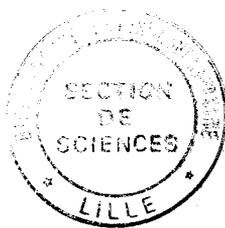


50376
1988
207



50376
1988
207

N° d'ordre : 253

THÈSE

présentée à

L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE FLANDRES ARTOIS

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE

Mention : Biologie Expérimentale

par

Pascal VANACKER

**RECHERCHE DE NOUVELLES AMYLOGLUCOSIDASES THERMOSTABLES
CHEZ LES CHAMPIGNONS FILAMENTEUX. SELECTION DE SOUCHES
MUTANTES HYPERPRODUCTRICES ET ETUDE BIOCHIMIQUE DE
DEUX COMPLEXES AMYLOGLUCOSIDASIQUES.**

Soutenu le 6 Juillet 1988 devant la Commission d'Examen

M. L. LACOSTE, Professeur, Muséum National d'Histoire Naturelle Paris
M. J. LABARERE, Professeur, Université de Bordeaux II - INRA
M. G. VIDAL, Maître de Conférences, Université de Lille I
M. S. BALL, Professeur, Université de Lille I
M. M. PORCHET, Professeur, Université de Lille I

Président
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur



A V A N T - P R O P O S

Ce travail a été réalisé au laboratoire de Cryptogamie de l'U.S.T.L.F.A. dans le cadre d'un contrat CIFRE établi entre le Ministère de la Recherche et la société Roquette Frères (Lestrem).

C'est un grand plaisir pour moi d'exprimer tout d'abord ma profonde gratitude à Monsieur le Professeur L. Lacoste. Après m'avoir accueilli dans son laboratoire, il a toujours su me faire profiter de ses grandes connaissances et de ses précieux conseils. Je le remercie pour la confiance si souvent témoignée et je le prie de bien vouloir accepter l'expression de ma très vive et très profonde reconnaissance.

Il m'est agréable de retrouver dans ce jury Monsieur le Professeur J.LABARERE dont j'ai eu l'occasion d'apprécier lors d'un stage effectué au laboratoire de Génétique Moléculaire et d'Amélioration des Champignons Cultivés de Bordeaux la grande compétence et la grande disponibilité. Le sachant constamment animé d'un souci aigu de perfection, je n'en redoute cependant que plus encore son jugement.

Je tiens à remercier Monsieur G.VIDAL qui m'a beaucoup appris du métier de mycologue, pour la bienveillance avec laquelle il a accepté d'examiner ce mémoire. L'aide qu'il m'a apportée pour la rédaction du texte m'a été particulièrement précieuse.

J'adresse mes plus vifs remerciements à Monsieur le Professeur S.BALL qui en dépit de l'accumulation d'obligations qu'entraîne pour lui sa récente installation à Lille n'a pas hésité à lire cette thèse et à la juger.

Je voudrais manifester ma grande reconnaissance à Monsieur le Professeur M.PORCHET de l'honneur qu'il me fait d'être de ce jury ainsi que de l'estime toujours témoignée depuis le D.E.A.

Je remercie Monsieur P. SICARD, Directeur recherche et développement de la société Roquette Frères, d'avoir accepté le principe d'un contrat CIFRE sur le sujet proposé. Je tiens également à remercier mes interlocuteurs au sein de l'entreprise : Madame M.H. SANIEZ, Mademoiselle F. VERWAERDE, et messieurs P. LEULEU et P. LOOTEN. Je n'oublie pas non plus Madame E.BRIOIS du service de documentation de Roquette Frères qui m'a toujours apporté un concours efficace lors des diverses recherches bibliographiques.

Monsieur VIALA a réalisé l'analyse des acides aminés de l'alpha-glucosidase de *Thermoascus crustaceus* qui figure dans ce mémoire. Je tiens ici à le remercier tout particulièrement.

M.BECHET, R. BLONDEAU et G.STRECKER m'ont souvent apporté un appui précieux en me faisant profiter des moyens de leur laboratoire mais aussi de leurs conseils. Je leur en suis très reconnaissant.

Il m'est agréable d'évoquer également les amicales et fructueuses conversations que j'ai eues avec P.SIMONEAU, T.NOEL et J.C. SALVADO au cours de mon stage de génétique moléculaire. Mon initiation aux techniques propres à celle-ci en a été grandement facilitée.

Je n'aurai garde d'oublier d'adresser mes très sincères remerciements à Noëlle CHAUDORGE dont l'aide dévouée m'a été extrêmement précieuse tout au long de mes expériences ainsi que lors de la réalisation des figures de ce mémoire.

Madame MAETIE a assuré avec efficacité et bonne humeur la dactylographie de cette thèse. Qu'elle en soit remerciée ici.

Je remercie enfin tous ceux qui, de près ou de loin, m'ont aidé au cours de ce travail et tout particulièrement mes condisciples du laboratoire du Laboratoire de Cryptogamie G.BOUDART, B.DEHORTER, et D.TAVERNIER. La première partie de l'étude a été réalisée, même si ce fut parfois difficile, en collaboration avec B.BACLE, je l'en remercie.

Table des Matières

INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE PRELIMINAIRE.....	5
I.- PROCESSUS INDUSTRIEL DE TRANSFORMATION DE L'AMIDON EN GLUCOSE.....	7
1.- Le substrat: L'amidon.....	7
a) Isolement.....	7
b) Composition chimique.....	7
2.- La transformation.....	9
a) La liquéfaction.....	9
b) La saccharification.....	10
Conclusion.....	11
II.- MISE EN EVIDENCE ET DOSAGE DES ENZYMES AMYLOLYTIQUES FONGIQUES.....	11
1.- Mise en évidence et dosage de l' α -amylase.....	14
a) Mise en évidence.....	14
b) Dosage.....	17
2.- Dosage de l'amyloglucosidase et de l' α -glucosidase en présence d' α -amylase.....	17
3.- Différenciation et dosage de l' α -glucosidase et de l'amyloglucosidase.....	17
III.- CHOIX D'UN TYPE DE DOSAGE.....	21
CONCLUSION.....	22

Chapitre I : SELECTION DE MICROORGANISMES PRODUCTEURS D'ACTIVITE AMYLOGLUCOSIDASIQUE A THERMOSTABILITE AMELIOREE

I.- ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

A.- LES PRODUCTEURS D'AMYLOGLUCOSIDASE ET D' α -GLUCOSIDASE.....	25
1.- Les bactéries.....	25
2.- Les levures.....	27

3.- Les champignons filamenteux.....	27
a) Les souches produisant une amyloglucosidase ou une α -glucosidase.....	28
b) Les souches industrielles.....	28
c) Conclusion.....	29
B.- THERMOSTABILITE DES ENZYMES	
1.- Définition et méthodes d'analyse.....	29
2.- Recherche de l'amélioration de la thermostabilité.....	31
a) Modification de l'enzyme.....	33
b) Modification de l'organisme producteur.....	36
c) Changement d'organisme producteur.....	38
Conclusion.....	41
II.- RESULTATS DE LA SELECTION	
A.- ISOLEMENT DES SOUCHES ET PREMIER CRIBLE.....	43
1.- Isolement et détermination des souches étudiées.....	43
2.- Test utilisé lors du premier crible.....	45
3.- Première sélection.....	50
Conclusion.....	55
B.- DEUXIEME SELECTION.....	55
1.- Caractérisation des enzymes amyloglucosidasiques des souches sélectionnées.....	55
a) Mesure de la durée de la demi-vie des enzymes amyloglucosidasiques.....	55
b) Optimums de température et de pH.....	58
2.- Autres données biologiques concernant les souches sélectionnées.....	61
Conclusion.....	63
C.- DERNIERE ETAPE DE LA SELECTION ET DETERMINATION DE L'ACTIVITE AMYLOGLUCOSIDASIQUE DES DEUX ESPECES DE THERMOASCUS.....	65
1.- Choix final d'une souche.....	65

2.- Mise en évidence des activités de type amyloglucosidasique produites par les deux <i>Thermoascus</i>	66
a) Technique de Chiba et al. (1982).....	66
b) Technique de Kujawski et al. (1980).....	66
Conclusion.....	69
CONCLUSION DE LA SELECTION.....	69

III.- LE THERMOASCUS CRUSTACEUS

A.- HISTORIQUE, POSITION SYSTEMATIQUE ET BIBLIOGRAPHIE DU GENRE <i>THERMOASCUS</i>	71
B.- <i>THERMOASCUS CRUSTACEUS</i> (souche P6): DESCRIPTION ET CONTRIBUTION AU DETERMINISME DES PHASES SEXUEE ET ASEXUEE.....	73
1.- Description de la souche P6.....	76
2.- Déterminisme des phases sexuée et asexuée.....	76
a) Etude préliminaire de l'effet de la température et du milieu de culture.....	78
b) Variation des sources de carbone et d'azote, et du taux d'azote sur le déterminisme des phases de la reproduction du <i>Th. crustaceus</i> (souche P6)....	79
Conclusion.....	81
CONCLUSION DE LA PREMIERE PARTIE.....	83

CHAPITRE II. AMELIORATION GENETIQUE DE LA PRODUCTION D'ENZYME PAR VOIE DE MUTAGENESE ET SELECTION

INTRODUCTION.....	87
I.- <u>ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE</u>	88
A.- MUTAGENESE.....	88
1.- Choix de l'agent mutagène.....	88
2.- Dose optimale d'agent mutagène.....	89
3.- Effets de l'environnement.....	91
B.- PROCEDURES DE SELECTION ET UTILISATION DE TESTS.....	93
1.- Procédures de sélection.....	93
a) sélection en plusieurs étapes.....	95
b) sélection par recyclage.....	95

2.- Utilisation de tests.....	96
a) test de surface.....	96
b) test en milieu liquide.....	97
3.- Artéfacts des tests.....	97
4.- Développement du milieu de culture.....	99
C.- AMELIORATION DE LA PRODUCTION D'AMYLOGLucosidase.....	99
CONCLUSION.....	102
II.- <u>RESULTATS: CHOIX DU TEST ET DE LA PROCEDURE DE SELECTION</u>	105
A.- PRESENTATION DES TESTS ENVISAGES.....	105
1.- Test de carottage.....	105
2.- test de diffusion sur le milieu de culture.....	106
B.- MISE AU POINT DU TEST.....	106
1.- Mise en évidence de la zone d'hydrolyse.....	106
2.- Nature du milieu utilisé.....	107
a) action sur la taille de la zone d'hydrolyse.....	107
* nature de la source de carbone.....	107
* teneur du milieu en substrat carboné et gélose.....	110
* synthèse du pool enzymatique sur milieu solide.....	112
b) action sur la taille de la colonie.....	112
* choix d'un restricteur de croissance et	
concentration utilisée.....	115
* effets possibles du desoxycholate de sodium....	116
* évaluation de l'effet de différents restricteurs	
de croissance sur la production de l'enzyme....	119
C) PROCEDURE DE SELECTION ADOPTEE.....	119
III.- <u>RESULTATS DE LA MUTAGENESE ET DE LA SELECTION</u>	121
A.- OBTENTION DE MUTANTS.....	121
1.- Mutagenèse UV.....	121
2.- Mutagenèse NTG.....	121
3.- Mutagenèse EMS.....	121

B.- AMELIORATION DE PRODUCTION.....	123
1.- Premiers essais.....	123
* évaluation de la distribution des mutants selon le mutagène.....	123
* évaluation du test.....	123
2.- Résultats de la sélection.....	128
CONCLUSION.....	128
CHAPITRE III. ETUDE ENZYMOLOGIQUE DU COMPLEXE AMYLOGUCOSIDASIQUE DE THERMOASCUS CRUSTACEUS	
INTRODUCTION.....	133
I.- <u>ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE</u>	133
A.- PURIFICATION DES AMYLOGUCOSIDASES ET DES ALPHA-GLUCOSIDASES.....	133
B.- PROPRIETES PHYSIQUES.....	137
1.- Poids moléculaire.....	137
2.- Effets de la température, du pH et des sels.....	139
C.- CARACTERISTIQUES CHIMIQUES.....	139
1.- Composition en acides aminés et séquences.....	139
2.- Partie glycanique.....	140
a) contenu en oses et oses représentés.....	143
b) liaison ose peptide.....	143
c) structure de la partie glycanique.....	145
d) rôle de la partie glycanique.....	145
3.- Transformations chimiques.....	147
Conclusion de l'étude bibliographique.....	148
II.- <u>TRAVAUX EFFECTUES SUR LE COMPLEXE AMYLOGUCOSIDASIQUE DE THERMOASCUS CRUSTACEUS</u>	151
A.- PURIFICATION DU SYSTEME AMYLOGUCOSIDASIQUE DE <i>T. crustaceus</i>	151
B.- SPECIFICITE D'ACTION ET IDENTIFICATION DES ENZYMES.....	154
C.- CINETIQUE ENZYMATIQUE.....	157

D.- PROPRIETES PHYSIQUES.....	157
1.- Poids moléculaire.....	157
2.- Effets de la température du pH des sels.....	162
E.- CARACTERISTIQUES CHIMIQUES.....	162
1.- Composition en acides aminés.....	162
2.- Partie polysaccharidique.....	162
F.- COMPORTEMENT DU COMPLEXE AMYLOGUCOSIDASE EN CONDITIONS INDUSTRIELLES DE SACCHARIFICATION.....	165
G.- DISCUSSION.....	171
 CONCLUSION.....	 175
 CHAPITRE IV. CONFIDENTIEL	 177
Le chapitre IV pour cause de secret industriel ne peut être publié.	
CONCLUSION GENERALE.....	207
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	209
ANNEXES	

I N T R O D U C T I O N
G E N E R A L E

Très tôt, l'Homme a produit et utilisé des préparations enzymatiques avant que leur nature et fonction réelles soient connues ou comprises. Ainsi, en Occident, les procédés de brasserie reposaient sur l'utilisation des enzymes d'orge germé alors qu'en Orient, les champignons filamenteux étaient employés pour modifier le goût de divers aliments ou boissons.

Des raisons telles que la spécificité d'action ou l'amélioration de la qualité du produit fabriqué ont permis d'imposer l'emploi des enzymes dans de très nombreux secteurs d'activité. Néanmoins, si les premiers travaux consacrés aux enzymes datent du XIXe siècle, le véritable essor de l'industrie des enzymes n'est apparu qu'au lendemain de la seconde guerre mondiale grâce aux progrès enregistrés dans le domaine de la culture en fermenteur.

Les deux marchés actuellement les plus importants sont d'une part l'utilisation des protéases dans les poudres lessiviellées et d'autre part la transformation enzymatique de l'amidon. Parmi les enzymes intervenant dans ce dernier processus, l'amyloglucosidase fongique, faisant suite à l'action d'une α -amylase bactérienne qui catalyse la dépolymérisation primaire de l'amidon, permet l'obtention finale du glucose. Ce dernier possède de nombreuses applications, tant dans le domaine alimentaire que pharmaceutique ou industriel, reflétant l'importance considérable de l'amyloglucosidase.

En dépit des améliorations apportées par la dégradation enzymatique de l'amidon par rapport à l'hydrolyse acide antérieurement en cours, on peut reprocher à cet enzyme principalement produit par des *Aspergillus* du groupe *niger* certaines insuffisances, la plus importante résidant dans une température optimale d'activité voisine de 60°. Cette température limitée de fonctionnement, l'enzyme étant rapidement inactivée au-delà de celle-ci, expose les cuves de saccharification à des contaminations bactériennes et impose une durée d'hydrolyse totale de soixante douze heures. Il apparaît donc qu'il serait intéressant de substituer à l'amyloglucosidase actuellement commercialisée un enzyme possédant une stabilité opérationnelle à une température supérieure à 70°C.

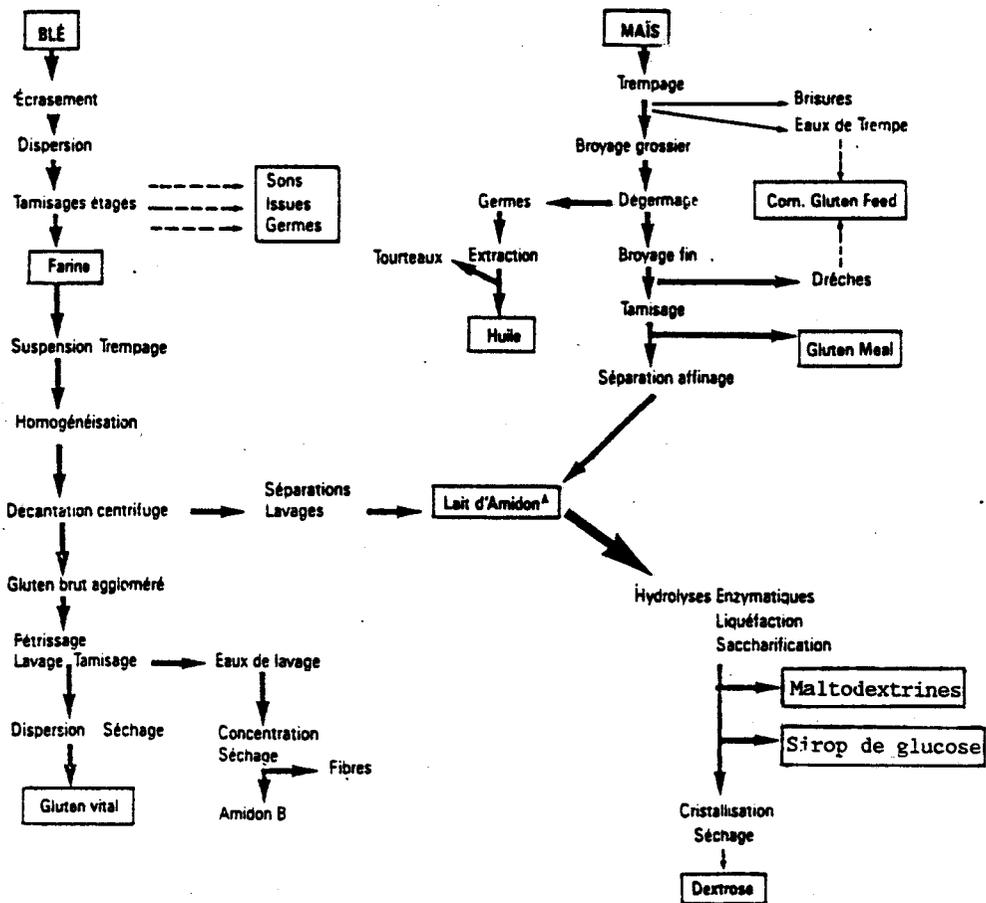
Le laboratoire de Cryptogamie de l'Université de Lille-Flandres-Artois dans le cadre de l'action "Essor des enzymes industriels", mise en place par le MIR en 1983, a été chargé de la recherche d'une amyloglucosidase à thermostabilité améliorée. A ce programme s'est jointe la société Roquette Frères qui dans le cadre d'un contrat CIFRE a participé au programme de recherche.

Nous nous sommes attachés dans une première partie à isoler, parmi un large éventail de souches fongiques, plusieurs organismes produisant une telle amyloglucosidase. Ce travail a été réalisé conjointement avec B. Bacle qui s'est par la suite intéressée à l'amélioration physiologique de la production d'enzymes pour une des souches retenues. Pour notre part, l'étude

conduite est consacrée à une analyse plus approfondie de deux systèmes enzymatiques correspondant aux critères initialement requis ainsi qu'à leurs souches productrices respectives.

C H A P I T R E
P R E L I M I N A I R E

Fig. 1: Localisation des traitements enzymatiques dans les chaînes de d'ensemble amidonnerie-glucoserie (d'après Segard, 1985)



Tab. 1: Composition non glucidique et teneur en amylose de différents amidons (résultats exprimés en % d'amidon sec).

AMIDON	PROTEINES (N x 6,25)	LIPIDES	CENDRES	P	AMYLOSE
Blé	0,33	1,12	0,3	0,05	26
Maïs cireux	0,10	0,23	0,1	0,003	<1
Maïs normal	0,30	0,61-0,65	0,1	0,015	28
Maïs riche en amylose	0,50	1,11	0,2	0,03	52-80

INTRODUCTION

Le but de ce chapitre est de présenter le processus industriel dans lequel s'insère les enzymes amylolytiques, de clarifier le problème posé par le dosage de ces différents enzymes produits de manière concomitante par un même micro-organisme et de définir une technique de dosage de l'enzyme recherché pour l'étude qui suivra.

I. PROCESSUS INDUSTRIEL DE TRANSFORMATION DE L'AMIDON EN GLUCOSE

A.- LE SUBSTRAT : L'AMIDON

L'amidon constitue avec la cellulose la principale substance polysaccharidique synthétisée par les végétaux supérieurs à partir de l'énergie solaire. Si la cellulose est essentiellement responsable de la structure des parois cellulaires, l'amidon constitue quant à lui la réserve glucidique de choix des végétaux.

1. Isolement

Nous ne présenterons dans la figure 1 que les méthodes d'extractions d'amidon issu des céréales utilisées en amidonneries occidentales: le Blé et le Maïs (Segard, 1985).

Comme le montre la figure 1, un ramollissement préalable des graines, par trempage en conditions contrôlées (durée, température, pH) et en présence de SO₂, précède la phase de broyage. Les graines broyées, dégermées et homogénéisées sont alors tamisées jusqu'à la séparation totale de l'albumen des grains d'amidon. Il est à remarquer que les étapes enzymologiques (liquéfaction et saccharification) ne peuvent intervenir qu'à la suite d'opérations lourdes de fractionnement et d'affinage.

2. Composition chimique

Les grains d'amidon obtenus se présentent sous la forme d'une poudre blanche insoluble dans l'eau. La forme et la taille des grains dépendent de l'origine de l'amidon (lenticulaire de 2 à 30 µm de diamètre pour le blé, polyédrique de 2 à 25 µm pour le maïs).

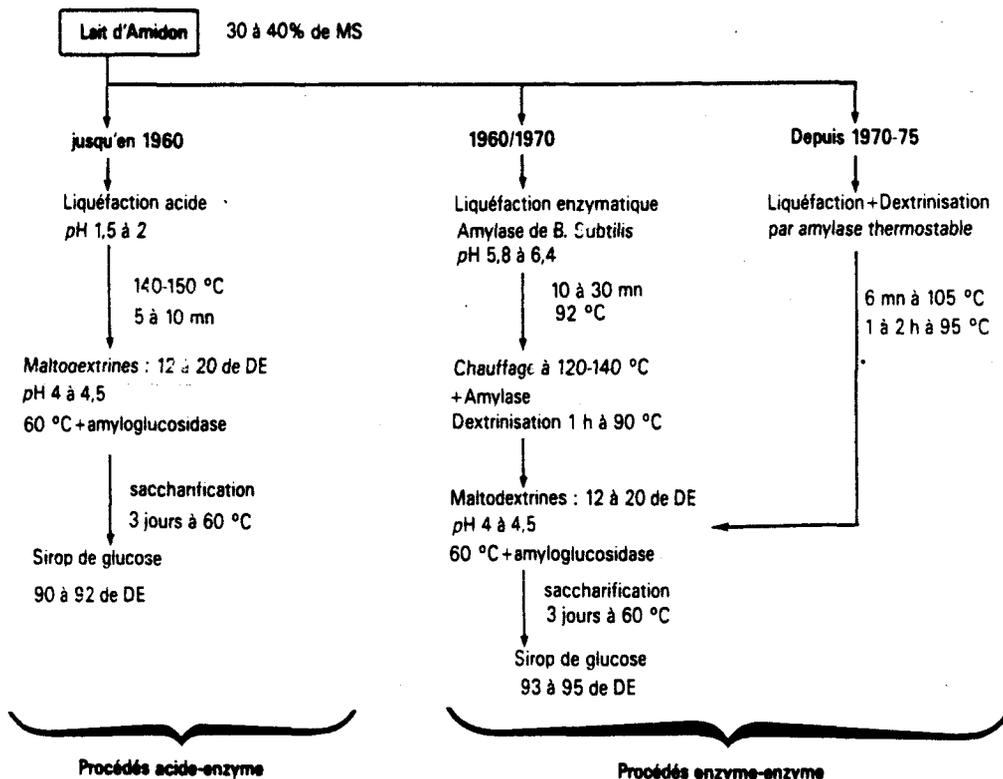
La fraction non glucidique représente environ 0,5 à 2 % de la composition chimique totale de l'amidon (tableau 1, Duprat et al., 1980). Les impuretés résiduelles sont constituées de lipides (lysolécithine ou acides gras libres dans le cas des céréales), de protéines, de nucléotides et de matières minérales.

L'amidon est un polymère de D-anhydro glucose. Les unités D-anhydro glucose sont reliées entre elles par des liaisons α-1,4 et 4 à 5 % de liaisons α-1,6. Le grain d'amidon est constitué d'au moins trois types de composants glucidiques : l'amylose, macromolécule linéaire, l'amylopectine macromolécule à structure

Tab. 2: Propriétés physico-chimiques comparées de l'amylose et l'amylopectine .

	AMYLOSE	AMYLOPECTINE
STRUCTURE GENERALE	Enchaînement linéaire de motifs D-anhydroglucose au moyen de liaisons Alpha-1,4	Structure branchée où des fragements constitués d'enchaînements par liaisons Alpha-1,4 se lient les uns aux autres par mise en oeuvre de liaisons Alpha-1,6
% de liaisons α -1,6	1 %	5 à 6 %
Limite de la β -amylolyse	68 à 78 %	57 à 58 %
Longueur moyenne des enchaînements linéaires exprimée en nombre de motifs anhydroglucose unis par des liaisons Alpha-1,4	environ 10^3	15 à 20 (chaines A) 45 (chaines B)
DP moyen des macromolécules	environ 10^3	$10^4 - 10^5$
Coloration à l'iode	bleu intense	violet
- λ (nm) max	660	530 - 550
Comportement en solution aqueuse	instable	stable

Fig. 2: Historique des procédés enzymatiques de glucoserie (Segard, 1985)



branchée, dont les principales propriétés physiques et chimiques sont regroupées dans le tableau 2 (Duprat et al., 1980; Sicard, 1982), et une substance de composition intermédiaire entre l'amylose et l'amylopectine. Divers auteurs décrivent une telle substance dont la capacité de fixation de l'iode est plus élevée que celle de l'amylopectine et la limite de la β -amylolyse plus faible que celle de l'amylose.

Le type et la quantité de ce matériel intermédiaire varient considérablement non seulement avec l'origine végétale mais également avec le degré de maturation de l'amidon. Baptisée amylose ou amylopectine anormale, cette fraction, pouvant atteindre 5 % chez les amidons de céréales, serait formée d'une variété de structures dont le taux de ramification est intermédiaire entre l'amylose et l'amylopectine (Duprat et al., 1980).

B.- LA TRANSFORMATION

1. La liquéfaction

L'organisation du grain d'amidon dépend de la manière dont sont associées les deux macromolécules, amylose et amylopectine, grâce à des liaisons hydrogènes inter et intra-chaînes. Lorsque les liaisons sont intenses, nombreuses et régulières, les chaînes s'associent en réseau cristallin. Cette structure organisée rend l'amidon insensible à l'action enzymatique. La première étape en glucoserie consistera donc à casser cette structure. La dés-organisation du granule est obtenue par traitement hydrothermique ayant pour but l'éclatement du grain pour libérer l'amylose et l'amylopectine.

Avant 1960, la liquéfaction (terme décrivant la chute de viscosité résultant de la dispersion des macromolécules) était obtenue par l'addition d'acide sulfurique. A partir de 1960, l' α -amylase de *Bacillus amyloliquefaciens*, capable de travailler à une température supérieure à 80°C, a remplacé l'hydrolyse acide, source de contamination par divers métaux et sucres réassociés. L'un des inconvénients de l'enzyme, lié à sa thermostabilité moyenne, est son action en deux temps lors de la liquéfaction (fig 2). Depuis 1970-1975, la thermostabilité améliorée de l' α -amylase de *Bacillus licheniformis* permet de pratiquer l'opération en une seule étape à une température supérieure à 95°C, après un chauffage à 110°C permettant l'éclatement des grains (Sicard, 1982 ; Segard, 1985).

Le produit final consiste en une malto-dextrine de dextrose équivalent (DE) de 8 à 12 (pourcentage de sucres réducteurs exprimés en équivalent glucose ou DE).

Le résultat de cette première étape est une solubilisation de l'amidon accompagnée d'une chute importante de sa viscosité et de l'apparition de nombreuses extrémités non réductrices propres à être attaquées par l'amyloglucosidase.

2. La saccharification

L'étape de saccharification consiste en la transformation en glucose des maltodextrines obtenues en fin de liquéfaction.

Comme l'indique l'historique des procédés enzymatiques de glucoserie (figure 2), cette étape n'a guère subi de modification depuis presque trente ans. Avant l'apparition de l'amyloglucosidase, les rendements en glucose final étaient mauvais par suite de réactions de réversion, de transglucosylation et de dégradation acide à chaud.

Depuis que l'on peut utiliser industriellement l'amyloglucosidase, le Dextrose Equivalent final de la réaction s'est amélioré bien plus grâce aux modifications apportées à l'étape précédente qu'à l'obtention de meilleures conditions de saccharification.

Quelques améliorations ont toutefois été apportées :

- les résidus contaminants (oligosaccharides branchés en α -1,6) provenant d'une activité transglucosidasique (EC 2.4.1.24.) sont réduits par passage des solutions d'amyloglucosidase sur colonne de bentonite qui fixe la transglucosidase. Cette dernière peut avoir une influence considérable pouvant provoquer 3 à 4 % de réversion en produisant des sucres infermentescibles pourvus de liaisons α -1,6 et s'opposant à la cristallisation du glucose monohydraté (Sicard, 1982). Il faut toutefois noter que l'incubation d'une solution de glucose dans les conditions actuelles de saccharification (60°C à pH 4,5) autorise une réversion purement chimique qui peut représenter environ 2 % du glucose initial, limitant le rendement théorique à environ 98%.

- l'addition de pullulanase (EC 3.2.1.41) permet d'augmenter le dextrose équivalent final des hydrolysats d'amidon. Néanmoins, l'utilisation de cet enzyme implique de travailler à un taux de matière sèche plus faible (de l'ordre de 30 à 35 %) et à une température de 55°C, optimum d'activité de la pullulanase.

La saccharification en processus continu n'a pas connu à ce jour de développement comparable à celui qu'a connu l'isomérisation du glucose. Une moins grande efficacité (dextrose équivalent obtenus de l'ordre de 92 à 94), une température d'utilisation plus faible, des systèmes d'immobilisation onéreux, ont, jusqu'à présent, empêché toute percée industrielle de cette technique.

Dans les conditions actuelles de saccharification en discontinu, le dextrose équivalent final de la solution est de 96 à 98, soit une teneur en glucose effective de 92 à 96%. Si le rendement en glucose final s'avère satisfaisant, il n'en est pas de même des conditions de son obtention. En effet, malgré l'optimisation des fourchettes de température praticables avec les enzymes actuels, les temps de réaction nécessaires pour

atteindre des rendements intéressants demeurent importants (72h à 60°C pour l'amyloglucosidase). Ces temps de séjour ne sont pas sans incidence sur les investissements, les immobilisations et les coûts de fonctionnement. La température utilisée autorise également un développement bactérien, réduisant le rendement final. Une température de réaction plus élevée permettrait d'éviter ces inconvénients, et en plus, de diminuer la viscosité du sirop de glucose pour les filtrations ultérieures.

Cet ensemble de faits explique la tendance actuelle, en glucoserie enzymatique, à rechercher des amyloglucosidases à thermostabilité améliorée.

CONCLUSION

La transformation de l'amidon de céréale en glucose s'établit en trois phases. La première consiste en une purification de l'amidon à partir de la graine de céréale utilisée; la seconde, en la dégradation de l'amidon en maltodextrine sous l'action d'une α -amylase bactérienne (étape de liquéfaction). Les maltodextrines sont ensuite hydrolysées en glucose par l'amyloglucosidase (saccharification). Si l'étape de liquéfaction a pu être améliorée de manière sensible grâce aux introductions successives des α -amylases de *Bacillus subtilis* et *Bacillus licheniformis*, l'étape de saccharification appelle encore diverses améliorations qui seront envisageables grâce à une thermostabilité supérieure de l'amyloglucosidase.

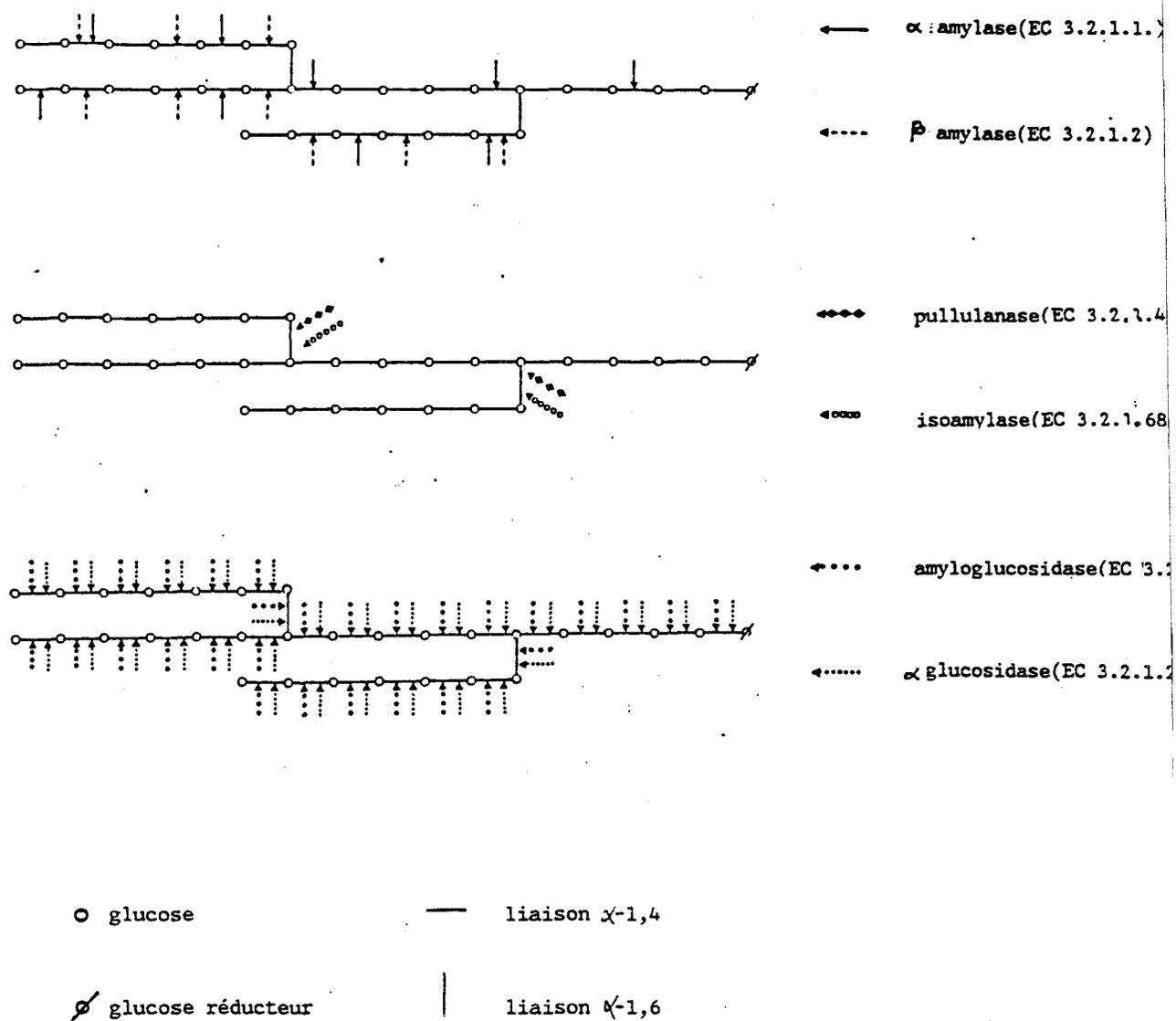
Le cadre de l'utilisation de l'amyloglucosidase étant défini, la différenciation des activités amylolytiques susceptibles d'être rencontrées est nécessaire.

