

ISOLEMENT DU JUS DE PRESSE DE CANNE À SUCRE D'UNE SOUCHE DE *CANDIDA SP* THERMOPHILE ET PRODUCTRICE DE FRUCTOFURANOSIDASE

M. ENNOUALI¹, Z. MENNANE², E. KERAK³, A. CHAOUCH¹, and M. OUHSSINE¹

¹Laboratoire d'Agro-physiologie, Biotechnologie, Environnement et Qualité, Département de Biologie, Faculté des Sciences, université Ibn Tofail, KENITRA B.P 14999, Morocco

²Institut National d'Hygiène Rabat, Avenue Ibn Batouta, Rabat, Morocco

³Laboratoire de virologie, microbiologie, qualité et biotechnologie: ETB-FST-Mohammedia, Morocco

Copyright © 2016 ISSR Journals. This is an open access article distributed under the **Creative Commons Attribution License**, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

ABSTRACT: Thirty high activity yeast strains saccharolytic and acidifying were isolated from sugar cane press juice and molasses from a sugar plant (grown on a solid semi-synthetic culture medium supplemented with 3 g of sucrose and incubated for 72 h at 40 ° C. the purification of the strains is verified by microscopic control after three subculture cycles in liquid medium and a passage on solid medium in a Petri dish 80 mm in diameter. the identification was carried out according to biochemical tests, physico-chemical and microscopic. These culture, purification and identification have isolated a strain which we named LES16 characterized by its temperature tolerance, which considerably increases during fermentation. This is a *Candida sp* which presents optimal conditions (pH 5, 3 g / l sucrose, 1 g / l (NH₄)₂SO₄ and 40 ° C) an enzyme activity of 4228 IU / l. has a major interest in the application of a technique primarily based on the use of a mixed starter containing lactic acid bacteria and yeast fermentation and strong acidifying power. Localization of beta-fructofuranosidase activity LES16 strain was obtained by culture on the semi-synthetic liquid medium supplemented with 3 g of sucrose. The centrifuge technology and cell lysis have produced more cell fractions to search for enzyme activity

KEYWORDS: Enzyme activity, *Candida sp*, beta.- fructofuranosidase, acidifying power and fermentation.

RESUME : Trente souches de levures à forte activité saccharolytique et acidifiantes ont été isolées à partir du jus de presse de Canne à sucre et de la mélasse d'une usine sucrière (cultivée sur un milieu de culture semi-synthétique solide additionné de 3 g de saccharose et incubées 72 h à 40°C. La purification des souches est vérifiée par un contrôle microscopique après trois cycles de repiquage en milieu liquide et un passage sur milieu solide en boîte de Pétri de 80 mm de diamètre. L'identification a été réalisée selon les tests biochimiques, physico-chimiques et microscopiques.

Ces techniques de culture, de purification et d'identification ont permis d'isoler une souche que nous avons nommée LES16 caractérisée par sa tolérance à la température, qui augmente considérablement au cours de la fermentation. Il s'agit d'un *Candida sp* qui présente en conditions optimales (pH 5, 3 g/l saccharose, 1 g/l (NH₄)₂SO₄ et 40°C) une activité enzymatique de 4228 UI/l. présente un intérêt majeure pour l'application d'une technique basée essentiellement sur l'utilisation d'un levain mixte contenant des bactéries lactiques et des levures à fort pouvoir acidifiant et fermentaire.

Localisation de l'activité β-fructofuranosidase de la souche LES16 a été obtenue en faisant des cultures sur le milieu semi-synthétique liquide additionné de 3 g de saccharose. La technique de centrifugation et lyse cellulaire ont permis d'obtenir plusieurs fractions cellulaires pour rechercher l'activité enzymatique

MOTS-CLEFS: Activité enzymatique, *Candida sp*, β-fructofuranosidase, pouvoir acidifiant et fermentaire

1 INTRODUCTION

L'industrie marocaine d'extraction d'agar-agar à partir des algues, notamment *Gelidium sesquipedale*, occupe la troisième place mondiale. Cette industrie génère une grande quantité de déchets généralement déposés anarchiquement en décharge publique qui constituent un sérieux problème pour la ville de Kénitra, dans la région du Gharb au Maroc.

