisant le saccharose comme source de carbone. L'invertase est aussi synthétisée par les végétaux (Goetz et Roitsch, 2000; Romero-Gomez et al., 2000). L'espèce *Saccharomyces cerevisiae* communément appelé levure de Boulanger est la souche principale utilisée pour la production d'invertase commerciale.

L'invertase est présente sous deux formes dans la cellule de levure, une forme majeure glycosylée externe localisée dans l'espace péri-plasmique, et une forme mineure interne non glycosylée (Reddy et Maley, 1990).

III.4. Structure

Le gène « SUC2 » est un gène structural de la levure *Saccharomyces cerevisiae*, codant pour l'expression de l'invertase (Kaiser et Botstein, 1986).

L'invertase extracellulaire de levure est une glycoprotéine (Mislovičová et al., 1997). Il s'agit d'une enzyme oligomérique contenant environ 50% de glucides, cette partie glucidique est hétérogène (Kern et al., 1992).

L'invertase intracellulaire est un dimère de 115 kDa, alors que la forme glycosylée extracellulaire est un mélange de dimères, de tétramères et d'octamères formé par glycosylation (Kern et al., 1993). La forme active de l'invertase extracellulaire est un homodimère formé de deux sous unités protéiques identiques d'approximativement 61 kDa chacune et comprenant chacune 532 acides aminés (Reddy et Maley, 1990; Acosta et al., 2000).

La dimérisation est nécessaire et suffisante pour générer une activité enzymatique; une association ultérieure n'affectera pas l'activité spécifique, ce qui suggère que le site actif de l'invertase n'est pas affecté par l'association des dimères. Contrairement à l'enzyme intracellulaire, la forme glycosylée est protégée de l'agrégation (**Kern et al., 1993**).

III.5. Le Substrat

Le saccharose, connu généralement sous le terme de sucre de table, occupe une position centrale dans l'alimentation humaine. L'obtention de ce sucre se fait par le traitement (extraction) de certaines plantes contenant de la chlorophylle, telles que la canne à sucre ou la betterave. L'extraction du sucre ne fait appel qu'à des procédés physique très simples (broyage, solubilisation et évaporation), sans aucune utilisation d'additifs ni de produits chimiques (**Linden et Lorient, 1994**).

Le saccharose ou le α -D-glucopyranosyl (1 \rightarrow 2) β -D-fructofuranoside est un disaccharide formé d'une molécule de glucose et d'une molécule de fructose liées par une liaison osidique β (1 \rightarrow 2) (**Soro, 2007**). Il se présente sous forme de cristaux (**Decloux, 2002**).

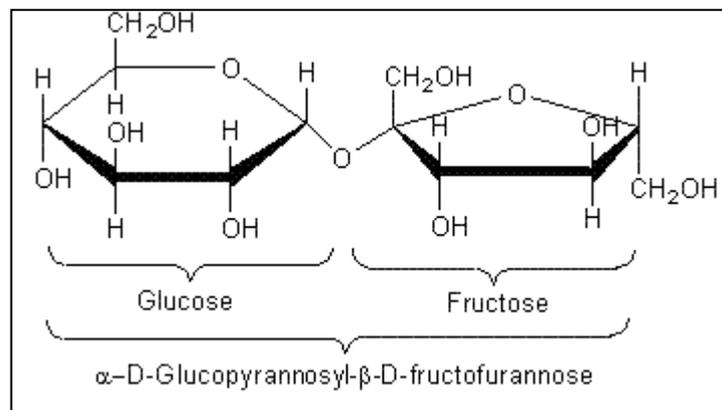


Figure 8 : Structure du saccharose.

III.6. Mode d'action de l'invertase

La formation du complexe enzyme-substrat est contrôlée par le modèle de l'ajustement induit et par le modèle de simple complémentarité stérique (**Mouranche, 1985**). L'enzyme et son substrat, associés par des interactions de forces diverses, constituent un ou plusieurs intermédiaires réactionnels instables qui permettent d'abaisser la barrière de l'énergie de la réaction; la vitesse de la réaction est reliée à la différence de l'énergie libre entre l'état de transition et l'état fondamentale, on l'appelle énergie d'activation « E_a » ou barrière de potentiel.

Dans les réactions enzymatiques, l'étude d'un mécanisme catalytique suppose de préciser les points suivants :

- Les résidus du site actif impliqués.
- La nature et le type de liaison des intermédiaires.
- Les échanges de protons, d'électrons et de radicaux fonctionnels.
- Les changements conformationnels (**Lemerini et Raib, 2003**).

L'invertase est l'une des plus anciennes enzymes dont le mécanisme d'action est parfaitement élucidé (**Reddy et Maley, 1990**).

Reddy et Maley (1996) ont proposé le mécanisme catalytique schématisé dans la figure suivante: le glutamate « Glu 204 » sert de donneur de proton à l'oxygène de la liaison glycosidique du saccharose, alors que le nucléophile l'aspartate « Asp 23 » attaque le carbone « C2 » du résidu fructose; ceci a pour résultat la formation d'un complexe covalent fructosyl-enzyme associé au dégagement du glucose. Ensuite, le glutamate « 204 » agit comme une base en soustrayant un proton d'une molécule d'eau, ce qui permet au groupe hydroxyle restant de déplacer le fructose et de reconstituer les résidus actifs originaux. La figure 9, illustre le mécanisme décrit en montrant la libération d'abord du glucose, ensuite du fructose grâce à l'intervention d'une molécule d'eau.

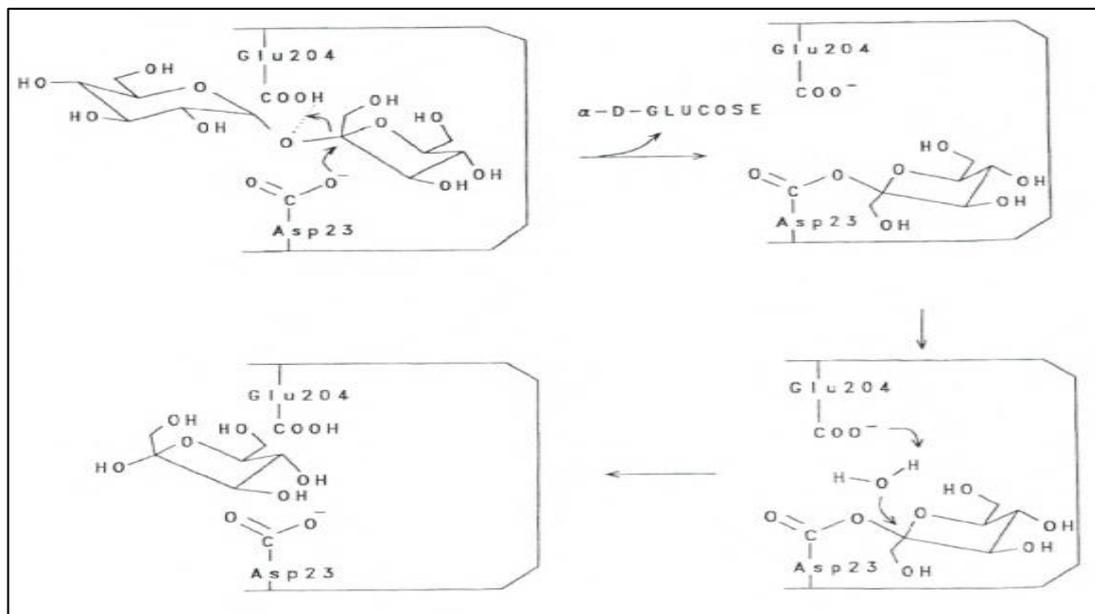


Figure 9: Mécanisme catalytique de l'invertase de levure (**Reddy et Maley, 1996**).

En résumé, les hydrolase maintiennent une configuration anomérique suivent un mécanisme de double déplacement impliquant la formation transitoire d'un complexe intermédiaire enzyme-produit, et l'intervention d'une molécule d'eau pour le dégagement final du produit. Ce mécanisme catalytique s'effectue donc en deux étapes successives et obligatoires (**Reddy et Maley, 1996**). **Kaplan et al. (1997)** indiquent également que le mécanisme d'action de l'invertase implique la protonation de l'oxygène glycosidique du saccharose et une attaque nucléophile du carbone anomérique du résidu fructosyl: ce qui appuie le mécanisme proposé par **Reddy et Maley (1996)**. **Naumoff (1999)** précise que, pour l'invertase de *S.cerevisiae*, il a été montré que le résidu glutamate sert de donneur de proton dans l'hydrolyse de la liaison glycosidique.

III.7. Production de l'invertase par fermentation

L'invertase est produite dans un milieu de culture constitué d'un mélange de source de carbone (mêlasse), d'azote apporté sous forme de phosphate d'ammonium ((NH₃)₃PO₄) et de sels minéraux essentiels (potassium, magnésium).

Les conditions de fermentations sont choisies pour éviter la fermentation alcoolique, tels que, la bonne aération, l'apport en sucre pour maintenir le taux suffisamment bas (5 à 10 g/l maximum), le pH est maintenu entre 4,5 et 5,5 par l'ajout de l'ammoniaque (NH₄OH) et enfin la température est fixée entre 26 °C et 28 °C (**Bacha, 2008**).