II.- MISE EN EVIDENCE ET DOSAGE DES ENZYMES AMYLOLYTIQUES FONGIQUES

Les enzymes capables de dégrader l'amidon sont distribuées de manière très variée dans les règnes animal et végétal ainsi que chez les microorganismes. Initialement, le terme "amylase" a été utilisé pour désigner les enzymes capables d'hydrolyser les liaisons α -1,4 du glycogène, de l'amylose et de l'amylopectine (Meyer, 1952). Un certain nombre de nouveaux enzymes découverts chez les microorganismes sont venus compléter cette seule hydrolyse des liaisons α -1,4. Les principaux enzymes amylolytiques, actuellement produits par des microorganismes et possédant un intérêt industriel, sont décrits dans le tableau 3 et la figure 3.

A ce jour, la pullulanase n'a été décrite que chez les bactéries essentiellement *Aerogenes aerobacter*, divers *Bacillus*, *Streptomyces*, *Pseudomonas* ou *Streptococcus* (Mercier, 1985); l'isoamylase chez diverses bactéries et chez *Saccharomyces cerevisiae* (Mercier, 1985); la β -amylase n'est pas décrite chez les champignons filamenteux, les principaux producteurs étant des *Bacillus*.

Fig 3 : Action des différentes amylases sur la molécule d'amylopectine



L' α -amylase, la pullulanase et l'isoamylase sont des endoamylases capables d'hydrolyser respectivement les liaisons α -1,4 ou α -1,6 au hasard des chaînes polysaccharidiques.

L'amyloglucosidase, la β -amylase et l' α -glucosidase sont des exoamylases hydrolysant de manière séquentielle les chaînes polysaccharidiques à partir des résidus glucose non-réducteurs.

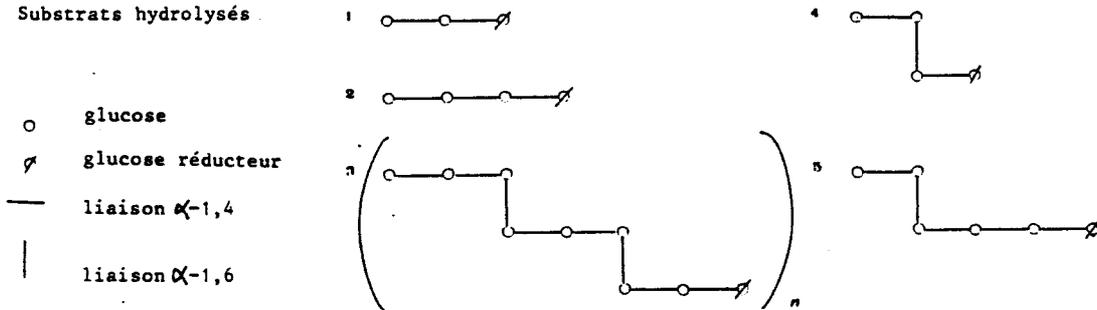
Tableau 3 : Principaux enzymes intervenant dans la dégradation de l'amidon

Enzymes	Nomenclature	liaisons hydrolysées	substrats hydrolysés	substrats limites	produits formés
α -Amylase	EC 3.2.1.1.	α -1,4	Amylose, *amylopectine	maltotriose (1)	oligosaccharides de 2 à 7 unités glucose sous configuration α
β -Amylase	EC 3.2.1.2.	α -1,4	Amylose, **amylopectine	maltotétraose (2)	maltose sous configuration β , Dextrines limites
Pullulanase	EC 3.2.1.41	α -1,6	Pullulan, (3) amylopectine	maltosyl- maltose (4)	maltotriose (pullu- lan), Dextrines débranchées (amylopectine)
Isoamylase	EC 3.2.1.68.	α -1,6	Amylopectine, glycogène	maltosyl- maltotriose (5)	maltotriose Dextrines débranchées (amylopectine)
Amyloglucosidase	EC 3.2.1.3.	α -1,4 α -1,6	amylose, amylopectine	maltose	glucose sous configuration α
α -Glucosidase	EC 3.2.1.20.	α -1,4 α -1,6	Oligosaccharides	maltose	glucose sous configuration β
Transglucosidase	EC 2.4.1.41.	α -1,4	Maltose	glucose	oligosaccharides branchés en α -1,6

* action non arrêtée par les liaisons α -1,6** action stoppée au niveau des liaisons α -1,6

Nomenclature des enzymes : EC 3. Hydrolase
 EC 3.2. Hydrolase agissant sur des composés glycosylés
 EC 3.2.1. Glycosylhydrolase
 EC 2. Transférase
 EC 2.4. Glycosyltransférase
 EC 2.4.1. Hexosyltransférase

Substrats hydrolysés



Tab. 14: Dosages courants des principaux enzymes amylasiques.

ENZYME	SUBSTRAT	PRODUIT DE REACTION	METHODE DE DOSE
α -amylase	amidon soluble	sucres réducteurs	DNS ou Cu ⁺⁺
		maltodextrines	Iode
amyloglucosidase	amidon soluble	sucres réducteurs	DNS ou Cu ⁺⁺
		glucose	glucose oxydase
α -glucosidase	maltose	glucose	glucose oxydase

Les principaux enzymes fongiques susceptibles d'intervenir dans la dégradation de l'amidon ou de maltodextrines sont au nombre de trois: l' α -amylase, l'amyloglucosidase et l' α -glucosidase.

Le dosage de ces différents enzymes purifiés est généralement effectué dans les conditions résumées dans le tableau 4.

Ces techniques souffrent de deux imprécisions: d'une part, le substrat n'est pas spécifique à l'enzyme; d'autre part, le produit dosé en fin de réaction ne correspond pas toujours au produit réel de la réaction (sucres réducteurs dosés au lieu du glucose). Ces imprécisions rendent impossible l'utilisation de ces types de dosages pour différencier des enzymes amylolytiques lorsque ceux-ci sont produits de manière concomitante, comme le font en général les champignons.

Le premier problème posé, celui du substrat à utiliser, s'avère délicat à résoudre. Des enzymes comme l' α -glucosidase (Reese, 1968) ou l'amyloglucosidase sont peu spécifiques possédant toutes les deux la propriété de couper les liaisons α -1,4 ou α -1,6 voire les liaisons α -1,3. Le maltose est hydrolysé par l'amyloglucosidase, certaines α -glucosidases hydrolysent l'amidon soluble (tableau 3). L' α -amylase, présente dans un filtrat de culture contenant l'amyloglucosidase, augmentera artificiellement le résultat du dosage de la seconde si le substrat est l'amidon soluble. Finalement, le seul dosage du glucose comme produit final de réaction ne permet pas de différencier l'amyloglucosidase de l' α -glucosidase.

Divers auteurs se sont penchés sur ces problèmes de dosage des différents enzymes amylolytiques présents dans un même filtrat de culture, et, ont essayé de faire jouer de manière plus précise les différentes caractéristiques des enzymes.

A.- MISE EN EVIDENCE ET DOSAGE DE L' α -AMYLASE

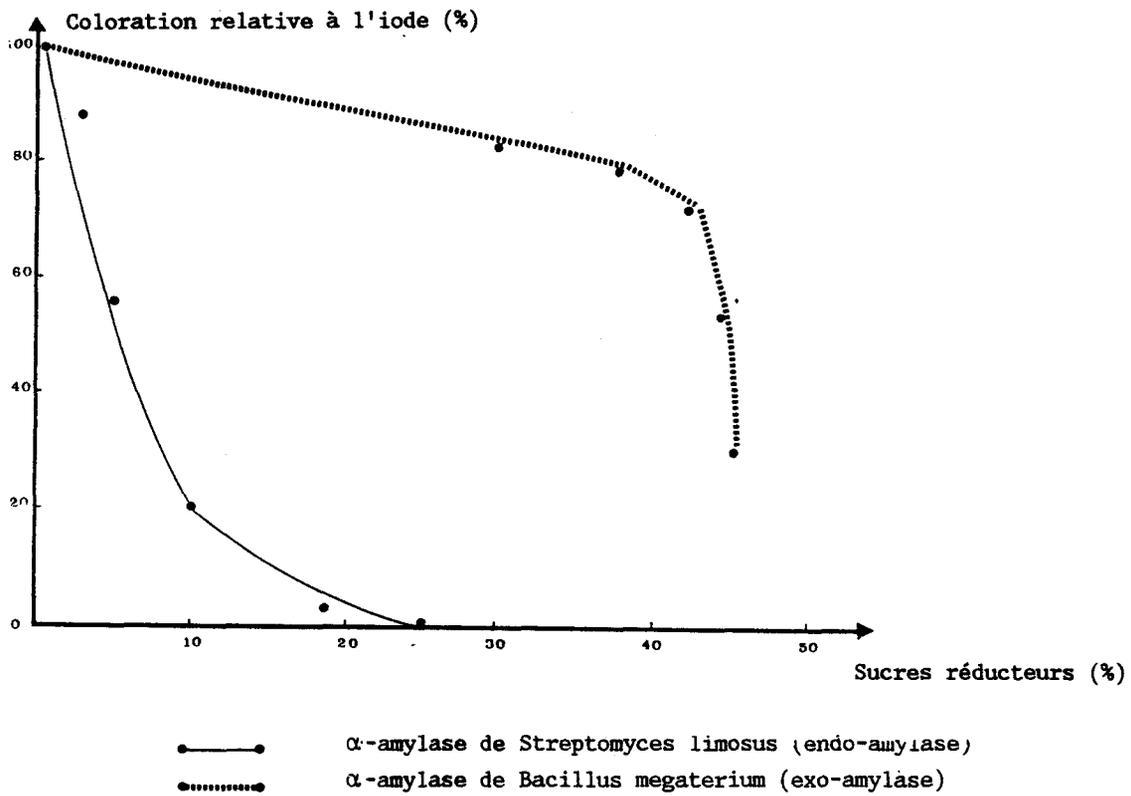
L'activité purement endoamylasique de cet enzyme a permis de séparer l' α -amylase des deux exoenzymes amyloglucosidase et α -glucosidase.

1.- Mise en évidence

Deux techniques reposant sur un dosage du produit de réaction sur l'amidon soluble sont utilisées. Dans la première technique, la présence d'une endoamylase est mise en évidence par une chute rapide de la coloration à l'iode par rapport aux sucres réducteurs apparus (fig.4, Fairbain et al., 1986). Dans la seconde, un rapport sucres réducteurs sur glucose supérieur à l'unité en début d'hydrolyse (tableau 5) établit la présence d'une endoamylase.

Si ces techniques ne permettent pas un dosage de l'activité α -amylasique, elles n'en autorisent pas moins une mise en

Fig. 4: Evolution de la coloration à l'iode en fonction de l'apparition des sucres réducteurs provenant de l'action d'une endo-amylase ou d'une exo-amylase (d'après Fairbain et al., 1986)



Tab. 4: Evolution de la teneur en sucres réducteurs (S.R.), du degré d'hydrolyse (D.H.), du glucose et du rapport S.R./glucose chez *Piricularia oryzae*, *A.niger* et une préparation commerciale d'amyloglucosidase (Gluc SB)

	Durée (min)	S.R. ($\mu\text{g}/10\mu\text{l}$)	D.H. %	Glc. ($\mu\text{g}/10\mu\text{l}$)	S.R./Glc.
<i>Piricularia oryzae</i> (Amyloglucosidase seule)	15	6	15	6	1.00
	30	13	33	13	1.00
	60	21	52	20	1.05
<i>Aspergillus niger</i> (Amyloglucosidase et α -amylase)	15	12	31	8	1.50
	30	21	54	19	1.11
	60	28	70	25	1.12
Gluc SB (Amyloglucosidase et α -amylase)	15	15	37	6	2.50
	30	20	51	15	1.33
	60	26	65	22	1.19

Fig. 5: Représentation schématisée des sites d'action de l'amyloglucosidase et de l' α -amylase sur l'amylose modifié par des ponts glycériques interchaînes (d'après Mateescu et al., 1980)

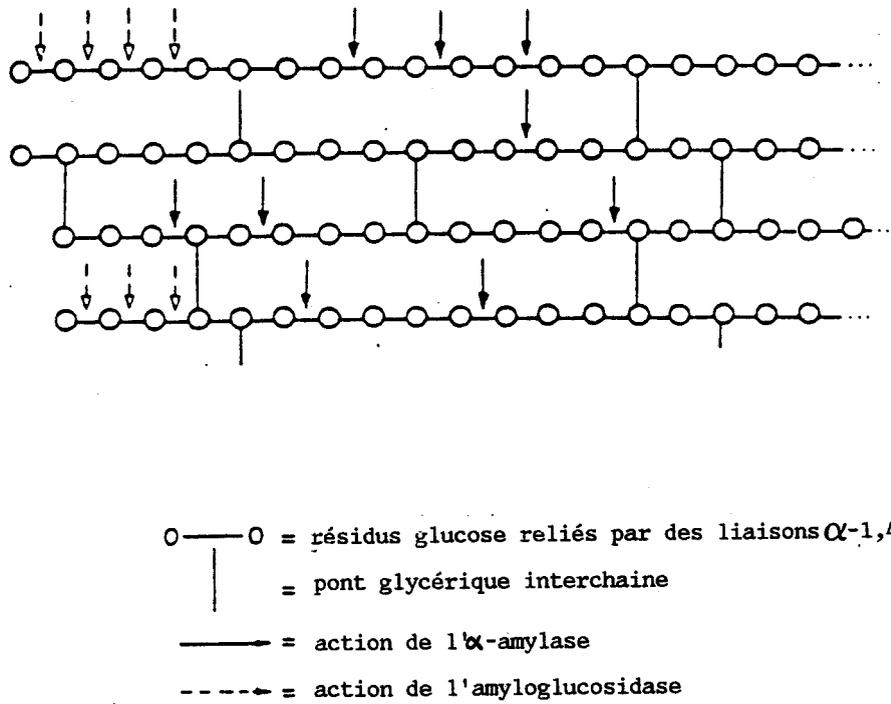
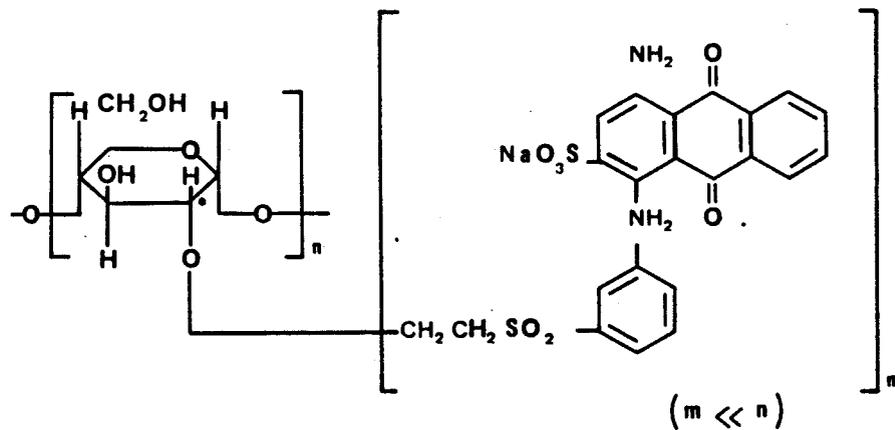


Fig. 6: Représentation de l'amylose azure.



évidence aisée.

2. Dosage

Trois techniques utilisent des substrats modifiés dans le but d'empêcher toute activité exoamylasique. La première utilise un amylose aux chaînes polysaccharidiques reliées par des ponts glycériques (figure 5). Elle nécessite deux dosages, l'un effectué avec l'amylose natif, le second avec l'amylose modifié; les deux enzymes amyloglucosidase et α -amylase sont alors dosés quantitativement par différence. Néanmoins, la technique ne sépare pas α -glucosidase et amyloglucosidase.

Les deux autres techniques font appel soit à un amylose oxydé à l'aide de métaperiodate de sodium (Marshall, 1978), soit à l'amylose azure dans lequel le Rémozol brillant blue R se greffe sur chaque résidu glucose (figure 6, Rinderknecht et al., 1967). Depuis la publication de H. Rinderknecht et collaborateurs (1967), d'autres substrats sont apparus, fondés sur le même principe : la formation et la détection d'un produit de réaction soluble, coloré, facilement séparable du substrat insoluble (Fogarty et Kelly, 1979).

B.- DOSAGE DE L'AMYLOGLUCOSIDASE ET DE L' α -GLUCOSIDASE EN PRESENCE D' α -AMYLASE

Divers agents inhibant sélectivement l' α -amylase (celle-ci étant une métallo-protéine) ont été utilisées: l'EDTA (Acide éthylène-diamine-tétraacétique), le PCMB (Acide 4-chloromercuribenzoïque), le DTNB (Acide S-S'-dithiobis-2-nitrobenzoïque), l'acide hydroxymercuribenzoïque (Simonin et Pilet, 1974). L'amyloglucosidase ne semble pas affectée par ces agents chimiques.

Une étude cinétique menée par Fugi et Kawamura (1985) a montré que lorsque le substrat utilisé possède une masse moléculaire inférieure ou égale à 5000, l'action de l' α -amylase peut être négligée et que le taux de formation du glucose répond à la seule amyloglucosidase. Cette remarque permettrait donc de pratiquer un dosage sélectif de l'amyloglucosidase (ou de l' α -glucosidase) en présence d' α -amylase sans utiliser les inhibiteurs précédemment cités.

C.- DIFFERENCIATION ET DOSAGE DE L'AMYLOGLUCOSIDASE ET DE L' α -GLUCOSIDASE

La différenciation de ces deux enzymes est plus subtile : ce sont tous deux des exoenzymes libérant du glucose à partir d'oligo ou de polysaccharides.

Une tentative de détermination de l'activité α -glucosidasique en présence d'amyloglucosidase a été effectuée par Kujawski et Wegrzyn (1980), en utilisant un substrat combiné amidon soluble -maltose (10 %, 0,5 %) et en déduisant de l'activité présentée

Tab.6 : Hydrolyse de l'amidon soluble et produits de transfert du maltose par les α -glucosidase fongiques(Yamasaki et Suzuki, 1980).

	Espèces décrites	Hydrolyse de l'amidon soluble	Produit de transfert du maltose
Groupe 1	Mucor javanicus Mucor racemosus Penicillium purpurogenum	+++	Maltotriose
Groupe 2	Penicillium oxalicum	+++	Isomaltose panose
Groupe 3	Aspergillus niger Aspergillus oryzae Aspergillus awamori	-	Isomaltose panose

sur un tel substrat l'activité obtenue sur amidon soluble. Cette détermination de l'activité α -glucosidasique propre se base sur l'affinité très supérieure que possède l'amyloglucosidase pour l'amidon soluble par rapport au maltose. Dans les conditions citées, une plus grande libération de glucose obtenue dans le cas du substrat combiné est attribuée à l'activité α -glucosidasique. Malheureusement, certaines α -glucosidasases apparaissent comme très efficaces sur l'amidon soluble (tableau 6). La technique apparaît donc plus comme une mise en évidence qu'un dosage, sauf pour les souches appartenant au groupe 3 défini par Yamasaki et Suzuki (1980) (tableau 6).

Kueck et Kidby (1985) ont proposé un dosage de l'amyloglucosidase faisant appel à la particularité que cette dernière possède de couper les liaisons α -1,6. Le dextran, polysaccharide produit par la bactérie *Leuconostoc mesenteroides* qui contient 95 % de liaisons α -1,6 sur les chaînes principales ou latérales (Von Cleve et al., 1956), est utilisé comme substrat, le glucose dosé comme produit de réaction. Néanmoins, un tel dosage n'évite pas la dégradation par la dextranase (EC 3.2.1.11.), enzyme largement répandu chez les champignons filamenteux.

Lorsque les enzymes sont purifiés, la détermination de l'anomérisation du glucose libéré (par chromatographie en phase gazeuse ou polarimétrie) permet d'identifier de façon formelle l' α -glucosidase ou l'amyloglucosidase (Chiba et al., 1983). L'utilisation de l'acarbose, tétraose synthétique, produit par BAYER (Block et Pedersen, 1984; Svensson et al., 1986) et inhibiteur des activités amylolytiques permet, également, grâce à la sensibilité très différente des deux enzymes vis à vis de l'inhibiteur (l'amyloglucosidase se révélant être la plus sensible), de les individualiser. D'autre part, l' α -glucosidase dégradera plus facilement les oligosaccharides à bas poids moléculaire, ou le maltose, que l'amidon soluble, le rapport étant inversé pour l'amyloglucosidase (Reese et al., 1968).

Certains auteurs ont utilisé des aryl ou alkyl- α -D-glucosides pour doser l'amyloglucosidase ou l' α -glucosidase (Fogarty et Kelly, 1980), ou encore ont comparé l'action de l'enzyme sur ces substrats par rapport au maltose ou l'amidon soluble. Le méthyl- α -D-glucoside, substrat utilisé par Benson et collaborateurs (1982) pour doser la transglucosidase (EC 2.4.1.24.), n'est que très rarement cité comme étant hydrolysé par l'amyloglucosidase ou à des taux faibles: 0,072 % de l'hydrolyse de l'amidon soluble pour une amyloglucosidase décrite par Pazur et Kleppe (1962), 0,05 % pour celle décrite par Fogarty et Benson (1983), absence de dégradation pour celles décrites par Medda et collaborateurs (1982). Parmi les α -glucosidasases seule celle d'*A. oryzae* est citée comme dégradant le méthyl- α -D-glucoside (Kelly et Fogarty, 1983), bien qu'Ada chi et al. utilisent ce substrat pour doser l' α -glucosidase.

L'utilisation de ces substrats à seule fin de différencier α -glucosidase et amyloglucosidase semble donc pour le moins controversée. La capacité que possèdent les trois enzymes citées

Tab. 7: Différenciation et dosage de l' α -amylase, l'amyloglucosidase et l' α -glucosidase.

ENZYMES DIFFERENTIES		TECHNIQUES DE MISE EN EVIDENCE ET DOSAGES	
α -amylase par rapport à l'amyloglucosidase ou l' α -glucosidase	mise en évidence	Evolution de la coloration de l'iode et des sucres réducteurs lors de l'hydrolyse de l'amidon soluble Evolution du rapport sucres réducteurs sur glucose formés lors de l'hydrolyse de l'amidon soluble.	
	dosage	α -amylase	Substrat utilisé : amylose azure
		α -glucosidase et glucoamylase	Substrat utilisé : maltodextrine de MM \leq 5000
	mise en évidence	anomérie du glucose libéré	
amyloglucosidase par rapport à l' α -glucosidase	dosage	si la souche appartient au groupe III de Yamasaki et al. (1980)	substrat utilisé amidon soluble/maltose (10%/0,5%) et amidon (dosage comparatif)
		si la souche n'appartient pas au groupe III de Yamasaki et al. (1980)	Amyloglucosidase substrat amidon soluble
		Purification des enzymes	α -glucosidase substrat : maltose

(amyloglucosidase, α -glucosidase, transglucosidase) à catalyser des réactions de réversion (dans certaines conditions pour l'amyloglucosidase) ne facilite pas le problème. Chiba et collaborateurs (1983) montrent ainsi que des enzymes traditionnellement cités comme des α -glucosidases se révèlent être des amyloglucosidases à l'examen de l'anomérisation du glucose libéré. Certaines amylases de *Clostridium acetobutylicum* sont alternativement décrites comme α -glucosidases ou amyloglucosidases selon les auteurs sans qu'une étude fine soit effectuée (Hockenfull et al., 1945; Brevet E. n° 135-138, 1984; Kelly et Fogarty, 1983).

En conclusion, la différenciation et le dosage de l' α -amylase par rapport aux deux exoenzymes α -glucosidase et amyloglucosidase sont possibles en jouant sur le substrat utilisé (pour le dosage) ou les produits libérés (pour la mise en évidence). La séparation des activités de l' α -glucosidase et de l'amyloglucosidase est plus délicate; si les souches incriminées n'appartiennent pas au groupe 3 (*Aspergillus niger*, *A. awamori*, *A. oryzae*) défini par Yamasaki et Suzuki (1980) seule l'étape de purification permet d'identifier et de doser de manière formelle les deux glucosidases. Le tableau 7 récapitule les différentes étapes d'identification et de dosage de ces différents enzymes.

III.- CHOIX D'UN TYPE DE DOSAGE

Les différents paramètres pouvant intervenir sur le résultat et l'analyse d'un dosage sont les suivants :

- le substrat (qualité et quantité)
- le produit final dosé
- la quantité d'enzyme
- le pH, la température et la durée d'incubation

Seuls les deux premiers seront discutés ici, le dosage complet sera détaillé dans le chapitre II: Matériels et Méthodes, de la première partie.

Comme nous venons de voir, le substrat privilégié de l'amyloglucosidase, l'amidon soluble n'est pas spécifique de ce seul enzyme, non plus que le produit final de la réaction, le glucose. En conséquence, le but de l'étude étant de trouver un nouvel enzyme propre à dégrader en glucose le produit final de liquéfaction, ce dernier pouvait être choisi comme substrat. Le glucidex 12 (MD 02), maltodextrine commercialisée par Roquette Frères et de composition suivante :

- polysaccharides 95-97 %
 - maltose 2 - 3 %
 - glucose 1 -1,5%
- Masse moléculaire moyenne : 2700

est très proche de ce produit de liquéfaction. De plus, la masse moléculaire moyenne inférieure à 5000 permet d'échapper à toute interférence due à une α -amylase. C'est donc cette substance

qu'en commun accord avec les responsables de Roquette Frères nous utiliseront comme substrat. Le produit de réaction de l'amyloglucosidase, le glucose, constituera le produit dosé.

CONCLUSION

Le processus de saccharification demande à l'enzyme utilisé d'hydrolyser en glucose une maltodextrine issue de l'étape de liquéfaction. Les dosages courants pratiqués sur les amylases sont parfois imprécis, néanmoins certains artifices permettent dans certains cas de différencier les diverses activités amylolytiques.

Le substrat choisi, proche du résultat d'une liquéfaction, le MD02, et le produit final dosé permettent d'éviter toute action concomitante de l' α -amylase. Par contre, ils ne nous autorisent pas à trancher entre l'amyloglucosidase et l' α -glucosidase, ces deux enzymes produisant du glucose à partir du substrat retenu. Les auteurs étudient d'ailleurs rarement le critère fondamental permettant de séparer les deux enzymes, l'anomérisation du glucose. En conséquence, amyloglucosidase et α -glucosidase ne seront pas différenciés lors de la première partie de l'étude.

C H A P I T R E I

SELECTION DE MICROORGANISMES PRODUCTEURS
D'ACTIVITE AMYLOGUCOSIDASIQUE A
THERMOSTABILITE AMELIOREE

TABLEAU 8: Microorganismes cités comme produisant au moins une amyloglucosidase. Tableau inspiré de (Fogarty et Kelly, 1980).

CLASSIFICATION	GENRE	ESPECE	REFERENCES
BACTERIES			
Classe des Schizomycètes	Clostridium	thermoamylolyticum	Brevet EP 135-138 (1984)
Famille des Bacillaceae	Clostridium Bacillus	thermoxydrosulfuricum stearothermophilus	HYUN (1985b) SRIVASTAVA (1984)
Famille des Pseudomonadaceae	Halobacterium	sodomense	OREN (1983)
Famille des Achromobacteraceae	Flavobacterium	sp.	BENDER (1981)
LEVURES			
ASCOMYCOTINA			
Classe des Hemiascomycètes	Endomyces	sp.	HATTORI et al (1962)*
Ordre des Endomycétales	Endomyopsis	bispora	BORRIS (1980)*
Famille des Endomycetaceae	Endomyopsis	capsularis	EBERTOVA (1966)*
	Endomyopsis	fibuligera	SILLS et STEWART (1982)
	Saccharomyces	diastaticus	HOPKINS et KULKA (1957)*
	Pichia	burtoni	SILLS et STEWART (1982)
	Schwanniomycetes	alluvius	DE MOT et al (1986b)
	Schwanniomycetes	castelli	DE MOT et al (1986b)
	Schwanniomycetes	occidentalis	DE MOT et al (1986b)
	Lipomyces	kononenkoae	DE MOT et al (1986b)
	Lipomyces	starkeyi	DE MOT et al (1986b)
Classe des Blastomycètes	Cryptococcus	flavus	DE MOT et al (1986b)
Ordre des Cryptococcales	Candida	antarctica	DE MOT et al (1986b)
Famille des Cryptococcaceae	Candida	fennica	DE MOT et al (1986b)
	Candida	homilantoma	DE MOT et al (1986b)
	Candida	silvanorum	DE MOT et al (1986b)
	Candida	tsukubaensis	DE MOT et al (1985a)
	Trichosporon	pullulans	DE MOT et al (1986a)
CHAMPIGNONS FILAMENTEUX			
	Mucor	niehei	MANGALLAN et al (1977)
	Mucor	rouxianus	YAMASAKI et al (1977b)*
ZYGOMYCOTINA	Rhizopus	amagasakiensis	TAKAYA et al (1982)*
Classe des Zygomycètes	Rhizopus	delemar	HAMAIZU et al (1965)*
Ordre des Mucorales	Rhizopus	javanicus	WATANABE et FUKIMBARA (1973)*
Famille des Mucoraceae	Rhizopus	niveus	OHNISHI et HIROMI (1978)*
	Rhizopus	nodosus	MUTHUKUMARAN et DHAR (1983)
	Rhizopus	pygmaeus	GRIGOROV et al (1983)
ASCOMYCOTINA			
Classe des Pyrenomycètes			
Ordre des Hypocreales			
Famille des Hypocreaceae	Hypocrea	peltata	OKADA (1983)
Ordre des Sphaeriales	Neurospora	crassa	MURUYAMA et ISHIKAWA (1973)*
Famille des Melanosporaceae	Neurospora	sitophila	FOGARTY et DIXON (non publié)*
Classe des Plectomycètes			
Ordre des Eurotiales	Talaromyces	thermophilus=dupontii	Brevet belge 878-466 (1979)
Famille des Eurotiaceae	Monascus	rubiginosus (Sato)	SHOUJUN et al (1984)
	<i>Aspergillus</i> groupe niger		
	Aspergillus	awamori	WATANABE et FUKIMBARA (1965)*
	Aspergillus	cinnamomeus	KURUSHINA (1974)*
	Aspergillus	foetidus	BODE (1968)*
	Aspergillus	phoenicis	LINEBACK et BAUMANN (1970)*
	Aspergillus	saitoi	TAKAHASHI et al (1981)*
	Aspergillus	niger	PAZUR et ANDO (1960)*
	autres <i>Aspergillus</i>		
	Aspergillus	batatae	BENDETSKII et al (1974)*
	Aspergillus	candidus v. aureus	IYER (1973)*
Classe des Hyphomycètes	Aspergillus	clavatus	VOITKOVA-LEPSHIKOVA et al (1966)*
Ordre des hyphomycétales	Aspergillus	oryzae	MORITA et al (1966)*
Famille des Moniliaceae	autres Moniliaceae		
	Aureobasidium	pullulans	FEDERICI et D'HELIA (1983)
	Cephalosporium	charticola Lindau	KRZECZOWSK et URBAK (1975)*
	Cephalosporium	eichhorniae	DAY (1978)*
	Chalara	paradoxa	MONMAM et al (1987)
	Dactylium	dendroides	NEGRAD et al (1981)
	Hemicola	lanuginosa	TAYLOR et al (1978)
	Paecilomyces	variotii	TAKEDA (1985)
	Paecilomyces	subglobosus	KIM (1977)*
	Penicillium	expansum	SREEKANTIAH et al (1973)
	Penicillium	oxalicum	YAMASAKI et al (1977a)*
	Pyricularia	oryzae	YUHKI et al (1977)*
	Sporotrichum	thermophile	MANGALLAN et al (1977)
	Torula	thermophila	SUBRAMANYAM et al (1977)
	Trichoderma	viride	SHELLART et al (1976)*
BASIDIOMYCOTINA			
Classe des Téléomycètes			
Ordre des Ustilaginales			
Famille des Filobasidiaceae	Filobasidium	capsuligenum	DE MOT et VERARCHTERT (1985c)**
Classe des Hyménomycètes			
Ordre des Aphylliphorales			
Famille des Schizophyllaceae	Schizophyllum	commune	SCHWALB et JANSONS (1973)
Famille des Conidiophoraceae	Conidiophora	cerebella	KING (1971)*

* références citées par FOGARTY et KELLY (1980).

** champignon cité comme levure par les auteurs.

I.- BIBLIOGRAPHIE

A.- LES PRODUCTEURS D'AMYLOGLUCOSIDASE ET D' α -GLUCOSIDASE

Comme nous l'avons vu lors du chapitre préliminaire, la différenciation entre l'amyloglucosidase et l' α -glucosidase nécessite la détermination de la configuration du glucose libéré. Cette détermination est rarement effectuée dans la pratique. Aussi, dans cette revue bibliographique, avons-nous étudié les différents producteurs d'amyloglucosidase ou d' α -glucosidase décrits par les auteurs sans tenir compte de la configuration du glucose libéré.