Nous avons mis en place une technique biologique de transformation de ces déchets en un produit stable pour des applications agronomiques, notamment comme fertilisant du sol et comme supplément alimentaire des rations destinées à l'alimentation animale. Cette technique est basée essentiellement sur l'utilisation d'un levain mixte contenant des bactéries lactiques et des levures à fort pouvoir acidifiant et fermentaire en présence de 20 % de mélasse (Ennouali et al., 2006)

Dans le présent travail, nous avons cherché à isoler et caractériser des levures saccharolytiques possédant non seulement un pouvoir acidifiant et fermentaire, mais étant également thermophiles, car la température augmente considérablement au cours de la fermentation.

2 MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1 MILIEU DE CULTURE

Un milieu de culture semi-synthétique additionné de saccharose a été utilisé (3 g extrait de levure, 1 g KH_2PO_4 , 1 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1 ml solution de micro-éléments q.s.p. 1 l eau distillée (Cooney et Levine.,1972]). Le milieu liquide est agité à 105t/min (pour tous les essais) dans des erlenmeyers. Il peut être rendu solide par addition d'agar (20 g/l). Les glucides sont ajoutés aseptiquement par filtration sur membrane millipore (0,45 μm). Il est autoclavé 20 min à 120°C.

2.2 ISOLEMENT, PURIFICATION ET IDENTIFICATION DES SOUCHES

Des échantillons ont été prélevés du jus de presse et de la mélasse de Canne à sucre de la chaîne de fabrication d'une usine sucrière de Sidi Alal Tazi (région de Gharb au Nord Ouest du Maroc). Les cultures ont été réalisées sur le milieu semi-synthétique solide additionné de 3 g de saccharose et incubées 72 h à 40°C. La purification des souches est vérifiée par un contrôle microscopique après trois cycles de repiquage en milieu liquide et un passage sur milieu solide en boîte de Petri de 80 mm de diamètre.

Les souches pures ont été conservées à 4°C sur milieu PDA (Potato Dextrose Agar) incliné en tubes. Un repiquage est réalisé tous les mois.

L'identification a été réalisée selon les tests biochimiques, physico-chimiques et microscopiques.

La souche a été incubée 24 h à 30°C à l'obscurité sur un milieu semi-synthétique après inondation des puits par 0,1 ml de cette culture. Après 24 h d'incubation à 30°C, l'identification est effectuée selon les références du fabricant.

2.3 CARACTÉRISTIQUES DES TRENTE SOUCHES

Les souches purifiées ont été cultivées sur le milieu semi-synthétique liquide pendant 48 heures à 30°C.

Le pH est mesuré après addition des glucides par un pHmètre type Orion Research étalonné à pH 7,02 et 4,4 par NaOH 1N, HCl 1N. La croissance cellulaire est déterminée par turbidimétrie à 600 nm.

Pour mesurer la température, nous avons préparé deux cultures de milieu semi-synthétique pour chaque souche isolé, et après nous avons incubé les souches à deux températures différentes 30°C et 40°C pendant 24 heures pour optimiser les levures mésophiles et les levures thermophiles.

L'activité enzymatique est déterminée par dosage des sucres réducteurs par la méthode de Nelson [1944] améliorée par Somogyi [1952]. Le milieu réactionnel contient 0,1 ml de culture, 0,25 ml de saccharose 0,1 M et 0,15 ml de tampon phosphate à pH 5. Le milieu est incubé dans un bain marie thermostaté 10 min à 40°C. 2 ml de réactif de Somogyi sont additionnés puis on porte à l'ébullition pendant 15 minutes. Après refroidissement, 1 ml de réactif de Nelson est additionné. L'absorbance à 540 nm de chaque échantillon est déterminée contre un témoin blanc contenant 0,5 ml de tampon. La détermination des sucres réducteurs obtenus par hydrolyse est déterminée par une gamme étalon, à partir d'une solution mère de 0,3 g/l de glucose et 0,3 g/l de fructose.