III.8. Facteurs influençant l'activité enzymatique de l'invertase

III.8.1. Facteurs physicochimiques

- **Effet de la température:** Tout facteur environnemental qui perturbe la structure des protéines peut entraîner une modification de l'activité enzymatique, La température a un effet direct en accélérant les vitesses des réactions enzymatique (**Malou, 2018**). La vitesse de la plupart des réactions enzymatiques double approximativement quand la température augmente d'environ 10°C (**Lehninger, 1977**). Selon **Wang (1996)** l'invertase présente une activité maximale à environ 55°C.
- **Effet du pH :** La plupart des enzymes possèdent un pH optimum caractéristique auquel leur activité atteint une valeur maximum : au-dessus ou au-dessous de ce pH, l'activité de l'enzyme chute (**Lemerini et Raib, 2003**). **Wang (1996)** précise que le pH optimum de l'invertase se situe aux alentours de 4,5, même si cette enzyme reste relativement active dans une gamme de pH assez large allant de 3,5 à 5,5.
- **La concentration en substrat :** Le schéma de base d'une réaction catalytique fait intervenir un complexe enzyme-substrat (ES) dit complexe de Michaelis, la vitesse augmente avec l'augmentation de la concentration en substrat jusqu'à un point où l'enzyme est dite « saturée »

par le substrat, la vitesse initiale mesuré atteint alors une valeur maximale qui ne peut pas être modifiée par une augmentation de la concentration du substrat (**Robert et al., 2003**). L'invertase de levure catalyse les réactions d'hydrolyse du saccharose en glucose et en fructose.

III.8.2. Facteur chimique

▪ **Les inhibiteurs** : On appelle inhibiteur tout composé dont la fixation sur la molécule enzymatique entraîne son inactivation partielle ou totale, ce qui se traduit par une diminution ou une annulation de la vitesse initiale. L'inhibition des enzymes est un domaine de recherche extrêmement important (**Pelmont, 1993**). Le type d'inhibiteur apporte des renseignements sur la spécificité de l'enzyme ou sur le mécanisme de la réaction (**Loncle, 1992**). L'inhibition compétitive par le produit de la réaction est un phénomène courant en enzymologie. L'invertase de *saccharomyces cerevisiae* subit une inhibition par les produits d'hydrolyse (glucose et fructose) (**Pelmont, 1993;Chaplin, 2002**).

III.9. Intérêt et applications de l'invertase

L'invertase est une enzyme largement utilisée dans l'industrie alimentaire en particulier, la confiserie, pour obtenir un sirop liquide ou semi visqueux riche en fructose à partir du saccharose (**Cherrak, 2003**). Ainsi, elle est utilisée pour empêcher la cristallisation des sucres dans les produits alimentaires comme c'est le cas pour la fabrication du miel artificiel (**Glazer et Nikaido, 1995**).

L'invertase permet l'assimilation de l'alcool dans les vins fortifiés (**Mirzarakhmetova et Abdurazakova, 1998**). Aussi, elle ramollit le chocolat et conserve le taux d'humidité des aliments (**Ko et al., 1999**).

Elle est utilisée dans la fermentation de l'acide citrique en prenant la mélasse comme matière première, qui contient principalement du saccharose comme source de carbone (**Suresh et al., 2012**).

L'invertase est également utilisée dans l'industrie pharmaceutique comme comprimé d'aide digestive dans le lait en poudre pour les nourritures infantiles et dans les sucres inversés comme nourriture pour les abeilles mellifères (**Phadtare et al., 2004**).

Chapitre 2.
Matériel et Méthodes

I. Principaux réactifs utilisés

- ✦ Acide acétique.
- ✦ Acétate de sodium.
- ✦ Bicarbonate de sodium.
- ✦ *Bovine Serum Albumin* (BSA).
- ✦ 3,5 Dinitro-salicylique (DNSA).
- ✦ D (+) saccharose.
- ✦ D (+) glucose.
- ✦ D (-) fructose.
- ✦ Hydroxyde de sodium.
- ✦ Iodure de Potassium.
- ✦ Levure de boulanger (*Saccharomyces cerevisiae*).
- ✦ Tartrate double de sodium et de potassium.
- ✦ Sulfate de cuivre.
- ✦ Ultra-levure (*Saccharomyces boulardii*).

II. Préparation de l'extrait de l'invertase de levure

II.1. Protocole d'extraction de *Saccharomyces cerevisiae*

Il s'agit de l'extraction d'une enzyme endocellulaire. Les méthodes d'extraction s'avèrent non spécifiques et se basent toutes sur la rupture membranaire en assurant cependant l'intégrité des protéines enzymatiques (**Kati, 2012**).

La méthode utilisée afin d'obtenir la préparation enzymatique, est une modification d'un protocole réalisé par **Loncle (1992)** et adapté par (**Alnadjjar, 2001**). Elle consiste en la succession des étapes suivantes :

- Dans un bécher de 250 mL, introduire 100 mL d'une solution aqueuse qui contient 0,1M de bicarbonate de sodium (8,40 g) et 0,01M d'acétate de sodium (16,40 g).
- Ajouter 50g de levure *Saccharomyces cerevisiae*.
- Couvrir le bécher avec du papier aluminium et agiter jusqu'à la dissolution totale de la levure.
- Laisser reposer à température ambiante pendant 45 heures.
- Ajouter 100 ml d'eau distillée et bien homogénéiser.
- Centrifuger la solution à 4000 tr/min pendant 12 minutes.
- Récupérer le surnageant et y ajouter de l'acide acétique pour acidifier la préparation jusqu'à pH 4,0. L'acide acétique est employé comme conservateur.
- Centrifuger cette dernière solution à 4000 tr/min pendant 12 minutes et récupérer le surnageant qui contient la plus grande partie de l'enzyme, en ajustant de nouveau, le pH à 4 si nécessaire.

Remarque : L'extrait enzymatique obtenu (préparation d'invertase) est relativement limpide et de couleur jaune. Il est conservé à 4°C pour éviter la formation de tout trouble ou inactivation avec le temps.

II.2. Protocole d'extraction de *Saccharomyces boulardii*

- Dans un bécher de 250 mL, introduire 100 mL d'une solution aqueuse qui contient 0,1 M de bicarbonate de sodium (0,70 g) et 0,01 M d'acétate de sodium (0,06 g).
- Ajouter 4,20 g de la levure *Saccharomyces baulardii* en poudre.
- Couvrir le becher avec du papier aluminium et agiter jusqu'à la dissolution totale de la levure.
- Laisser reposer à température ambiante pendant 45 heures.
- Ajouter 8,4 mL d'eau distillée et bien homogénéiser.
- Centrifuger la solution à 4000 tr/min pendant 12 minutes.

- Récupérer le surnageant et y ajouter de l'acide acétique pour acidifier la préparation jusqu'à un pH égale à 4,0. L'acide acétique est employé comme conservateur.
- Centrifuger la solution obtenue à 4000 tr/min pendant 12 minutes puis récupérer le surnageant qui contient l'enzyme, en ajustant de nouveau, le pH à 4 si nécessaire.

Remarque : la préparation de l'invertase obtenue est limpide et de couleur jaune. Elle est conservée à 4 °C.

IV. Dosage des protéines par la méthode du biuret

III.1. Principe

La mise en évidence de l'activité spécifique d'un extrait enzymatique est déterminée par le dosage des protéines présentes (**Loncle, 1992**). Le dosage repose sur la réaction rapide entre le cuivre divalent (Cu^{2+}) et les liaisons peptidiques des protéines (méthode du biuret) en présence d'un complexant tel que le tartrate (**Pelmont, 1993**).

En milieu alcalin, le cuivre divalent (Cu^{2+}), en excès, réagit rapidement avec les liaisons peptidiques des protéines pour donner un complexe bleu violet (complexe de biuret) qui absorbe fortement dans le visible à une longueur d'onde $\lambda = 540 \text{ nm}$. La quantité de protéines présente en solution est directement proportionnelle à l'intensité de la coloration de la solution après ajout de Cu^{2+} . Dans cette méthode la nature des protéines n'influence pas le protocole de dosage, mais l'inconvénient majeur en est la faible sensibilité (**Loncle, 1992**).

III.2. Préparation de la gamme d'étalonnage

Le dosage par spectrophotométrie UV-visible nécessite la réalisation d'une courbe d'étalonnage en prenant comme protéine de référence l'albumine du sérum bovin (BSA). Le protocole expérimental est comme suit :

- On prépare une solution mère de l'albumine du sérum bovin (protéine Étalon) à 6,0 g/L.
- On prend une série de 21 tubes à essais (3 tubes pour chaque essai), on effectue les dilutions indiquées dans le tableau suivant :

Tableau 4 : Dilutions de la solution mère de la protéine étalon (BSA).

Numéro du tube	1	2	3	4	5	6	7
Volume de la solution mère de BSA (mL)	0	0,2	0,4	0,6	0,8	1	1,2
Volume du tampon acéto-acétique (mL)	2	1,8	1,6	1,4	1,2	1	0,8
Concentration finale en protéine (g/l)	0	0.6	1.2	1.8	2.4	3	3.6

- Dans chaque tube, on y ajoute 3mL du réactif du biuret (cette composition est indiquée dans la partie annexes).

- Ensuite, on incube les tubes pendant 30 min à température ambiante et à l'abri de la lumière.
- L'absorbance correspondante à chaque tube est mesurée à 540 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Visible en utilisant un blanc réactif référence composé de 2 ml du tampon acéto-acétique et de 3mL de réactif du biuret.
- Ayant pour chaque concentration une absorbance spécifique, on peut tracer la courbe d'étalonnage en portant sur l'axe des \overline{OX} les valeurs des concentrations et sur l'axe \overline{OY} les valeurs des absorbances correspondantes. La courbe obtenue est une droite représentée dans la figure 10.