Les deux enzymes sont distribués de manière très variée au sein des règnes animal et végétal où ils se trouvent en général associés à d'autres amylases. Ils sont produits par de nombreux micro-organismes (tableaux 8 et 9).

1. Les bactéries

L'amyloglucosidase (EC 3.2.1.3.) est principalement décrite chez les champignons filamenteux. Néanmoins, quelques bactéries la synthétisent également.

Le *Clostridium thermoamyloticum* (Brevet Européen n°135-138, 1984) produit, à une température de croissance de 56°C, une amyloglucosidase à température optimale d'activité comprise entre 70° et 75° et de pH voisin de 5. Le *C. thermohydrosulfuricum* (Hyun et Zeikus, 1985) synthétise une amyloglucosidase ayant une activité optimale pour un pH de 5 à 6 et une température de 75°. Les autres bactéries décrites sont un *Bacillus stearothermophilus* (Srivastava, 1984), divers *Flavobacterium* (Bender, 1981) et un *Halobacterium sodomense* (Oren, 1983). L'amyloglucosidase de cette dernière bactérie présente un optimum d'activité à 65° en présence de 1,4 M NaCl et à 75° pour 3,9 M NaCl, ceci pour un pH de 7,5 (Oren, 1983).

La pauvreté de la bibliographie sur les amyloglucosidases bactériennes s'explique par le faible nombre d'espèces répertoriées comme productrices et par les conditions délicates de culture des bactéries connues (température élevée de croissance et anaérobiose pour les *Clostridium*). De plus, les bactéries sont généralement considérées comme productrices d' α -glucosidase ou d' α -amylase et les champignons filamenteux d'amyloglucosidase et d' α -amylase.

L' α -glucosidase (EC 3.2.1.20) est par contre produite par de nombreuses bactéries (tableau 8). Les principaux producteurs sont (tableau 9) des *Bacillus*, des *Pseudomonas* et des *Streptococcus*.

La majorité des α -glucosidases bactériennes dégrade de manière préférentielle le maltose, exception faite de l'enzyme produit par *Clostridium acetobutylicum* (French et Knapp, 1950). La

Tab. 9: Microorganismes cités comme produisant au moins une α -glucosidase
(Kelly et Fogarty, 1983)

CLASSIFICATION	GENRE	ESPECE	REFERENCES
BACTERIES			
Classe des Schizomycètes	Bacillus	amyloliquefaciens	URLAUB et WÖBER (1978)*
Famille des Bacillaceae	Bacillus	amylolyticus	KELLY et al (1980)*
	Bacillus	brevis	MC WETHY et HARTMAN (1979)*
	Bacillus	cereus	YAMASAKI et SUZUKI (1974)
	Bacillus	caldovelox	GIBLIN et al (1987)
	Bacillus	subtilis	WANG et HARTMAN (1976)*
	Bacillus	thermooglucosidius	SUZUKI et al (1976)*
	Bacillus	licheniformis	KELLY et al (1986)
Famille des Lactobacillaceae	Clostridium	acetobutylicum	FRENCH et KNAPP (1950)*
	Lactobacillus	acidophilus	LI et CHANG (1979)*
	Streptococcus	mitis	SUND et al (1978)*
Famille des Pseudomonadaceae	Streptococcus	pyogenes	DOOLIN et PANOS (1969)*
	Pseudomonas	amyloderamosa	AMEMURA et al (1974)*
Famille des Streptomycetaceae	Pseudomonas	fluorescens	GUFFANDI et CORPE (1976)*
	Streptomyces	hygroscopicus	GRAF et al (1986)
	Streptomyces	venezuelae	CHAFERJRE et VINING (1981)*
	Myxobacter	sp	GUNTERMAN et al (1975)*
LEVURES			
ASCOMYCOTINA			
Classe des Hemiascomycètes	Schizosaccharomyces	pombe	CHIBA et SHIMOMURA (1965)
Ordre des Endomycétales	Saccharomyces	carlsbergensis	OUWEHAND et VAN WIJK (1972)*
	Saccharomyces	cerevisiae	KHAN et EATON (1967)*
	Saccharomyces	italicus	HALVORSON et ELLIAS (1958)*
	Saccharomyces	logos	CHIBA et al (1973)
	Saccharomyces	oviformis	LAI et AXELROD (1974)*
	Lipomyces	starkeyi	KELLY et al (1985)
Classe des Blastomycètes	Candida	tropicalis	HEHRE et al (1977)*
Ordre des Cryptococcales			
Famille des Cryptococcaceae			
CHAMPIGNONS FILAMENTEUX			
ZYGOMYCOTINA			
Classe des Zygomycètes	Mucor	javanicus	YAMASAKI et al (1973a,b)
Ordre des Mucorales	Mucor	racemosus	YAMASAKI et al (1977)
	Mucor	rouxii	FLORES-CARREON et al (1972)*
ASCOMYCOTINA			
Classe des Plectomycètes	Thermoascus	aurantiacus	OBERT (1980-1981)
Ordre des Eurotiales	Aspergillus	awamori	YAMASAKI et al (1977a)*
	Aspergillus	batatae	BENDESTSKII (1977)*
	Aspergillus	flavus	OLUTIOLA (1981)
	Aspergillus	fumigatus	RUDICK et ELBEIN (1974)*
	Aspergillus	niger	RUDICK et al (1979)*
	Penicillium	oxalicum	YAMASAKI et al (1977b)*
	Penicillium	purpurogenum	YAMASAKI et al (1976)
	Faecilomyces	variotti	REESE et al (1968)

* references citées par KELLY et FOGARTY (1983).

plupart de ces enzymes possède une activité glucosyltransférase. Les produits de transfert formés à partir du maltose peuvent être le maltotriose (*Bacillus cereus*; Yamasaki et Suzuki, 1974), l'isomaltose et l'isomaltotriose (*B. brevis*; Mc Wethy et Hartman, 1979), ou un grand nombre d'oligosaccharides (*B. subtilis*; Wang et Hartman, 1976; *B. amylolyticus*; Kelly et al., 1983).

Les températures optimales d'activité se situent entre 35° (*B. brevis*; Mc Wethy et Hartman, 1979) et 75° (*B. thermoglucosidius*; Suzuki et al., 1976), les α -glucosidases bactériennes se révélant en général peu thermostables exceptions faites de *B. thermoglucosidius* (Suzuki et al., 1978) et d'un *Bacillus sp* décrit par Suzuki et collaborateurs, 1976).

2.- Les levures

Dans la famille des levures, un large éventail d'espèces est doté d'une amyloglucosidase (tableau 8.). Le *Saccharomyces diastaticus* est différencié de *S. cerevisiae* par son amyloglucosidase (Searle et Tubb, 1981; Pretorius et al., 1986; Tucker et al., 1985). Certaines souches de *S. cerevisiae* ont néanmoins été décrites comme produisant une amyloglucosidase intracellulaire ne s'exprimant que durant la période de sporulation (Pretorius et al., 1986; Yamashita et Fukui, 1985).

Depuis quelques années, l'équipe de R. de Mot, à l'Université de Louvain, en Belgique, travaille sur les amylases des levures et sur l'amyloglucosidase en particulier. R. De Mot et H. Verachtert démontrent la présence d'amyloglucosidase chez plusieurs espèces de *Candida sp*, *Schwanniomyces sp* et diverses autres levures (tableau 7; De Mot et al., 1984a, 1984b, 1985a, 1985b, 1985c, 1986a, 1986b). Aucune des amyloglucosidases présentées dans le tableau n'est thermostable, la plage de température optimale se situant entre 45° et 60° et la plage de pH entre 3,5 et 6,5.

Très peu d'espèces de levures sont concernées par une activité α -glucosidase (tableau 9), les genres *Saccharomyces* et *Schizosaccharomyces* étant les principaux étudiés. Les α -glucosidases des levures possèdent en général une affinité pour le saccharose ou les aryl-D-glucosides supérieures au maltose - exception faite de *Saccharomyces logos* (Chiba et al., 1973) et *Schizosaccharomyces pombe* (Chiba et Shimomura., 1965). Les températures optimales d'activité sont faibles, de 36°C pour *Saccharomyces italicus* (Halvorson et Helias, 1958) à 45°C pour *Schizosaccharomyces pombe* (Chiba et Shimomura, 1965). Les pH optimums d'activité sont neutres (Kelly et Fogarty, 1983) mis à part pour *S. pombe* (pH 4 - 4,4) (Chiba et Shimomura, 1965).

3.- Les champignons filamenteux

Un grand nombre de champignons filamenteux possèdent au moins

une amyloglucosidase ou une α -glucosidase. Il faut différencier deux groupes: d'une part celui constitué par un nombre important de souches fongiques présentées comme faibles productrices d' α -glucosidase ou d'amyloglucosidase et d'autre part celui regroupant les *Aspergillus* des groupes *niger* et *oryzae* et les *Rhizopus*, hyperproducteurs d'amyloglucosidase extracellulaire et très étudiés pour leur intérêt industriel.

L' α -glucosidase n'est actuellement pas utilisée industriellement.

a) Souches produisant une amyloglucosidase ou une α -glucosidase:

Des espèces très différentes sont présentées comme productrices d'amyloglucosidase (tableau 8; Fogarty et Kelly, 1980). Parmi celles-ci diverses espèces thermophiles sont citées comme *Torula thermophila* (Mangallam et al., 1977; Subrahmanyam et al., 1977), *Humicola lanuginosa*, *Mucor miehe* et *Sporotrichum thermophile* (Mangallam et al., 1977) et *Talaromyces dupontii* (Brevet Belge n° 878-466, 1979). L'enzyme de cette dernière espèce possède un optimum d'activité à 75° et pH 3,5. Un *Humicola lanuginosa* (Taylor P. et al., 1978) possède deux amyloglucosidases dont l'une présente une température optimale d'activité se situant entre 65°C et 70°C.

La liste des champignons filamenteux possédant une α -glucosidase n'est que peu fournie; quatre genres: *Aspergillus*, *Mucor*, *Penicillium* et *Paecilomyces* sont cités comme produisant une α -glucosidase extracellulaire (tableau 9; Kelly et Fogarty, 1983). Une α -glucosidase intracellulaire est décrite chez *Thermoascus aurantiacus* (Obert, 1980-1981).

La plupart de ces α -glucosidases possèdent, comme chez les bactéries, une affinité très grande pour le maltose (Fogarty et Kelly, 1983). Néanmoins, diverses espèces (*Mucor javanicus*, *M. racemosus*, *Penicillium purpurogenum*, *P. oxalicum*, Yamasaki et Suzuki, 1980) peuvent hydrolyser l'amidon soluble. La température optimale d'activité se situe en général entre 50° et 55° (Fogarty et Kelly, 1983), l' α -glucosidase d'*Aspergillus flavus* possédant une température optimale d'activité exceptionnellement faible: 35°, (Olutila, 1981). Le pH optimal d'activité se situe entre pH 3 (*P. purpurogenum*; Yamasaki et al., 1976) et pH 6 (*Mucor racemosus*; Yamasaki et al., 1977).

b) les souches industrielles.

Le deuxième groupe de champignons filamenteux est représenté par les souches industrielles. Les *Aspergillus* du groupe *niger* (*A. awamori*, *A. niger* Van Tieghem, *A. cinnamomeus*, *A. foetidus*, *A. phoenicis* et *A. saitoi*) (tableaux et), les *Aspergillus* du groupe *oryzae* (tableaux et) ont subi des études toxicologiques prouvant leur innocuité lors d'une utilisation industrielle à des fins alimentaires et sont employés en France pour la production d'enzyme. Les *Rhizopus* (tableaux 8 et 9) sont, quant à eux, utilisés en Extrême-Orient ou aux Etats-Unis.

Une bibliographie imposante a été consacrée aux amyloglucosidases des *Aspergillus* (caractérisation des amyloglucosidases, conditions de culture, amélioration de productions....). Ces champignons sont d'autre part connus comme producteurs de diverses autres activités enzymatiques (ex: protéases, cellulases, α -amylase, hémicellulases, lipases, glucose-oxydase, pectinases, β -glucanase pour *A.niger*) et sont donc abondamment étudiés.

c) conclusion

Les contraintes législatives, l'hyperproductivité associée à la polyvalence de production font que les espèces classiques utilisées en production industrielle (*Aspergillus* du groupe *niger* et du groupe *oryzae*) n'ont pas jusqu'à présent été sujets au remplacement.

En résumé, deux points peuvent être soulignés :

- d'une part, seules quelques espèces de champignons filamenteux sont connues comme hyperproductrices d'amyloglucosidase (*Aspergillus* des groupes *niger* et *oryzae*, *Rhizopus* sp.) alors qu'un nombre très important d'espèces sont citées comme faiblement productrices d'amyloglucosidase et d' α -glucosidase .

- d'autre part, peu de souches fongiques sont décrites comme produisant une amyloglucosidase thermostable: seuls trois *Aspergillus* du groupe *niger* (Ramasesh et al., 1982; Fogarty et Benson, 1983, Alazard et Raimbault, 1981), *Talaromyces dupontii* (Brevet belge n° 878-466, 1979) et *Humicola lanuginosa* (Taylor et al., 1978; Basaveswara Rao et al., 1979, 1981) possèdent un tel enzyme.

B.- THERMOSTABILITE DES ENZYMES

1.- Définition et méthodes d'analyse

Zuber (1979), dans sa revue consacrée à la structure et la fonction des enzymes de microorganismes thermophiles, récapitule les différentes techniques utilisées pour définir la thermostabilité :

- le dosage de l'activité résiduelle de l'enzyme après incubation pendant un certain temps à différentes températures,
- la détermination de la température optimale d'activité de l'enzyme,
- la mesure de la transition thermique par le rapport $pH/\Delta T$ selon la procédure de Bull et Breese (1973a,b),
- le suivi de la cinétique de dénaturation de la protéine par dichroïsme circulaire,
- la mesure de la taille de la molécule par dispersion de la lumière,
- le suivi des changements du microenvironnement des résidus tryptophane en fluorescence.

Tableau 10: Optimum de température d'activité et thermostabilité de quelques amyloglucosidases et alpha-glucosidases

	Température optimale d'activité	Thermostabilité	Durée, pH	Références
AMYLOGLUCOSIDASE (EC.3.2.1.3.)				
<i>Clostridium thermohydrosulfuricum</i>	75°	65°	60mn pH 5	Hyun et Zeikus (1985b)
<i>Aspergillus hennebergi</i>	70°	60°	15mn pH 4,5	Alazard et Baldensperger (1982)
<i>Aspergillus niger</i>	70°	50°	30mn pH 4,5	Fogarty et al. (1983)
<i>Humicola lanuginosa</i>	70°	60°	60mn pH 4,5	Basaveswara rao et al. (1979)
<i>Humicola lanuginosa</i>	65-70°	55°	30mn pH 6,6	Taylor et al. (1978)
<i>Aspergillus niger</i> Van Thiegem	65°	60°	10mn	Ramasesh et al. (1982)
<i>Aspergillus oryzae</i>	60°	40°	30mn pH 5	Miah et al. (1977)
<i>Aspergillus oryzae</i>	60°	40°	30mn pH 6	Saha et al. (1979)
<i>Aspergillus niger</i> Van Thiegem	60°	40°	10mn	Ramasesh et al. (1982)
<i>Aureobasidium pullulans</i>	50°	45°		Federici (1984)
<i>Aspergillus oryzae</i>	50°	40°	30mn pH 5	Miah et Ueda (1977)
ALPHA-GLUCOSIDASE (EC 3.2.1.20.)				
<i>Thermoascus aurantiacus</i>	70°	60°	60mn pH 4	Obert (1980-1981)
<i>Bacillus caldovelox</i>	55°	60°	60mn pH 6	Giblin et al. (1987)
<i>Oryza sativa</i>	55°	55°	15mn pH 4,5	Yamasaki et Konno (1985)
<i>Oryza sativa</i>	55°	45°	15mn pH 4,5	Yamasaki et Konno (1985)
<i>Oryza sativa</i>	50°	45°	15mn pH 4,5	Yamasaki et Konno (1985)
<i>Penicillium purpurogenum</i>	50°	40°	15mn pH 5,3	Yamasaki et al. (1976)
<i>Bacillus licheniformis</i>	45°	35°	60mn pH 6	Kelly et al. (1986)
<i>Bacillus licheniformis</i>	45°	30°	60mn pH 6	Kelly et al. (1986)
<i>Bacillus cereus</i>	40°	30°	15mn pH 6,9	Yamasaki et al. (1974)

La thermostabilité exprimée dans la troisième colonne correspond à la température permettant de recouvrer 100% d'activité enzymatique après incubation dans les conditions précisées dans la quatrième colonne. Les souches sont classées par température optimale d'activité décroissante.

Les quatre dernières méthodes nécessitent des enzymes hautement purifiés et ne sont donc guère applicables à un échantillonnage de grande taille : aussi, seules les deux premières techniques ont-elles retenue notre attention.

Certains auteurs considèrent l'optimum de température d'activité enzymatique comme un critère de thermostabilité bien qu'il s'agisse d'un paramètre de cinétique enzymatique déterminé à partir de vitesses de réaction. Pour Singleton et Amelunxen (1973), le meilleur critère de thermostabilité est défini par le pourcentage d'activité résiduelle d'un enzyme après incubation pendant un certain temps à une température donnée et sous des conditions précises d'environnement (pH, ions, absence ou présence de substrat).

Peu de données bibliographiques présentant conjointement la température optimale d'activité et la thermostabilité sont disponibles. On s'aperçoit (tableau 10) que, pour les amyloglucosidases et α -glucosidases concernées, les deux critères donnent des résultats voisins quant à l'échelle de thermostabilité qu'ils déterminent et que les températures optimales d'activité sont supérieures de 5 à 20°C à la température caractérisant la thermostabilité. La thermostabilité exprimée correspond ici à la température autorisant la conservation de 100 % d'activité de l'enzyme après incubation pendant une certaine durée de temps (variable selon les auteurs) en l'absence de substrat. L'expression de la demi-vie de l'enzyme (durée d'incubation permettant de recueillir 50% de l'activité initiale de l'enzyme) n'est que rarement indiquée.

Des résultats similaires à ceux énoncés pour l'amyloglucosidase ou l' α -glucosidase se retrouvent dans la littérature pour d'autres enzymes: les xylanases de *Thermoascus aurantiacus* (Yu et al., 1987) et de *Bacillus stearothermophilus* (Gruninger et Fichter, 1986), l' α -amylase de *Clostridium thermosulfurogenes*, la β -glucosidase et la carboxyméthyl cellulase de *Trichoderma reesei* ou de *Thermoascus aurantiacus* (Kawamori et al., 1987). Ainsi, il apparaît que l'amélioration de la thermostabilité d'un enzyme peut être estimée au prime abord grâce à l'amélioration de sa température optimale d'activité.

2. Recherche de l'amélioration de la thermostabilité

Trois voies peuvent être suivies pour tenter d'améliorer la thermostabilité d'un enzyme d'usage industriel.

- modifier l'enzyme produit
- modifier l'organisme producteur
- changer d'organisme producteur

La bibliographie propose un éventail de techniques en vue d'améliorer la thermostabilité de certains enzymes dont l'amyloglucosidase; par contre, aucune information n'a pu être obtenue pour l' α -glucosidase.

Tableau 11 : Stabilisation des enzymes par liaison avec le dextran (d'après Wasserman, 1984)

Enzymes	T (°C)	durée de chauffage (mn)	activité résiduelle (%)		Références
			natif	modifié	
α-Amylase	65	30	0	70	Marshall and Rabinowitz (1975)
α-Amylase	60	30	10	90	Marshall and Rabinowitz (1975)
Catalase	52	60	40	90	Marshall and Rabinowitz (1976)
Lactase	50	180	10	92	Blomhoff and Christensen (1983)
Lactase modifié avec dextran acétylé	50	180	10	100	Blomhoff and Christensen (1983)
Lactase modifié avec dextran méthylé	50	180	10	85	Blomhoff and Christensen (1983)

a) Modification de l'enzyme

Cette voie est peu suivie dans la pratique pour l'amyloglucosidase, seules quelques tentatives ont été effectuées dans ce sens (par modification chimique ou immobilisation), mais elles n'ont pas suscité d'utilisations industrielles. La sélection de production d'enzymes thermostables grâce à des variations de conditions de culture (température, milieu) n'apparaît pas non plus comme généralisable.

modification chimique de l'enzyme

Cette approche est voisine de l'immobilisation dans le sens où une multitude de méthodes ont été envisagées sans pouvoir à l'heure actuelle prédéterminer laquelle peut profiter à un enzyme particulier. Ces modifications peuvent être classées en trois groupes:

- utilisation de réactifs monofonctionnels
- utilisation de réactifs bifonctionnels
- utilisation de polymères

La modification à l'aide de réactifs monofonctionnels implique en général l'altération des propriétés de charge à la surface de la protéine. Le nombre de réactifs utilisés est vaste et la sélection largement empirique; la lactate-deshydrogénase a ainsi pu être stabilisé de manière conséquente (Wasserman, 1984).

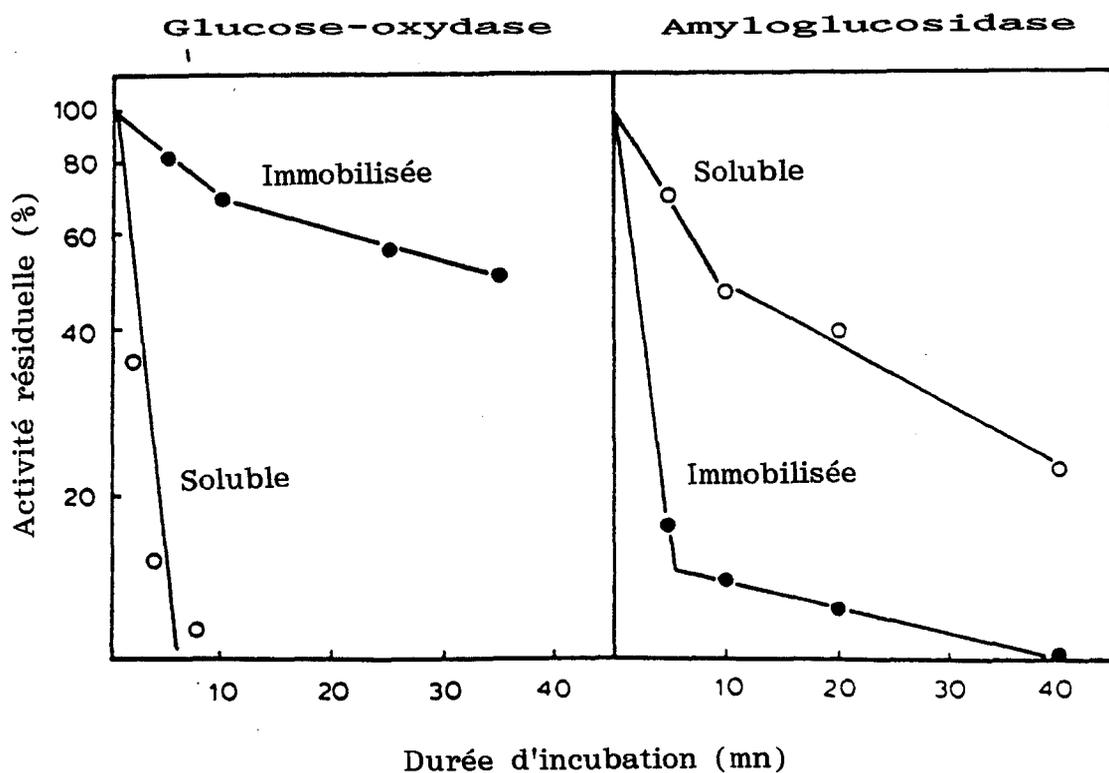
L'emploi de réactifs bifonctionnels repose sur la formation de ponts entre deux domaines de la protéine. Un grand nombre de ces réactifs ont été synthétisés (Ji, 1983). Le glutaraldéhyde est un des réactifs les plus communément utilisés.

La liaison à certains polymères entraîne une amélioration notable de la thermostabilité de certains enzymes. Un intérêt croissant existe pour les techniques utilisant le dextran activé par le bromure de cyanogène (tableau 11). Les auteurs concluent qu'un déterminant important de la thermostabilisation des enzymes modifiés est le pontage hydrogène entre le polymère et la surface de l'enzyme.

L'utilisation de solvants organiques (provoquant une chute des constantes diélectriques) exerce une action dans le même sens lorsqu'ils se combinent aux parties hydrophiles de l'enzyme.

Peu d'utilisations effectives de ces modifications sont pratiquées en vue d'une amélioration de la thermostabilité d'un enzyme. Seul un brevet (EP 0189 838, 1986) fait état d'une méthode améliorant la thermostabilité d'une α -amylase bactérienne à l'aide d'amphiphiles (molécules possédant un groupe hydrophile et un groupe hydrophobe). Diverses classes d'alcool et d'amines ont été essayées, les carboxylates ($R-COO^-$) sous la forme de sels de sodium ou de calcium retenant particulièrement l'attention des auteurs. Les groupes R aromatiques et les chaînes de substitution

Fig.7 : Effet de l'immobilisation sur la thermostabilité de la glucose-oxydase et de l'amyloglucosidase. (d'après Wasserman, 1984).



Les deux enzymes étaient immobilisés sur polyéthylèneimine.

Les températures d'incubation étaient respectivement de 61°C (glucose-oxydase) et 68°C (amyloglucosidase).

longues procurent dans ce cas une thermostabilité meilleure que les groupes aliphatiques ou les chaînes courtes.

Chez l'amyloglucosidase, diverses modifications chimiques produites dans le but de mieux définir les différentes propriétés des radicaux présents n'ont pas permis d'améliorer la thermostabilité (Inokuchi et al., 1982; Iwama et al., 1986a, b; Clarke et Svensson, 1984).

Immobilisation de l'enzyme

L'immobilisation d'un enzyme correspond à sa fixation sur ou dans un support. Cette fixation peut être réalisée par inclusion (dans une micro-capsule ou dans une matrice) par adsorption ou liaison covalente avec un support ou encore par la technique de réticulation. Ces procédés d'immobilisation nécessitent des méthodes douces respectant la structure native de la protéine, les liaisons exercées excluant les acides aminés impliqués dans la réaction à catalyser.

L'immobilisation peut apporter de singuliers avantages quant à l'utilisation de l'enzyme, le principal résidant dans l'absence de renouvellement du catalyseur pendant de longues périodes. Cependant, elle réclame un coût faible du support et un maintien des propriétés de l'enzyme.

L'immobilisation d'un enzyme sur un support insoluble a souvent été présentée comme un moyen d'améliorer la stabilité des enzymes contre la dénaturation due à la chaleur ou au pH. Cependant il n'existe pas de corrélation en ce domaine, l'immobilisation peut très bien induire une stabilisation, une déstabilisation ou n'avoir aucun effet (Lenders et al., 1985; Wasserman, 1984, figure 7)

Divers auteurs présentent l'immobilisation de l'amyloglucosidase comme un moyen d'améliorer la thermostabilité (Morijawa et al., 1980). Néanmoins les températures d'utilisation (50°C) restent très inférieures à celles réclamées par l'industrie (70°C-75°C). De plus le coût du support rend l'application du procédé peu rentable. De très nombreux supports ont été testés en vue de diminuer le prix de l'immobilisation (Bon et al., 1984a; 1984b) sans pour cela être suivies d'une quelconque utilisation industrielle.

Modification par des conditions culturelles

La thermostabilité de quelques enzymes varie suivant la température de culture du microorganisme producteur. Ainsi l' α -amylase du *Bacillus stearothermophilus* (Isono, 1970), de *Bacillus coagulans* (Campbell, 1954), la protéase neutre (Sidler et Zuber, 1972) et la pyrophosphatase de *Bacillus stearothermophilus* (Brown et al., 1957) se sont avérées être plus thermostables lorsque l'organisme était cultivé à plus haute température.

Haberstich et Zuber (1974) ont de même mis en évidence une meilleure thermostabilité de plusieurs enzymes dans les extraits de *B.stearothermophilus* et *B.caldotenax* lorsque ceux-ci sont cultivés à 50°C plutôt qu'à 37°C.

Chez les champignons filamenteux, Crisan (1973) cultive *Penicillium dupontii* et *Humicola lanuginosa* à diverses températures et observent une thermostabilité améliorée de certains enzymes lorsque les souches se développent à plus hautes températures.

Par contre Prasad et Maheswari (1978) ainsi que d'autres auteurs (Thompson et Thompson, 1962; Miller et Sheperd, 1972; Griffith et Sundaram, 1973; Yutani et al., 1973) ne signalent aucune évolution dans ce sens.

Les conditions de culture semblent cependant dans certains cas favoriser la synthèse d'enzymes thermostables. Une hypothèse réside dans la synthèse préférentielle d'isoenzymes thermostables lors de culture effectuées à température plus élevée. Ainsi Hayashida (1975) peut sélectionner l'un des 3 isoenzymes d'amyloglucosidase en fonction des conditions culturelles.

Alazard et collaborateurs (Alazard et Raimbault, 1981; Alazard et Baldensperger, 1982) décrivent les enzymes amylolytiques produits par *Aspergillus niger* en cultures liquide ou solide. L'enzyme isolé après culture en milieu solide possède une thermostabilité très supérieure (optimum d'activité à 70°C, 100% d'activité conservée à 65°C pendant 30 minutes) à celle obtenue après culture en milieu liquide (optimum d'activité à 50°C, 100% d'activité conservée à 50°C pendant 30 minutes). Ce phénomène n'a jamais été observé depuis, la production en milieu liquide agité propre à une culture et à une récupération faciles étant en général préférée.

L'explication de cette thermostabilité améliorée lors de la culture sur milieu solide peut encore résider dans une simple synthèse préférentielle d'isoenzyme.

En conclusion, la culture de microorganismes à températures plus élevées semble parfois entraîner une amélioration de la thermostabilité de certains enzymes, mais les nombreux échecs ne permettent pas une généralisation de la technique.

b. Modification de l'organisme:

Deux possibilités peuvent être envisagées dans ce but: provoquer une mutation de l'organisme producteur ou faire appel à l'ingénierie des protéines.

Mutagenèse

Il existe peu de rapports d'une expérimentation établie en vue d'améliorer la thermostabilité d'enzymes par mutagenèse.

Les bactéries ont fait l'objet de quelques réussites en ce domaine bien qu'il reste encore peu développé. Ainsi une sous unité de tryptophane synthétase d'*Escherichia coli* (Yutani et al., 1987) et un répresseur de phage (Hecht, 1984) ont été les premiers décrits.

Diverses procédures ont été mises en place en vue de sélectionner après mutation les organismes produisant un enzyme plus thermostable que l'enzyme natif. La sélection peut être basée sur la résistance à un antibiotique (cas de la Kanamycine nucléotidyltransférase; Liao; .1986) ou encore la résistance à la lyse du phage T4 (lysozyme du phage; Alber et Wozniak, 1985) ou à l'endonucléase de restriction (Hendrix et Welker, 1985). Les enzymes sélectionnés sont fonctionnels 3°C à 6°C au dessus de la température de l'enzyme natif.

Chez les champignons, Mitra et Sane (1981) relatent l'existence d'une souche d'*A.niger* mutée possédant une amyloglucosidase à meilleure thermostabilité que celle de la souche initiale. Néanmoins, le gain en thermostabilité pour l'enzyme était infime.

L'option mutagénique ne peut être ignorée; cependant les fréquences faibles d'obtention d'enzymes thermostables et la faible augmentation de température d'activité qui résulte de la mutagenèse montrent que cette option est très alléatoire.

Ingénierie des protéines.

Ce terme rassemble les techniques permettant, à partir des données de la structure tridimensionnelle des protéines obtenues par l'étude aux rayons X, de modifier d'une manière rationnelle cette structure par l'intervention au niveau des gènes correspondants.

Cette méthode développée ces quinze dernières années, a bénéficié de l'évolution des différentes techniques mises en oeuvre pour sa réalisation: la mutagenèse dirigée (Hutchinson et al., 1978; Shortle et Nathans, 1982; Hirose, 1982; Dalbadi-Mc farland et al., 1982), le génie génétique, la cristallographie aux rayons X et le design moléculaire (Ulmer, 1983; 1985).

Dans un premier temps, l'observation de protéines thermostables a permis d'appréhender les subtiles différences pouvant intervenir dans la thermostabilité par rapport aux enzymes mésostables. Diverses "règles" de modifications ont ainsi été édictées (Péruz et Raidt, 1975; Argos et al., 1980; Atkinson, 1976; Querol et Parrilla, 1987). Quelques résultats obtenus récemment ont montrés les possibilités offertes par l'ingénierie des protéines dans le domaine d'une stabilisation thermique, que ce soit la triose phosphate isomérase (Ahern et al., 1987), la subtilisine (Wells, 1986), le lysozyme T4 (Perry et Wetzl, 1984) ou la thermolysine (Imanaka et al., 1986).

Cette technique de pointe aussi séduisante qu'elle puisse paraître, demande néanmoins la collaboration de très nombreuses personnes appartenant à des groupes de discipline très variés.

Le symposium UCLA (1985) "Structures, repliage et design des protéines" a montré l'intérêt que prêtait la communauté scientifique à cette technique, les difficultés actuelles résident dans:

- la détermination de la structure protéique qui reste un point limitant pour la plupart des équipes
- les approches théoriques, encore inadéquates, disponibles pour prévoir la structure des nouvelles protéines.

En conclusion, si cette technique apparaît comme riche en potentialités elle demeure pour l'instant une technique d'avant garde, limitée à l'étude de quelques protéines et manipulée par un nombre restreint de groupes très complets de spécialistes.

c) Changement d'organisme producteur.

Face aux possibilités hasardeuses de la mutagenèse et des modifications chimiques futuristes de l'ingénierie des protéines, il existe la possibilité simple de changer d'organisme producteur.

Peu d'organismes sont reconnus comme producteurs légaux d'enzymes. Les contraintes législatives reposant sur l'obligation d'utiliser des organismes ayant fait preuve d'une innocuité toxicologique, et appartenant aux espèces mentionnées dans le tableau 12. Néanmoins, une procédure d'agrément existe (Desmazeaud, 1985), permettant de faire produire un enzyme à un organisme non compris dans la liste. Diverses commissions sont consultées sur l'intérêt technologique réel de l'enzyme proposé et l'évaluation de la toxicité des préparations ou des produits de la réaction enzymatique.