2.4 LOCALISATION DE L'ACTIVITE β -FRUCTOFURANOSIDASE DE LA SOUCHE LES16

Les cultures sur le milieu semi-synthétique liquide additionné de 3 g de saccharose ont été arrêtées en fin de phase exponentielle de croissance, centrifugées 15 min à 10 000 tours/minute. Le surnageant constitue la fraction FI. Le culot contenant les cellules intactes constitue la fraction FII. Une partie des cellules est remise en suspension dans du tampon phosphate à pH 5, lysée par sonication (ultrasons) et à nouveau centrifugée. La fraction soluble constitue la fraction FIII et la partie insoluble contenant les débris cellulaires la fraction FIV. L'activité enzymatique a été ensuite recherchée dans chaque fraction.

2.5 FACTEURS INFLUENÇANT LA CROISSANCE ET L'ACTIVITE ENZYMATIQUE DE LES16

Différents pH (2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 et 9) ont été testés avec le milieu semi-synthétique liquide contenant 5 g/l de saccharose sur la croissance et la production de l'enzyme. La biomasse et l'activité enzymatique ont été mesurées en fin de culture.

La croissance et la production de l'enzyme ont été suivies à 20, 25, 30, 35, 40, 45 et 50°C. Les cultures sont réalisées dans le milieu semi-synthétique liquide avec 3 g/l de saccharose à pH 5. La température optimale de croissance et de production de l'enzyme a été alors déterminée.

Diverses concentrations de saccharose (0, 1, 3, 5, 7 et 10 g/l) ont été testées avec le milieu semi-synthétique liquide sur la croissance de la levure et l'activité enzymatique à 35°C, pH 5 et 105 t/min.

Des cultures ont été réalisées dans le milieu semi-synthétique liquide contenant un glucide simple (glucose, galactose), un diholoside (lactose, maltose, saccharose), un polymère (amidon, cellulose, inuline) à 3 g/l à 35°C et pH5.

Des substances azotées organiques et inorganiques ont été testées sur la croissance et l'apparition de l'activité enzymatique. Les cultures sur le milieu semi-synthétique à pH 5 contenant 5 g/l de saccharose ont été incubées 24 h à 35°C.

2.6 CROISSANCE ET ACTIVITE ENZYMATIQUE EN FERMENTEUR DE LES16

Les cellules ont été cultivées dans un fermenteur SETRIC (SET 002M) muni d'une cuve de 2 litres. On a utilisé 1800 ml de milieu semi-synthétique liquide à pH 5,5 autoclavé 30 min à 120°C et additionné de 5 g/l de saccharose. Il a été inoculé avec 200 ml de préculture (24 h à 30°C). Des échantillons sont prélevés périodiquement pour le suivi de la biomasse et de l'activité enzymatique pendant 24 heures d'incubation.

3 RÉSULTATS

3.1 ISOLEMENT ET IDENTIFICATION DES SOUCHES

Trente souches de levures à fort pouvoir saccharolytique ont été isolées et purifiées (Tableau I). Elles appartiennent aux genres Candida, Pechia et Saccharomyces.

L'étude de la croissance revient alors à évaluer la biomasse microbienne lorsque les levures se trouvent dans un milieu favorable et dans des conditions physicochimiques optimales. 15 souches isolées présente une biomasse varie entre 0.84 et 2.00, et 15 souches de levures ont des valeurs entre 2.00 et 4.36 comme valeur maximale obtenue dans le cas de la souche LES 16 (Candida sp).

25 souches sont mésophiles, la température optimale de croissance et de production de l'enzyme optimale étant de 30°C, et 5 souches possèdent une croissance et une production d'enzymatique maximale entre 35 et 45°C.

Au cours de mesure du pH, les résultats obtenus montrent qu'il y a trois types de souches de levures isolées.