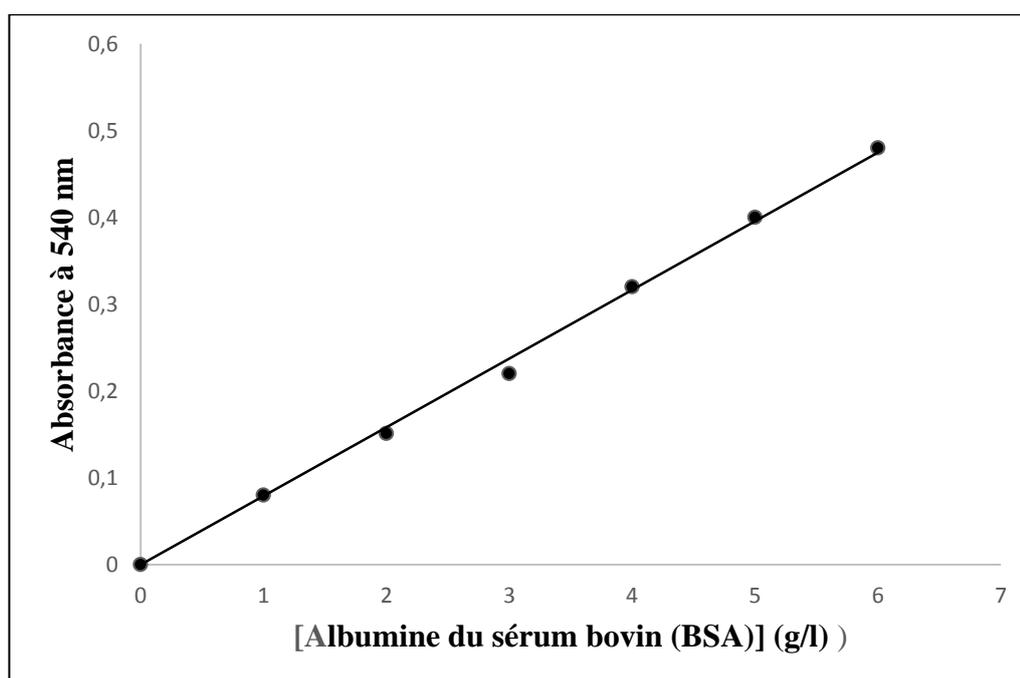


Figure 10: Courbe d'étalonnage pour le dosage des protéines par la méthode du biuret
(Absorbance = $0,0791 \times [\text{Protéines}]$; $r^2=0,9972$).

III.3. Détermination de la concentration protéique des extraits enzymatiques.

- Dans une série de tubes à essai, différentes dilutions de l'extrait enzymatique sont effectuées.

Tableau 5 : Dilutions de l'extrait enzymatique obtenu à partir des deux levures.

Numéro de tube	1	2	3	4	5
Volume de l'extrait enzymatique (ml)	0	0,25	0,5	0,75	1
Volume du tampon acéto-acétique (ml)	1	0,75	0,5	0,25	0

- Dans chaque tube, on ajoute 3 ml du réactif de biuret, on laisse incuber pendant 30 minutes à température ambiante et à l'abri de la lumière.
- La lecture de l'absorbance de chaque tube est réalisée à 540nm à l'aide d'un spectrophotomètre contre un blanc réactif.
- La courbe d'étalonnage préalablement réalisée permettra de calculer la concentration en protéines de notre extrait enzymatique.
- La formule permettant le calcul de la concentration en protéine est :

$$[\text{protéine}]_{\text{g/L}} = \frac{\text{Absorbance de l'échantillon} \times \text{facteur de dilution}}{\text{pente de la droite d'étalonnage (unité d'absorbance L/g)}}$$

- La concentration en protéine de la β -fructosidase, des extraits de *Saccharomyces cerevisiae* et de *Saccharomyces boulardii*, est calculée en prenant la moyenne des quatre concentrations déterminées expérimentalement.

IV. Dosage des sucres réducteur

IV.1 Principe

L'invertase hydrolyse le saccharose en fructose et en glucose, ces derniers sont des sucres réducteurs. C'est grâce à cette propriété que l'on va effectuer nos dosages (**Cherrak, 2003**).

En milieu alcalin, à chaud et en présence de sucres réducteurs, l'acide 3,5 dinitrosalicylique (3,5-DNSA) est réduit en acide 3-amino-5-nitrosalicylique, produit de couleur jaune orangé, selon la figure 11.

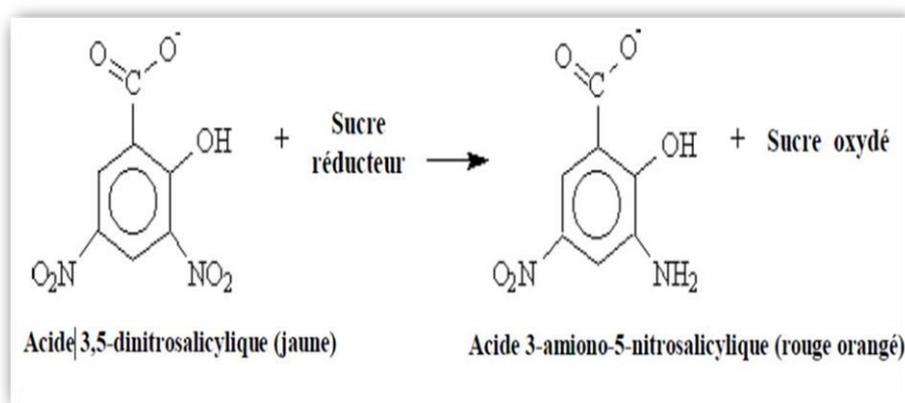


Figure 11: Réduction de l'acide 3,5 dinitrosalicylique par un sucre réducteur lors du dosage de sucre par la méthode DNSA (**Maktouf et al., 2013**).

Ce dosage est mis au point pour donner la quantité de sucres réducteurs présents dans la solution à doser. L'intensité de la coloration sera fonction de la quantité de sucres réducteurs, c'est-à-dire du glucose et du fructose (sucre-inverti) libérés après hydrolyse du saccharose.

IV.2. Préparation de la gamme d'étalonnage

- Nous avons en premier préparé une solution mère de sucre inverti à 5 mmol/L (2,5 mM de glucose + 2,5 mM de fructose), en utilisant un tampon acétate 0,1M- pH 4,6 comme solvant.
- Dans une série de tubes à essais, on met à raison de 0,75ml par tube les différentes dilutions de la solution mère. Puis, on ajoute 0,25ml du tampon acéto-acétique (0,1M – pH 4,6) et enfin 1ml du réactif DNSA et on agite.

- Les tubes sont placés dans un bain marie bouillant pendant 5 minutes, puis il faut refroidir les tubes rapidement dans un récipient d'eau glacée en ajoutant 10 ml d'eau distillée dans chaque tubes, puis il faut agiter.
- La lecture de la densité optique se fait à 530 nm contre un blanc réactif (contenant 1 ml de tampon acétate à la place de la solution de sucre inversi) à l'aide d'un spectrophotomètre.
- La droite d'étalonnage obtenue est représentée dans la figure suivante :

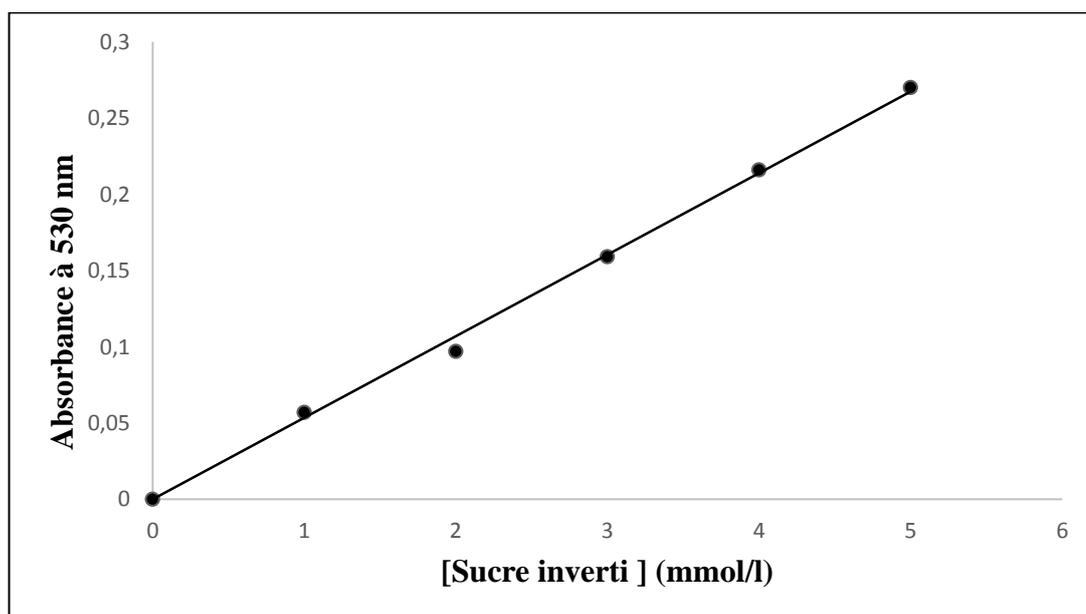


Figure 12 : Droite d'étalonnage pour le dosage des sucres réducteur (Absorbance = 0,0535 X [Sucre inversi]; $r^2 = 0,9976$).