Ces procédures, si elles peuvent paraître longues, permettent néanmoins l'émergence de souches présentant des propriétés enzymatiques non partagées par les microorganismes industriels.

C'est cette dernière voie, l'une des plus simples et des moins hasardeuses, que nous avons finalement choisi de suivre.

Le premier problème posé dans la recherche de souches productrices d'enzyme à thermostabilité améliorée réside dans le choix des biotopes à sonder pour mener à bien la recherche.

Dans notre cas, il paraissait naturel de commencer les investigations au sein des microorganismes thermophiles ou thermotolérants. La thermostabilité des enzymes produits par des microorganismes thermophiles est, en effet, généralement plus élevée que celle des mêmes enzymes produits par des organismes mésophiles (Zuber, 1979).

Tab. 12: Microorganismes utilisés pour la production d'enzymes
(Desmazeaud,1985).

BACTERIES	CHAMPIGNONS FILAMENTEUX	LEVURES
Bacillus subtilis	Aspergillus niger	Saccharomyces sp
Bacillus licheniformis	Aspergillus oryzae	
Bacillus coagulans		
Streptomyces violaceoniger	Aspergillus wentii	
Streptomyces olivochromogenes	Endothia parasitica	
	Mucor pusillus	
	Mucor miehei	

Divers organismes thermophiles bactériens ou fongiques ont déjà été cités comme produisant une amyloglucosidase ou une α -glucosidase (tableaux 8 et 9). Les champignons filamenteux, traditionnels producteurs d'amyloglucosidase, comprenant un nombre élevé d'espèces thermophiles ou thermotolérantes (Cooney et Emerson, 1964; Crisan, 1973) sont riches en potentialités dans le domaine des productions d'enzymes thermostables. Ainsi des lipases (Omar et al., 1987), xylanases (Yu et al., 1987), β -glucosidases (Durand et al., 1984; Bedino et al., 1985), exo et endo β -1-4 glucanases (Grajek, 1986), α -glucosidase (Obert, 1980-1981), carboxyméthyl cellulase (Durand et al., 1984) ont été rapportés comme plus thermostables que celles de la plupart des organismes mésophiles.

Si on considère 60°C comme température optimale d'activité de la plupart des amyloglucosidases, quelques rares champignons filamenteux ont été cités comme produisant une amyloglucosidase nettement plus thermostable (soit un optimum de température d'activité supérieur ou égal à 70°C). Trois souches d'*Aspergillus niger* (Alazard et Rimbault, 1981; Fogarty et Benson, 1983; Ramasesh et al., 1982), *Humicola lanuginosa* (Taylor et al., 1978; Basaveswara et al., 1979, 1981) et *Talaromyces dupontii* (Brevet n°878-466, 1979) ont ainsi été décrits. Deux remarques sont à faire: d'une part le nombre restreint d'organismes isolés à ce jour et possédant une telle caractéristique, d'autre part aucune amyloglucosidase (bactérienne ou fongique) ne possède une température optimale d'activité supérieure à 75°C.

Les α -glucosidases décrites par les auteurs (tableau 8) possèdent toutes un optimum de température voisin de 50°C-55°C sauf l' α -glucosidase intracellulaire de *Thermoascus aurantiacus* (Obert, 1980-1981) dont l'optimum d'activité atteint 75°C.

Une cinquantaine de champignons filamenteux sont considérés comme thermophiles ou thermotolérants d'après la définition de Crisan (1973). Pour ce dernier, un champignon thermophile ou thermotolérant possède un optimum de température proche de 40°C ou plus pour une croissance normale. Par contre, pour Cooney et R. Emerson (1964), un champignon thermophile est un organisme fongique ayant une température optimale de croissance d'au moins 50°C et une température minimale de croissance supérieure à 20°C. Certains des champignons thermophiles ou thermotolérants sont déjà cités comme producteurs d'amyloglucosidase même si la thermostabilité de l'enzyme n'est pas toujours rapportée. Ces champignons constituent sans nul doute un ensemble riche en perspectives, cependant il convient de ne pas éliminer trop vite les souches mésophiles qui peuvent présenter elles aussi, des enzymes thermostables (Mitsutomi et Ohtakara, 1984). D'autre part, beaucoup d'enzymes produits par des organismes thermophiles ne sont pas plus thermostables que ceux fournis par les microorganismes mésophiles (Prasad et Maheswari, 1978).

CONCLUSION

L'obtention d'une amélioration de la thermostabilité d'un enzyme peut être obtenue par les diverses voies discutées dans ce chapitre: modification chimique de l'enzyme, modification des conditions de culture, mutagenèse des souches productrices, ingénierie des protéines ou recherche de nouveaux organismes producteurs. Cette dernière méthode reste la plus facile d'accès et la moins hasardeuse, certains organismes possédant les propriétés de thermostabilité ayant déjà été décrits.

Les souches thermophiles ou thermotolérantes présentent de bonnes perspectives quant à la recherche menée, ces souches produisant en général des enzymes plus thermostables que leurs congénères mésophiles. Néanmoins, ces dernières peuvent également produire des enzymes à température optimale d'activité élevée et ne sauraient être éliminées de suite.

II. - RESULTATS DE LA SELECTION

Cette première étape de la sélection avait pour but de tester un grand nombre de microorganismes fongiques sauvages, sans à priori de connaissance préalable et d'intérêt industriel, pour la recherche d'une hydrolase des liaisons α -1,4 et α -1,6 à thermostabilité améliorée.

Les souches fongiques décrites ont été isolées d'une part de biotopes chauds, pour la recherche de microorganismes thermophiles ou thermotolérants (potentiellement plus aptes à synthétiser des protéines thermostables), et d'autre part de produits à forte teneur en amidon, pour l'obtention d'organismes amylolytiques.

A. - ISOLEMENT DES SOUCHES ET PREMIER CRIBLE

1. Isolement et détermination des souches étudiées

846 souches ont été testées au laboratoire. Ces souches proviennent de diverses origines: isolement à partir de biotopes variés au laboratoire et de différentes collections (tableau 13).

L'isolement des souches a été pratiqué selon la technique décrite dans l'Annexe I.

Ces souches, obtenues sur un milieu amylicé (source de carbone: MDO2/glucidex 12, Roquette frères) sont de probables producteurs d'enzymes amylolytiques (α ou β -amylase, amyloglucosidase et α -glucosidase).

Deux températures de culture ont été utilisées pour l'isolement des souches, 28°C et 45°C afin de pouvoir recueillir des souches thermophiles et mésophiles.

Quelques souches fongiques témoins, producteurs connus d'amyloglucosidase, ont été suivies lors de cette étude: un *Aspergillus niger* v. *awamori* (NRRL 3112) et trois de ces mutants hyperproducteurs (25-17, 25-23 et O₁), obligeamment fournis par Roquette Frères (Lestrem).

Parmi les 700 souches de détermination connue (souches de collection et détermination effectuée au laboratoire), 30 genres et 61 espèces ou sous-genres ont été identifiés* (tableau 14). Afin d'alléger le travail de détermination, 146 souches, ne présentant aucun intérêt pour l'étude, n'ont pas été déterminées.

Les souches potentiellement intéressantes, *Aspergillus* du groupe *niger* et champignons thermophiles, ont été isolées en de nombreux exemplaires dans le but de trouver des souches à caractéristiques originales dans la production d'un enzyme dégradant les liaisons α -1-4 du substrat provenant de la liquéfaction de l'amidon.

* Diverses caractéristiques des souches déterminées (appartenance systématique, description, intérêt industriel potentiel, effets nuisibles) sont consignées dans l'annexe XII.

Tab. 13: Origine des souches testées lors de la sélection

ORIGINE DES SOUCHES	NOMBRE DE SOUCHES TESTÉES DE CETTE ORIGINE	NOMBRE DE SOUCHES SÉLECTIONNÉES EN FIN DE PREMIÈRE SÉLECTION
COLLECTIONS		
Laboratoire de Cryptogamie USTL Flandres Artois	63	
Laboratoire de Microbiologie USTL Flandres Artois	5	
Centraalbureau Voor Schimmelcultures (BAARN) Pays-Bas	11	
Laboratoire de Cryptogamie du Muséum National d'Histoire Naturelle de Paris	8	
Laboratoire de Microbiologie de Roquette Frères à Lestrem	4	
Laboratoire de Cryptogamie de la faculté de Toulouse	1	
ISOLEMENTS AU LABORATOIRE		
Origine : Air, pollutions diverses	62	1 <u>A. carbonarius</u>
Bois	14	
Colle d'étiquette	16	1 <u>Th. aurantiacus</u>
Compost pasteurisé de champignonnières	54	1 <u>Th. aurantiacus</u>
Ensilage de maïs	3	
Farine non traitée	10	
Fumier de canard	22	
Fumier de jardin	29	
Fumier d'oisies et d'oisons	7	
Fumier de porc	9	
Fumier de poule	16	
Grains (Maïs, pois, seigle)	12	
Litière de vache et cheval	26	
Moquettes	10	
Murs	2	
Terre de terrils (P.de.Calais, Nord)	54	5 <u>A. fumigatus type I</u>
Terre d'Afrique du Sud	1	
Terre des Baléares	9	
Terre du Burkina Faso	49	
Terre de Côte d'Ivoire	35	[1 <u>A. carbonarius</u>
Terre du Congo	34	[2 <u>Th. crustaceus</u>
Terre de Grèce	21	
Terre du Gabon	28	
Terre de Guinée (Conakry)	58	2 <u>Th. aurantiacus</u>
Terre de Porto Rico	17	2 <u>Th. aurantiacus</u>
Terre du Pérou	13	1 <u>Th. crustaceus</u>
Terre de Syrie	30	2 <u>P. série restricta</u>
Terre de Tunisie	26	[2 <u>A. carbonarius</u>
Terre de Zimbabwe	87	[1 <u>A. fumigatus type I</u>
		[3 <u>Th. aurantiacus</u>

92 souches *Aspergillus* du groupe *niger*, d'après la classification de A. Al Musallam (1980), ont été obtenues: *Aspergillus niger* v. *niger* (ex-*A. niger* Van Tieghem), *A. niger* v. *awamori* (ex-*A. awamori*), *A. niger* v. *niger* f. *hennebergii* (ex-*A. hennebergii*), *A. carbonarius* (ex-*A. fONSECAUS*), *A. foetidus*, *A. acuelateus* et *A. japonicus*.

Parmi les souches thermophiles et thermotolérantes isolées à 45°C, de nombreuses espèces décrites comme thermophiles par Cooney et Emerson (1964) ont été recueillies. Pour ces auteurs, un champignon thermophile est un organisme fongique ayant une température maximale de croissance d'au moins 50°C et température minimale de croissance supérieure à 20°C.

Crisan (1973) donne une définition plus large et moins précise du champignon thermophile, qui serait un champignon ayant un optimum de température proche de 40°C ou plus, pour une croissance normale.

Les champignons thermophiles isolés et déterminés lors de cette étude ont été: *Humicola lanuginosa*, *H. grisea*, *H. insolens*, *Rhizomucor pusillus*, *R. miehe*, *Talaromyces thermophile*, *Thermoascus crustaceus*, *Th. aurantiacus*, *Torula thermophile* et *Malbranchea pulchella* v. *sulfurea*.

Diverses espèces classées comme thermotolérantes, d'après la définition de Cooney et Emerson (1964) (espèce croissant à température élevée et à température inférieure à 20°C) ont également été isolées et testées; plusieurs *Aspergillus* du groupe *fumigatus*, *Paecilomyces variotii*, *Absidia* sp., *Endomycopsis bispora*, *Zygorhynchus* sp, *Penicillium vermiculatum*, *Rhizopus pygmaeus*, *Mucor fragilis*.

2. Test utilisé lors du premier crible

Ce premier crible a une importance primordiale pour la suite de l'étude. En effet, une sélection mal orientée, ou un test mal choisi, peuvent ne pas déboucher sur des résultats intéressants. Aussi, afin de pouvoir examiner un grand nombre de souches différentes, fallait il utiliser un test rapide, reproductible et suffisamment sensible pour mettre en évidence toutes les caractéristiques de l'enzyme étudié.

Dans la bibliographie de ce chapitre, nous avons présenté les différentes méthodes de recherche d'une thermostabilité améliorée. Nous avons choisi, dans cette étude, de rechercher l'optimum de température d'activité de l'enzyme, critère permettant de définir une échelle de thermostabilité d'après les données bibliographiques.

Cet optimum a été évalué par le dosage de l'activité enzymatique à 2 températures: 60°C qui est l'optimum habituel des amyloglucosidases et 75°C, température idéale à atteindre dans la phase de saccharification.

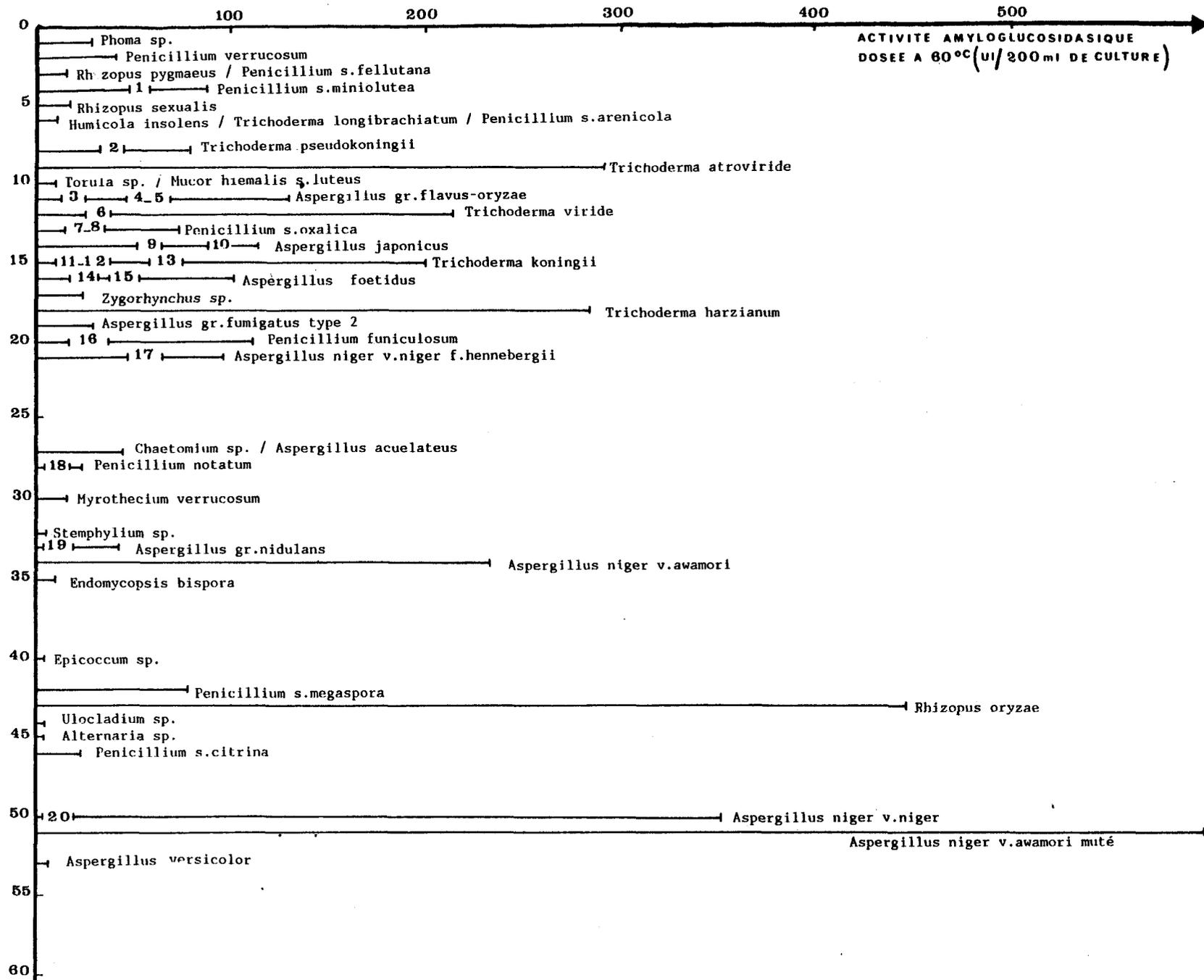
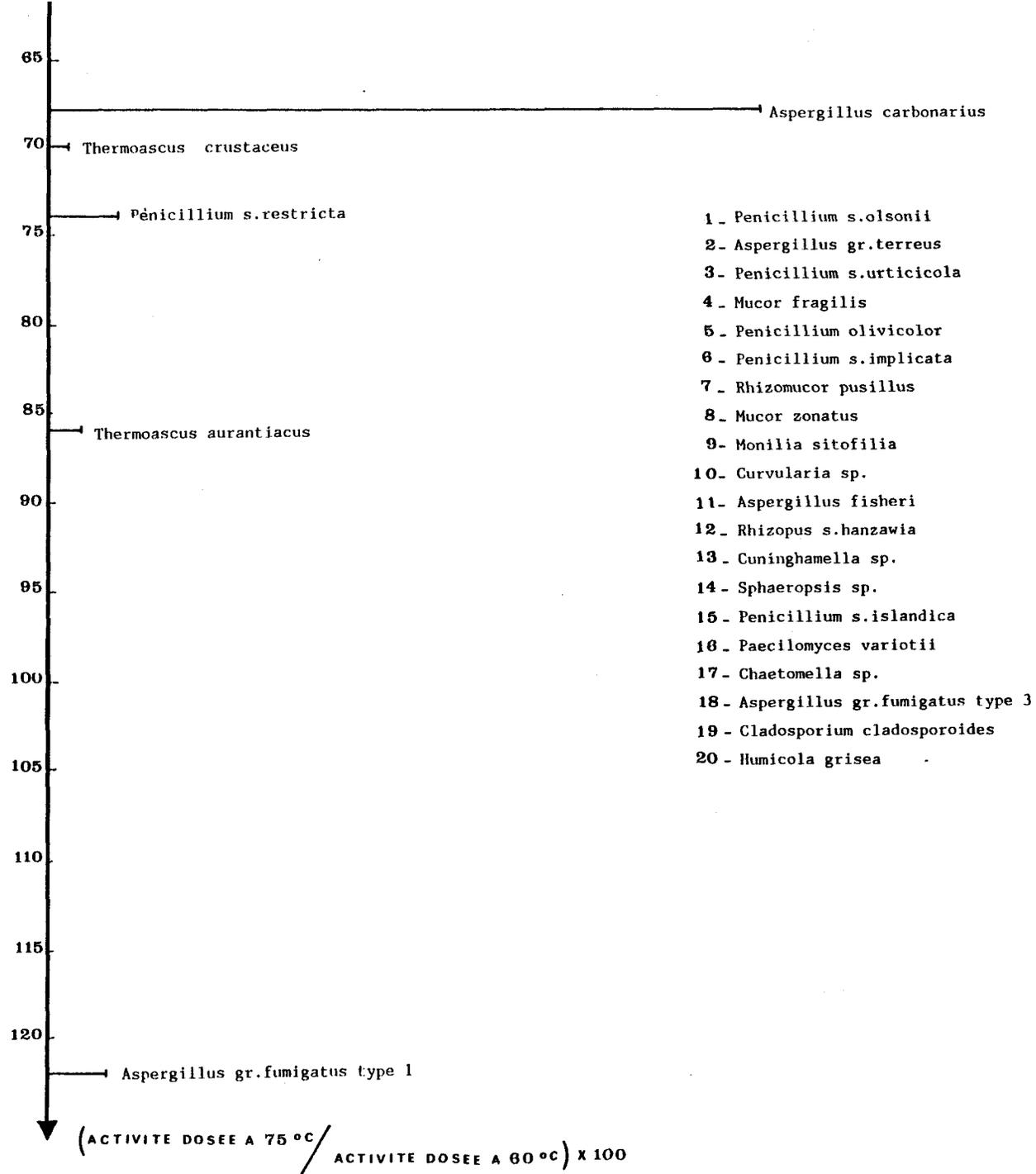


FIGURE 8: Rapport des activités amyloglucosidasiques dosées à 75°C et à 60°C (exprimé en pourcentage) et production de cette activité à 28°C (dosée à 60°C, en UI / 200ml) par les souches fongiques déterminées.



- 1 - Penicillium s.olsonii
- 2 - Aspergillus gr.terreus
- 3 - Penicillium s.urticicola
- 4 - Mucor fragilis
- 5 - Penicillium olivicolor
- 6 - Penicillium s.implicata
- 7 - Rhizomucor pusillus
- 8 - Mucor zonatus
- 9 - Monilia sitofilia
- 10 - Curvularia sp.
- 11 - Aspergillus fisheri
- 12 - Rhizopus s.hanzawia
- 13 - Cuninghamella sp.
- 14 - Sphaeropsis sp.
- 15 - Penicillium s.islandica
- 16 - Paecilomyces variotii
- 17 - Chaetomella sp.
- 18 - Aspergillus gr.fumigatus type 3
- 19 - Cladosporium cladosporoides
- 20 - Humicola grisea

FIGURE 8 : (Suite).

FIGURE 9: Rapport des activités amyloglucosidasiqes dosées à 75°C et à 60°C (exprimé en pourcentage) et production de cette activité à 45°C (dosée à 60°C, en UI/ 200ml) par les souches fongiques déterminées.

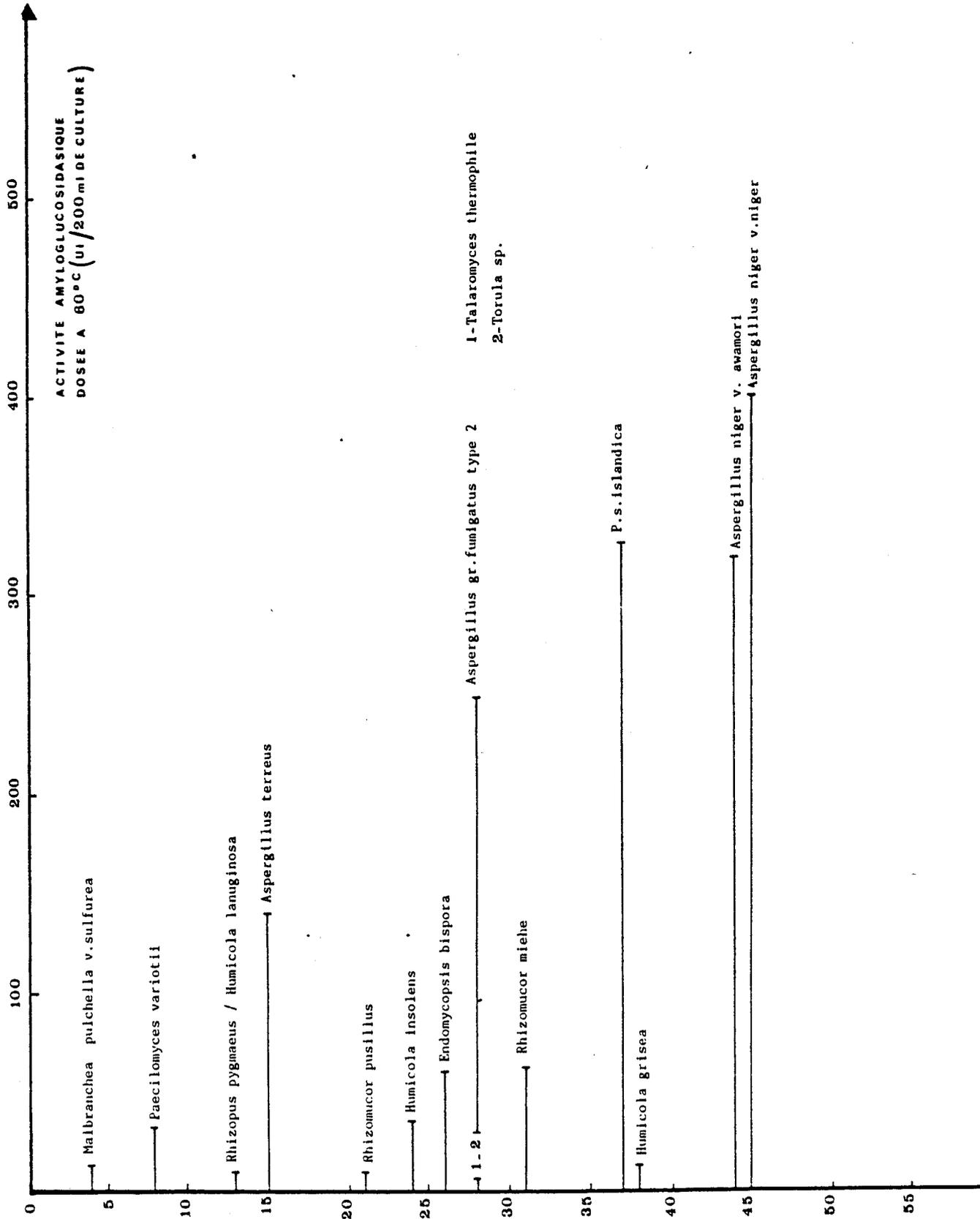


Figure 9 : (suite)

Thermoascus aurantiacus

Thermoascus crustaceus

(ACTIVITE DOSEE A 75°C

ACTIVITE DOSEE A 80°C) X 100

65
70
75
80
85
90
95
100
105
110
115

Le rapport de ces deux activités (%75/60) nous a permis d'appréhender une thermostabilité éventuelle. Par ce test, nous avons pu quantifier chaque résultat et donc classer les différentes souches selon leur aptitude à produire un enzyme thermostable. Ce test quantifié nous a également permis de choisir, en fonction des résultats, le niveau de la sélection.

La production de l'enzyme étudié, pour chacune des souches isolées, a été réalisée en milieu liquide agité. Cette méthode, bien qu'assez fastidieuse, nous a semblé la plus fiable et la plus proche des conditions industrielles.

Comme nous l'avons souligné dans le chapitre préliminaire, la différenciation entre amyloglucosidase et α -glucosidase nécessite des dosages trop longs pour être réalisés en grand nombre et donc incompatibles à ce niveau de la sélection. Aussi appellerons nous, dans la suite de ce travail, activité amyloglucosidasique (ou AM), les activités de l'amyloglucosidase et de l' α -glucosidase.

En résumé, le déroulement de cette première étape de sélection a été le suivant:

- 1- Isolement sur milieu solide amylicé de souches fongiques de biotopes divers.
- 2- Production de l'éventuel enzyme sur milieu d'isolement amylicé liquide.
- 3- Dosage à 60°C et 75°C des activités enzymatiques du filtrat de culture.

3. Première sélection

846 souches (dont 700 déterminées) ont été examinées comme décrit précédemment. Les résultats de ce test sont consignés dans le tableau 14 et les figures 8 et 9.

Chacune de ces souches a été testée au moins une fois. Lorsque plusieurs essais ont été réalisés, seule la moyenne a été retenue. Pour chaque groupe de champignons (espèces, genres ou sous genres) une moyenne et un écart-type de chaque donnée ont été déterminés (activité à 60°C, activité à 75°C et pourcentage 75/60).

Deux températures de croissance ont été utilisées: 28°C, pour les souches mésophiles, et 45°C, pour les souches thermophiles. Certaines souches ont été mises en culture aux 2 températures de croissance.

Les figures 8 et 9 constituent les représentations graphiques du tableau 14, soit le pourcentage d'activité AM dosée à 75°C par rapport à l'activité AM dosée à 60°C, d'une part et la production totale d'enzyme dosée à 60°C, d'autre part, pour chaque groupe de champignons étudié. Les groupes de souches ayant un pourcentage 75/60 nul ne sont pas représentés graphiquement. De plus, dans le cas où plusieurs groupes possèdent un même %75/60 moyen, la position sur le graphique de certains groupes a été visualisée

TABLEAU 14: Rapport des activités amyloglucosidasiqes dosées à 75°C et à 60°C des différentes souches fongiques déterminées.

CLASSIFICATION	TEMP. °C	POURCENTAGE 75°C/60°C	A. AM DOSEE A 60°C UI/200ml	NOMBRE DE SOUCHES
LEVURES				
ASCOMYCOTINA				
Classe des Hemiascomycètes				
Ordre des Endomycétales				
Famille des Endomycetaceae				
Genre Endomycopsis				
E.bispora	28	35±9%	10± 5	2
	45	26±8%	62± 38	2
CHAMPIGNONS FILAMENTEUX				
ZYCOMYCOTINA				
Classe des Zygomycètes				
Ordre des Mucorales				
Famille des Mucoraceae				
Genre Absidia				
Absidia sp.	28	0%	6	1
Genre Mucor				
Mucor sp.	28	12± 2%	3± 1	2
M.fragilis	28	11%	47	1
M.racemosus	28	0%	0	1
M.hiemalis s.luteus	28	10± 4%	15± 10	3
M.zonatus	28	13%	16	1
Genre Rhizopus				
Rhizopus sp.	28	14±17%	22± 18	5
	45	0%	1	1
R.s.hanzawia	28	15±17%	17± 27	35
R.pygmaeus	28	3± 4%	15± 16	3
	45	14± 0%	2± 2	2
R.sexualis	28	5± 5%	13± 16	8
R.oryzae	28	43%	448	1
Genre Rhizomucor				
R.pusillus	28	13±19%	17± 25	11
	45	21±33%	11± 16	9
R.miehei	28	0%	9± 7	2
Genre Zygorhynchus				
Zygorhynchus sp.	45	ND	0	1
Famille des Choanephoraceae				
Genre Cunninghamella				
Cunninghamella sp	28	15± 9%	60± 7	2
ASCOMYCOTINA				
Classe des Pyrénomycètes				
Ordre des Nectriales				
Famille des Hypocreaceae				
Genre Nectria				
N.coccinea	28	0%	1	1
Classe des Plectomycètes				
Ordre des Eurotiales				
Famille des Thermoascaceae				
Genre Thermoascus				
Th.aurantiacus	28	86±28%	14± 2	3
	45	98±59%	29± 16	9
Th.crustaceus	28	70±32%	9± 7	3
	45	114±33%	4± 3	3
Famille des Eurotiaceae				
Genre Talaromyces				
T.thermophilus	45	28±30%	8± 6	14
classe des Hyphomycètes				
Ordre des Hyphomycétales				
Famille des Moniliaceae				
Genre Alternaria				
Alternaria sp	28	45±39%	12± 14	2
Genre Aspergillus				
Aspergillus sp.	28	39±16%	17± 19	6
groupe niger				
A.gr.niger	28	27±31%	183±126	18
A.niger v.niger	28	50±11%	350±136	35
	45	45±11%	398± 59	2
A.niger v.niger f.hennebergii	28	21%	97	1
A.niger v.awamori	28	34±12%	233±144	12
	45	44± 3%	320± 90	2
A.niger v.awamori muté	28	51± 6%	617± 64	3
A.carbonarius	28	68± 6%	32± 36	4
A.japonicus	28	14± 4%	117±139	14
A.aculeatus	28	27±13%	98± 15	2
A.foetidus	28	16± 5%	96± 13	2
groupe flavus-oryzae				
A.gr.flavus-oryzae	28	11± 4%	130±150	9
A.oryzae muté	28	12± 1%	113± 84	4
groupe fumigatus				
A.fisheri	28	15±10%	8± 3	11
A.gr.fumigatus type 1	28	127± 6%	26± 6	6
A.gr.fumigatus type 2	28	19±22%	36± 66	82
	45	28±20%	251±193	23
A.gr.fumigatus type 3	28	28±37%	4± 4	5
groupe nidulans				
A.gr.nidulans	28	33±22%	42± 55	6
groupe terreus				
A.gr.terreus	28	8± 8%	35± 25	18
	45	15± 6%	140± 37	2
groupe versicolor				
A.gr.versicolor	28	53±26%	6± 6	3

TABLEAU 14: Suite.

CLASSIFICATION	TEMP. °C	POURCENTAGE 75°C/60°C	A. AM DOSEE A 60°C UI/200ml	NOMBRE DE SOUCHEs
CHAMPIGNONS FILAMENTEUX				
classe des Hyphomycètes				
Ordre des Hyphomycétales				
Famille des Moniliaceae				
Genre Cladosporium				
Cladosporium sp.	28	14%±14%	12± 13	6
C.herbarium	28	0%	1	1
C.cladosporoides	28	33%± 0%	1± 1	2
Genre Curvularia				
Curvularia sp.	28	14%± 4%	87± 64	2
Genre Epicoccum				
Epicoccum sp.	28	40%	1	1
Genre Humicola				
H.grisea	28	50%± 0%	1± 1	2
	45	38%±34%	14± 40	17
H.insolens	28	6%± 7%	9± 6	7
	45	24%±17%	36± 77	16
H.lanuginosa	45	13%±14%	11± 16	14
Genre Malbranchea				
M.pulchella v.sulfurea	45	4%± 6%	13± 28	6
Genre Monilia				
M.sitofila	28	14%	53	1
Genre Myrothecium				
M.verrucaria	28	30%	17	1
Genre Paecilomyces				
P.variotti	28	21%±11%	18± 12	5
	45	8%	32	1
Genre Penicillium				
serie restricta	28	74%± 0%	30± 1	2
serie citreonigra	28	0%	1	1
serie implicata	28	12%±12%	26± 4	2
serie urticola	28	11%± 8%	15± 5	2
P.olivicolor	28	11%± 9%	58± 44	7
P.verrucosum	28	2%	41	1
serie viridicata	28	nd	5	1
serie arenicola	28	6%	8	1
serie olsonii	28	4%	48	1
serie citrina	28	7%±13%	19± 12	5
serie oxalica	28	13%±13%	74± 36	2
serie fellutana	28	3%± 4%	19± 14	4
serie megaspora	28	42%	78	1
serie islandica	28	16%±16%	42± 54	5
	45	37%	32±	1
serie miniolutea	28	4%	86	1
P.funiculosum	28	20%	110	1
serie expansa				
P.notatum	28	28%	22	1
genre Stemphylium				
Stemphylium sp.	28	32%	4	1
genre Trichoderma				
Trichoderma sp.	28	13%± 4%	294±197	6
T.atroviride	28	9%	291	1
T.harzianum	28	18%± 2%	284±158	3
T.koningii	28	15%± 2%	202± 86	3
T.longibrachiatum	28	6%	11	1
T.pseudokoningii	28	8%	78	1
T.viride	28	12%± 8%	213±125	12
Genre Torula				
Torula sp.	28	10%± 6%	8± 6	6
	45	28%±35%	15± 12	13
Genre Ulocladium				
Ulocladium sp.	28	44%	2	1
Ordre des Sphaeropsidales				
Famille des sphaeropsidaceae				
Genre Chaetomella				
Chaetomella sp.	28	21%± 1%	50± 30	2
Genre Phoma				
Phoma sp.	28	1%± 0%	28± 12	2
Ordre des Sphaeriales				
Famille des Chaetomiaceae				
Genre Chaetomium				
Chaetomium sp.	28	27%±27%	45± 37	2

par un numéro correspondant au bas du graphique au nom du groupe (espèce ou genre).