- Un groupe de levures à faible pouvoir acidifiant avec un pH supérieur à 4.8 (LES3, LES4, LES5, LES6, LES12, LES14).
- Un groupe de levures à moyen pouvoir acidifiant avec un pH de 4.4 à 4.8 (LES7, LES9, LES10, LES11, LES13, LES14, LES15, LES19, LES20, LES22, LES23, LES24, LES25, LES26, LES27, LES28, LES29, LES30).
- Un groupe de levures à fort pouvoir acidifiant avec un pH de 4.1 à 4.4 (LES2, LES8, LES13, LES16, LES18, LES21).

Par son pouvoir acidifiant, saccharolytique et sa thermophilie, la souche LES16 a été retenue pour les essais ultérieurs. D'après les caractères biochimiques et microscopiques il s'agit de *Candida sp*.

Tableau I. Croissance (Absorbance à nm), pH et activité saccharolytique AE de trente souches de levures issues du jus de presse (JP) ou de la mélasse (M) cultivées 48 h sur un milieu semi-synthétique additionné de 3 g/l saccharose à 30°C et 40°C.

Souche	Détermination		A initial	A final	30 °C	40 °C	pH initial	pH final	AE (UI/l)
LES1	<i>Candida</i>	JP	0,19	1,98	+	-	5,56	4,51	706
LES2	<i>Candida</i>	JP	0,15	2,03	+	-	5,56	4,38	1139
LES3	<i>Candida</i>	JP	0,12	3,17	+	+	5,56	5,19	2120
LES4	<i>Saccharomyces</i>	JP	0,09	0,89	+	-	5,56	5,35	406
LES5	<i>Candida</i>	JP	0,12	0,84	+	-	5,56	4,82	821
LES6	<i>Saccharomyces</i>	JP	0,35	2,68	+	-	5,56	5,07	2161
LES7	<i>Saccharomyces</i>	JP	0,17	1,75	+	-	5,56	4,54	585
LES8	<i>Candida</i>	JP	0,19	3,18	+	+	5,56	4,32	2174
LES9	<i>Candida</i>	JP	0,12	1,98	+	-	5,56	4,60	1168
LES10	<i>Candida</i>	JP	0,09	1,87	+	-	5,56	4,70	1170
LES11	<i>Candida</i>	M	0,19	3,35	+	-	5,56	4,49	2174
LES12	<i>Candida</i>	M	0,08	1,98	+	-	5,56	4,81	1052
LES13	<i>Candida</i>	M	0,18	2,28	+	-	5,56	4,36	1174
LES14	<i>Candida</i>	M	0,35	2,58	+	-	5,56	5,11	2127
LES15	<i>Candida</i>	M	0,21	3,22	+	-	5,56	4,65	3154
LES16	<i>Candida sp</i>	JP	0,27	4,36	+	+	5,56	4,11	4228
LES17	<i>Candida</i>	JP	0,17	2,98	+	-	5,56	4,63	1487
LES18	<i>Candida</i>	JP	0,23	2,68	+	-	5,56	4,35	1187
LES19	<i>Saccharomyces</i>	JP	0,09	2,86	+	-	5,56	4,65	1870
LES20	<i>Saccharomyces</i>	JP	0,18	1,20	+	-	5,56	4,45	1145
LES21	<i>Saccharomyces</i>	M	0,11	3,18	+	+	5,56	4,38	1420
LES22	<i>Saccharomyces</i>	M	0,27	2,94	+	-	5,56	4,65	1365
LES23	<i>Saccharomyces</i>	M	0,15	1,70	+	-	5,56	4,77	835
LES24	<i>Candida</i>	M	0,14	2,69	+	-	5,56	4,67	1102
LES25	<i>Candida</i>	M	0,14	2,70	+	-	5,56	4,55	1324
LES26	<i>Candida</i>	M	0,27	3,30	+	+	5,56	4,48	2115
LES27	<i>Candida</i>	M	0,10	1,95	+	-	5,56	4,49	1164
LES28	<i>Candida</i>	M	0,18	1,59	+	-	5,56	4,49	732
LES29	<i>Pechia</i>	M	0,08	2,87	+	-	5,56	4,48	2178
LES30	<i>Pechia</i>	M	0,08	2,95	+	-	5,56	4,64	2282

(Pour distinguer entre les souches mésophiles et les souches thermophiles, nous avons étudiés la capacité des levures isolées de se cultivés dans le milieu semi-synthétique à des températures différentes: 30°C et 40°C).