VI. Détermination de l'activité enzymatique de l'invertase de *Saccharomyces cerevisiae* et *Saccharomyces boulardii*

L'activité d'une enzyme se traduit par une quantité de substrat transformée au cours du temps, qui s'exprime par des Unité international (UI) (**Pelmont, 1993**).

Pour la détermination de l'activité enzymatique de l'invertase, nous avons procédé de la manière suivante :

- L'extrait enzymatique a été dilué 150 fois dans le tampon acétate pH 4,6 - 0,1 M.
- Le substrat (saccharose) a été préparé en utilisant le tampon acétate pH 4,6 - 0,1 M.
- Dans une série de tube à essais, mélanger 0,75 ml de solution de substrat (saccharose 0,1 M) et 0,25 ml de la solution d'enzyme (pour chaque extrait enzymatique des de deux souches de levures).
- La réaction enzymatique se déroule à 25°C pour les durées d'incubation suivantes : 0- 30- 60- 90- 120- 150- 180- 210- 240- 270-300 secondes.
- Le réactif d'arrêt de la réaction est le réactif DNSA à raison de 1 ml par tube.
- Dans le tube correspondant au temps 0 (blanc réactif), mettre dans l'ordre le substrat, le réactif DNSA puis la solution d'enzyme.
- La réaction a été suivie pendant 3 min.
- Les tubes fermés sont incubés dans un bain-marie bouillant pendant 5 min, puis on les refroidit dans un récipient contenant de l'eau glacée.
- Nous avons ajouté 10 ml d'eau distillée dans chacun des tubes, afin de déterminer la densité optique à l'aide d'un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 530 nm.

Remarque : Chaque mesure est répétée 3 fois.

V.1. Détermination de la vitesse initiale de la réaction d'hydrolyse du saccharose par l'invertase

L'activité enzymatique est déterminée à partir de la mesure de la vitesse initiale de la réaction. La vitesse initiale d'hydrolyse du substrat par l'invertase est la quantité de substrat transformé ou de produit apparu par unité de temps et par unité de volume du milieu réactionnel. La vitesse initiale d'hydrolyse du saccharose par l'invertase a été déterminée par la formule suivante :

$$V_{in} = \frac{b \cdot 10^3}{2 \cdot b'}$$

Avec :

V_{in} : Vitesse initiale d'hydrolyse du saccharose ($\mu\text{mol.l}^{-1}.\text{min}^{-1}$).

b : Pente de la droite « absorbance du milieu réactionnel en fonction du temps » (unités d'absorbance. Min^{-1}).

b' : Pente de la droite d'étalonnage.

V.2. Détermination de l'activité enzymatique volumique

L'activité enzymatique volumique est la quantité d'enzyme pouvant transformer une quantité de matière par unité du temps. L'activité enzymatique peut être exprimée en unités internationales. Une unité internationale (UI) est la quantité d'enzyme catalysant la transformation d'une micromole de substrat par minute dans des conditions définies et si possible optimales. L'activité volumique de la préparation enzymatique est déterminée par l'équation suivante :

$$AV = \frac{V_{in} \cdot V_r \cdot F}{1000 \cdot V_e}$$

Avec :

AV : Activité enzymatique volumique (UI/ml).

V_{in} : Vitesse initiale d'hydrolyse du saccharose ($\mu\text{mol.l}^{-1}.\text{min}^{-1}$).

V_r : Volume du milieu réactionnel (1 ml).

V_e : Volume d'enzyme (0,25 ml).

F : Facteur de dilution de la préparation enzymatique.

V.3. Détermination de l'activité enzymatique spécifique

L'activité spécifique est le nombre d'unités d'enzyme par unité de masse de protéines totale de la solution enzymatique (**Pelmont, 1993**). L'activité spécifique traduit le degré de pureté de la préparation enzymatique, elle est maximale lorsque l'enzyme est complètement purifiée (**Loncle, 1992**). L'activité spécifique est une mesure de pureté d'un échantillon d'enzyme, elle augmente au cours de la purification. L'activité spécifique est déterminée par la formule suivante :

$$As = \frac{AV}{[\text{Protéine}]}$$

Avec:

AS : Activité spécifique (UI/mg).

AV : Activité volumique (UI/ml).

[Protéines]: Concentration en protéines de la préparation d'invertase (mg/ml).

Chapitre 3.
Résultats et Discussion

I. Recherche de l'activité « invertase » dans la préparation enzymatique

L'extrait enzymatique de la β -fructosidase, obtenu à partir des deux espèces de levure *Saccharomyces cerevisiae* et de *Saccharomyces boulardii*, est convenablement dilué et utilisé pour l'étude de la cinétique d'hydrolyse du saccharose en glucose et en fructose.

Les figures 13 et 14 permettent de constater qu'en présence des extraits préparés, le saccharose est hydrolysé en sucre-inverti. En effet, lors d'essais témoins réalisés en l'absence de l'invertase, le substrat n'était pas hydrolysé. Il est donc vraisemblable que l'enzyme contenue dans l'extrait soit une invertase. Selon **Kaiser et Botstein (1986)**, le genre *Saccharomyces* est la source la plus commune de cette enzyme. On peut donc admettre que l'invertase est présente en quantité notable dans les deux extraits préparés.

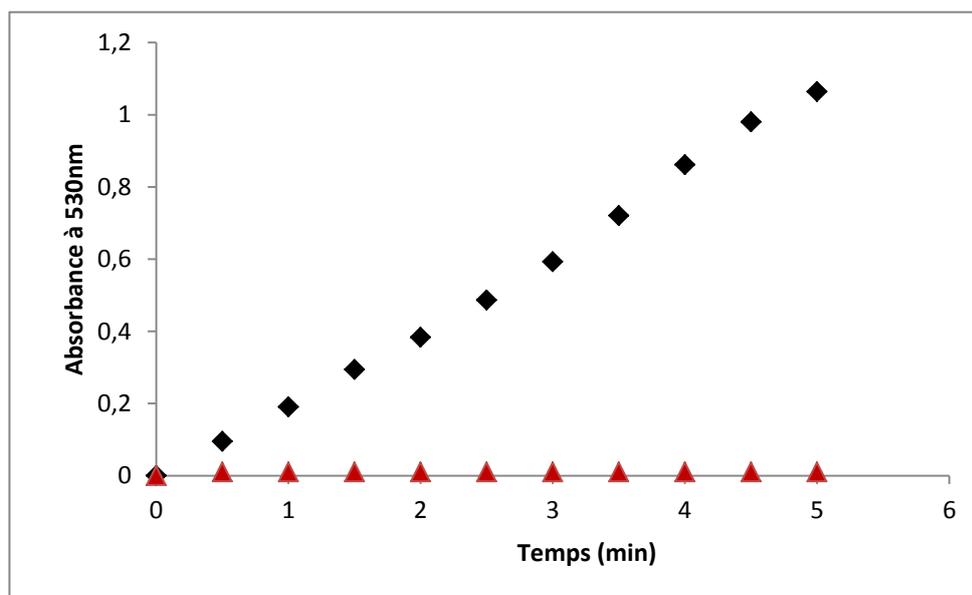


Figure 13 : Cinétique d'hydrolyse du saccharose en présence (◆) et en absence (▲) d'extrait enzymatique de l'invertase de *Saccharomyces cerevisiae* ([Saccharose]=0,1 M; dilution de l'enzyme 1/150 (V/V); tampon acétate 0,1M - pH4,6; 25°C).

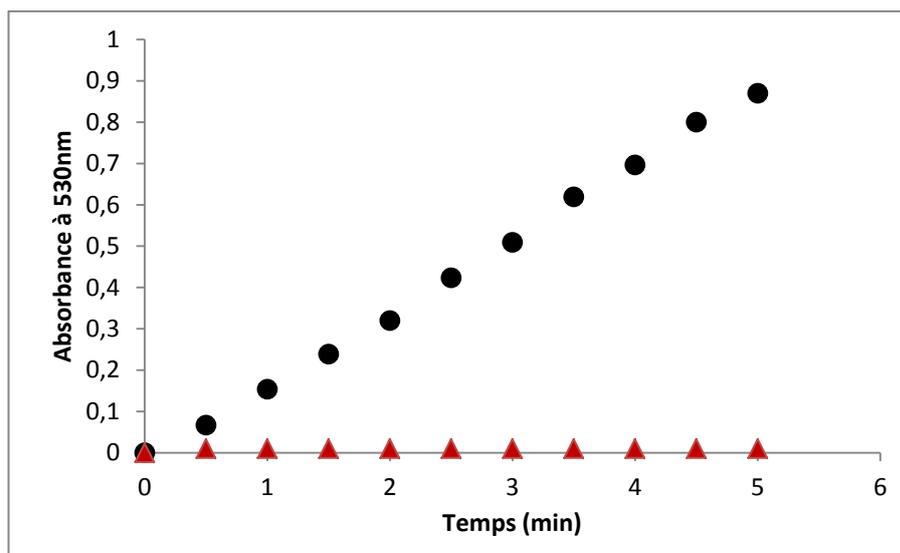


Figure 14 : Cinétique d'hydrolyse du saccharose en présence (●) et en absence (▲) d'extrait enzymatique de l'invertase de *Saccharomyces boulardii* ([Saccharose]=0,1 M; dilution de l'enzyme 1/150 (V/V); tampon acétate 0,1M - pH4,6; 25°C).