Ces deux représentations (figures 8 et 9), ainsi que le tableau 14, appellent quelques commentaires:

-La plupart des enzymes étudiés possèdent un optimum de température équivalent à ceux des enzymes des *Aspergillus* des groupes *niger* et *oryzae* (ou un % 75/60 compris entre 0% et 50%). Seules quelques espèces possèdent un optimum de température de l'activité AM augmenté (ou un % 75/60 nettement supérieur à 50%).

A 28°C de température de croissance, on remarque les *Aspergillus carbonarius* (groupe *niger*), les *Thermoascus crustaceus*, les *Th.aurantiacus*, des *Aspergillus* du groupe *fumigatus* et des *Penicillium* de la série *restricta*.

A 45°C de température de croissance, on retrouve les deux *Thermoascus*; aucun essai n'a été effectué à cette température pour les *A.carbonarius*, les *Aspergillus* du groupe *fumigatus* et pour les *Penicillium* de la série *restricta*.

-Les productions d'enzymes ayant un %75/60 intéressant sont toujours très faibles, sauf pour ceux des *A.carbonarius*,

-Les écart-types sont souvent larges, vue l'étendue des groupes systématiques et dans une même espèce, il existe des variations importantes de production selon les différents isolats. Il est cependant possible d'évaluer le %75/60 ainsi que la production d'enzyme de ces différents groupes.

Lors de cette sélection, nous n'avons étudié qu'un faible nombre d'espèces de champignons, et ceci pour différentes raisons:

-Le screening a été orienté, en partie, vers les biotopes chauds et par l'utilisation de températures d'isolement et de culture élevée (28°C et 45°C).

-Le milieu d'isolement utilisé était un milieu synthétique simple, amylicé, dans lequel la source d'azote était minérale et sans substances de croissance particulières.

-Certains échantillons n'ont pu être traités immédiatement, d'où une sélection des champignons ayant émis un grand nombre de spores, au détriment des espèces à faible sporulation.

Ces différentes observations nous amènent à penser que certaines souches présentant un intérêt peuvent avoir échappé à la sélection.

Dans la revue bibliographique présentée précédemment, seuls quelques champignons avaient été cités comme produisant une amyloglucosidase à thermostabilité élevée; 3 souches du groupe *A.niger* dont un *A.hennebergii* (Alazard et Raimbault, 1980) ou *A.niger v.niger f.hennebergii* d'après la dernière classification des *Aspergillus* du groupe *niger* (Al Musallam, 1980) et un *A.niger* Van Tieghem ou *A.niger v.niger* (Ramasesh et al., 1982); *Humicola lanuginosa* (Taylor et al., 1978; Basaveswara et al., 1979, 1981)

et *Talaromyces dupontii* ou *T.thermophile* (Brevet belge n°878-466, 1979). Seul le *Thermoascus aurantiacus* est nommé comme possédant une α -glucosidase intracellulaire thermostable (Obert, 1980-81).

Dans nos essais, seuls les résultats du *Th.aurantiacus* concordent réellement avec les données bibliographiques, bien que dans notre cas il s'agisse d'un enzyme extracellulaire. Les *A.niger v.niger* (ex-*A.niger Van Tieghem*) que nous avons testés sont également assez intéressants par une très bonne production absolue et un %75/60 proche de 50%, rappelant les résultats de certains autres auteurs (Ramasesh et al., 1982).

Aucun des *Humicola lanuginosa* et des *Talaromyces thermophile* n'a présenté un %75/60 intéressant, s'éloignant ainsi des résultats de la bibliographie (Taylor et al., 1978; Basaveswara et al., 1979; 1981; Brevet belge n°878-466, 1979).

De plus, rien dans la bibliographie ne laissait supposer les résultats obtenus au laboratoire avec les espèces remarquées dans cette première étude tels les : *A.carbonarius*, *A.gr.fumigatus* I, *Penicillium* de la série *restricta* et *Th.crustaceus*.

Un certain nombre de genres, non décrits à ce jour comme producteurs, ont également été testés, mais se sont avérés être sans grand intérêt pour cette étude.

De nombreux genres, cités dans la revue bibliographique comme producteurs d'amyloglucosidase ou d' α -glucosidase, ont été isolés et testés, mais très peu ont présenté un intérêt, tant en thermostabilité qu'en production absolue. Il convient de souligner la production exceptionnelle des *Trichoderma sp.*, comparable à celle des *A.niger*. Seul le *T.viride* avait été cité (Schellart et al., 1976) comme producteur d'amyloglucosidase. Nous avons recueilli différentes espèces de ce genre et plusieurs de ces souches ont montré une bonne production d'enzyme (*T.atroviride*, *T.viride*, *T.koningii* et *T.harzianum*). Ces enzymes amyloglucosidasiques ne présentaient malheureusement pas une thermostabilité améliorée par rapport à celle des enzymes industriels.

A la fin de cette étape de sélection, différents groupes de champignons dont la plupart sont thermotolérants ou thermophiles (*A.gr.fumigatus*, *Th.crustaceus* et *Th.aurantiacus*) ont pu être sélectionnés. Les *A.carbonarius* et les *Penicillium* de la série *restricta* sélectionnés ne présentent aucun caractère de thermotolérance, même s'ils croissent encore facilement à 37°C. Ceci confirme le fait qu'une plus grande chance d'obtention d'enzyme thermostable est réalisée chez les champignons thermophiles, mais que tous les champignons thermophiles ne présentent pas cette caractéristique et que cette propriété peut exister chez les champignons mésophiles.

Conclusion

En résumé, la sélection de ce premier crible regroupe les champignons suivants:

-Les *Aspergillus* du groupe *niger* dont essentiellement l'*A. carbonarius* et l'*A. niger* v. *niger*, qui présentent l'avantage d'avoir une très bonne production et un %75/60 plus élevé que ceux des souches décrites habituellement.

-Les *Aspergillus* du groupe *fumigatus* type I qui possèdent une activité amyloglucosidase ayant un excellent %75/60 mais une faible production.

-Les *Thermoascus crustaceus* et *Th. aurantiacus*, champignons thermophiles stricts de culture rapide à hautes températures (35°C-45°C); leur production enzymatique est très faible sur le milieu d'isolement mais le %75/60 est relativement élevé.

-Les *Penicillium* de la série *restricta* possèdent également un bon %75/60 mais une production d'enzyme très faible.

B. -DEUXIEME SELECTION

Au cours de cette étape de sélection, nous nous sommes attachés à préciser certaines caractéristiques des enzymes amyloglucosidasiques des souches sélectionnées lors de la première phase du screening, ainsi que certaines données biologiques de leur production enzymatique.

1. Caractérisation des enzymes amyloglucosidasiques des souches sélectionnées

Diverses données concernant les enzymes amyloglucosidasiques ont été précisées: leur thermostabilité, par la mesure de la durée de demi-vie de ces enzymes à 70°C, et leurs optimum de pH et de température. Toutes ces études ont été menées sur les filtrats de culture bruts, car nous ne pouvions assurer les différentes purifications de ces enzymes à ce niveau de la sélection; de plus, les enzymes industriels sont utilisés sans purification poussée.

a) Mesure de la durée de demi-vie des enzymes amyloglucosidasiques.

La thermostabilité de ces enzymes a été mise en évidence grâce au test de la demi-vie (durée d'incubation à une température précise pour laquelle l'activité est réduite de moitié). Ce test a été réalisé sur des filtrats de culture bruts placés à 70°C. Ce critère de demi-vie pouvait désormais être utilisé vu le faible nombre de souches retenues.

La température de 70°C présente l'avantage de correspondre à une température significativement supérieure à la température moyenne optimale des amyloglucosidasases industrielles et de permettre une comparaison avec l'énoncé d'une récente demande de brevet européen (135-138, 1984) sur une nouvelle amyloglucosidase thermostable produit par *Clostridium thermoamylolyticum*.

Tab.15: Demi-vies à 70°C, avec ou sans substrat et à différents pH des enzymes des souches précédemment sélectionnées et de deux enzymes témoins (enzyme industriel Novo et enzyme CPC).

SOUCHE	ESPECE	1/2 vie de l'activité Amyloglucosidasique sans substrat à 70°C			1/2 vie de l'activité Amyloglucosidasique avec substrat à 70°C		
		pH 4.5	pH 5.0	pH 6.0	pH 4.5	pH 5.0	pH 6.0
Ve 10	A.niger V.niger	8 min	10 min 30 s	2 min 30 s	3 h	1 h 40 min	30 min
CO 27	A.carbonarius	9 min	13 min	3 min 30 s	4 h 50	8 h	1 h 30 min
25-17	A.niger V.amamori (Roquette)	7 min	7 min	3 min	2 h	1 h 40 min	1 h 10 min
F 3-2	A. gr. fumigatus Type I	36 min	31 min 30 s	9 min	8 h 20 min	16 h	5 h 40 min
P6	Th. crustaceus	>10h (54%)	>10h (64%)	1 h 30 min	48 h	72 h	
Fu 1-1	Th. aurantiacus	>24h (63%)	>24h (67%)	3 h 20 min	>72h (69%)	>72h (76%)	>72h (82%)
Amyloglucosidase AMG 200 L (Novo industri AS)		4 min 30 s	4 min 30 s	3 min	2 h 30 min	2 h 15 min	1 h 55 min
Enzyme CPC de <u>Clostridium thermoamylolyticum</u>		< 5 min *	68 min *	3 h 35 min*	-	-	-

*données provenant de la demande de Brevet EP 135-138 (1984)

Conditions du test

En l'absence de substrat : des solutions de Tampon acétate 0,2M aux différents pH (pH 4,5 ; pH 5,0 ; pH 6,0) contenant 4 UI/ml d'activité amyloglucosidasique, sont placés en incubation à 70°C. Des prélèvements réguliers sont effectués et stockés à 4°C avant d'être dosés selon la méthode habituelle.

En présence de substrat : des solutions de MDO₂ (à 30% P/V de concentration finale) dans un tampon acétate 0,2M aux différents pH (pH 4,5 ; pH 5,0 ; pH 6,0) contenant 4UI/ml (ou 13,25 UI/g MDO₂) d'activité amyloglucosidasique sont incubées à 70°C. Les échantillons prélevés à intervalles réguliers sont dialysés contre de l'eau distillée pendant une nuit et dosés, ensuite, par la méthode habituelle.

Les différents résultats de la mesure des demi-vies sont consignés dans le tableau 15.

Les essais ont été effectués sur les enzymes amyloglucosidasiques des souches sélectionnées lors du premier crible (*A.carbonarius*, *A.niger* v. *niger*, *A.gr.fumigatus* I, *Th.crustaceus*, *Th.aurantiacus* et *P.* de la série *restricta*) et sur 2 enzymes témoins, celui produit au laboratoire par la souche témoin 25-17 (*A.niger* v. *awamori* muté, Roquette Frères) et un enzyme industriel (amyloglucosidase AMG 200L, NOVO INDUSTRI AS) produit également par un *Aspergillus* du groupe *niger*.

Différentes conditions ont été étudiées, la présence ou l'absence du substrat (MDO2, à 30% p/v de matière sèche, condition proche de la saccharification industrielle) et différents pH de réactions (de pH 4.5, pH habituel, à pH 6.0 proche du pH de la liquéfaction de l'amidon). La réalisation du test est expliquée en annexe du tableau 13.

La lecture du tableau 15 permet les observations suivantes:

La thermostabilité des enzymes des divers groupes de champignons est très variable. Elle évolue, chez les *Aspergillus* du groupe *niger*, de 2,5 à 13 min, sans substrat, et de 30 min à 8 heures, en présence de substrat, suivant les pH et les souches. On peut observer un gain d'un facteur 2 environ de l'enzyme de l'*A.carbonarius* par rapport à l'enzyme témoin (enzyme NOVO) aux pH 4.5 et 5.0.

La durée de la demi-vie des enzymes des souches de *Penicillium* de la série *restricta* sélectionnées n'a pu être déterminée de manière précise étant donnée la trop faible activité présente.

Une première amélioration est obtenue avec les *Aspergillus* du gr. *fumigatus* type I: demi-vie entre 9 et 36 min sans substrat, de 5h40 min à 16h. en présence de substrat.

Cependant, l'amélioration de la thermostabilité des activités amyloglucosidasique par les *Thermoascus* apparaît encore plus nette, la demi-vie de l'enzyme en l'absence de substrat étant supérieure à 10 heures pour pH 4.5 et de 2 à 3 jours en présence de substrat.

L'effet protecteur du substrat est vérifié pour tous les enzymes et ceci de façon très nette. Dans la plupart des cas la demi-vie, sans substrat, est de l'ordre de la minute et, avec substrat, avoisine l'heure.

La durée de la demi-vie des enzymes, en présence ou absence du substrat, est plus longue entre pH 4.5 et pH 5.0. Seules les enzymes du *Thermoascus aurantiacus* et *Clostridium amylolyticum* font exception à cette règle, le meilleur pH étant 6.0 pour eux. Au contraire, ce pH entraîne une chute importante des demi-vies

pour les enzymes produits par les *Aspergillus*.

Pour la plupart des souches, l'évolution de la demi-vie de l'enzyme de pH 4.5 à pH 6.0 est similaire en présence ou en l'absence de substrat. Seul le *Th.aurantiacus* présente un résultat différent selon la présence ou l'absence du substrat, comme si l'effet protecteur était renforcé à pH 6.0.

En conclusion, les tests de demi-vie démontrent donc une thermostabilité des enzymes amyloglucosidasiques produits par les deux espèces du genre *Thermoascus* très améliorée par rapport à celle des enzymes industriels que ce soit en présence ou en l'absence de substrat et à tous pH étudiés.

b) Optimums de température et de pH:

La recherche des optimums de température et de pH a été effectuée dans une zone étroite autour des optimums classiques (60°C et pH 4.5), ces données n'ont jamais été déterminées très précisément étant donnés les écarts utilisés (5°C pour la température et 0.5 pour le pH) et l'emploi d'un filtrat de culture non purifié.

La figure 10 représente les différentes courbes d'activités en fonction de la température obtenues pour les enzymes des souches sélectionnées. Le profil de ces courbes est similaire pour les différents enzymes présentés. La zone des activités maximales est assez large autour de l'optimum; en effet, il existe une plage d'une dizaine de degrés autour de l'optimum supposé dans laquelle l'activité enzymatique dépasse 85% du maximum enregistré.

La souche témoin (25-17) et le Ve 10 (*A.niger v.niger*) possèdent un enzyme à température optimale d'activité comprise entre 60°C et 65°C, le Co 27 *A.carbonarius*, le F3-2 (*A.grafumigatus* I), le Ful-1 et le P6 (les deux *Thermoascus*) entre 65°C et 70°C. Ces températures optimales d'activité sont comparables aux températures optimales d'activité les plus élevées des amyloglucosidases ou α -glucosidases présentées dans la bibliographie: 75°C pour celles du *Thermoascus aurantiacus* (Obert, 1980-1981), 70°C pour celles d'*A.hennebergii* (Alazard et Raimbault, 1981) ou d'*A.niger* (Fogarty et al., 1983) et 65°C pour celles d'*Humicola lanuginosa* (Taylor et al., 1978) ou d'*A.niger Van Tieghem* (Ramasesh et al., 1982).

L'effet du pH a été étudié entre pH 4.0 et 6.0 (figure 11), bien que certains enzymes semblent avoir un optimum d'activité à la limite inférieure de cet intervalle. En effet, des pH plus bas sortaient des zones de pH utilisés industriellement et des capacités de dosage de glucose du doseur YSI.

La plupart des enzymes étudiés ont leur optimum entre pH 4.5 et 5.0, ce qui correspond aux pH des amyloglucosidases connues

10: Effet de la température sur l'activité amyloglucosidase des filtrats de culture des souches sélectionnées

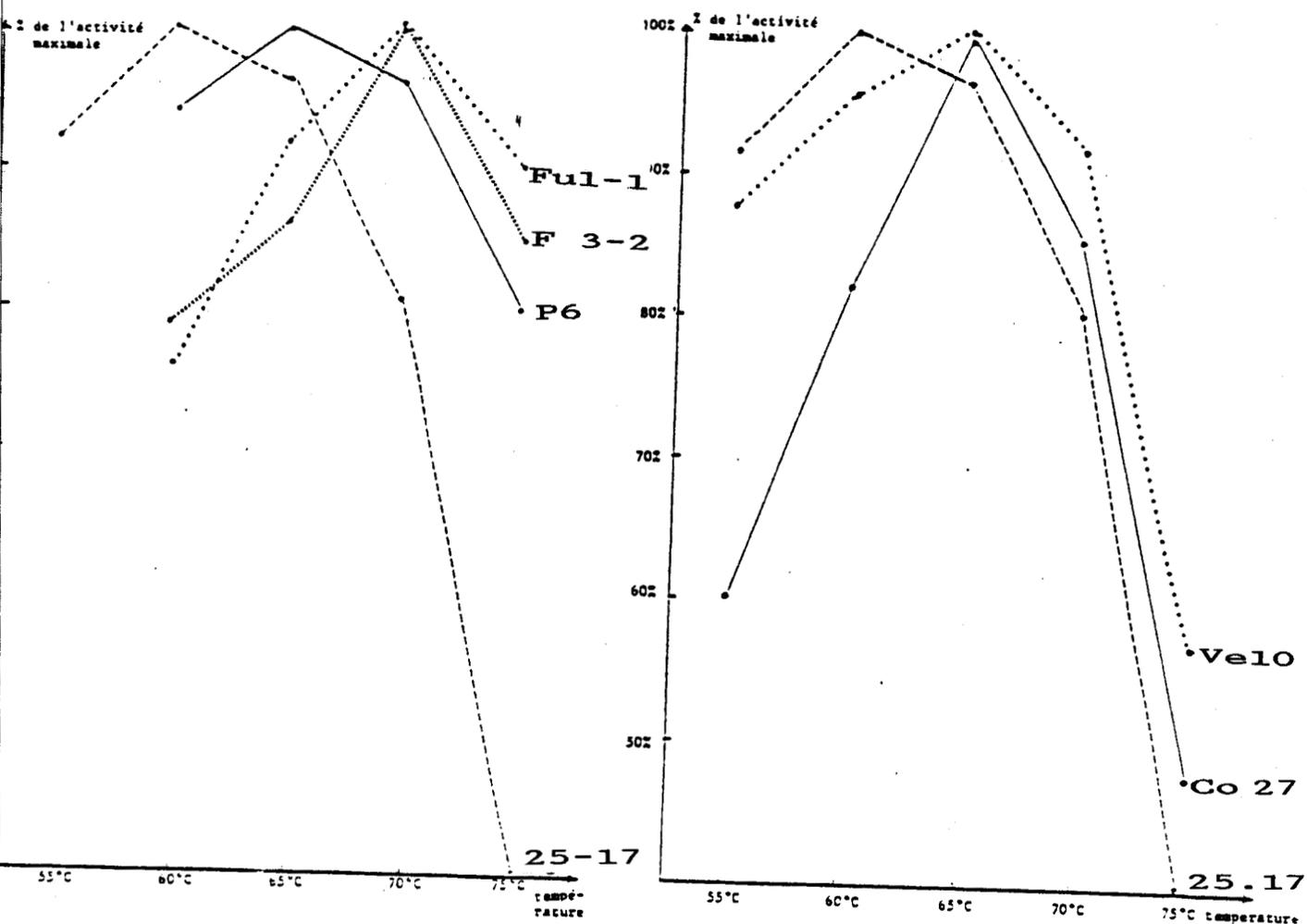
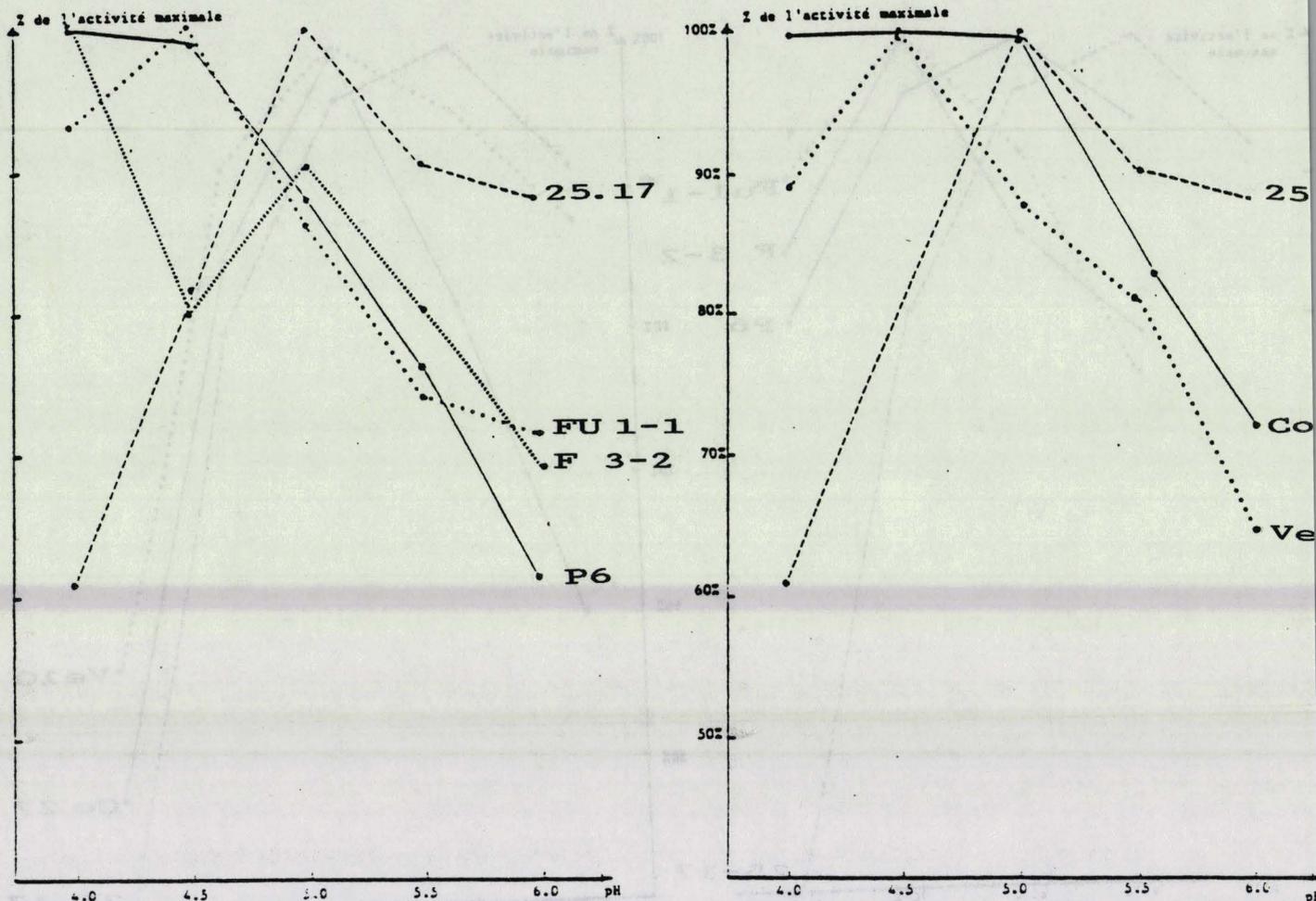


Fig. 11 Effet du pH sur l'activité amyloglucosidase des filtrats de culture des souches sélectionnées:



(Fogarty et Kelly, 1980). Seuls les enzymes de *Th. crustaceus* et de *A. gr. fumigatus* I sortent de ces limites (entre pH 4.0 et 4.5, ou moins).

Les pH optimum des α -glucosidases étant compris entre pH 3.0 et pH 6.0 pour les champignons filamenteux (Kelly et Fogarty, 1983), la présence d'une α -glucosidase n'est pas à exclure.

La courbe de l'activité enzymatique donnée par la souche F3-2 (*A. gr. fumigatus* I) montre, en plus de son optimum à pH 4.0, un deuxième optimum à pH 5.0. Ce résultat pourrait s'expliquer par la présence de plusieurs isoenzymes ayant des optimums de pH décalés, ou par l'existence des deux enzymes: amyloglucosidase et α -glucosidase. Cette hypothèse ne pourra être vérifiée qu'après purification des enzymes contenus dans le filtrat.

c) Conclusion:

Il n'existe qu'une concordance relative entre l'influence sur l'activité enzymatique des températures et pH d'incubation d'une part et la thermostabilité des enzymes d'autre part. En effet, on ne retrouve pas au niveau des optimum de température, le décalage très important constaté lors des mesures de demi-vie, entre les enzymes des souches thermophiles (*Th. crustaceus* et *Th. aurantiacus*) et ceux des souches du groupe *A. niger*.

Ceci confirme le fait qu'il s'agit de deux phénomènes différents. Les optimum de température et de pH sont des caractéristiques de cinétique enzymatique, tandis que la stabilité de l'enzyme vis-à-vis de la température et du pH est une caractéristique physico-chimique de la protéine enzymatique (Singleton et Amelunxen, 1973).

2. Autres données biologiques concernant les souches sélectionnées:

Diverses autres caractéristiques ont été définies et sont présentées dans le tableau 16, dans lequel nous avons rappelé les résultats de thermostabilité. Ces paramètres ont été étudiés pour les raisons suivantes.

1) L'intérêt d'une faible production de transglucosidase qui catalyse des réactions de réversion (déjà discuté dans le chapitre préliminaire).

2) La présence de polysaccharides, considérée comme gênante lors des étapes de filtration en production industrielle.

3) Le fait que certaines espèces fongiques ne supportent pas les conditions de culture en fermenteur (agitation et aération violentes).

4) La pathogénicité des espèces qui représente un facteur important étant données les contraintes législatives en vigueur et doit être déterminée avant tout choix définitif de souche.

Tab. 16: Autres caractéristiques des souches sélectionnées

	25-17 A.niger V.awamori muté	Ve 10 A.niger V.niger	Co 27 A.carbonarius	F 3-1 A.fumigatus type I	P6 Th.crustaceus	Fu 1-1 Th.aurantiacus
Thermostabilité 1/2 vie sans substrat 70°C pH 4,5	7 min	8 min	9 min	36 min	> 10 h (54%)	> 24 h (63%)
Production de A M dosée à 60°C UI/ml	23,10	9,25	2,00	0,15	0,11	0,11
Production relative de transglucosidase (TG) (10 ⁻³ UITG/UI A M)	0,5	1,4	0,3	51,7	3,5	193,0
Présence de Polysaccharides dans le filtrat de culture	-	-	-	-	-	+
Culture en fermenteur	+	+	+	+	+	+
Pathogénicité reconnu de l'espèce. Notion bibliographique	±	±	±	+	±	±

La lecture de ce tableau appelle quelques commentaires.

-Toutes les espèces sélectionnées présentent un taux de synthèse d'activité amyloglucosidase plus faible que la souche test 25-17. Mais cette souche est un mutant hyperproducteur, tandis que les autres souches sont sauvages, et un travail d'amélioration de la production par voie physiologique et génétique est envisageable.

-Les souches du groupe *A.niger* sélectionnées (Vel0 et Co27) ne présentent qu'une faible amélioration de la thermostabilité par rapport au 25-17, et les autres caractéristiques n'apportent aucun avantage supplémentaire.

L'*A.gr.fumigatus* I se singularise par une thermostabilité améliorée (d'un facteur 5), mais également par une production relative de transglucosidase importante (100 fois plus que le témoin) et une réputation de pathogénicité, bien qu'il ne soit qu'un pathogène opportuniste.

Le *Th.aurantiacus* présente deux désavantages majeurs: la présence de transglucosidase à un taux très élevé (production près de 400 fois supérieure à celle du témoin) et une synthèse de polysaccharides en culture agitée. Par contre, son activité amyloglucosidase est exceptionnellement thermostable (supérieure à 24 heures à pH 4.5 et à 70°C, sans substrat).

Le *Th.crustaceus* produit beaucoup moins de transglucosidase que le *Th.aurantiacus* et l'*A.gr.fumigatus* I et son enzyme amyloglucosidase possède une bonne thermostabilité (supérieure à 10 heures à 70°C et à pH 4.5, sans substrat).

3. Conclusion

La suite de l'expérimentation exigeant d'abondantes cultures, il était indispensable, pour des raisons techniques, de limiter ce travail à l'étude d'un nombre réduit de souches.

Les *Aspergillus* du groupe *niger*, ne procurant qu'un gain faible en thermostabilité de l'activité enzymatique étudiée, ont été écartés.

Le groupe des *A.fumigatus* souffre d'une réputation d'agent pathogène telle que l'appel à l'un de ces membres ne peut se justifier en regard de l'amélioration en thermostabilité obtenue.

Aussi avons nous décidé d'effectuer une approche plus précise des deux espèces de *Thermoascus*, souches les plus intéressantes suivant les critères retenus, afin de choisir celle qui subira les études plus approfondies.

Tableau 17 : Comparaison de quelques caractéristiques physiologiques, biologiques et enzymologiques des Thermoascus crustaceus et Th. aurantiacus

	Thermoascus crustaceus souche P6	Thermoascus aurantiacus souche Fu 1-1
<u>Caractères enzymatiques</u> (à 45°C de T° de croissance)		
Température optimale de l'enzyme A.AM	65°C < 70°C	65°C < 70°C
1/2 vie à 70°C pH 4.5 sans substrat avec substrat	>10h (54%) 48h	>24h (63%) >72h (69%)
Production absolue UI/ml de filtrat de culture	0,10	0,11
Production relative de Trans-glucosidase (TG) UITG/UIA.AM)	3,5	193
Activité spécifique UI A.AM/mg de protéine	10	3
<u>Physiologie de la production</u>		
Température de croissance minimum-maximum optimum	23°C < 35-37°C < 55°C	28°C < 45°C < 60°C
Production d'E.AM à 37°C Production d'E.AM à 45°C	+++ +	+ +++
Fermentation pilote en biolafitte de 2l	+	+
Production de polysaccharides en milieu d'isolement	0	+
<u>Biologie de l'organisme</u>		
Reproduction sexuée	+++	+++
Multiplication végétative	+++	+
Pathogénéicité reconnue	+	+

C.- DERNIERE ETAPE DE LA SELECTION ET DETERMINATION DE L'ACTIVITE AMYLOGUCOSIDASIQUE DES DEUX ESPECES DE THERMOASCUS

Une dernière comparaison des avantages et inconvénients des deux *Thermoascus* a été faite et une première analyse des différents enzymes amyloglucosidasiques présent dans les filtrats de culture a permis de compléter les connaissances de ces deux souches.

1. Choix final d'une souche:

Ce choix se fonde sur toutes les données obtenues au cours des deux premières étapes de la sélection et sur des caractéristiques biologiques et physiologiques particulières à ces deux espèces de *Thermoascus* (tableau 17).

Les caractéristiques propres au complexe enzymatique étudié sont favorables à l'enzyme du *Th.aurantiacus*. L'optimum de température d'activité et la thermostabilité, mise en évidence par le critère de demi-vie de l'enzyme, sont nettement supérieurs chez ce dernier. Par contre, les autres données tendent à favoriser le *Th.crustaceus*. La production absolue, pour une culture pratiquée à 45°C, est identique chez les deux souches, bien que cette température de croissance soit moins propice à la production d'enzyme que 37°C pour le *Th.crustaceus*. Une température de production de 37°C étant préférable industriellement, tant pour la régulation thermique que pour le coût énergétique, ce facteur favorise également le *Th.crustaceus*.

La production importante de transglucosidase, l'activité amyloglucosidasique spécifique faible et la présence de polysaccharides dans le filtrat de culture rendent le *Th.aurantiacus* moins intéressant du point de vue industriel que le *Th.crustaceus*.

Les différentes caractéristiques biologiques plaident également en faveur du *Th.crustaceus*.

Les deux souches présentent un cycle sexué d'obtention aisée. Par contre, seul le *Th.crustaceus* possède une phase de multiplication végétative nettement définie (conidies). Le *Th.aurantiacus* ne produit des aleurioconidies, solidaires du mycélium, qu'en très petit nombre.

Les conidies, spores génétiquement semblables car résultant de simples mitoses, constituent un matériel de travail de choix tant du point de vue génétique que physiologique. L'existence d'une phase de conidiogenèse facile à obtenir représente donc un avantage certain.

Les deux espèces ne sont pas réputées comme pathogènes bien que quelques publications relatent la présence du *Th.crustaceus* chez l'homme ou l'animal sans aucune preuve de sa pathogénicité même opportuniste (Pore et Larsh, 1967; Kwon-chung et al., 1984).

Des essais sur souris (alimentées par du mycélium séché), réalisés chez Roquette Frères (Lestrem), n'ont pu mettre en évidence une quelconque toxicité du *Th. crustaceus*.

A partir de ces diverses données, le choix de la souche définitive s'est fait en faveur du *Th. crustaceus* qui, bien que produisant un enzyme moins thermostable que celui du *Th. aurantiacus*, possède de nombreuses caractéristiques plus compatibles avec une production industrielle d'enzyme.

2. Mise en évidence des activités de type amyloglucosidasique produites par les deux *Thermoascus*

Les filtrats de culture des deux *Thermoascus* comprenant au moins un enzyme susceptible de libérer du glucose à partir de maltodextrine, il paraissait intéressant de savoir s'il s'agissait d'une amyloglucosidase, d'une α -glucosidase ou d'un complexe enzymatique comprenant les deux types d'enzymes.

Deux techniques décrites dans le chapitre préliminaire ont été utilisées; celle de Chiba et al. (1982) et celle de Kujawski et al (1980).

a) Technique de Chiba et collaborateurs (1982):

Ce procédé fait appel à la mise en évidence des anomères α et β du glucose par chromatographie en phase gazeuse (voir Annexe)

La figure 12 présente les enregistrements obtenus à partir des produits de la digestion du maltose par les différents filtrats de culture des deux *Thermoascus* et d'un témoin d'amyloglucosidase industrielle (AMG 200L, NOVO INDUSTRI).