3.2 LOCALISATION DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE DE LES16

L'activité enzymatique se trouve essentiellement dans la fraction cellulaire FII avec 4218 UI/l (Tableau II). La fraction insoluble FIV présente aussi une valeur proche de la fraction cellulaire. L'activité enzymatique au niveau du surnageant et de la fraction soluble reste très faible.

Tableau II. Localisation de l'activité enzymatique sur différentes fractions cellulaires de la souche de *Candida sp* cultivée sur milieu semi-synthétique à 30°C et pH 5,5.

Activité enzymatique	Surnageant FI	Cellules intactes FII	Fraction soluble FIII	Fraction insoluble FIV
UI	530	4772	632	2016
%	6,67	60,01	7,95	25,36

Comment calculez-vous les pourcentages ? Qu'est-ce qui fait 100 %? 67,05 + 5,18 est inférieur à 100 % Où est passé le reste ?

Réponse: 100% d'activité enzymatique de la souche LES16 = % fraction I + % fraction II + fraction III + fraction IV

$$\text{Donc } 6,67\% + 60,01\% + 7,95\% + 25,36\% = 100\%$$

3.3 FACTEURS INFLUENÇANT LA CROISSANCE ET L'ACTIVITE ENZYMATIQUE DE LES16

La biomasse et l'activité enzymatique de la souche LES16 varient en fonction du pH initial du milieu (Figure 1). Elles augmentent parallèlement à l'augmentation du pH pour atteindre 4215 UI/l avec une biomasse importante (A = 4,5) à pH 5. Au-delà de cette valeur, une diminution est constatée.

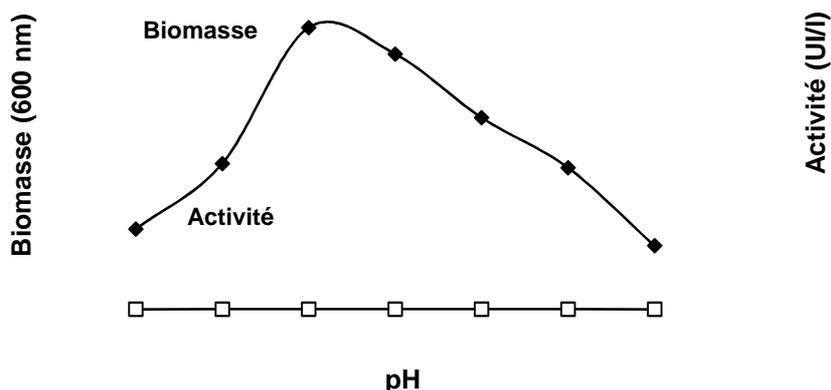


Fig. 1 : Effet du pH sur la croissance et l'apparition de l'activité enzymatique de la souche LES16 cultivée sur milieu semi-synthétique à 30°C 24 h à 105 tours/min.

La souche LES16 montre une croissance (A = 4,2) et une production d'enzyme (3580 UI/l) optimales à 35°C (Figure 2) et non négligeable à 40°C. À 30 et 45°C, la croissance et l'activité enzymatique restent importantes alors qu'à 50°C, elles diminuent fortement.