II. Mesure des activités volumique et spécifique de l'invertase dans les deux extraits

Le tableau 6 donne les résultats obtenus des activités volumique et spécifique de l'invertase dans les conditions opératoires ([Saccharose] = 0,1M; Tampon acéto-acétique (0,1M - pH 4,6); Température = 25°C; Dilution de l'enzyme 1/150 (V/V); Durée de la réaction 4 min).

Tableau 6 : Activités volumique et spécifique de l'invertase de *S.cerevisiae* et *S.boulardii* dans les conditions standards.

	[Protéines] (g/l)	Vitesse initiale ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{l}^{-1}$)	Activité volumique (UI/ml)	Activité spécifique (UI/mg)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	14,35	$1,95327\cdot 10^3$	1171,96	81,66
<i>Saccharomyces boulardii</i>	12,11	$1,61682\cdot 10^3$	970,092	80,10

Le dosage des protéines a été effectué par la méthode colorimétrique de biuret (**Tableau 6**). La concentration en protéines des extraits enzymatiques est du même ordre de grandeur mais néanmoins la préparation de la levure *Saccharomyces cerevisiae* présente une concentration en protéines plus élevée que celle de l'ultra-levure *Saccharomyces boulardii*.

La méthode du biuret a donc été adoptée dans cette étude pour le dosage des protéines en raison de sa fiabilité, de sa rapidité et essentiellement du non influence de la nature des protéines (**Lemerini, 2006**).

Les autres paramètres : la vitesse initiale, l'activité volumique et spécifique sont discutées dans le paragraphe III de la partie résultats et discussion.

III. Comparaison entre les activités enzymatiques des deux extraits de levures

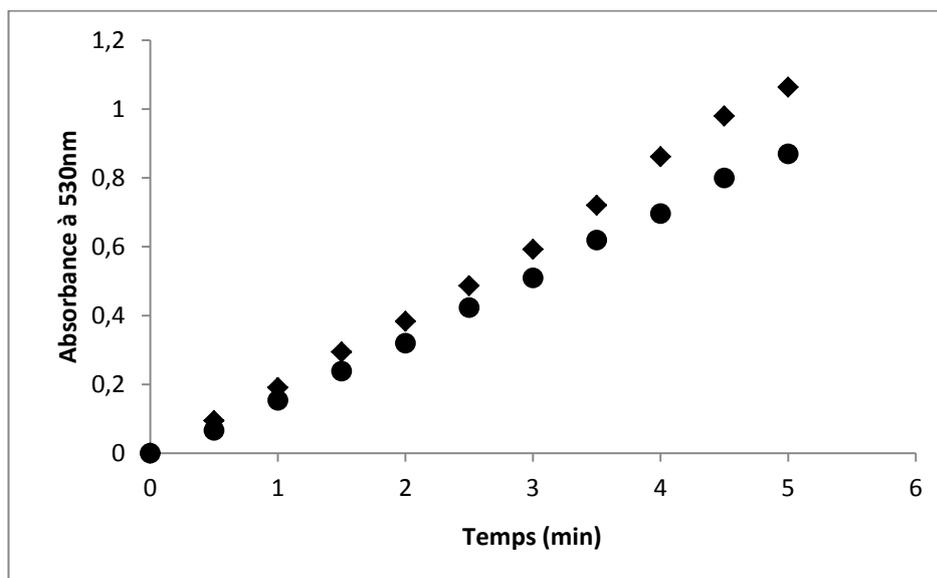


Figure 15 : Cinétique d'hydrolyse du saccharose par l'invertase extraite de *Saccharomyces cerevisiae* (◆) et de l'invertase extraite de *Saccharomyces boulardii* (●) ([Saccharose]=0,1 M; dilution de l'enzyme 1/150 (V/V); tampon acétate 0,1M - pH4,6; Température: 25°C).

Les activités enzymatiques obtenues pour les extraits de l'invertase des deux espèces de levure *Saccharomyces cerevisiae* et *Saccharomyces boulardii*, à 4 minutes de cinétique enzymatique valent respectivement 1171,96 UI/ml et 970,092 UI/ml. Ces résultats montrent une légère différence entre les deux activités. En effet, il est connu que le genre *Saccharomyces* est la source majeure de cette enzyme (**Kaiser et Botstein, 1986**).

IV. Effet du pH et de la température sur l'activité enzymatique

Remarque : Ce chapitre était prévu mais non réalisé pour cette étude.

IV.I. Effet du pH

En général, une enzyme possède un pH optimum où son activité catalytique est maximale. Il est important de connaître ce paramètre afin de mieux comprendre la réaction.

Le pH optimum de l'invertase de levure se situe entre 4,4 et 5,5 (**Durand et Monsan, 1982**). En effet, le pH du milieu intervient sur l'état d'ionisation de nombreux sites internes à de la molécule d'enzyme. Ses effets sont donc multiples :

- Sur la structure de l'enzyme.
- Sur l'association entre l'enzyme et le substrat.
- Sur le mécanisme réactionnel (**Pelmont, 1993**).

Arruda et Vitolo (1999) ont obtenu un pH optimum de 4,6 pour l'invertase. L'action du pH se traduit par la modification de la conformation et des propriétés de la protéine enzymatique (ionisation des acides aminés) et /ou du substrat (le substrat doit être sous une certaine forme, qui n'est pas nécessairement la forme de la neutralité) (**Kati, 2012**).

IV.II. Effet de la température

La stabilité de l'enzyme est dictée par sa configuration tridimensionnelle (elle-même déterminée par sa structure primaire et donc par son information génétique) et par l'environnement c'est à dire les interactions avec les différents facteurs température, pH et produits chimiques (**Illanes et al., 1999**).

L'activité catalytique des enzymes augmente avec la température, comme c'est le cas pour les catalyseurs chimiques. Toutefois, à partir d'une certaine température il se produit une dénaturation de l'enzyme qui s'accompagne d'une perte d'activité. C'est pourquoi les réactions enzymatiques sont conduites, généralement, légèrement en dessous de la température optimale d'action (**Berset, 1993**).

L'évolution de l'activité enzymatique de la β -fructosidase en fonction de la température fait apparaître une allure dissymétrique présentant deux phases bien distinctes qui correspondent à deux phénomènes différents. Dans la partie ascendante (de 15°C à 60°C), l'activité croît avec la température. Ce processus résulte d'une augmentation de l'agitation thermique des molécules avec l'augmentation de température, et peut s'expliquer par une augmentation de la concentration du

complexe entre les molécules de saccharose et l'invertase. Dans la partie descendante (au-delà de 60°C) l'activité enzymatique diminue. On assiste alors à une dénaturation thermique de la protéine enzymatique. Elle est due à l'agitation moléculaire qui détruit les liaisons faibles stabilisatrices de la structure spatiale de l'enzyme (**Lemerani et Raib, 2003**).

La température élevée perturbe l'activité enzymatique et peut conduire à une inactivation irréversible de l'enzyme.

L'activité enzymatique maximale (4211,2 UI/ml) est obtenue à une température de 60°C, cette température correspond à la température optimale de l'invertase de *Saccharomyces cerevisiae*. (**Alnajjar, 2001**).

L'énergie d'activation donne parfois des indications sur le mécanisme chimique de la réaction au niveau de l'enzyme (**Pelmont, 1993**).

Gouzi (2002) a déterminé une énergie d'activation de 45 KJ.mol⁻¹ pour l'invertase de *Saccharomyces cerevisiae*, dans les conditions opératoires suivantes ([Saccharose] = 0,25 M ; dilution de la préparation enzymatique : 1/500 (v/v) ; tampon acéto-acétique 0,1M – pH 4,8 ; temps de réaction : 0,5 min).

Les principaux avantages d'une température élevée lors de la mise en œuvre des enzymes à l'échelle industrielle sont :

- Vitesse de réaction plus importante, donc diminution du temps nécessaire pour obtenir un taux de conversion déterminé et augmentation de la productivité de l'installation.
- Diminution de la viscosité du milieu ce qui permet de minimiser l'énergie dépensée pour agiter le milieu.
- Solubilité élevée du substrat et/ou des produit(s) de réaction.
- Réduction des proliférations microbiennes.

Chapitre 4.
Conclusion et Perspectives

Ce travail a comme objectif l'étude de l'activité enzymatique de l'invertase extraite de *Saccharomyces cerevisiae* et de *Saccharomyces boulardii*.

Tout d'abord 'un protocole d'extraction de l'invertase à partir de deux espèces de levure (*Saccharomyces cerevisiae* et *Saccharomyces Boulardii*) est mis au point.

Nous avons ensuite mesuré l'activité de cette enzyme dans les conditions opératoires standards ([saccharose] = 0,1M; tampon acéto-acétique (0,1M - pH 4,6); température = 25°C; dilution de l'enzyme 1/150 (V/V); durée de la réaction 4 min).

Les activités enzymatiques obtenues pour les extraits de l'invertase des deux levures *Saccharomyces cerevisiae* et *Saccharomyces boulardii*, après 4 minutes de cinétique enzymatique valent respectivement 1171,96 UI/ml et 970,09 UI/ml. Ces résultats montrent une légère différence entre les deux activités des deux sources. En effet, il est connu que le genre *Saccharomyces* est la source majeure de cette enzyme

A la lumière de ce travail, plusieurs points peuvent se constituer en perspectives :

- La purification de l'invertase de *Saccaromyces Cerevisiae* et *Saccharomyces Baulardii*.
- Comparaison entre les paramètres cinétiques de l'invertase extraite des deux sources.