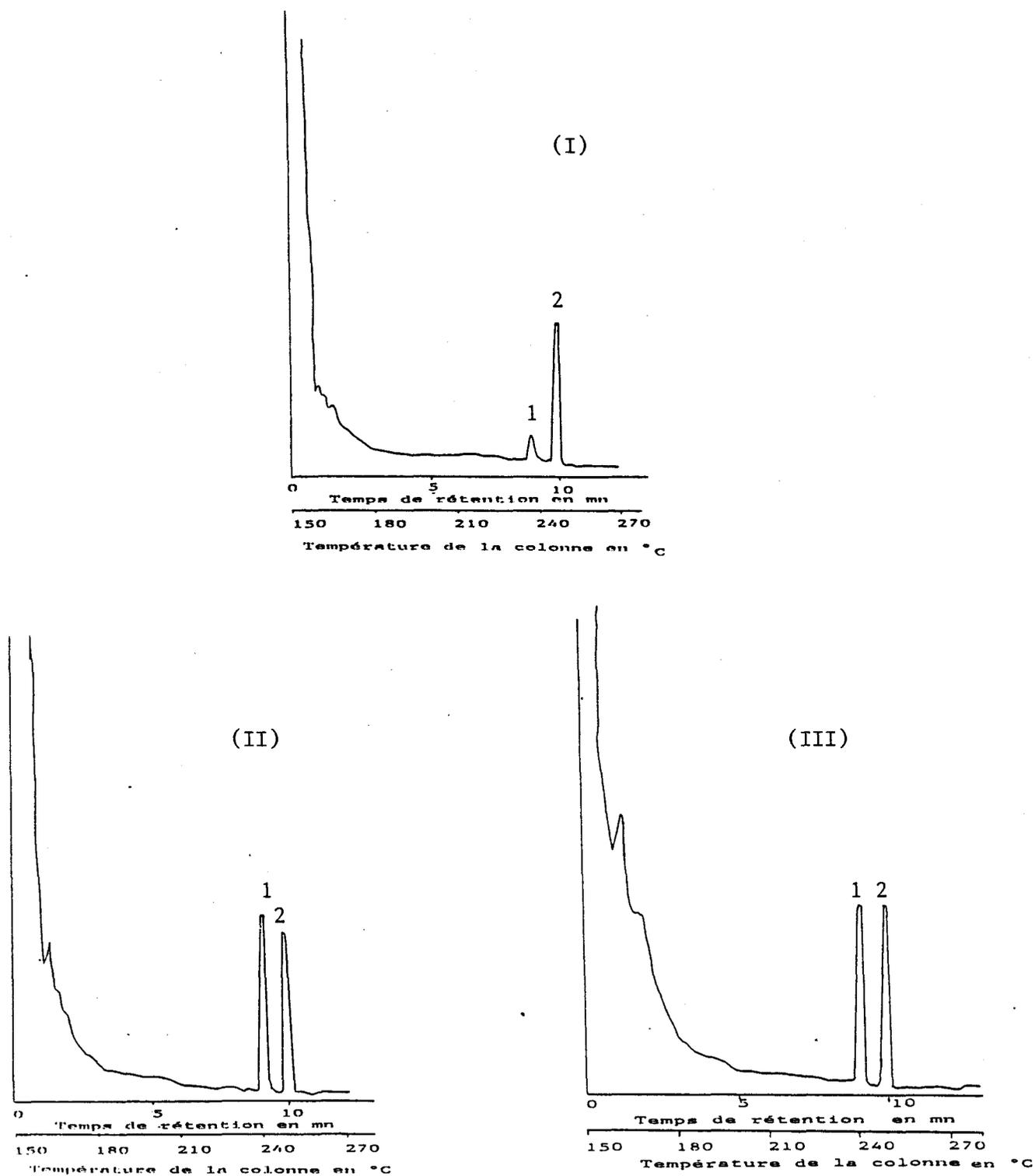
Les enregistrements mettent en évidence la présence d' α et de β glucose dans le milieu réactionnel des enzymes des deux *Thermoascus*. La technique n'entraînant qu'une mutarotation faible (de l'ordre de 3%, selon Chiba et al., 1983), le résultat indiquerait donc la présence et l'action simultanée d'un enzyme libérant de l' α -glucose (α glucosidase) et d'un enzyme libérant du β -glucose (amyloglucosidase) à partir du maltose.

La plus grande partie du glucose libéré par AMG 200L de NOVO INDUSTRI se trouve sous la configuration β indiquant la présence dominante d'une amyloglucosidase.

b) Technique de Kujawski et collaborateurs (1980):

Cette technique a été décrite dans le chapitre préliminaire. Si cette technique a été originellement conçue pour doser sélectivement l' α -glucosidase par rapport à l'amyloglucosidase, nous avons vu dans le chapitre préliminaire, que ce procédé s'appliquait aux seuls enzymes produits par les groupes des *A. niger* et *A. oryzae* (Yamasaki et al., 1980), les α -glucosidases

Fig. 12: Chromatographie en phase gazeuse des dérivés triméthylsilylés des produits de digestion du maltose par une amyloglucosidase industrielle (I), le complexe amyloglucosidasique du *Th.aurantiacus* (II) et du *Th.crustaceus* (III).



pic 1: α -D-glucose, pic 2: β -D-glucose.

Tab. 18: Mise en évidence des activités α -glucosidasique et amyloglucosidasique dans les filtrats de culture des deux *Thermoascus* étudiés.

		I	II	
Fu 1.1 (<i>Th.aurantiacus</i>)	Amidon soluble	200	7,4	(3,7%)
	Amidon soluble + Maltose	304	176	(77,9%)
P6 (<i>Th.crustaceus</i>)	Amidon soluble	431	22	(5,1%)
	Amidon soluble + Maltose	526	137	(26,0%)
A M G 200 L (<i>A.niger</i> -Amyloglucosidase NOVO INDUSTRI A/S)	Amidon soluble	513	240	(46,8%)
	Amidon soluble + Maltose	453	217	(47,9%)

résultats exprimés en μ Moles libérés par minute et par ml $\times 10^{-3}$

Condition I Dosages effectués à 60°C en présence d'amidon soluble 4% ou d'amidon soluble 4% + Maltose 0,4% dans un tampon acétate 0,2M pH 4,5

Condition II mêmes dosages effectués après une étape de chauffage à 70°C et pH 4,5
 - pendant 14 heures pour les deux *Thermoascus*
 - pendant 4 minutes pour l'amyloglucosidase industrielle.

de ces champignons ne dégradant l'amidon soluble que de manière très limitée. Néanmoins, l'utilisation de la technique permet de confirmer les résultats précédents et d'apporter quelques autres précisions sur les enzymes composant le complexe.

Les complexes amyloglucosidasiques des deux *Thermoascus* présentent une activité plus importante sur le substrat composé (amidon soluble + maltose) que sur l'amidon soluble seul. La présence d'une α -glucosidase est donc vérifiée. Par contre, l'AMG 200L (NOVO INDUSTRI AS) semble exclusivement composée d'amyloglucosidase (tableau 18).

L'étape de chauffage de l'enzyme (14 heures à 70°C et à pH 4.5, pour les deux *Thermoascus* et 4 min pH 4.5 pour l'AMG 200L) entraîne une nette diminution d'activité vis à vis de l'amidon soluble pour le complexe enzymatique des deux *Thermoascus*; par contre, cette diminution apparaît plus limitée dans le cas du substrat composé. Ces faits semblent indiquer que la thermostabilité du complexe enzymatique repose essentiellement sur une ou plusieurs α -glucosidases.

En conclusion, les techniques employées ont mis en évidence la présence concomitante d'au moins une α -glucosidase et une amyloglucosidase dans le filtrat de culture des *Thermoascus aurantiacus* et *Th. crustaceus*. De plus, la thermostabilité du complexe enzymatique semble reposer sur la seule fraction α -glucosidasique. Une purification des différentes enzymes présents serait désormais nécessaire pour confirmer et préciser les rôles respectifs de ceux-ci dans le complexe amyloglucosidasique.

Conclusion

Cette dernière étape nous a permis d'effectuer un choix entre les deux *Thermoascus* retenus à la suite des différentes phases de la sélection.

Le *Th. crustaceus*, bien que synthétisant un complexe amyloglucosidasique légèrement moins thermostable que celui du *Th. aurantiacus*, présente par contre de nombreux avantages tant d'ordre enzymatique que cultural ou biologique qui l'on fait préférer.

Les essais effectués en vue de déterminer la composition du complexe amyloglucosidasique du *Th. crustaceus* ont mis en évidence deux types d'enzyme à savoir au moins une amyloglucosidase et une α -glucosidase, la thermostabilité du complexe reposant sur le ou les α -glucosidases.

CONCLUSION DE LA SELECTION

846 souches fongiques issues de biotopes variés ont été testées en vue d'isoler des souches aptes à produire une activité amyloglucosidasique à thermostabilité améliorée.

Les différentes phases de la sélection, fondée sur l'étude de la thermostabilité de l'enzyme produit d'une part et sur différentes caractéristiques enzymologiques, physiologiques et biologiques des souches retenues d'autre part, ont abouti à la sélection d'une souche: le *Thermoascus crustaceus*. Ce champignon thermophile est un ascomycète de la famille des *Thermoascaceae* qui possède une conidiogenèse bien développée, tout aussi aisée à obtenir que la phase sexuée.

Une première étude du complexe amyloglucosidasique a permis de déterminer la présence d'au moins une α -glucosidase et une amyloglucosidase; la thermostabilité du complexe semble reposer sur l' α -glucosidase.

Nous nous proposons dans la partie suivante de ce chapitre de décrire le *Thermoascus crustaceus* et de résumer les données bibliographiques le concernant.

III.-THERMOASCUS CRUSTACEUS

A.-HISTORIQUE, POSITION SYSTEMATIQUE ET BIBLIOGRAPHIE DU GENRE THERMOASCUS

Le genre *Thermoascus* a été décrit pour la première fois par Miehe (1907) en prenant comme espèce-type du genre le *Thermoascus aurantiacus* Miehe (champignon à cléistothécies et à stade conidien réduit à des conidies du type aleurioconidies).

Sopp (1912) isole un champignon proche du *Thermoascus aurantiacus* Miehe et crée le genre *Dactylomyces* représenté par le *Dactylomyces thermophile* Sopp (champignon thermophile à cléistothécies et à phase conidienne de type *Polypaecilium*).

En 1964, Apinis et Chesters (Apinis et Chester, 1964) décrivent une espèce de *Dactylomyces* différente du *Dactylomyces thermophile* Sopp et la nomment *Dactylomyces crustaceus* (champignon thermophile à cléistothécies et à stade conidien du type *Paecilomyces*).

Cooney et Emerson dans "Thermophilic fungi" (1964) décrivent un isolat de *Thermoascus aurantiacus* possédant une phase conidienne de type *Paecilomyces*.

Stolk (1965) réunit les *Dactylomyces* et les *Thermoascus* en un seul genre le genre *Thermoascus* et critique la détermination de Cooney et Emerson (1964) en classant leur *Thermoascus* dans l'espèce *Th. crustaceus* de Apinis et Chester (1964).

Apinis, en 1967, dénonce la réunion des deux genres en un seul et préconise de garder les deux genres sur la base des formes conidiennes différentes.

Von Arx (1970) et Samson (1974), en accord avec la classification de Stolk (1965) contestent le maintien des genres et les réunissent en un seul, les stades sexués des trois espèces étant identiques.

Actuellement, l'appellation *Thermoascus* pour les trois espèces est unanimement acceptée. On utilise les caractéristiques du stade asexué pour la détermination spécifique.

Récemment, Ueda et Udagawa (1983) ont créé une nouvelle espèce de *Thermoascus*; le *Thermoascus aegypticus* isolé de vases marines du canal de Suez. Ce *Thermoascus* serait différent des autres isolats car il possède une phase conidienne de type *Paecilomyces* et des ascospores à ornementation verruqueuse, différentes des ascospores de *Th. crustaceus*. Kwon Chung et collaborateurs (1984) contestent cette création, estimant qu'il s'agit d'un *Th. crustaceus* identique à leurs isolats. D'après ces auteurs, la différence minime de l'ornementation des ascospores n'est pas suffisante pour la création d'une nouvelle espèce.

Le genre *Thermoascus* a été décrit par différents auteurs: Stolk (1965), Apinis (1967) et Subramanian et collaborateurs (1980).

Ce genre est caractérisé par son stade sexué constitué de cléistothécies (ascocarpes non ostiolés). Ces cléistothécies sont situées en superficie des cultures, de teintes allant du crème au marron en passant par une gamme d'orange jaune. Elles sont de petites tailles (de 250 à 660 μm parfois décrit jusqu'à 1,5 mm) isolées ou confluentes.

Le peridium est constitué de cellules pseudoparenchymateuses, de grande taille pour la couche externe et de taille plus petite pour la couche interne.

Les asques sont formés dans de petits amas cellulaires et sont entourés dans un peridium d'épaisseur irrégulière. Ils sont sphériques à ovales, toujours à huit ascospores.

Les ascospores sont hyalines ou jaunes claires, unicellulaires, de forme ovale à ellipsoïde.

Le mycélium est constitué d'hyphes hyalins, septés, ramifiés. Il peut être étroit (1,5 à 3 μm) ou large (jusqu'à 20 μm).

Un exsudat peut être présent, selon les conditions culturelles, sous forme de gouttelettes jaunes dorées à la surface de la culture.

La position systématique des *Thermoascus* (selon Ainsworth, 1973) est définie comme suit:

Ascomycotina
Classe des Plectomycètes
Ordre des Eurotiales
Familles des Thermoascaceae Apinis
Genre *Thermoascus* Miehle (ex *Dactylomyces* Sopp)

La classification du genre *Thermoascus*, comportant trois espèces, est la suivante: (d'après Stolk, 1965; Apinis, 1967; Sanson, 1974; Ueda et Udagawa, 1983; Kwong Chung et al., 1984)

Th.aurantiacus (planche I-a): phase conidienne constituée de conidies holoblastiques, type aleurioconidies, situées en fin de branches hyphales, seules ou en noeud de deux ou trois, en forme de massue à presque arrondies, lisses, à paroi étroite et de taille allant jusqu'à 20 x 8 μm .

Une variété *levisporus* a été créée par Upadhyah et collaborateurs (1984) basé sur des caractéristiques différentes des ascospores et du peridium.

Th.crustaceus (planche I-c): Caractérisé par une phase conidienne du type *Paecilomyces* (conidies phialidiques). Les conidies sont de forme ovale à elliptique, de taille: 6 à 10 μm x 3 à 6 μm .

Th.thermophilus (planche I-b): possède un stade asexué de type *Polypaecilium* (conidies annellidiques) constitué par des conidiophores branchés de façon dichotonique, terminé par plusieurs paires de phialides produisant de nombreuses conidies en chaînes qui adhèrent en colonnes.

Th.aurantiacus est l'espèce la plus étudiée du genre *Thermoascus*. Ses besoins nutritionnels de croissance ont été abordés par Obert (1978-1979) et par Subrahmanyam (1980). Différents auteurs donnent également quelques indications sur des productions d'enzymes par le *Th.aurantiacus*. Des xylanases, cellulases, α -glucosidases, β -glucosidases, protéases neutres, DNAses, lipases, RNAses, pectate lyases, uréases ont été décrites (Adams et Deploey, 1978; Tong et al., 1980; Obert, 1980-1981; Obert, 1983-1984; Marcy et al., 1984; Bedino et al., 1986; Grajek, 1986; Grajek, 1987; Kawamori et al., 1987; Tan et al., 1987; Yu et al., 1987). Parmi ces enzymes cités, certains sont considérés comme thermostables, tels la xylanase, un complexe cellulolytique, des cellulases, une α -glucosidase intracellulaire, une protéase neutre (Tong et al., 1980; Obert, 1980-1981; Marcy et al., 1984; Grajek, 1986; Grajek, 1987; Kawamori et al., 1987; Tan et al., 1987; Yu et al., 1987).

Aucune indication sur des productions d'enzymes par les *Th.crustaceus* et *Th.thermophilus* n'a pu être recueillie.

Deux articles provenant de la bibliographie non médicale, décrivent des *Th.crustaceus* isolés de sources animale (souris) et humaine (homme atteint d'une infection pulmonaire et des monocytes en culture de patients atteints du Sida) (Pore et Larsh, 1967; Kwon chung et al., 1984), sans preuve de leur pathogénicité.

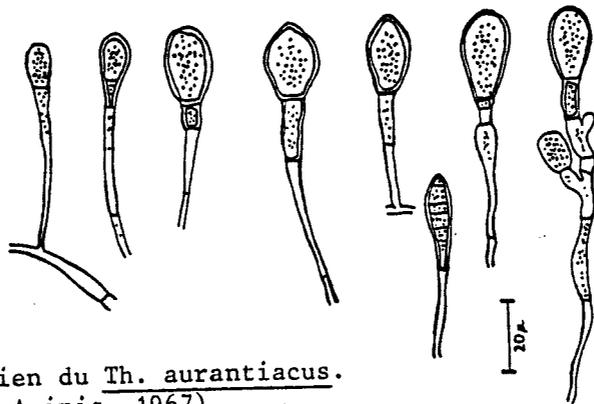
B.- THERMOASCUS CRUSTACEUS (SOUCHE P6): DESCRIPTION ET CONTRIBUTION AU DETERMINISME DES PHASES SEXUEE ET ASEXUEE

Le *Th.crustaceus* (Apinis et Chester, 1964) possède les caractéristiques des *Thermoascus* citées précédemment. Il se différencie des autres champignons par sa conidiogénèse, l'ornementation de ses ascospores et ses températures de croissance.

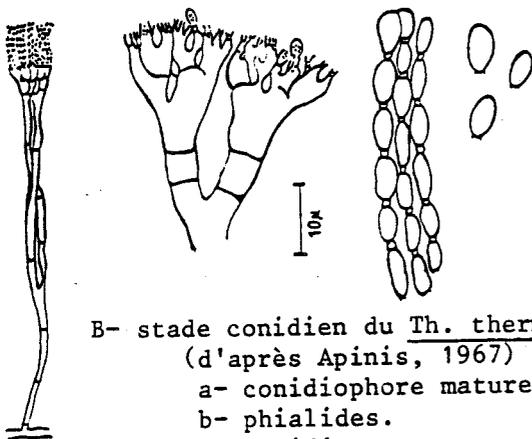
La conidiogénèse est de type *Paecilomyces*, genre proche des *Penicillium*, qui se caractérise principalement par des pinceaux de conidies moins ordonnés que chez les *Penicillium*, et par des phialides allongées ayant une base enflée et un apex effilé (planche I-C).

Les ascospores de *Th.crustaceus* sont fortement ornementées de taille (6,5 à 8 μm X 3,5 à 5 μm) plus grande que celles du *Thermoascus aurantiacus* (5 à 7 μm X 3,5 à 5 μm) et de taille équivalente à celles du *Th.thermophilus* (5,5 à 8 μm X 3,5 à 6 μm).

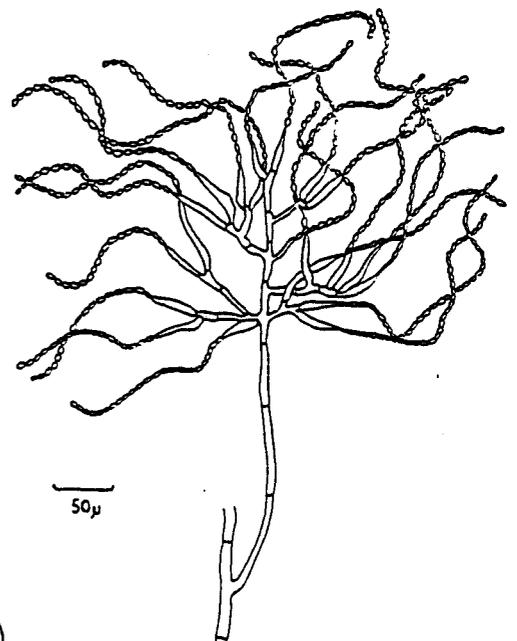
PLANCHE I: Les différents stades conidiens du genre Thermoascus.



A- Stade conidien du Th. aurantiacus.
(d'après Apinis, 1967)



B- stade conidien du Th. thermophile.
(d'après Apinis, 1967)
a- conidiophore mature.
b- phialides.
c- conidies.



C- Stade conidien du Th. crustaceus.
(d'après Stolk, 1965)
a- conidiophore mature.
b- phialides.

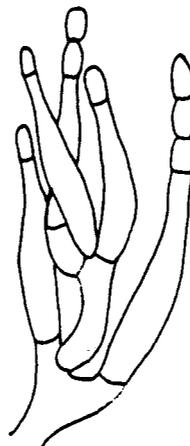
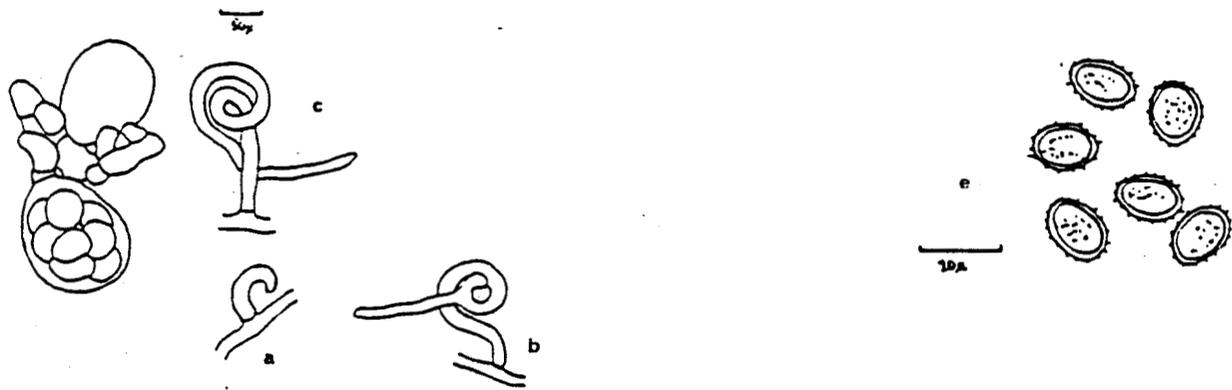


PLANCHE II: Stade sexué du Thermoascus crustaceus.
d'après Stolk (1965)

- a-b-c: Début de formation des ascocarpes.
d: Différents stades de développement de l'asque.
e: ascospores.



Ueda et Udagawa (1983) ont comparé les températures de croissance, d'apparition des ascocarpes et de la conidiogénèse des *Th. crustaceus* et *Th. thermophilus* à celles de leur *Thermoascus "aegyptacus"*. Ainsi le *Th. crustaceus* croît entre 25°C et 50°C, produit de nombreux ascocarpes entre 25°C et 40°C et une conidiogénèse modérée entre 35°C et 45°C. Néanmoins, Kwong Chung et collaborateurs (1984) publient une photographie d'un stade conidien réduit de *Th. crustaceus* obtenu à 25°C.

1. Description de la souche P6:

La souche P6, isolée au laboratoire, provient d'un échantillon de terre du Pérou (jardin municipal de Lima).

En culture à 37°C, sur milieu Malt-Agar, en boîte de Petri, la croissance est rapide, atteint un diamètre de 9cm en 3 jours.

A cet âge, le mycélium est crème et floconneux, présentant des petits agrégats très nombreux. Ces agrégats changent de couleur dès 4 jours de culture, passant de l'orange clair au rouge orangé, et présentent des petites gouttelettes dorées d'exsudat. Après 6 jours de croissance, le milieu gélosé commence à prendre la teinte de l'exudat.

L'observation au microscope permet d'associer la période où le mycélium est crème et floconneux au stade conidien (planche I-C) et celle où les agrégats se colorent au stade de formations des asques et des ascospores (planche II-d-c).

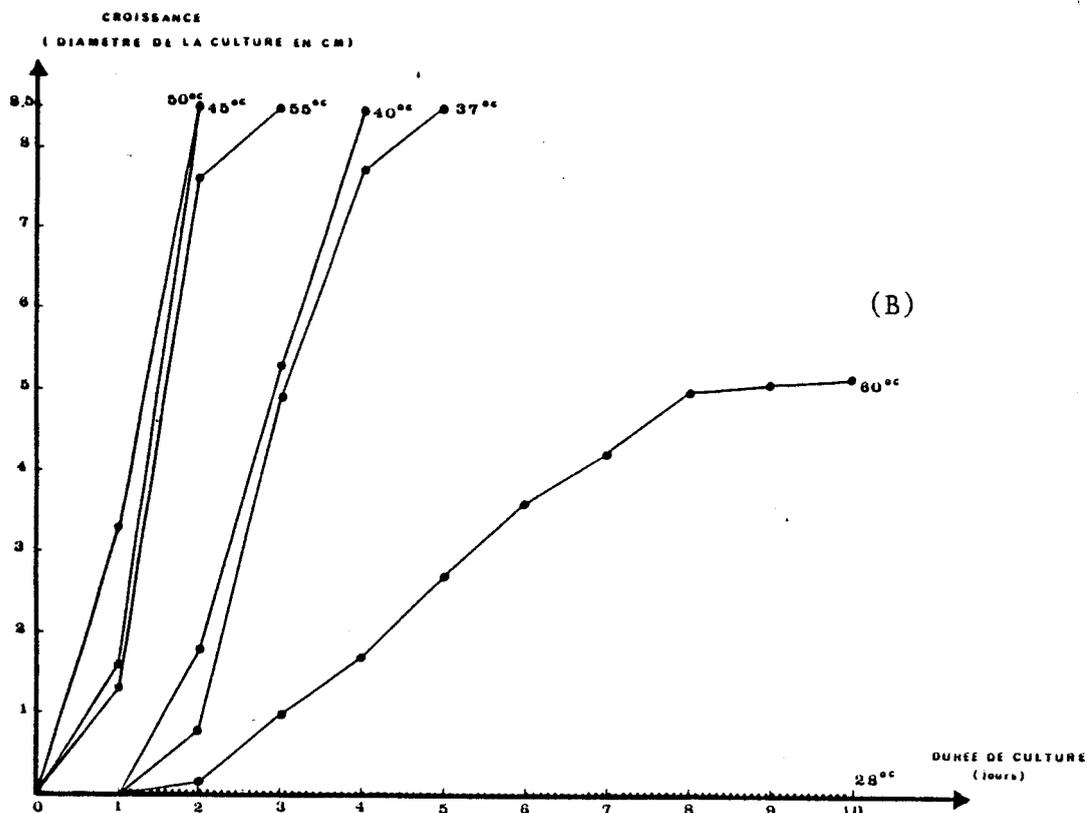
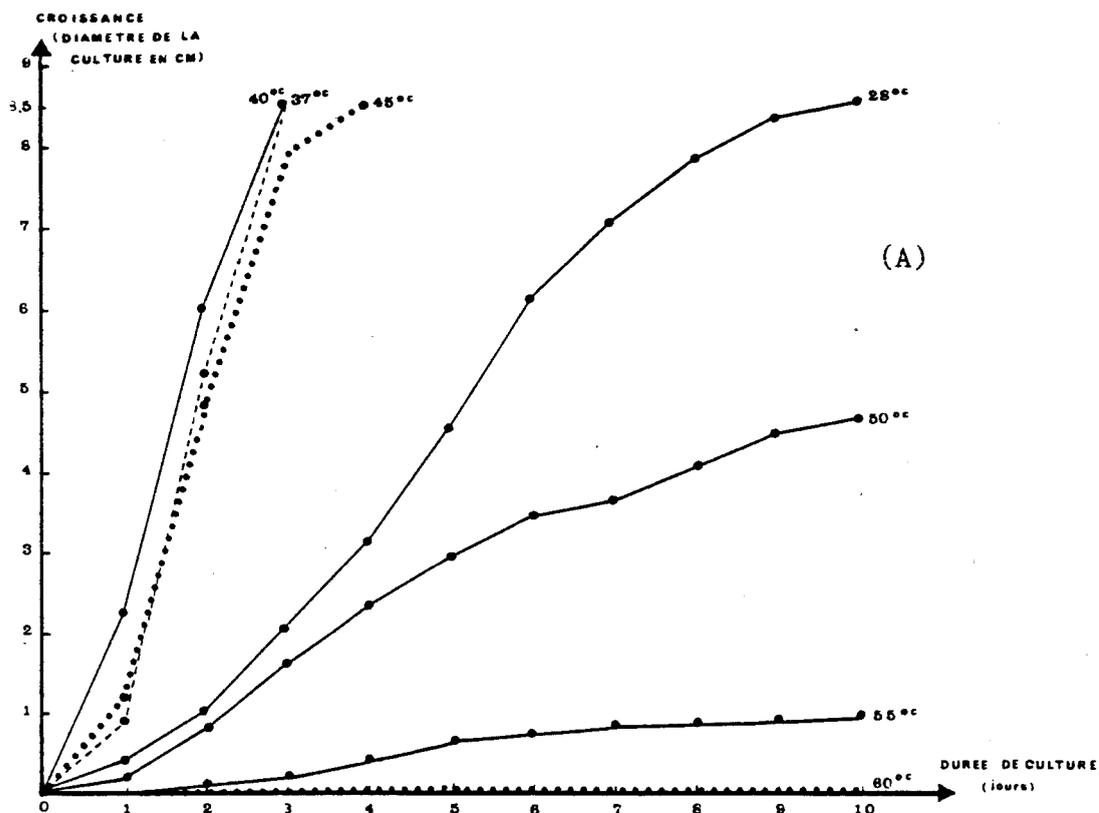
La croissance de la souche P6 (contrôlée par la mesure du diamètre de la culture sur boîte de Petri en milieu Malt-Agar provenant d'un explantat de conidies) a été suivie à différentes températures parallèlement à la croissance d'un *Th. aurantiacus* (souche Ful-1) isolé au laboratoire à partir de fumier pasteurisé à la champignonnière de La Gonthière (Wervicq-sud, Nord): figure 13.

La température permettant la croissance optimale du *Th. crustaceus* souche P6 est située entre 37°C et 45°C, pour le *Th. aurantiacus* souche Ful-1 cette température est située entre 34°C et 50°C. Il existe une différence de l'ordre de 10°C entre les optimums de température de ces espèces. Ces températures de croissance sont celles décrites dans la littérature pour ces deux espèces (Ueda et Udagawa, 1983; Subrahmanyam, 1980; Upadhyah et al., 1984).

2. Déterminisme des phases sexuée et asexuée:

Les champignons peuvent se multiplier selon deux modes: un mode asexué passant par l'intermédiaire de spores issues de la mitose (conidies, sporangiospores...) et un mode sexué s'achevant par une méiose aboutissant à des spores méiotiques (ascospores, basidiospores...). Une même espèce peut présenter ces deux modes de reproduction, ou ne présenter que l'une ou l'autre des formes,

Fig. 13: Courbes de croissance selon la température d'incubation de *Thermoascus crustaceus* (A) et de *Thermoascus aurantiacus* (B).



le déterminisme de la présence ou de l'absence d'une des formes pouvant être lié aux conditions culturales.

Le *Th. crustaceus*, comme décrit précédemment, possède les deux phases de reproduction. La possibilité de contrôler l'obtention de l'une ou l'autre forme présente un intérêt considérable pour les études physiologiques, métaboliques et génétiques. En effet, pour ces différentes études, il est nécessaire de pouvoir travailler dans des conditions les plus standardisées possibles et donc d'éliminer les variations inhérentes au matériel de base: le champignon. Dans la cas présent, le travail sur conidies semble le moins inducteur de variations, car ces spores proviennent de mitoses et non de méïoses.

La souche P6, comme les différents *Th. crustaceus* décrits dans la bibliographie (Cooney et Emerson, 1964; Stolk, 1965), présente à 37°C, sur milieu Malt-Agar, la succession des deux phases, le stade conidien fugace précédant le stade sexué. La conidiogénèse semble donc difficile à isoler de la phase ascogoniale.

Les travaux de Ueda et Udagawa (1983) pour trois souches de *Thermoascus* sur l'effet de la température, et de A. Subrahmanyam (1980) pour le *Th. aurantiacus* sur le rôle des sources de carbone et d'azote, ont orienté nos travaux pour le contrôle des stades de la reproduction.

a) Effets de la température et du milieu de culture sur les phases de reproduction du *Th. crustaceus* (P6):

Trois températures de croissance ont été étudiées: 28°C, 37°C, 45°C (températures citées en partie par S. Ueda et S. Udagawa, 1983).

ainsi que trois milieux de culture:

-milieu Malt-Agar 15 g de Malt

15 g de gélose Biokar E

q.s.p. 1000 ml d'eau

distillée

-milieu d'isolement, décrit An.I, gélosé (15 g gélose Biokar/ litre), C/N= 35.

-milieu Sp. Th (sporulation *Thermoascus*)

KH ₂ PO ₄	1,6	g
Ca(H ₂ PO ₄) ₂ , 2H ₂ O.....	0,2	g
MgSO ₄ , 7H ₂ O.....	0,5	g
MnSO ₄ , 5H ₂ O.....	0,02	g
ZnSO ₄ , 7H ₂ O.....	0,02	g
CuSO ₄ , 5H ₂ O.....	0,01	g
Glucose anhydre.....	25,00	g
Urée.....	6,00	g
Eau distillée.....	q.s.p. 1000	ml
Gélose Biokar type E.....	15,00	g
pH.....	5,8	
C/N=	4	

Ce milieu a été mis au point en modifiant les sources de carbone et d'azote du milieu d'isolement, d'après les résultats

de A. Subrahmanyam (1980) sur le *Thermoascus aurantiacus*.

Toutes les expériences ont été menées à l'obscurité, les cultures étant suivies jusqu'à 9 jours de développement.

A 45°C, les 3 milieux présentent uniquement la phase conidienne du *Th. crustaceus*

A 37°C, sur milieu Malt-Agar et sur milieu d'isolement, les deux phases se succèdent: la phase conidienne sur le mycélium jeune suivie par l'apparition des ascocarpes. Sur le milieu Sp.Th, on observe une conidiogénèse sur les tissus jeunes, suivie par des structures de même aspect que les cléistothécies mais ne comportant pas d'asques.

A 28°C, en 9 jours de culture aucune croissance sur le milieu Sp.Th n'est obtenue, tandis que sur les milieux d'isolement et Malt-Agar seule la phase sexuée a été observée.

Ces observations rejoignent celles de Ueda et Udagawa (1983). Kwong-Chung et collaborateurs (1984) signalent par contre quelques rares appareils conidiens pour une température de culture de 28°C.