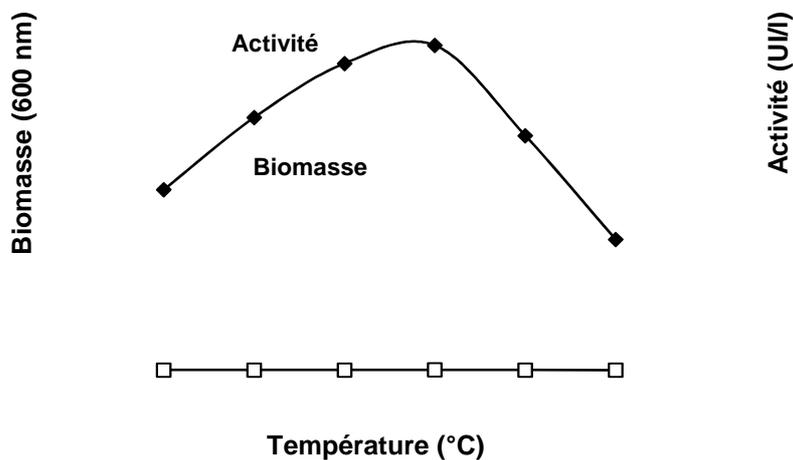


Fig. 2 : Effet de la température sur la croissance et l'activité enzymatique de la souche de *Candida sp* cultivée sur milieu semi-synthétique de 25 à 50°C 24 h à 105 tours /min.

La croissance et l'activité enzymatique (6115 UI/l) sont maximales à 5 g/l de saccharose (Tableau III). Au-delà, elles diminuent.

Tableau III. Effet de la concentration en saccharose sur la croissance et l'activité enzymatique Act de la souche de Candida sp cultivée sur milieu semi-synthétique 24 h à 35°C.

Saccharose (g/l)	pH initial	pH final	A initiale	A finale	Act initiale	Act finale
1	5,43	4,28	0,23	2,81	33	1751
3	5,35	4,31	0,25	4,45	128	5840
5	5,32	4,07	0,27	5,38	243	6115
7	5,30	4,11	0,25	4,14	228	3244
8	5,21	4,04	0,17	4,28	173	2192
10	5,19	4,15	0,12	4,03	113	940

En présence des sucres simples (galactose, glucose), la croissance reste importante alors que l'activité enzymatique est quasi nulle (Tableau IV). En présence de diholosides autres que le saccharose (lactose et maltose), l'activité enzymatique est faible, de même qu'en présence de polymères (amidon, cellulose et inuline). L'enzyme apparaît fortement induite par le saccharose avec une activité de 4295 UI/l.

Tableau IV. Effet de la source de carbone à 3 g/l sur la croissance et l'activité β -fructofuranosidase AE de la souche LES16 de Candida sp cultivée 24 h sur milieu semi-synthétique à 35°C, pH 5 et 105 tours/min.

Sucres	pH initial	pH final	A initiale	A finale	AE finale (UI/l)	Activité glucide /Activité saccharose (%)
Galactose	5,87	5,04	0,38	1,09	13	0,30
Glucose	5,87	4,71	0,37	1,20	118	2,75
Lactose	5,89	5,10	0,30	1,10	8	0,18
Maltose	5,91	4,53	0,28	1,15	23	0,53
Saccharose	5,57	3,65	0,16	1,37	4296	100,00
Amidon	5,47	4,76	0,18	1,04	18	0,41
Cellulose	5,51	5,03	0,19	1,03	113	2,63
Inuline	5,60	5,50	0,15	1,10	78	1,81

Pour la source d'azote inorganique, la meilleure croissance est obtenue avec le sulfate d'ammonium avec une activité enzymatique de 4100 UI/l (Tableau V). Pour la source d'azote organique, les meilleurs résultats sont observés avec l'extrait de levure (4290 UI/l). Pour les cultures mixtes contenant le sulfate d'ammonium à 1 g/l, la meilleure croissance est obtenue avec un mélange avec l'extrait de levure à 2 g/l avec une activité enzymatique de 5800 UI/l.