Références
Bibliographiques

1. **Acosta, N; Beldarrain, A; Rodriguez, L; Alonso, Y.** 2000.Characterization of recombinant invertase expressed in methylotrophic yeasts.Biotechnol. Appli. Biochem. Vol.32, pp. 179-187.
2. **Aggoune, B ; Zerkane, I.** Etude du comportement rhéologique d'une levure *Saccharomyces cerevisiae* en milieu liquide, Th, Master : Biotechnologie microbienne Université M'hamed Bougara-Boumerde, 2016
3. **Alguilera F; Peinado R. A ;Millan C ;Ortega J .M and Mauricio J .C** (2006) ;Relationship between ethanol tolerance (+)-ATPase activity and lipid composition of the plasma membrane in different win yeast strains ;Int J food Microbiol:110-34.42
4. **Alis van der Aa Kühle et Lene Jespersen.** (2003). The Taxonomic Position of *Saccharomyces boulardii* as Evaluated by Sequence Analysis of the D1/D2 Domain of 26S rDNA, the ITS1-5.8S rDNA-ITS2 Region and the Mitochondrial Cytochrome- c Oxidase II Gene. Systematic and Applied Microbiology, vol. 26, n° 4, 2003, pp. 564-571
5. **Alnajjar, A.** Préparation et études cinétique de la β -fructosidase de levure (*Saccharomyces cerevisiae*) soluble et immobilisé. Th, Magister : Biologie Moléculaire et Cellulaire, Université Aboubekr Belkaid - Tlemcen, 2001, pp. 21-22
6. **Arruda, L. M. D. O., & Vitolo, M.** (1999). Characterization of invertase entrapped into calcium alginate beads. Applied biochemistry and biotechnology, Vol, 81(1), pp. 23-33.
7. **Bacha, A .** Production et l'étude de l'activité de l'invertase produite par la levure *Saccharomyces cerevisiae* sur substrat à base de datte, Th, magister : agronomie, université El hadjLakhdar – Batna ,2008
8. **Barlikova, A., J. Svorc and S. Miertus.** 1991. Invertase for inverted syrup production and sugar determination. Anal. Chim. Acta., 247: 83-87.
9. **Benziane, S.**IMMOBILISATION DE LA IMMOBILISATION DE LA β - FRUCTOSIDASE DE *Saccharomyces Cerevisiae* ET ÉTUDE DES PHÈNOMÈNES DE TRANSFERT DE MATIÈRE, Th Magister : Biologie Moléculaire et Cellulaire, Université Aboubekr Belkaid, 2003 - Tlemcen, pp. 27
10. **Blachere, H., Corrieu, G., Peringer, P., et Lane, A.G.** (2009). A generalized mathematical model for the growth kinetics of *Saccharomyces cerevisiae* with experimental determination of parameters. Biotechnol Bioeng. Vol, 16: pp 431–454.

11. **Bouix M., Leveau J.Y.**, 1993. Microbiologie industrielle. Les micro-organismes d'intérêt industriel. Ed. Technique et documentation-Lavoisier-Apria. Paris, pp. 523
12. **Bourgeois, C. M., Larpent, J.**, (1996). Microbiologie alimentaire. Vol II : Aliments fermentés et fermentation alimentaire. (Ed) Lavoisier. Paris, pp 523.
13. **Bousmaha, L; Ouhssine, M ; El ychioui,M.** Isolement et caractérisation de *Candida guilliermondii* productrice d'une β fructofuranosidase endocellulaire.2014, laboratoire de biotechnologie microbienne, Université Ibn Tofail, Kénitra, Maroc
14. **Bultel, A.** Les probiotiques aujourd'hui : Où en est-on ? th. Doct : Pharmacie : université de Lille 2, 2017, pp. 48-50.
15. **Burnstein C.**, Biotechnologie enzymatique: Mode d'emploi – Industrie alimentaire - Environnement - Médical, Paris, Masson, 2000, 90 pages.
16. **Butel M-J.** Les probiotiques et leur place en médecine humaine. J Anti-Infect. juin 2014, Vol. 16(2) pp. 33-43.
17. **Camonis J.H.**, 1990. Modulation de l'activité des protéines RAS et régulation du cycle de division cellulaire de la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Memoire doctorat. Paris, 196 p
18. **Campeotto F, Waligora-Dupriet AJ, Doucet-Populaire F, Kalach N, Dupont C, Butel MJ.** Establishment of the intestinal microflora in neonates. Gastroenterol Clin Biol 2007, Vol.31, pp. 533-42.
19. **Cantarel, B., Coutinho, PM., Rancurel, C., Bernard, T., Lombard, V., Henrissat, B.** La base de données enzymes active sur les glucosides (CAZY) : une ressource experte pour la glyco-génomique. Nucleic acids, 2009, Vol.37, pp. 233-238.
20. **Castan, C.** la levure de bière : un champignon aux multiples bienfaits pour la santé et la beauté. Th. Doct : pharmacie : Université de Montpellier, 2016, pp. 74-75.
21. **Chaplin, M.** Enzyme technology, 2002. Cambridge University Press.
22. **Cherrak, S.** Mise en œuvre de la β -fructosidase de *Saccharomyces Cerevisiae* dans un bioréacteur à lit fluidisé. Th, Magister :Biologie moléculaire et cellulaire , Université Aboubekr Belkaid –Tlemcen,2003

- 23. Cinquin, C.** Développement et validation d'un nouveau modèle de fermentation colique in vitro avec cellules immobilisées. Québec : Thèse de recherche, 2005.
- 24. Coutouly, F., Montrossed, L., & Schoolclast, R.** (1992). COMPTE-RENDU DU COLLOQUE D'AIX-EN-PROVENCE. Feuille de routes, pp. 20-24.
- 25. Czerucka, D., Piche, T., Rampal, P.** *Saccharomyces boulardii*, has been found to be an effective probiotic in double-blind clinical studies. *Aliment Pharmacol Ther*, 2007, Vol. 26, pp. 767-778.
- 26. Decloux M.** (2002). Procédé de transformation en sucrerie (partie 1). Dans : *Technique de l'ingénieur, traité Agroalimentaire (F 6 150)*, 18p.
- 27. Desse-Berset, N.** (1993). Contenus d'amphores et surpêche: l'exemple de Sud-Perduto. *Exploitation des animaux sauvages à travers le temps ; actes des rencontres, 15-16-17 Octobre 1992 ; XIIIe Recontres internationales d'archéologie.*
- 28. Dides, J; Fabre, P.** Etude du phénotype invertase de la Levure de bière, étude de l'activité de l'enzyme invertase, Fiche laboratoire. 2007, Stage TP SvT en lycée J. Moulin de Pézenas.
- 29. Durand, G., Monsan, P.** Les enzymes : production et utilisations industrielles. Bordas, paris, pp. 309, 310, 315, 324,328.
- 30. Ezzariga, Nihal.** Probiotique : Applications thérapeutiques et effets secondaires. Th. Doct : Pharmacie : Université de Mohammed V de Rabat, 2015, pp. 3-4.
- 31. Faure S, Pubert C, Rabiller J, Taillez J, Yvain A-L.** Que savons-nous des probiotiques ? *Actualités Pharmaceutiques*. 2013, Vol. 52(528) :pp.18–21.
- 32. Fooks, L. J., and G. R. Gibson.** 2002. Probiotics as modulators of the gut flora. *Br. J. Nutr.* 88(Suppl. 1) :pp.39–49.
- 33. Gilbert, P,** Ultra-levure. Edition scientifique du laboratoire Biocodex, 1987, pp. 39-43.
- 34. Glazer, AN; Nikaido, H.** 1995. *Microbial technology- Fundamentals OD app! ied microbiology.* W. H. Freeman- and companny, New York.
- 35. Goetz, G., Roitsch, T.** Identification of amino acids essential for enzymatic activity of plant invertase. *Journal of plant physiology*, 2000, Vol.157, pp. 581-585.

36. **Goffeau A., Barrell B.G., Bussey H. & Davis R.W.** (1996). Life with 6000 gènes. Science.pp. 563-574
37. **Goulet O.** Un probiotique pas comme les autres : d'une histoire tropicale à des propriétés biologiques et des effets cliniques prouvés. Journal de pédiatrie et de puériculture. 2009, Vol. 22(6) pp. 269-272.
38. **Gouzi, H.** Etude cinétique de l'hydrolyse du saccharose par la β -fructosidase (E.C.3.2.1.26) de levure soluble et immobilisée en gel d'alginate. Mémoire de D.E.S., Université Aboubekr Belkaid, Tlemcen, p61.
39. **Guirand J.P.**, 1996 Microbiologie alimentaire .Ed Dunod .Paris,PP320
40. **Guirand J.P.**, 1998. Microbiologie alimentaire Ed Dunod PP320-625
41. **Guiraud J; Galzy P.**, 1998. Microbiologie alimentaire. Ed. Dunod. Paris, p 615.
42. **Guiraud, J., Galzy P.,** (1980). L'analyse microbiologique dans les industries alimentaires. Ed. Les éditeurs de l'Usine Nouvelle. Paris, pp 236.
43. **Herskowitz ,I** (1988) Life cycle of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae* Microbial Rev, Vol, 52(4).pp. 536-53
44. <http://www.tout sur la levure.fr>
45. **Illanes, A., Wilson, L., & Raiman, L.** (1999). Design of immobilized enzyme reactors for the continuous production of fructose syrup from whey permeate. Bioprocess engineering, vol, 21(6),pp. 509-515.
46. **Jaime, J.W.** Functional Profiling of the *Saccharomyces Cerevisiae* Genome in the Study of Mechanisms of Metal and Metalloid Toxicity. 2008, the Pennsylvania state university,p 219.
47. **Javillier M., Polonovski M., Florkin M.,** 1964. Traité de biochimie générale.Tome
48. **Kaiser, C.A; Botstein, D.** Secretion-Defective Mutations in the Signal Sequence for *Saccharomyces cerevisiae* Invertase. 1986, Molecular and cellular biology, pp. 2382-2391.
49. **Kamm, K., Hopps, S., Breves, G., Schroder, B.** (2004). Effets of the probiotic Yeats *Saccharomyces boulardii* on the neurochemistry of myenteric neurones in pig jejunum SCHEMANN *Neurogastroenterol Motil* 16, pp. 53–60