Il est apparemment possible de sélectionner l'une ou l'autre des phases de la reproduction en faisant varier la température de croissance. Mais il semblerait, d'après le comportement du *Th. crustaceus* sur le milieu Sp.Th, que l'on puisse inhiber la reproduction sexuée en modifiant les différents constituants du milieu.

b) Variation des sources de Carbone et d'Azote, et du taux d'Azote du milieu de culture sur le déterminisme des phases de reproduction du *Th. crustaceus* (souche P6):

Une deuxième étude a été réalisée en faisant varier la source de carbone (glucose ou maltodextrine type MDO2; taux de carbone: 10 g/l), la source d'azote (urée ou nitrate d'ammonium) et le taux d'azote (0,3g/l d'où un C/N = 35, ou 2,8g/l d'où un C/N = 4) en association avec la solution minérale utilisée dans le milieu Sp.Th, pour un pH de 5,8.

L'étude a été menée à 37°C, température permettant sur les milieux Malt-Agar et d'isolement la succession des 2 phases.

Le tableau 19 récapitule les résultats obtenus pour les différents cas étudiés.

On n'observe qu'assez peu de variations dans la conidiogénèse. Le nitrate d'ammonium (NH_4NO_3), quand il est apporté en petite quantité (N = 0,3g/l), induit une conidiogénèse réduite par rapport à celle provoquée par l'urée. En quantité importante (N = 2,8g/l), il permet une conidiogénèse aussi abondante que l'urée et plus précoce (après 3 jours au lieu de 4 jours pour l'urée).

Tab. 19: Obtention des formes asexuée et sexuée du Th. crustaceus souche P6 en fonction du taux d'azote dans le milieu et des sources d'azote et de carbone utilisées.

CONIDIOGENESE		ASCOCARPES		ASQUES		ASCOSPORES	
Taux	Source	Source de	qualité	date	Présence	ou absence	date
d'azote	d'azote	carbone	d'apparition	Présence	Présence	Présence	d'apparition
g/l	10g/l de C	jour	+ / 0	jour	+ / 0	jour	+ / 0
0,3	Urée	Maltodextrine	abondante	3	+	4	5
0,3	NH ₄ N O ₃	Maltodextrine	abondante	3	+	4	7b
0,3	Urée	Glucose	abondante	3	+	4	4
0,3	NH ₄ N O ₃	Glucose	abondante	3	+	5	7
2,8	Urée	Maltodextrine	abondante	4	+	5	7
2,8	NH ₄ N O ₃	Maltodextrine	abondante	4	+	5	14a
2,8	Urée	Glucose	abondante	4	+	10*	14a
2,8	NH ₄ N O ₃	Glucose	abondante	4	+	14a	14a
2,8	NH ₄ N O ₃	Glucose	abondante	3	+	22*	22a
0,3	Urée	Maltodextrine	abondante	3	+	4	5

a: date de dernière observation

b: présence d'un exudat abondant

c: tissu superficiel d'aspect proche des ascocarpes

*: stérile

L'obtention du stade sexué, quant à lui, est lié au taux d'azote apporté. Un apport de 0,3g/l d'azote permet, dans tous les cas, l'observation d'une phase sexuée complète. De plus, l'urée semble accélérer le processus (ascospores obtenues en 4 et 5 jours pour l'urée et en 7 jours pour le nitrate d'ammonium).

Un taux de 2,8g/l d'azote ne permet l'obtention d'ascospores que pour l'association urée-maltodextrine. Les autres associations n'entraînent que des ascocarpes stériles ou encore des stroma stériles, en superficie de la culture.

Il est donc possible d'inhiber la reproduction sexuée par un taux important d'azote dans le milieu de culture et donc pour un C/N bas.

Des observations similaires ont été faites par Dehorter (1985) sur le *Nectria galligena*, par Vidal et collaborateurs (1975) sur le *Leptoshaeria typhae* et par de nombreux autres auteurs.

C) Conclusion:

Cette courte étude a permis de mettre en évidence les conditions d'obtention de l'une ou l'autre des phases du cycle biologique du *Th. crustaceus* (P6).

L'obtention de la phase conidienne de multiplication s'obtient grâce à une culture pratiquée à 45°C; le milieu utilisé n'intervenant qu'au niveau de la production plus ou moins élevée de spores. A cet égard, le milieu conseillé par Marcy et collaborateurs (1984) : Malt 20g/l, peptones 1g/l, glucose 20g/l, s'est révélé comme aussi performant que le milieu SpTh (N=2,28; NH₄NO₃) pour la réalisation des inoculum de la souche.

La reproduction sexuée semble liée au taux d'azote du milieu de culture. Un apport de 0,3 g/l (sous forme d'urée ou de nitrate) permettant d'obtenir la phase sexuée à 28°C ou 37°C.

Finalement, à 37°C, les deux phases, conidiogénèse et reproduction sexuée (dans les conditions de milieu l'autorisant) se succèdent.

Des études plus précises seraient nécessaires afin de mieux appréhender les mécanismes intervenant dans le déterminisme de ces différentes phases ainsi que les conditions de leur obtention. Ce type d'étude, comme celui lié à l'absence de croissance à une température inférieure à 20°C est rarement abordé chez ce type d'organisme. Elles permettraient cependant une approche intéressante des champignons thermophiles, approche facilitée par la rapidité d'obtention d'un cycle biologique complet.

IV CONCLUSION DU CHAPITRE

La sélection que nous avons opérée en vue d'obtenir de nouveaux producteurs d'amyloglucosidase à thermostabilité améliorée nous a permis d'isoler un certain nombre de souches présentant ce caractère.

Cette voie d'obtention a été choisie parmi celles proposées par les auteurs pour son accessibilité aisée, certains champignons filamenteux présentant des caractères proches à ceux requis ayant déjà été décrits. Les données bibliographiques concernant les souches productrices ont orienté nos recherches vers les champignons thermophiles ou thermotolérants sans négliger toutefois les souches mésophiles; l'hypothèse selon laquelle les souches thermophiles produisent des enzymes plus thermostables restant à vérifier dans notre cas.

Parmi les 846 souches isolées, six espèces (un *Aspergillus* du groupe *fumigatus*, *Th. crustaceus*, *Th. aurantiacus*, *A. carbonarius*, *A. niger* v. *niger*, *P. ser. restricta*) possèdent un complexe amyloglucosidasique à thermostabilité améliorée par rapport à l'enzyme industriel. Seuls les trois premiers cités sont thermotolérants, confortant l'idée que des souches mésophiles puissent également produire des enzymes thermostables. Il convient néanmoins de remarquer que les complexes amyloglucosidasiques de l'A. du groupe *fumigatus* et des deux *Thermoascus* se sont avérés être nettement plus thermostables que ce soit en présence ou l'absence de substrat.

Les différentes analyses envisagées afin de limiter notre choix à un seul organisme nous ont permis d'éliminer les A. du groupe *niger* (au vu de leur faible amélioration de thermostabilité), les A. du groupe *fumigatus* (pour leur caractère de pathogénicité éventuel), les *Penicillium* de la série *restricta* (leur trop faible production ne permettant pas une évaluation correcte de la thermostabilité). Le *Th. crustaceus* et le *Th. aurantiacus* ont été soumis à une étude plus fine de leurs caractéristiques tant enzymatiques que biologiques. Des caractéristiques impropres à une utilisation industrielle telles que une production élevée de transglucosidase, une activité spécifique faible, la présence de polysaccharides dans le filtrat de culture et une température de croissance de 45°C ont écarté le *Th. aurantiacus* de notre choix final. La présence d'une phase de multiplication asexuée d'obtention aisée chez le *Th. crustaceus* a également plaidé en sa faveur. Ce dernier possède de plus un cycle sexué, propriété rare chez les souches utilisées en industrie et qui permet à plus long terme d'envisager des croisements par cette voie.

Une étude rapide du complexe amyloglucosidasique du *Th. crustaceus* a mis en évidence la présence concomitante d'au moins une α -glucosidase et d'une amyloglucosidase (phénomène par ailleurs souvent cité par les auteurs), la thermostabilité du complexe semblant reposer sur la ou les α -glucosidases.

Le *Thermoascus crustaceus* ne bénéficie que d'une bibliographie limitée (si l'on exclut les travaux à vocation de systématique) par rapport au *Th. aurantiacus* qui a été à l'origine d'études très complètes sur ses besoins nutritionnels ou ses productions enzymatiques.

L'analyse préliminaire des conditions d'obtention de la conidiogénèse et du cycle sexué a pu être effectuée. Les deux phases peuvent être obtenues indépendamment l'une de l'autre, la température et le taux d'azote du milieu jouant un rôle primordial dans l'obtention de ces deux modes de sporogénèse. Il sera donc possible de disposer de conidies, issues de seules mitoses, pour les manipulations ultérieures.

Le *Thermoascus crustaceus*, même s'il possède un complexe amyloglucosidasique nettement plus thermostable que les enzymes proposés par les *Aspergillus* du groupe *niger*, n'est pas encore un organisme propre à une expérience industrielle. En effet, il apparaît encore limité par une production très faible d'enzyme.

L'amélioration quantitative de cette production a été retenue comme premier point pour la suite de l'étude. Ce travail a été subdivisé en deux parties: amélioration par voie physiologique et génétique. La première voie de recherche a été envisagée au sein du laboratoire de Cryptogamie par B. Bacle (1988). Nous avons parallèlement envisagée l'amélioration génétique de production d'enzymes amyloglucosidasiques par le *Th. crustaceus* (P6).

La littérature canadienne ne bénéficie pas d'une bibliographie limitée (et l'on exclut les travaux à vocation de systématique) par rapport au Canada qui a été à l'origine d'études très complètes sur ses productions artistiques.

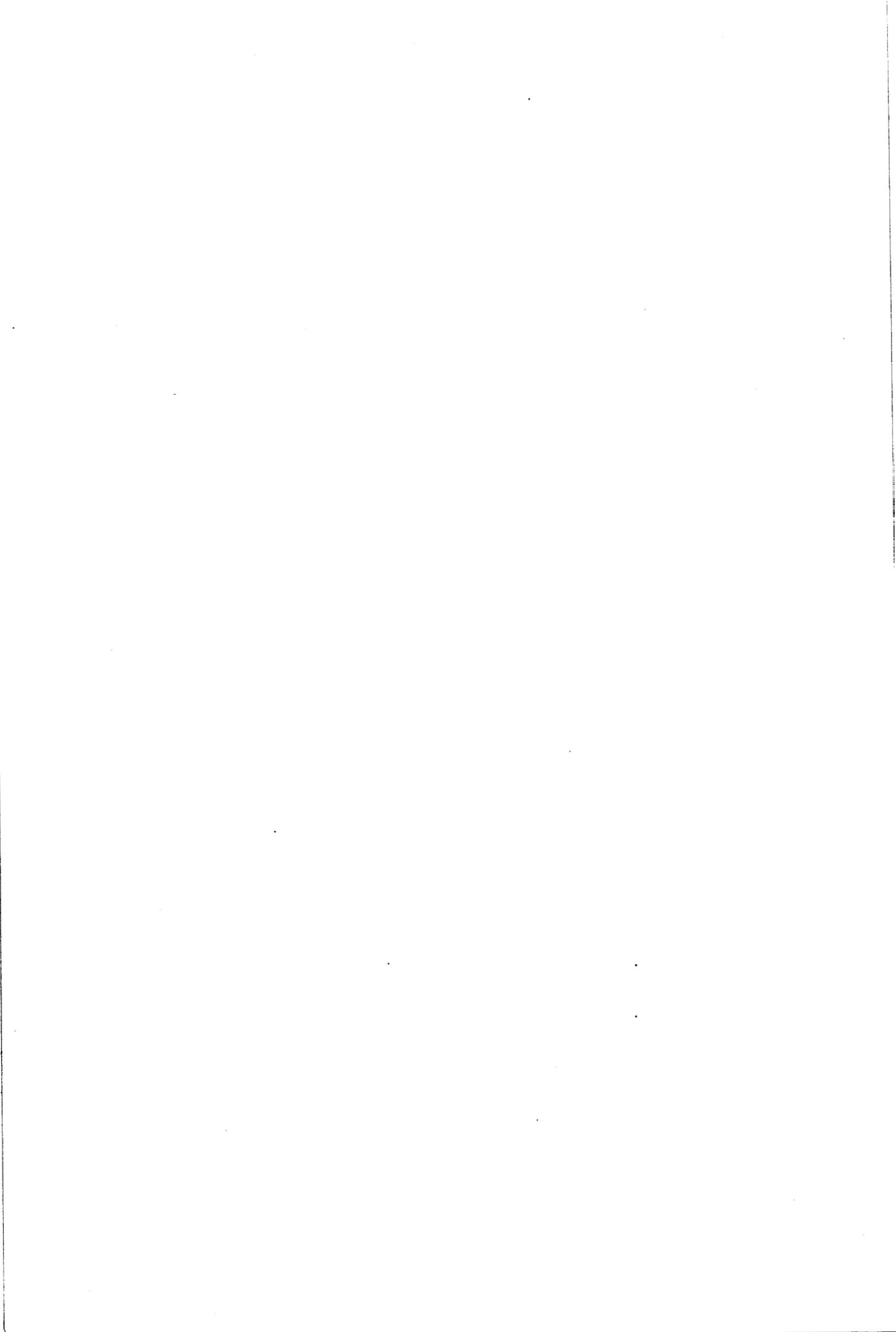
L'analyse préliminaire des conditions d'obtention de la conditionnée et de celle soumise à ce type d'effets. Les deux phrases peuvent être obtenues indépendamment l'une de l'autre, la conditionnée et le taux d'erreur de cette phrase sera d'autant plus élevé dans l'obtention de ces deux modes de réponse que dans une possible de disposer de conditions, issues de sources diverses, pour les manipulations effectuées.

Le théorème canadien, mais s'il possède un complexe symbolique, notamment plus caractéristique que les autres proposés par les auteurs, du groupe test, n'est pas encore un organisme propre à une expérience industrielle. Le effet, il apparaît encore limité par une production très faible d'essai.

L'amélioration quantitative de cette production a été réalisée comme premier point pour la suite de l'étude. Le travail a été réalisé en deux parties: amélioration par voie physique et génétique. La première voie de recherche a été envisagée en vue de l'obtention de l'amélioration (1982). Nous avons parallèlement envisagé l'amélioration génétique de production d'essai symbolique par la (1982).

C H A P I T R E I I

AMELIORATION GENETIQUE DE LA PRODUCTION
D'ENZYME PAR VOIE DE MUTAGENESE
ET SELECTION



INTRODUCTION

L'amélioration de souches industrielles est une activité complexe et pluridisciplinaire qui possède désormais ses propres symposium internationaux (Krumphanzl et al., 1982 ; Ikeda et al., 1983). Elle constitue une partie essentielle du processus de développement de produits microbiens de fermentation et peut permettre de réduire les coûts de production en :

- augmentant la production
- permettant l'utilisation de matières premières moins chères
- améliorant la récupération du produit désiré (filtration, absence de produits indésirables)
- autorisant la culture dans des conditions physicochimiques données (température, oxygène).

Trois voies s'offrent au généticien désireux d'améliorer une production en fermentation industrielle: la mutation, la recombinaison et le clonage de gènes, ces trois techniques pouvant dans certains cas être employées l'une après l'autre pour optimiser la production. La mutation possède l'avantage de la simplicité, elle requiert en effet peu de connaissances de la génétique et de la physiologie des voies biosynthétiques du produit désiré. Elle entraîne théoriquement des améliorations rapides de production pour peu que des procédures appropriées soient établies; l'efficacité du système repose sur celles du mutagenèse et de la précision des différentes étapes de sélection.

La recombinaison génétique peut représenter une adjonction importante à la mutation lorsque plusieurs lignées de mutants sont produites. Elle permet en effet d'envisager la construction de souches combinant diverses mutations intervenant dans la production. La technique de fusion de protoplastes autorise désormais dans certains cas une telle recombinaison lorsque le passage par la voie sexuée est impossible.

Le clonage de gènes possède quant à lui, divers avantages exploitables si les facteurs génétiques limitants de production sont relativement bien connus. Cette méthode peut être utilisée pour introduire un nouveau gène dans un organisme ou accroître la production grâce à l'augmentation de copies du gène dans la cellule; de plus, employée de pair avec la mutagenèse dirigée, elle peut participer à la diminution de la force d'un promoteur, l'altération des sites de fixation des ribosomes, ou modifier certaines enzymes pour éliminer les inhibitions dues au produit formé.

La connaissance des facteurs génétiques intervenant dans la production est nécessaire pour aborder les deux dernières méthodes. Aussi, lorsque l'amélioration en est encore dans la première phase, le recours à la mutation suivie de sélection fondée sur une mesure directe de production est encore encore la procédure la plus fiable et la moins chère. De plus, cette approche a pu bénéficier des progrès apportés par les divers secteurs technologiques intervenant dans sa réalisation.

Dans le cadre de notre étude, c'est cette méthode qui a été choisie dans un premier temps pour tenter d'améliorer la production d'amyloglucosidase chez le *Thermoascus crustaceus*.

Ce chapitre est divisé en deux parties: la première est consacrée à une revue bibliographique de l'amélioration de souches par mutation et sélection d'organismes hyperproducteurs, la seconde, aux résultats obtenus avec le *Thermoascus crustaceus*.

I.- REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

A.- MUTAGENESE

1.-Choix de l'agent mutagène

Les agents mutagènes sont généralement divisés en deux groupes:

- les mutagènes physiques comme les rayonnements UV, et X
- les mutagènes chimiques comme l'éthyl méthane sulfonate (EMS), le nitroso-méthyl-guanidine (NTG) ou les moutardes

Pour le généticien, ces subdivisions sont plutôt artificielles. Plus importantes sont les différences qui existent entre les types de mutation induites et qui dépendent de deux facteurs:

- le type de modification apportée à l'ADN
- l'action de réparation de l'ADN opérée par les systèmes cellulaires.

La plupart des mutagènes vont produire plus d'un type de modification mais la fréquence de production de ces dernières varie avec le mutagène employé. Ainsi, par exemple, les UV lointains (254nm) donnent une proportion élevée de dimères pyrimidiques, les radiations ionisantes provoquent un grand nombre de cassures chromosomiques tandis que l'EMS et le NTG sont des agents alkylisants. Cependant, les UV lointains produisent également des bases hydroxylées et des cross linking de brins d'ADN.

Les systèmes de réparation de l'ADN peuvent être non mutagènes ("error free") ou mutagènes ("error prone") selon les mécanismes enzymatiques impliqués.

Le système non mutagène comprend les étapes de photoréactivation, "excision repair" et "recombinaison repair". Le plus important et le mieux connu des systèmes de réparation mutagénique est le système "SOS repair" d'*E. coli* impliqué dans la réparation de modifications causées par des mutagènes chimiques ou physiques tels les UV, les radiations ionisantes, le 5-Bromouracil, le 8-MOP (8-méthoxy-sporalen) en présence d'UV proches (360nm).

L'EMS induit un système de réparation différent, le NTG un troisième. Chez *Saccharomyces cerevisiae* une situation différente existe, tous les mutagènes semblant utiliser une partie d'un

système majeur de réparation.

Un élément important lors du choix d'un agent mutagène est celui de sa spécificité, un agent mutagène donné ayant tendance à muter certaines parties du génome en ne touchant que rarement les autres ou pas du tout. Alderson et collaborateurs (1966, 1967, 1970, 1971) ont mis en évidence une telle action des mutagènes grâce à deux systèmes "meth GI suppresseur" et "résistance au 2-thioxanthine" qui permettent une analyse sélective respective de 5 et 8 loci. Dans les deux systèmes, le 8-MOP associé aux UV lointains a eu une action non spécifique, produisant une distribution au hasard des mutations parmi les loci étudiés. Les autres mutagènes utilisés (NTG, UV, EMS) produisaient diverses fréquences de mutants selon les loci. Cette expérience reste la seule dans ce domaine et le résultat peut très bien ne pas s'appliquer à d'autres souches ou organismes.

Comme le généticien ne sait en général pas quel type de mutation il désire au niveau moléculaire, il est préférable d'utiliser des systèmes de mutation complémentaires pour générer des mutants aussi variés que possible.

Un autre facteur qui peut affecter le choix du mutagène concerne la facilité d'utilisation, facteur en liaison directe avec le risque d'emploi du produit. Les agents mutagènes doivent être considérés comme des agents cancérigènes potentiels et la protection individuelle du manipulateur est à considérer.

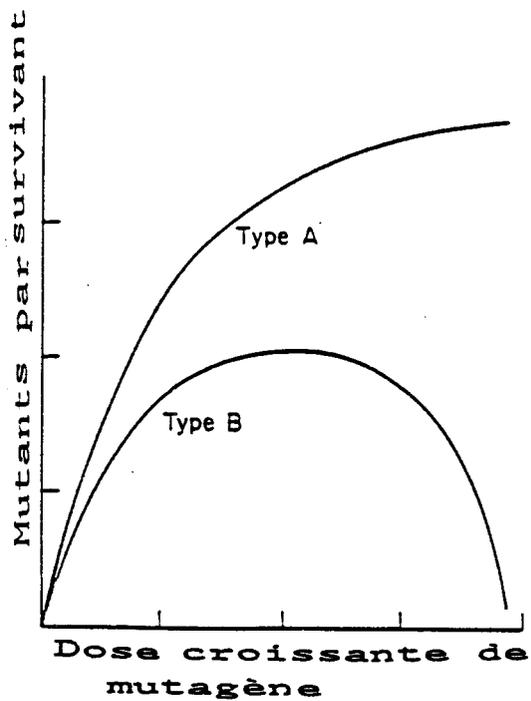
Les UV lointains sont à cet égard les plus faciles à utiliser des mutagènes et apparaissent comme créant presque toutes les modifications d'ADN connues. De plus, des mesures faciles de protection efficace peuvent être prises contre leurs effets. Parmi les agents chimiques, les produits liquides comme l'EMS sont plus faciles à manipuler en toute sécurité que les poudres comme le NTG. Néanmoins, l'aspect volatil de l'EMS comme d'ailleurs celui du NTG dans certaines conditions d'utilisation implique de travailler sous hotte ou tout au moins en conditions d'aération contrôlées.

Finalement, étant donné la spécificité de certains mutagènes et la possibilité qu'une souche devienne réfractaire à certains d'entre eux (des souches réfractaires au NTG sont connues, C. Olmedo et Valquez, 1979) l'alternance des mutagènes semble être une solution acceptable. Les UV, pour leur sécurité d'emploi et leur spectre de mutations, peuvent être utilisés au prime abord pour initialiser l'amélioration de souches.

2.-Dose optimale d'agent mutagène

La dose optimale de mutagène est celle qui donne la plus grande proportion de mutants désirés dans la population de survivants utilisés au début de sélection. Dans ces conditions, la cinétique mutant par survivant en fonction de la dose de mutagène employée (ou nombre de survivants) prend toute son importance. Deux types de courbes peuvent être tracées dépendant

Fig. 14: Courbes d'apparition de mutants par survivant selon la dose d'agent mutagène employée.(d'après Rowlands 1983).



Type A : courbe obtenue lors de l'obtention de révertants d'auxotrophie ou de mutants de résistance.

Type B : courbe obtenue lors de la recherche de mutants morphologiques ou de mutants hyper producteurs de céphalosporine chez *C. acremonium*.

du phénotype de mutation recherché plutôt que du traitement mutagénique utilisé. (figure 14).

La plupart des travaux ont été réalisés sur des mutants morphologiques (une classe très hétérogène) cependant ces mutants suivaient invariablement la courbe de type B (tous ces mutants avaient été obtenus grâce aux UV lointains). Les mutants auxotrophes donnent généralement ce même type de courbe avec les UV lointains ou le NTG. Les révertants prototrophes peuvent suivre par contre ainsi que les mutants de résistance, une courbe de type A. Les généticiens industriels sont plus généralement intéressés par les mutations provoquant une augmentation de production (antibiotiques ou enzymes). Alikanian (1962) a montré que les mutations induisant des améliorations de production suivaient la courbe de type B pour les rayons X UV lointains et l'éthylenimine chez divers actinomycètes; la dose optimale pour l'augmentation de production était toujours plus faible que pour l'induction de chute de production ou de mutations morphologiques.

Brown et Elander (1966) ont utilisé des méthodes statistiques pour étudier les effets des UV lointains sur la production de céphalosporine chez *Cephalosporium acremonium*. Ils montrent que la variabilité de production augmente alors que la production moyenne chute. Les mutations provoquant une augmentation de production suivaient une courbe de type B alors que la dose optimale de mutagène provoquait un taux de survie compris entre 25 et 30%.

Simpson et Caten (1979) étudiant le système de production d'antibiotique d'*Aspergillus nidulans* ont montré qu'en augmentant la dose de mutagène (rayons UV, NTG, EMS) ils augmentaient la variabilité de production, par contre, aucune conclusion précise ne pouvait être tirée des résultats des mutations provoquant une augmentation ou une baisse de production. En général, les auteurs estiment que des doses relativement faibles de mutagène (déterminant un taux de survie compris entre 1 et 20%) procurent de meilleurs résultats quant à une augmentation de production.

En conclusion, il s'avère indispensable de vérifier dès le début des étapes de mutagénèse l'efficacité de la dose de mutagène choisie pour l'expérience.

3.- Effets de l'environnement

L'environnement immédiat peut avant, pendant et après mutagénèse affecter la fréquence et le type de mutants obtenus.

Un prétraitement avec un mutagène avant d'en utiliser un autre peut entraîner un effet de synergie (Talmud, 1977). Pour que l'effet soit utile, la conjonction des deux mutagènes doit entraîner une augmentation de la fréquence de mutants (survivant à l'optimum de dose et non seulement un déplacement du pic à une dose plus faible). Une telle synergie peut provenir d'une saturation du système de réparation par le premier mutagène ou

d'une stimulation du système de réparation inducteur d'erreurs (error-prone). Dans ce système, la conjonction de mutagènes peut inhiber la mutagenèse. Le 8-MOP mutagène lorsqu'activé par les UV proches, protège la cellule des effets mutagéniques de l'UV lointain si il est présent avant ou durant l'irradiation.

L'environnement externe agissant sur la spécificité du mutagène pendant l'étape de mutagenèse inclut (Kilby, 1974) la température, la nature du milieu de suspension durant la mutagenèse (NTG) et l'âge du matériel soumis à mutagenèse. L'environnement immédiat suivant la mutagenèse (comme par exemple la composition du milieu de culture) peut affecter la fréquence de mutation et la spécificité. Il est connu depuis longtemps que la croissance sur un milieu riche après mutagenèse accroît le pourcentage de mutants. Ceci est probablement dû au fait que l'action du système de réparation inducteur d'erreur (error-prone) est facilité dans les conditions pour lesquelles la synthèse de protéines est favorisée (Clarke, 1975). L'incorporation dans le milieu de croissance d'inhibiteurs de l'excision repair tels que la caféine, le 8-MOP, l'acriflavine augmente la fréquence de mutation après irradiation par UV en créant probablement une plus grande proportion de lésions mutagéniques devant être réparées par le système error-prone (Auerbach, 1976).

Cove (1976) en utilisant un système de résistance au chlorate chez *Aspergillus nidulans* montre que la nature de la source d'azote du milieu d'isolement affecte grandement le spectre des mutants obtenus. Birkett et Rowlands (1981), utilisant le même système de résistance au chlorate, n'ont cependant pu mettre en évidence une telle influence chez les mutants de *Penicillium chrysogenum*.

Un facteur important à considérer lors de l'utilisation des UV comme agent mutagène est l'augmentation du taux de survie lorsque le matériel muté est maintenu dans un milieu ne permettant pas la croissance (Auerbach, 1976) ; ceci laissant alors un temps plus grand aux systèmes de réparation de fonctionner avant les premières divisions cellulaires qui suivent le traitement mutagénique. Un autre phénomène connu est celui de photoréactivation grâce auquel les spores ou cellules soumises au traitement sont réactivés après exposition à la lumière du jour initiant ainsi un taux de survie très élevé (Rupert, 1964). La réparation due à la photoréactivation est généralement error proof (Rupert et Harm, 1967), mais des photoréactivations spécifiques de certains allèles ont été notés (Kilbey, 1974) et pourraient causer des pertes ou augmentations de la mutation désirée. Le spectre d'action de la photoréactivation n'est pas le même chez tous les organismes mais il est généralement considéré qu'il n'apparaît pas au delà de 525nm (Hopwood, 1970), les manipulations suivant l'irradiation pouvant donc être effectuées sous lumière jaune ou rouge.

Si l'environnement peut affecter les résultats de mutagenèse, la connaissance des principaux facteurs intervenant dans le système mutagène choisi peut néanmoins permettre de

pratiquer les expériences dans des conditions standards ne favorisant pas une perte excessive de mutants.

B.- PROCEDURES DE SELECTION ET UTILISATION DE TESTS

1.- Procédures de sélection

Les souches issues des manipulations du généticien (mutagenèse, transformation, croisement) doivent à un moment ou à un autre franchir une étape de sélection. Celle-ci doit permettre de détecter le génotype désiré sous peine de voir les efforts précédents sans effet. La procédure de sélection nécessite donc une attention toute particulière. Deux types de sélection existent: une sélection de type conventionnel (random screen des auteurs anglo-saxons) dans laquelle tous les isolats sont testés individuellement pour les qualités désirées, une sélection rationnelle (rational screen des auteurs anglo-saxons) fondée sur une présélection plus spécifique du produit recherché.

Les travaux initiaux de Calam (1964) et Davies (1964) restent encore valables près de 25 ans après leur publication et peuvent être consultées dans le but de définir les modalités d'une sélection conventionnelle ainsi que celles de Brown et Elander (1966) ou Dahl et collaborateurs (1971). Ces études fondées sur des analyses statistiques détaillées ont montré que les erreurs tant de fermentation que de dosage jouaient un rôle très important dans une procédure de sélection efficace: un grand nombre de tests s'avèrent nécessaires pour isoler une souche réellement meilleure productrice. De plus, de petites améliorations apparaissent bien plus souvent que des grandes comme le montre Davis (1964). Ce dernier préconise donc la sélection de mutants présentant une faible amélioration après chaque étape de mutagenèse. Cette méthode apparaît comme plus efficace que la recherche d'un mutant hyperproducteur en une seule étape parmi une large population, de tels mutants étant trop rares ou même inexistantes.

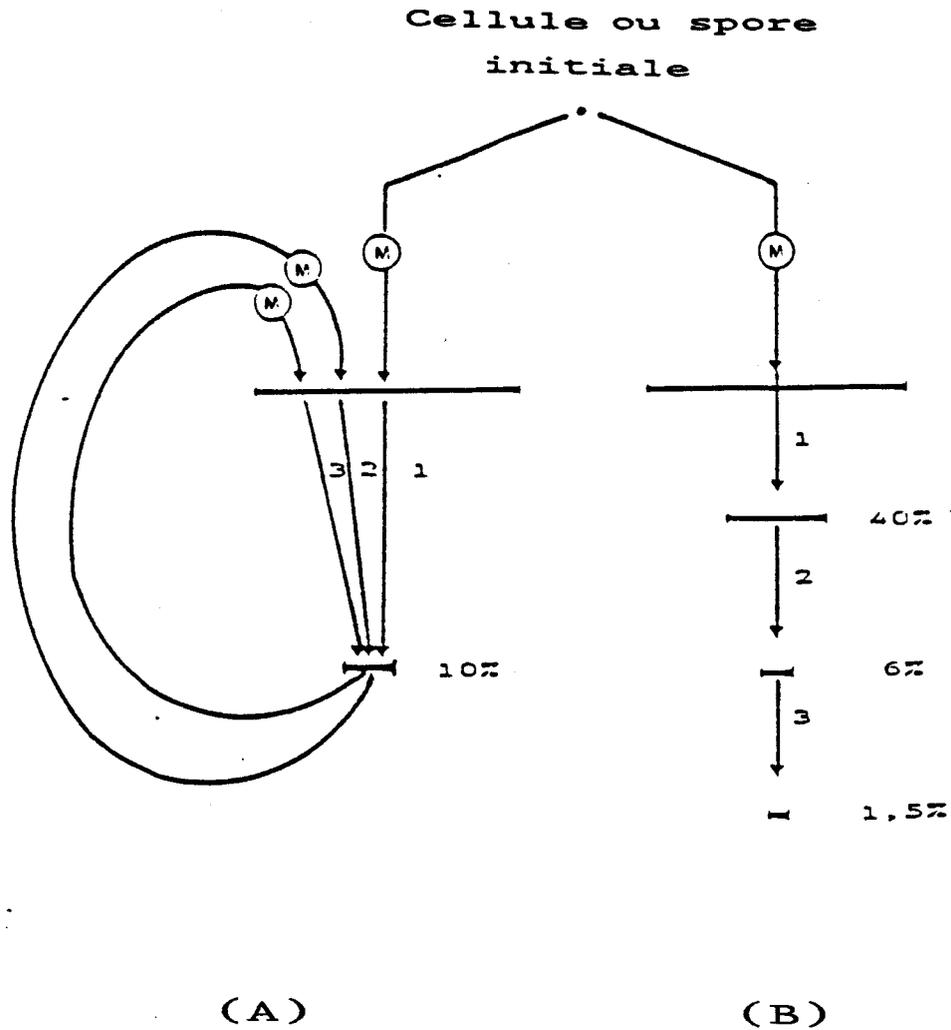
Le choix du nombre de réplifications est ici déterminant, les limites telles que l'espace disponible, le temps et les ressources humaines du laboratoire intervenant massivement dans le choix.

Des analyses statistiques des paramètres ont montré (Davies, 1964) que deux types de sélection pouvaient affiner le choix de l'expérimentateur vis-à-vis des problèmes de :

- sélection (nombre d'étapes à utiliser et degré de réduction du nombre de souches à chaque étape)
- mutation (nombre optimal de mutants à tester à chaque cycle et nombre optimal à conserver pour l'étape de mutation suivante)

Ces deux techniques, sélection effectuée en plusieurs étapes et recyclage rapide, peuvent être utilisées de manière combinée ou séparément.

Fig. 15: Schémas de sélection par recyclage rapide (A) et en plusieurs étapes (B).



M étape de mutagenèse

1 2 3 étape de sélection

— population de mutants

a) Sélection effectuée en plusieurs étapes

Lorsque les isolats présentant une amélioration sont rares, les erreurs d'échantillonnage sont grandes, une sélection effectuée en plusieurs étapes offre les meilleures chances de détecter les isolats améliorés (Calam, 1964 ; Davies, 1964). Le principe de cette sélection repose sur un passage successif des isolats par une série de tests le nombre de sélectionnés diminuant à chaque test. La précision de la sélection s'accroît seulement avec la racine carrée du degré de réplication (Calam, 1964). En conséquence, les premiers stades d'une sélection en plusieurs étapes sont utilisés pour tester un grand nombre d'isolats en utilisant une procédure grossière comme un test en boîte. De tels tests sont peut être peu précis, mais permettent d'éliminer les isolats peu productifs. Au fur et à mesure que le nombre de souches retenues diminue, le nombre de réplifications est augmenté. Un test de sélection en fiole agitée intervient alors, l'étape ultime pouvant être réalisée en fermenteur de faible contenance.