Tableau V. Effet de onze sources d'azote sur la croissance et l'activité saccharolytique AE de la souche LES16 de Candida sp cultivée 24 h sur milieu semi-synthétique additionné de 5 g/l de saccharose à 35°C et 105 tours/min

Sucres	pH _i	pH _f	A initiale	A finale	AE initiale (UI/l)	AE à 24 h (UI/l)
(NH ₄) ₂ HPO ₄	5,53	5,12	0,30	1,05	0	328
(NH ₄) ₂ SO ₄	5,52	4,26	0,25	3,37	379	4100
C ₂ H ₄ NO ₂	5,56	5,01	0,12	1,07	28	424
NaNO ₃	5,60	5,08	0,19	1,05	0	198
CO(NH ₂) ₂	5,54	4,70	0,12	2,01	113	634
Extrait de levure	5,58	4,21	0,29	3,45	218	4291
Peptone	5,40	5,03	0,14	2,15	178	383
Tryptone	5,55	4,71	0,21	1,04	41	172
(NH ₄) ₂ SO ₄ + extrait de levure	5,62	4,10	0,87	4,23	716	5800
(NH ₄) ₂ SO ₄ + peptone	5,60	4,20	0,57	4,16	645	4421
(NH ₄) ₂ SO ₄ + tryptophane	5,51	4,40	0,43	4,18	566	4432

3.4 CROISSANCE ET ACTIVITE ENZYMATIQUE EN FERMENTEUR DE LES16

L'activité enzymatique augmente régulièrement et parallèlement à la croissance de la levure (Figure 3). Le maximum de production est obtenu après 13 heures de culture (6000 UI/l) avec un taux de conversion du saccharose de 90 %.

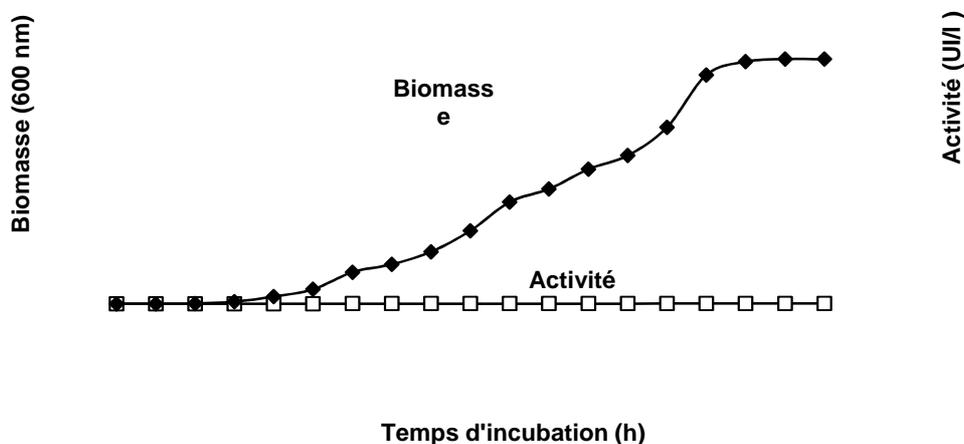


Fig. 3 : Cinétique enzymatique de la souche LES16 de *Candida sp* cultivée dans un fermenteur contenant 1800 ml de milieu semi-synthétique à 5 g/l saccharose à 40°C et pH 5.

4 DISCUSSION ET CONCLUSION

Parmi les trente levures isolées sur un milieu semi-synthétique contenant le saccharose comme source de carbone, la souche LES16, issue du jus de presse de la Canne à sucre et correspondant à *Candida sp*, a été sélectionnée. Nous avons déjà isolé des souches de *Candida* productrices de β -fructofuranosidase, de *C. colliculosa* à partir du jus de presse [Labioui et al., 2007] et de *C. famata* à partir de la mélasse de la Canne à sucre [Ouhssine et al., 2007].

La fraction insoluble FIV présente une activité β -fructofuranosidase élevée proche de la fraction cellulaire FII alors que l'action enzymatique au niveau du surnageant et de la fraction soluble sont très faibles. Ceci suggère que l'activité de cette souche est exclusivement extramembranaire. C'était aussi le cas de la β -fructofuranosidase de *C. colliculosa* [Labioui et al., 2007].