50. Kaplan ,O;Bakir ,U;Erarslan , A .1997.Thermal inactivation of native and crosslinked invertases biotechnology techniques
51. Kati, D.E. Cours de génie enzymatique .2011-2012, Université de Béjaia – FSNV Département des Sciences Alimentaires, p 57.
52. Kern G., Kern D., Jaenicke R., Seckier R., 1993. Kinetics of folding and association of differently glycosylated variants of invertase from *Saccharomyces cerevisiae*. Protein Science, 2, No 1, pp. 1862-1868.
53. Kern G., Schuik N., Schmid F.X., Jaenicke R., 1992. Stability, quaternary structure, and folding of internal, external, and core-glycosylated invertase from yeast. Protein Science, 1, No 1, pp. 120-131.
54. KO, S; LOHA, V; DU, L; PROKOP IA ; TANNER, RI. 1999. Partitioning invertase between a dilute water solution and generated droplets. Applied Biochemistry and Biotechnology. Pp. 77-79, 501 - 510.
55. Kreger –Van, Rij N.J., (1984). The yeast, a Taxonomic Study, Elsevier Biomedical.
56. Larpent J. P., Gourgoud M. (1985). Elément de microbiologie. Ed. Herman. Paris. P : 464
57. Larpent, J. P. Biotechnologie des levures. Ed. Paris. Masson, 1991, pp. 426.
58. Larpent. J.P; gourgoud, M.L. Eléments de microbiologie. éditeurs des sciences et des arts. Paris. Herman,1985,pp 46.
59. Lehninger, A. L. Biochimie : Bases moléculaires de la structure et des fonctions cellulaires (2^{ème} édition), Flammarion, 1977, pp. 191, 192, 207,208.
60. Lekikot,Z ; Malki, R. Etude de la production de la biomasse de *Saccharomyces cerevisiae* sur milieu optimisé à base de l'extrait de dattes déclassées , Th, master : biotechnologie fongique, Université des Frères Mentouri - Constantine, 2016
61. Lemerini, W ; Raib, H. Etude de la stabilité thermique de l'invertase de *Saccharomyces Cerevisiae* en présence d'alginate de sodium, Th diplôme supérieur : biologie moléculaire et cellulaire. Université Aboubekr Belkaid Tlemcen, 2003.

- 62. Lemerini, W.** Contribution à l'étude des paramètres cinétiques de l'ascorbate oxydase de courgette verte (*Cucurbita pepo medullosa*). Ebauche d'un capteur optique pour le dosage de l'acide ascorbique, Th Magistère : biologie, université Aboubekr Belkaid, Tlemcen, 2006
- 63. Lilly, D.M. and Stillwell, R.H.** (1965). Probiotics. Growth promoting factors produced by micro-organisms. Science.
- 64. Linden, G., Lorient, D.,** Biochimie agro-alimentaire .Ed .Paris : Masson, 1994, pp.213
- 65. LOIEZ Annie,** «Production de la levure de panification par biotechnologie-la levure *saccharomyces cerevisiae*», 2003, dans ' techniques de l'ingénieur'.Bio, Bioprocédés, vol Bio 2 (Trimestrielle).
- 66. Loncle, D.** Génie enzymatique, 1992.Doin, Paris, pp. 4, 12, 13, 15, 17, 63,143.
- 67. Lucile, S.,** Leon Balents. "Quantum spin liquids: a review." Reports on Progress in Physics 80.1 (2016): 016502.
- 68. Maktouf, S., Kamoun, A., Moulis, C., Remaud-Simeon, M., Ghribi, D., & Chaabouni, S. E.** (2013). A new raw-starch-digesting α -amylase: production under solid-state fermentation on crude millet and biochemical characterization. J Microbiol Biotechnol, Vol, 23(4).
- 69. Malou, R.** Contribution à la mise en évidence des modulateurs de l'activité enzymatique de la Béta Fructosidase, Th, master : Biochimie, Université Aboubekr Belkaid – Tlemcen, 2018
- 70. Mirzarakhmetova, DT; Abdurazakova, SK.** 1998.Production of invertase immobilized on polyamide in a medium with a high sucrose concentration. Chemistry of Natural Compounds, 34. N° 3, pp. 309 - 311.
- 71. Misloviovâ, D; Vikartovskâ, A; Gemeiner, P.** 1997.The glycosylated enzyme-binding assay for the study of the interaction of free and immobilized lectins with carbohydrates. J. Biochem. Biophys. Methods, 35, 37-48.
- 72. Mouranche, A; Costes, C.** Enzymes d'intérêt industriel. 1985, Gauthier Villars-bordas, paris, pp. 14,40.
- 73. Naumoif D.G.,** 1999. Conserved sequence motifs in levansucrases and bifunctional α -xylosidases and α -L- arabinases. F.E.B.S. Letters, 488, pp. 177-179.

- 74. Noui Y.** L'optimisation de la production de la biomasse *Saccharomyces cerevisiae* cultivée sur un extrait de datte, Th, ingénieur. Institut d'Agronomie. Université de Batna, 2001, 62 p.
- 75. Olivier Goulet,** (2009) .Effets de *Saccharomyces boulardii* dans le traitement et la prévention des diarrhées de l'enfant.
- 76. Oteng-Gyang K.** 1984. Introduction à la microbiologie dans les pays chauds.Ed.lavoisier.Paris.PP :43-51
- 77. Pandey, A., Soccol, C.R., Selvakumar, P., Soccol, V.T., Krieger, N., et Jose, D.,** (2009). Recent developments in microbial inulinases, its production, properties and industrial applications. Appl Biochem Biotechnol. 81: pp 35–52.
- 78. Pelmont, J.** Enzymes, 1993. Office des publications universitaires, Alger, pp. 167, 193,196, 205,240.
- 79. Pelmont, J.** Les enzymes. 1993, office des publications universitaires, pp.167-169.
- 80. Phadtare S ; Britto D.V; Pundle A ;Prabhune A ; Sastry M,** 2004. Invertase lipid bio composite films: preparation, characterization, and enzymaticactivity, Biotechnol. Prog, 2004, 20(1), pp. 156-16.
- 81. Phaff .H, Miller M.W and Mrak E.K,** 1968. The life of yeasts. In: Oteng-Gyang K.Introduction à la microbiologie alimentaire dans les pays chauds. Technique & Documentation Lavoisier, Paris. 8, PP : 43.
- 82. Pol, D.** travaux pratiques de biologie des levures. Edition Ellipses, 1996, pp. 103-104.
- 83. Quevrain E., Seksik P.** « Microbiote intestinal : de la diarrhée post-antibiotiques aux maladies inflammatoires intestinales ». La Presse Médicale. janvier 2013. Vol. 42, n°1, pp. 45-51.
- 84. Rampal P.** « Les levures : classification, propriétés, utilisations technologiques et thérapeutiques ». Journal de Pédiatrie et de Puériculture. 1996. Vol. 9, n°3, pp. 185-186.
- 85. Reddy A., Maley F.,** 1996. Studies on identifying the catalytic role of Glu-204 in the active site of yeast invertase. The journal of Biological Chemistry, 271, No 24, 13953-13958.
- 86. Reddy, A; Maley, F.** Identification of an active-site residue in yeast invertasenby affinity labeling and site-directed mutagenesis.1990, The Journal of Biological Chemistry, 265, No 19

- 87. Rehamnia, B., Djelid, H.** Recherche de microorganismes de différents écosystèmes développant une activité probiotique. Mémoire pour l'obtention du diplôme de master en biologie. Université de Constantine, 2016, pp. 3-4-5.
- 88. Revuz B.,** (1979). Microbiologie et industrie alimentaire (culture de la levure sur mélasse). (Ed) Lavoisier. Paris, pp 113-120
- 89. Robert G , Emercy, Charles R., Kramer, Tracy R., et Tian.** Return to academic standards: A critique of student evaluations of teaching effectiveness. Quality assurance in Education, 2003
- 90. Rodrigues. A.C.P., Cara D.C, Fretez S.H.G.G, Cunha F.Q, Vieira E.C., Nicoli J.R. and Vieira L.Q.** (2000).*Saccharomyces boulardii* stimulates sIgA production and the phagocytic system of gnotobiotic mice.
- 91. Romero-Gomez S; Augur C; Viniegra-Gonzalez G,** 2000. Invertase production by *Aspergillus Niger* in submerged and solid-state fermentation. *BiotechnolLett.* 22:1255e1258.
- 92. Sazawal S, Hiremath G, Dhingra U, et al.** Efficacy of probiotics in prévention of acute diarrhoea : a meta-analysis of masked, randomized, placebo-controlled trials. *Lancet Inf Dis* 2006, Vol.6 pp. 374–82.
- 93. Simon R., Meunier P.,** 1970. Microbiologie industrielle et Génie biochimique. (Ed) Masson et Cie. Paris, 559 p.
- 94. Soro Y. R., Diomande M., Kouame L. P., Diopoh K. J.** (2001). Purification et caractérisation des cellulases du suc digestif de l'escargot *Archachatina ventricosa* (Achatinidae, Achatinaceae). *Rev Ivoir Sc Technol.* 2 : pp. 103-107
- 95. Suresh P ; Kamble ; Jyotsna C.B,** 2012.Effect of nitrogen sources on the production of invertase by yeast *Saccharomyces cerevisiae* 3090. *International Journal of AppliedBiology and Pharmaceutical Technology,* 2, pp.539-550
- 96. Thuriaux P.,** 2004. Les organismes modèles : "la levure" .Ed. DECLIN. Paris , P- 144
- 97. Tortora G.J., Anagnostakos, N.P.** (1987). Principes d'anatomie et de physiologie.Ed. INC, 5 ème édition. pp. 688-693.
- 98. Tortora, G.J; Funk, B.R; Case, C.L.** introduction à la microbiologie.2003, édition du renouveau pédagogique, Canada, p 121.

99. Van der Aa Kuhel, A., Jespersen, L. The Taxonomic Position of *Saccharomyces Boulardii* as Evaluated by Sequence Analysis of the D1/D2 Domain of 26S rDNA, the ITS1-5.8S rDNA-ITS2 Region and the Mitochondrial Cytochrome-C Oxidase II Gene. *Microbiol*, 2003, vol. 26(4), pp. 71-564.

100. Wallach, J. Les enzymes. 1997, Nathan, Paris, pp 4, 6,8.

101. Wang, N.S. Experiment N°14 : Enzyme Kinetics of invertase via initial rate determination, 1996. Protocole de travaux pratiques, Université du Maryland, États-Unis.

Annexes

I. Préparation du réactif du biuret

- **1g** du sulfate de cuivre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)
- **6g** du tartrate double de sodium et de potassium
- **30g** d'hydroxyde de sodium
- **1g** d'iodure de potassium (KI)
- **1000ml** d'eau distillée

Dissoudre le sulfate de cuivre et le tartrate double de sodium et de potassium dans 500 ml d'eau distillée. Ajouter l'iodure de potassium puis ajouter la solution de soude 0,8 N préalablement préparée (30g dans 100ml d'eau distillée); compléter le volume à 1litre.

Le réactif du biuret doit être conservé à l'abri de la lumière dans un flacon soigneusement bouché (Wallach *et al.*, 1996; Lemerini et Raib, 2003).

II. Préparation du tampon acéto-acétique

Pour préparer le tampon acéto-acétique 0,1M – pH 4,6, utilisé comme solvant de l'invertase et de son substrat (saccharose), il faut procéder à la préparation des solutions suivantes :

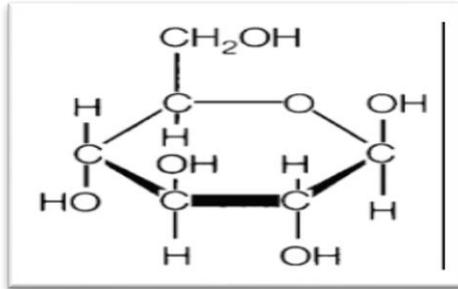
- ✓ Solution « A » d'acide acétique 0,2 M : 11,55 ml de CH_3COOH dilués dans 1000 ml d'eau distillée.
- ✓ Solution « B » d'acétate de sodium 0,2M : 27,2g $\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2\text{Na} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ dissous dans 1000 ml d'eau distillée.
- ✓ Mélanger 25,5 ml de la solution « A » et 24,5ml de la solution « B », compléter à 200 ml avec de l'eau distillée pour obtenir une solution tampon à 0,1M de pH 4,6.

III. Composition du réactif de l'acide 3,5-dinitosalicyclique (DNSA)

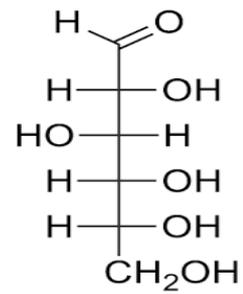
Pour préparer 100 ml de réactif du DNSA nous avons procédé aux pesées suivantes :

- ✓ 1g de DNSA dissoudre dans 20 ml de soude pour obtenir une solution 2 N.
- ✓ 30 g de tartrate double de sodium et de potassium dissout dans 50 ml d'eau distillée.
- ✓ Compléter à 100 ml avec de l'eau distillée et agiter jusqu'à obtention d'une solution homogène de couleur orange-rouge (si nécessaire, chauffer légèrement le mélange).
- ✓ Conserver ce réactif DNSA dans un flacon bien fermé et à l'abri de la lumière.

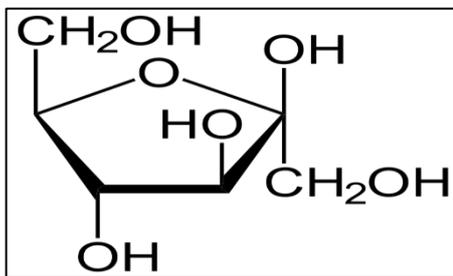
IV. Structure du glucose, du fructose et du saccharose



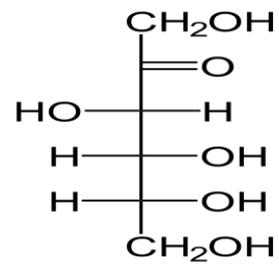
(α ou β)-D- glucopyranose



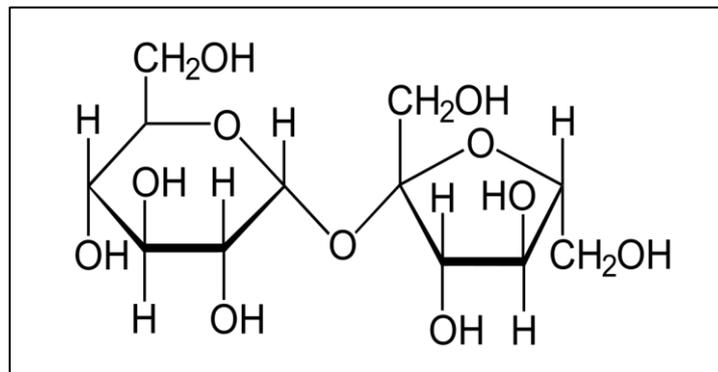
D-Glucose



(α ou β) -D-fructofuranose



D-Fructose



α -D-glucopyranosyl-(1-2) - β -fructofuranoside (saccharose).

Résumés

Abstract

The objective of our work was to evaluate the enzymatic activity of invertase extracted from the baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae* and the ultra yeast *Saccharomyces boulardii*. Our study consisted, in a first step, of obtaining a raw preparation of the invertase from the two yeast species and then studying the activity of this enzyme.

The invertase activity was studied under standard conditions of pH, temperature, enzyme extract concentration, sucrose concentration and acetate buffer. We found that the enzyme activity of the invertase extracted from *Saccharomyces cerevisiae* (1171.96 UI/ml) is higher than that extracted from *Saccharomyces boulardii* (970.09 UI/ml) but never the less it remains of the same order of magnitude.

Key words: *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces boulardii*, extraction, invertase.

ملخص

كان الهدف من عملنا هو تقييم النشاط الإنزيمي للإنفيرتيز المستخرج من خميرة الخبز *Saccharomyces cerevisiae* وخميرة *Saccharomyces boulardii*.

تألفت دراستنا، أولاً، من الحصول على تحضير خام للإنفيرتيز من نوعي الخميرة ثم دراسة نشاط هذا الإنزيم.

تمت دراسة نشاط الإنفيرتيز في الظروف القياسية لدرجة الحموضة ودرجة الحرارة وتركيز مستخلص الإنزيم وتركيز السكر وعازلات الاسيتات. لقد وجدنا أن النشاط الإنزيمي للإنفيرتيز المستخرج من *Saccharomyces cerevisiae* (1171.96 UI/ml) أعلى من ذلك المستخرج من *Saccharomyces boulardii* (970.09 UI/ml) ولكن مع ذلك يبقى من نفس الترتيب من حيث الحجم.

الكلمات المفتاحية : خميرة الخبز *Saccharomyces cerevisiae*، *Saccharomyces boulardii*، إنفيرتيز، استخلاص

Résumé

L'objectif de notre travail était d'évaluer l'activité enzymatique de l'invertase extraite à partir de la levure de boulangerie *Saccharomyces cerevisiae* et l'ultra levure *Saccharomyces boulardii*. Notre étude consistait, dans un premier temps, d'obtenir une préparation brute de l'invertase des deux espèces de levure puis d'étudier l'activité de cette enzyme.

L'activité de l'invertase a été étudiée dans les conditions standards de pH, de température, de concentration d'extrait enzymatique, de concentration du saccharose et du tampon acétate. Nous avons constaté que l'activité enzymatique de l'invertase extraite de *Saccharomyces cerevisiae* (1171,96 UI/ml) est plus élevée que celle extraite à partir de *Saccharomyces boulardii* (970,09 UI/ml) mais néanmoins ça reste du même ordre de grandeur.

Mots clés : *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces boulardii*, extraction, invertase.