La souche LES16 présente une croissance et une production d'enzyme non négligeable de 25 à 45°C et élevées à 35 et 40°C alors qu'à 50°C, elles diminuent. La souche LES16 est donc thermophile. Les résultats enregistrés dans le cas de l'effet de température se concordent avec ceux mentionnés par [Blanco et al. 1994].

L'enzyme est fortement induite par le saccharose et peu par les autres glucides. L'activité enzymatique est maximale pour 5 g de saccharose et diminue de moitié pour 10 g. Les activités de l'inulinase de *Kluyveromyces fragilis* et de l'invertase de *Sacharomyces cerevisiae* [Groot-wassink et Fleming., 1980 et Yurkivich et Kovaleva., 1972] diminuent de plus de 50 % pour une concentration de saccharose supérieure à 5 g/l.

Dans le cas d'ajout de source d'azote, la meilleure croissance et apparition de l'activité enzymatique sont obtenues dans les cultures mixtes contenant le sulfate d'ammonium à 1 g/l et l'extrait de levure à 2 g/l avec une activité enzymatique est de 5800 UI/l.

Les conditions optimales de croissance et l'apparition de l'activité enzymatique sont limitées en erlenmeyers du fait de la consommation du substrat et de l'accumulation de métabolites. Pour cette raison, une culture en fermenteur dont les paramètres sont contrôlés (pH, température, concentration du substrat, source de carbone, source d'azote) a été effectuée.

En conclusion, la β -fructofuranosidase de la souche LES16 de *Candida sp* est extramembranaire, fortement induite par le saccharose à pH 5,5, de 35 à 45 °C, et nettement favorisée par un mélange de sulfate d'ammonium et d'extrait de levure, à 5 g/l de saccharose, avec une production maximale de 6000 UI/l. Ces caractéristiques permettent d'envisager une utilisation industrielle.

REFERENCES

- [1] Blanco (C.), Siero (C.A.), Daiz (A.), Villa (T.G.) - Production and partial characterization of an endopolygalacturonase from *Saccharomyces cerevisiae*. - *Can. J. Microbiol.*, 1994, 40(11), 974-977.
- [2] Cooney (C.L.), Levine (D.W.) - Microbial utilization of methanol. - *Adv. Appl. Microbiol.*, 1972, 15, 337-365.
- [3] Ennouali (M.), Ouhssine (M.), Ouhssine (K.), Elyachioui (M.) - Biotransformation of algal waste by biological fermentation. - *African J. Biotechnol.*, 2006, 5(13), 1233-1237.
<http://www.academicjournals.org/ajb/PDF/pdf2006/3Jul/Ennouali%20et%20al.pdf>
- [4] Groot-Wassink (J.W.D.), Fleming (S.E.) - Non specific β -fructofuranosidase (inulase) from *Kluyveromyces fragilis*: batch and continuous fermentation, simple recovery method, and some industrial properties. - *Enzym. Microbiol. Technol.*, 1980 2, 45-53.
- [5] Labioui (H.), Elmoualdi (L.), El Yachioui (M.), Berny (E.H.), Ouhssine (M.) - Souche de *Candida colliculosa* saccharolytique à activité β -fructofuranosidase membranaire. - *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, 2007, 146(1-2), 39-50.
- [6] Ouhssine (M.) El Yachioui (M.), Sanhagi (W.), Gessouss (Z.) - Souche de *Candida famata* productrice de β -fructofuranosidase. - *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, 2007, 146(3-4), 289-298.
- [7] Nelson (N.J.) - A photometric adaptation of the Somogy method for the determination of glucose. - *J. Biol. Chem.*, 1944, 153(2), 375-380.
- [8] Somogyi (M.) - Notes on sugar determination. - *J. Biol. Chem.*, 1952, 195(1), 19-23.
<http://www.jbc.org/cgi/reprint/195/1/19.pdf>
- [9] Yurkevich (V.V.), Kovaleva (N.S.) - [Sucrose and inulinase functions of the beta-fructosidase active center of *Kluyveromyces (Saccharomyces) fragilis*.] (russe) - *Dokl. Akad. Nauk. S. S. S. R.*, 1972, 207(5), 1233-1235.