Il est important dans ce type de sélection en plusieurs étapes de s'assurer que les différents tests utilisés n'interviennent pas l'un contre l'autre en créant des pressions de sélection antagonistes.

Aussi certains isolats retenus peuvent ne pas montrer une réelle amélioration de production mais seulement une bonne réponse à l'environnement particulier imposé par le test. Il est donc essentiel que les pressions de sélection soient communes à tous les niveaux de sélection, la meilleure manière d'obtenir ce résultat étant d'incorporer le facteur limitant de la production dans chaque étape. De même, le milieu de culture utilisé devrait être le même tout au long des différentes étapes.

b) Sélection par recyclage

Il se peut que la variation de production entraînée par mutagenèse soit plus faible que les erreurs de tests. On peut alors procéder à un recyclage rapide (mutation récurrente et sélection) qui améliore l'efficacité du test (figure 15, partie gauche). La technique consiste à recycler rapidement un nombre élevé de souches en début de sélection de la manière suivante: un pourcentage prédéterminé d'isolats avec ou sans mutation est mélangé et de nouveau testé. Une sélection en plusieurs étapes peut être couplée au recyclage rapide. Un isolat présentant une petite amélioration de production peut difficilement être repéré comme un isolat amélioré, mais peut faire partie des meilleures souches mises en évidence. Recycler celles-ci entraînera donc un enrichissement de la proportion de ces descendants dans la population; les descendants des isolats apparaissant dans les meilleures souches isolées par hasard sont quant à eux, éliminés. Un des problèmes du recyclage rapide apparaît avec des caractéristiques secondaires néfastes ou des souches ne possédant pas une réelle augmentation de production. Si les souches possèdent un quelconque avantage grâce aux tests, elles éliminent de la

population toutes les autres. En conséquence, il est utile de vérifier ces possibilités assez tôt dans la sélection pour éliminer ces lignées et étudier parallèlement diverses lignées. Ces souches issues de différentes lignées peuvent éventuellement être croisées en vue d'améliorer, soit la production initialement recherchée, soit d'autres caractéristiques culturelles intéressantes (filtrabilité, aptitude à croître sur certains milieux, sporulation).

2.- Utilisation des tests

a) Test de surface

Ces types de sélection se divisent en deux groupes:

- le premier repose sur la détection et la mesure d'une zone créée par le produit excrété par la colonie
- le second sur l'éluion du produit à partir d'un milieu de culture dans une solution sur laquelle s'effectue les dosages.

Le matériel muté (en général des conidies) peut être inoculé directement sur la surface de boîtes de Pétri gélosées ou subcultivé sur bouchons de gélose (extraits à l'aide d'un emporte-pièce) ou sur gouttes de gélose.

Les dosages de zone sont effectués en recouvrant directement les colonies à l'aide d'une solution de dosage chimique ou biologique; dans le cas des bouchons ou gouttes de gélose, ces derniers peuvent être placés à la surface de la solution de dosage.

Un dosage biologique typique contient un organisme test sensible dans un milieu gélosé, tandis qu'une solution de dosage chimique contient un composé chromogène réagissant avec le produit à doser pour donner une réaction colorée. Toutes les sélections fondées sur des tests de zone souffrent de la relation exponentielle décroissante entre la concentration du produit et le diamètre de la zone, ce qui fait qu'une grande augmentation de concentration du produit donne seulement un petit accroissement du diamètre de la zone. En conséquence, ces tests ont tendance à ne pas détecter des faibles différences de concentration de manière efficace. Cet effet peut être minimisé en limitant les zones d'une taille minimale ce qui est aussi avantageux lorsqu'on traite un grand nombre d'individus. La réalisation peut passer par l'utilisation d'un restricteur de croissance, l'incorporation d'un enzyme dégradant le produit recherché, l'utilisation d'un organisme test plus résistant ou des temps d'incubation moindres. L'utilisation des gouttes ou bouchons de gélose limite également la zone de diffusion.

La mesure de la surface de la zone plutôt que le diamètre améliore la résolution de la sélection; comme la morphologie des isolats varie du fait de l'étape de mutagenèse des colonies compactes vont donner des zones exagérément petites alors que des grandes colonies vont donner des zones très grandes. Quelques

auteurs ont tenté de palier ce phénomène en introduisant un index où le diamètre de la zone est divisé par le diamètre de la colonie .

Les techniques fondées sur l'élution sont plus longues que les tests de zone mais possèdent l'avantage de permettre d'effectuer une grande quantité de dosages quantitatifs lorsque le produit est en solution. De plus les bouchons de géloses peuvent être placés sur des plaques de chromatographie de couche mince sur lesquelles différents produits peuvent être recherchés.

b) Tests de sélection effectués en milieu liquide

Ces tests sont fréquemment fondés sur l'utilisation de fioles d'Erlenmeyer agitées bien que d'autres types de culture liquide puissent être adoptés (cultures statiques en fioles de Roux ou en tubes). Eswaran et Nga (1978) utilisent un test en tube dans lequel le milieu de culture contient comme source de carbone de l'amylose-azure, substrat spécifique de l' α -amylase. Ils mesurent ensuite la zone de dégradation du substrat coloré sous le mycelium et constatent une bonne corrélation entre cette mesure et la production d'enzyme en fiole agitée. Des tests comparables sont réalisés de manière classique pour les cellulases, protéases ou pectinases (Hankin et Anagnostakis, 1975). Malheureusement, aucun substrat spécifique de l'amyloglucosidase n'est connu.

Searle et Tubb (1981) inoculent des puits contenant le milieu de culture avec des levures du genre *Saccharomyces* et mettent en évidence la libération de glucose résultant de l'action de l'amyloglucosidase par un kit glucose oxydase/peroxydase/chromogène (Boeringher-Manheim, cat.n°124028). Néanmoins, ce test n'est utilisé que pour différencier des souches possédant ou ne possédant pas d'amyloglucosidase.

Les tests en milieu liquide possèdent l'avantage par rapport aux tests de surface de simuler de manière plus proche les conditions industrielles de production en fermenteur. Des conditions physiologiques peuvent être contrôlées et différents dosages menés à des temps différents de la culture. L'aération par exemple peut être contrôlée en tenant compte du volume du milieu de culture, l'agitation et l'utilisation de contre pâles dans l'erlenmeyer. En général, ces tests demandent beaucoup plus de temps et de surface et donc moins d'isolats peuvent être testés en une même durée de temps. Ils tendent donc à être utilisés comme des tests de deuxième ou troisième sélection.

3.- Artéfacts des tests

La corrélation entre l'évaluation de production par différents tests (boîtes de Pétri, Erlenmeyer, Fermenteur) peut être très faible. Les sélections effectuées sur *P.chyrogenum* en vue d'améliorer la production d'antibiotiques l'ont montré (Burnett, 1975). Cette absence de corrélation entre les différentes étapes ou les différents test de sélection est, la plupart du

Tableau 18 : Amélioration de production d'amyloglucosidase par voie de mutagenèse et sélection selon différents auteurs.

Espèces utilisées	Taux de survie utilisé	Nombre d'étapes de sélection	Nombre de mutants testés par étape	Méthode de sélection	Gain en production	Références
<i>Aspergillus phoenicis</i>	2%	1	600	rationnelle	141%	Kuek et Kidby (1984)
<i>A. awamori</i>	0,5 à 5%	3	500	rationnelle	145%	Nevalainen et Pálva (1979)
<i>A. awamori</i>	?	1	?	conventionnelle	100%	Park et al. (1977)
<i>A. niger</i>	?	?	?	conventionnelle	172%	Mitra et Sane (1981)
<i>A. candidus</i>	37 à 75%	1	?	conventionnelle	120%	Kolhekar et al. (1985)
<i>Rhizopus pygmaeus</i>	0,011 à 0,15%	5	150 à 730	conventionnelle	300%	Grigorov et al. (1982)
<i>Endomycopsis fibuligera</i>	2,6%	1	?	conventionnelle	100%	Afas'eva et Zaitseva (1977)

temps, liée à la différence d'environnement de croissance (plus particulièrement entre culture en milieu liquide et culture de surface) différence ayant pour résultat des pressions de sélection différentes même lorsque le facteur limitant de production, par exemple la source de carbone, est présent. De tels artéfacts peuvent revêtir la forme de surproduction d'un antibiotique auquel le test biologique est sensible ou d'une enzyme à spectre proche de celui recherché. Plus grande sera la différence entre le stade culture de production et le test, plus grandes sont les chances de sélection des souches apparemment améliorées. D'autre part, certaines souches peuvent se comporter de manière idéale sur le test et en fermenteur et non sur les tests intermédiaires. En conséquence, bien qu'il soit nécessaire de passer par certaines étapes du test initial à la fermentation finale, trop d'étapes intermédiaires peuvent nuire à la sélection.

4.- Amélioration du milieu de culture

L'amélioration du milieu de culture a pour but d'obtenir une production maximale de la part d'une souche en manipulant les facteurs d'environnement affectant l'expression des gènes de synthèse (composition du milieu mais aussi aération ou agitation). Une nouvelle souche possède un nouveau génotype et en conséquence nécessitera probablement une nouvelle optimisation des conditions de culture, elle peut par exemple exiger de nouveaux précurseurs de synthèse, une agitation ou un inoculum plus approprié. Certains effets pléiotropes indésirables des mutations peuvent apparaître (filtrabilité difficile, synthèse de produits non recherchés) et demandent des études approfondies afin de les éliminer.

Finalement, l'instabilité des souches est un facteur à ne pas négliger lors des fermentations à grande échelle et peut nécessiter des études génétiques et physiologiques complémentaires.

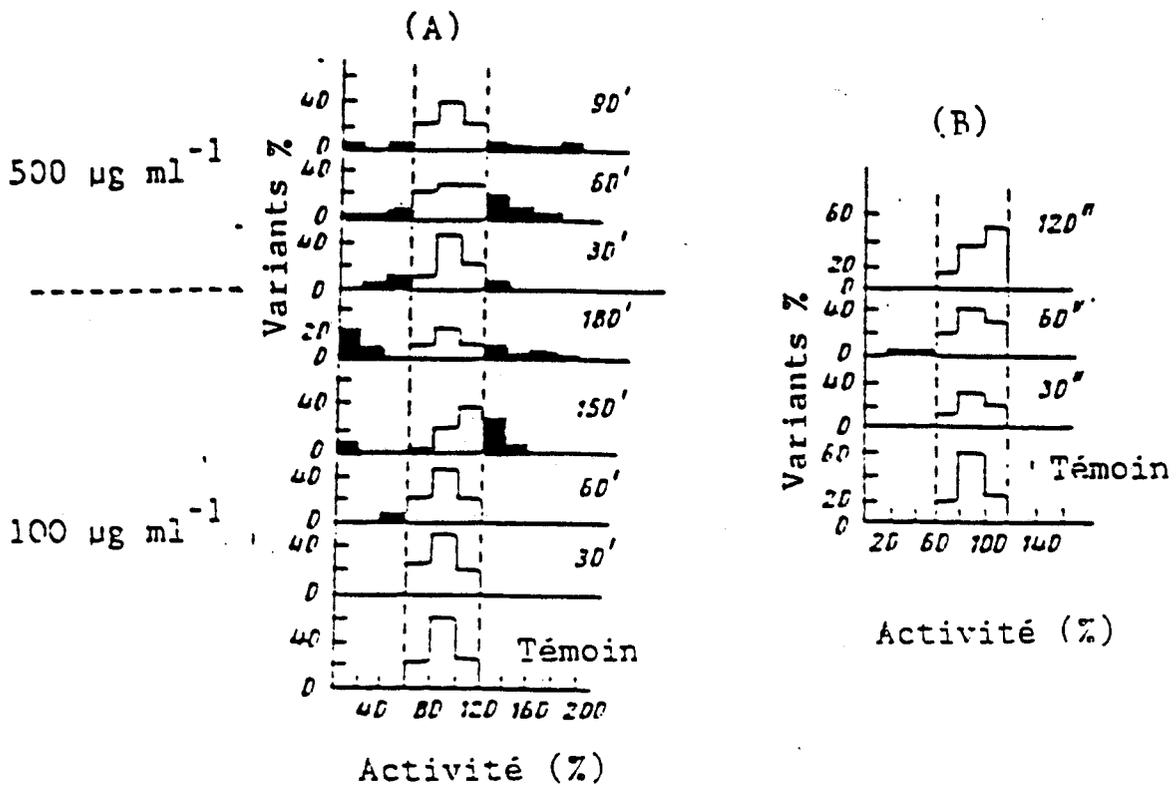
C.- AMELIORATION DE LA PRODUCTION D'AMYLOGLucosIDASE

Le tableau (20) donne les références de quelques expériences menées dans le but d'améliorer la production d'amyloglucosidase par voie de mutagenèse suivie de sélection. Ces expériences touchent aussi bien des champignons filamenteux (divers *Aspergillus*, *Rhizopus pygmaeus*) qu'une levure (*Endomycopsis fibuligera*) tous traditionnellement utilisés en industrie que ce soit en Occident ou en Orient.

Les deux méthodes de sélection, conventionnelle (random-screen) et rationnelle (rational screen), ont été utilisées à la suite d'étapes de mutagenèse faisant intervenir des agents mutagènes variés: le NTG (Afanas'eva et Zaissera, 1977, Kuek et Kidby, 1984, Nevalainen et Palva, 1979), les UV (Grigerov et al., 1983), les irradiations UV (Kolhekar et al., 1985), le diethylsulfate (DES), le nitrite de sodium (NaNO_2) (Nevalainen et Pelpa, 1979). Des améliorations conséquentes ont pu être appor-



Fig. 16 : Influence de l'agent mutagène et de la dose employée sur l'apparition d'hyperproducteurs d'amyloglucosidase chez *E.fibuligera* (Afanas'eva et Zaitseva, 1977)



Légende: (A) : NTG, (B): UV.

tées en une ou quelques étapes, la production était en général doublée dans la plupart des cas exposés. Peu d'auteurs ont établi une relation entre l'action de différents mutagènes et leur dose sur la fréquence de mutants hyperproducteurs d'amyloglucosidase après l'étape de mutagenèse.

Afanas'eva et Zaitsera (1977) ont effectué une étude comparée de l'action des mutagènes sur la production d'amyloglucosidase en utilisant le NTG et les rayons UV, ainsi qu'une étude de l'influence du taux de gènes sur l'amélioration de production. Dans le cas d'*Endomycopsis fibuligera* aucune amélioration de production d'amyloglucosidase ne peut être mise en évidence à la suite de mutagenèse par UV, le NTG créant par contre des mutants hypo ou hyperproducteurs dans la plupart des essais (fig. 16).

L'effet maximal du NTG apparaît pour les concentrations de $100 \mu\text{gml}^{-7}$ et $500 \mu\text{gml}^{-7}$ aux plus faibles taux de survie (respectivement 2% et 1%) (fig.16). Par contre, l'augmentation des doses de NTG (1000 à 9000 μgml^{-7}) cause une chute de viabilité considérable et la variabilité de la production de mutants diffère peu de celle du témoin (données non exposées).

Des deux solutions de type rationnel, la méthode de Kuek et Kidby (1984), fondée sur l'utilisation du Dextran T10 a déjà été discutée. Nevalaisen et Palva (1979) de leur côté sélectionnent les souches présentant une meilleure activité amyloglucosidasique (après mutagenèse) au vu de leur croissance rapide sur milieu minimal avec amidon comme source de carbone. La production d'amyloglucosidase est ensuite vérifiée par culture en Erlenmeyer sur milieu complet.

Quel que soit l'agent mutagène utilisé, la plupart des auteurs (voir tableau 20) utilisent des doses massives d'agent mutagène qui entraînent des taux de survie faibles à très faibles (très inférieurs à 1% pour Grigovov et collaborateurs. (1983), ce qui semble aller à l'encontre des propositions de Rowland (1983).

L'étude bibliographique consacrée à l'amélioration de production d'amyloglucosidase par voie mutagénique nous montre donc:

- qu'une amélioration de production de 100% semble possible en quelques étapes (tout au moins chez les souches industrielles),
- qu'un grand nombre de souches (plusieurs centaines) sont testées à chaque étape de mutagenèse,
- que les techniques de mutagenèse et sélection employées sont très diverses et semblent convenir dans la plupart des cas
- que le taux de survie utilisé pour la mutagenèse par les auteurs est généralement faible (inférieur à 5%).

CONCLUSION DE L'ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

La revue bibliographique menée a mis en évidence les points essentiels touchant la mutagenèse, le choix et la dose optimale d'agent mutagène, ainsi que les effets possibles de l'environnement sur le résultat attendu de l'étape de mutagenèse.

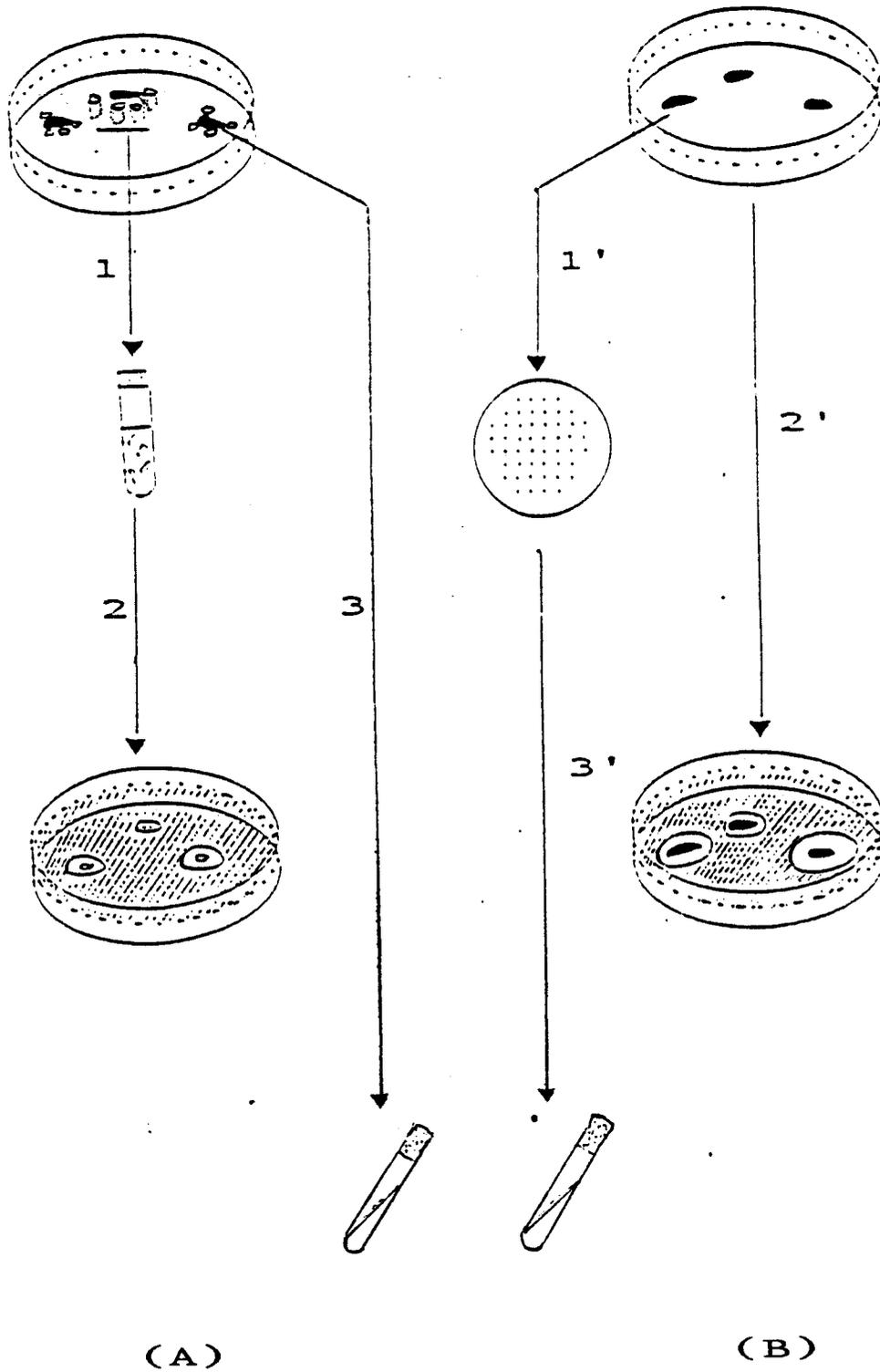
Des procédures de sélection efficaces proposées il y a près de 25 ans par Davies ou Elander (1964) sont encore utilisées de nos jours. Etablies à partir d'analyses statistiques, elles permettent d'aider l'expérimentateur face aux problèmes de sélection et mutation. D'autre part, divers tests utilisables pour le suivi d'une amélioration de production d'enzyme existent. Tous présentent des avantages et des inconvénients à estimer avant d'effectuer un choix définitif.

La production d'amyloglucosidase a déjà été améliorée chez certaines espèces de champignons filamenteux ou levures en utilisant des techniques variées de sélection et mutation.

L'importance du choix du test et de sa mise au point ayant été mis en exergue au cours de cette partie, il sera nécessaire avant d'entamer la procédure de sélection de définir exactement les paramètres intervenant dans la mise en évidence de l'enzyme et le choix des souches. D'autre part, l'importance de l'agent mutagène dans la sélection devra également être débattue.

La suite de ce chapitre sera donc consacrée à l'étude de ces deux éléments.

Fig. 17: Présentation des tests de mise en évidence de l'amyloglucosidase en boîte de Petri.



(A) : test de carottage

(B) : test de diffusion sur milieu de culture

II.- RESULTATS: CHOIX DU TEST ET DE LA PROCEDURE DE SELECTION

A.- PRESENTATION DES TESTS ENVISAGES

Nous avons montré dans la revue bibliographique les limites des tests mais également les soins nécessaires à apporter à leur élaboration. Nous reprendrons donc ici pas à pas le cheminement effectué dans la partie bibliographique quant aux paramètres à analyser pour définir nos choix.

Au prime abord, il convenait d'opérer un premier choix entre les tests en milieu liquide ou gélosé.

Toute culture en milieu liquide imposant un dosage du glucose libéré, un test en boîte de Pétri, limitant les manipulations, semblait plus approprié au type de sélection envisagée.

Deux types de test en boîte pouvaient être utilisés:

- l'un mettant en jeu une récupération de l'enzyme après carottage du milieu de culture gélosé,
- le second utilisant l'enzyme au niveau du milieu de culture par révélation de l'hydrolyse de la source de carbone.

L'utilisation de ces deux tests a été envisagée dans notre étude.

1. Test de carottage

Il consiste (fig.17, partie gauche):

- dans le prélèvement, à la périphérie de la colonie, de cylindres de milieu à l'aide d'un emporte-pièce,
- mise en solution de l'enzyme contenu dans ces cylindres par diffusion dans un tampon (fig. 17 1).
- dépôt d'un volume de tampon contenant l'enzyme dans des puits aménagés dans un substrat gélosé et mise en évidence de l'hydrolyse par réaction colorimétrique (fig17 2).

Les souches potentiellement intéressantes sont ensemencées à partir des boîtes de Pétri initiales (fig.17 3).

Cette méthode a l'avantage de ne pas faire intervenir la taille de la colonie. Par contre, elle entraîne une standardisation extrême des événements (culture sur boîte, carottage, dialyse, dépôt), étapes susceptibles d'entraîner des erreurs importantes. L'étude du carottage selon les concentrations de substrat et gélose utilisées indique que la culture ne peut guère se réaliser à des concentrations élevées en carbone.

L'avantage de la méthode réside dans la possibilité de choisir un substrat de dosage pouvant différer de la source de carbone utilisé pour le milieu de culture. De plus, une fois l'enzyme récupéré de nombreux dosages sur différents substrats peuvent être envisagés.

Néanmoins, comme dans notre cas, le substrat utilisé pour le dosage (MDO2) et la source de carbone utilisée sont identiques, un test mettant directement en évidence l'enzyme sur le milieu initial de culture semblait plus intéressant.

2.- Test de diffusion sur milieu de culture

Dans ce type de test sur milieu gélosé, les souches, après croissance sur milieu test, sont d'abord repiquées sur boîte de Petri contenant un milieu au Malt gélosé à raison de 50 souches par boîte (fig.171'). Les colonies des boîtes initiales sont ensuite recouvertes par un révélateur de l'hydrolyse du substrat carboné (fig.172'). Les souches intéressantes sont alors repiquées en tubes à partir des boîtes de repiquage (fig.173').

Ce deuxième type de test possède l'avantage de se pratiquer en une seule étape. Par contre, la zone d'hydrolyse dépend de la taille de la colonie, de plus la technique impose de repiquer systématiquement les souches avant d'effectuer la révélation des zones d'hydrolyse.

Ce test a néanmoins été retenu car les manipulations qu'il nécessite sont plus aisées que celles qu'impose le test précédent, particulièrement l'étape de carottage, ces dernières étant sujettes à des fluctuations importantes.

Ce type de test a déjà été, à maintes reprises, utilisé par les auteurs en vue de découvrir ou d'améliorer la production de divers enzymes:

- en utilisant un substrat dont la lyse était directement perceptible: les cellulases (Montenecourt et Evelergh, 1977 et 1979), protéases (Sckine et al., 1969; Nakadan et Nasano, 1977) chitinases (Hankin et Anagnostakis; 1975)
- ou après avoir recouvert la surface de la culture par un indicateur coloré pour les cellulases (Hankin et Anagnostakis, 1977), l'--amylase (Meyrath et al., 1971), pectinase (Hankin et Anagnostakis, 1975).

B.- MISE AU POINT PRATIQUE DU TEST CHOISI

Deux paramètres importants conditionnent la mise en application du test:

- la mise en évidence de la zone d'hydrolyse du substrat choisi,
- la nature du milieu utilisé.

1. Mise en évidence de la zone d'hydrolyse

Dans ce type de test de surface mettant en jeu un substrat amylacé, le lugol (solution aqueuse iodoiodurée diluée) est généralement utilisé pour la mise en évidence de la zone d'hydrolyse (Swanson, 1948). Pour tout enchaînement de glucose inférieur à 7, le lugol vire au jaune, le polysaccharide non

digéré demeurant bleu (amidon) ou rouge (maltodextrine).

Chez les levures du genre *Saccharomyces*, des souches synthétisant une amyloglucosidase ont été mises en évidence sur des milieux à base d'amidon ou de dextrans supplémentées d'indicateurs de pH (Takahashi, 1970) afin d'éviter la production de zones d'hydrolyse par des enzymes intracellulaires résultant de lyse cellulaire. Cependant, des acides organiques peuvent être excrétés indépendamment de toute synthèse d'amyloglucosidase. Ce choix du lugol peut néanmoins entraîner un artéfact de sélection. En effet, la sélection s'effectue sur la mise en évidence des amylases au sens le plus large, toute souche retenue devant être cultivée en milieu liquide pour s'assurer de la présence réelle d'amyloglucosidase et non seulement d' α -amylase.

Le test peut toutefois permettre une première sélection d'hyperproducteurs; d'autre part, l'incubation des boîtes-tests pendant une nuit à 60-70°C, températures d'activité optimale des amyloglucosidases, permet de limiter l'influence des α -amylases tout en activant celle des amyloglucosidases, méthode déjà utilisée pour la mise en évidence des cellulases à l'aide de tests en boîte (Montenecout et Eveleigh, 1979).

Si initialement (Fergus, 1969) le test consistait en la seule détermination au diamètre de l'auréole, Ho et Foster (1971) voulant diminuer le rôle du diamètre de la colonie sur celui de l'auréole, utilisent un test de sélection fondé sur le rapport du diamètre de l'auréole au diamètre de la colonie, ils isolent, par cette méthode, un certain nombre de mutants hypo à hyperproducteurs. Aussi avons-nous choisi ce dernier critère pour mener les premiers essais. Le rapport diamètre auréole d'hydrolyse/diamètre colonie sera dénommé R pour le reste de l'étude.

2.- Nature du milieu utilisé

Le milieu peut intervenir à la fois sur la taille de la zone d'hydrolyse (teneur en source de carbone, teneur en gélose) et sur la taille de la colonie (agent de restriction de croissance).

a) action sur la taille de la zone d'hydrolyse

Trois facteurs peuvent intervenir dans cette action:

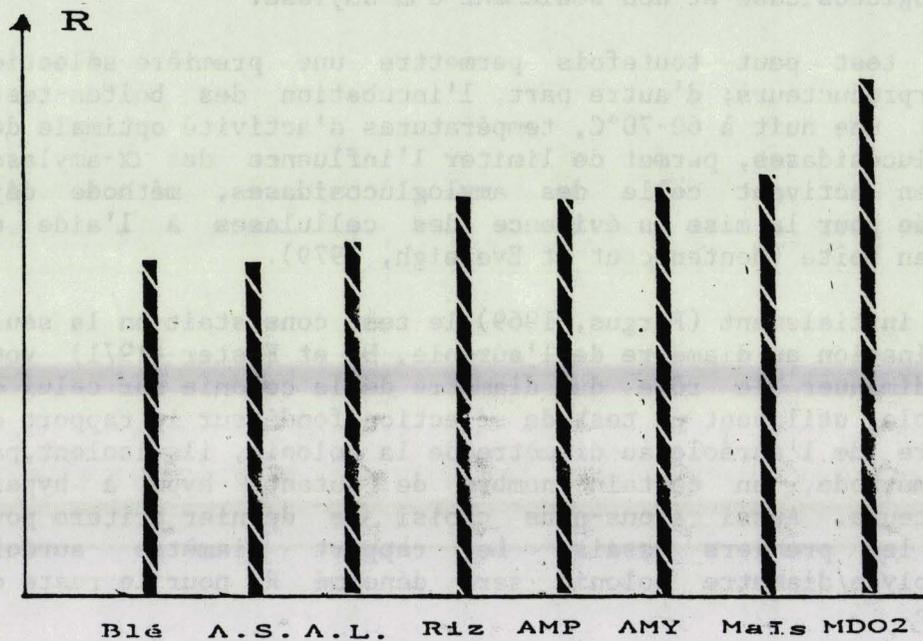
- la nature de la source de carbone
- la teneur en substrat carboné
- la teneur en gélose .

* Nature de la source de carbone

Celle-ci doit permettre à la fois:

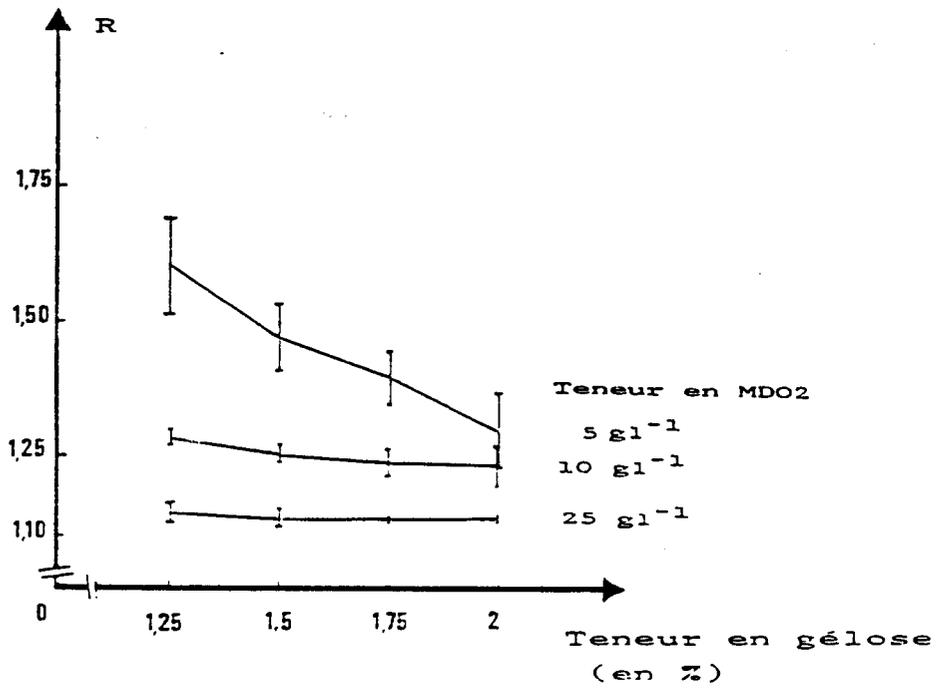
- la croissance du micro-organisme
- la mise en évidence aisée de l'hydrolyse

Fig. 18: Influence de divers substrats carbonés sur le rapport R
(diamètre de la zone d'hydrolyse/diamètre de la colonie)



Légende : Blé: amidon de blé; A.S.: amidon soluble; A.L.: amidon soluble selon Lintner; Riz: amidon de riz; AMP: amylopectine; AMY: amylose; Maïs: amidon de maïs; MDO2: maltodextrine MDO2.

Fig.19: Influence de la teneur en gélose et MD02 du milieu sur le rapport R (diamètre de la zone d'hydrolyse/diamètre de la colonie).



Kuek et Kidby (1984-85) ont utilisé la propriété d'hydrolyse des liaisons α -1,6 par l'amyloglucosidase pour mettre au point un test mettant en jeu le dextran (polymère de glucose contenant 95% de liaisons α -1,6 sur les chaînes principales et secondaires). Mais ce test n'est utilisable qu'avec des souches ne synthétisant pas de dextranases. Le filtrat de culture brut du *Thermoascus crustaceus* dégradant le dextran et certains *Paecilomyces*, formes conidiennes des *Thermoascus* possédant une dextranase, nous avons préféré ne pas utiliser un tel substrat pour le test.

Un test réalisé avec la souche P6 sur milieu S gélosé avec comme source de carbone huit polysaccharides différents a donné les résultats consignés dans la figure 18.

Ces substrats peuvent entraîner la synthèse de complexes enzymatiques de compositions différentes. La MDO2 utilisée comme substrat procure le rapport R le plus élevé, l'amidon de blé le plus faible. Rowlands (1983) conseille de ne pas choisir des conditions favorisant la formation d'une trop grande zone d'hydrolyse; néanmoins, comme cette zone est singulièrement faible dans le cas de la souche P6 et comme la MDO2 est utilisée comme substrat de notre dosage, nous l'avons conservée pour mener le test.

** Teneur du milieu en substrat carboné et gélose

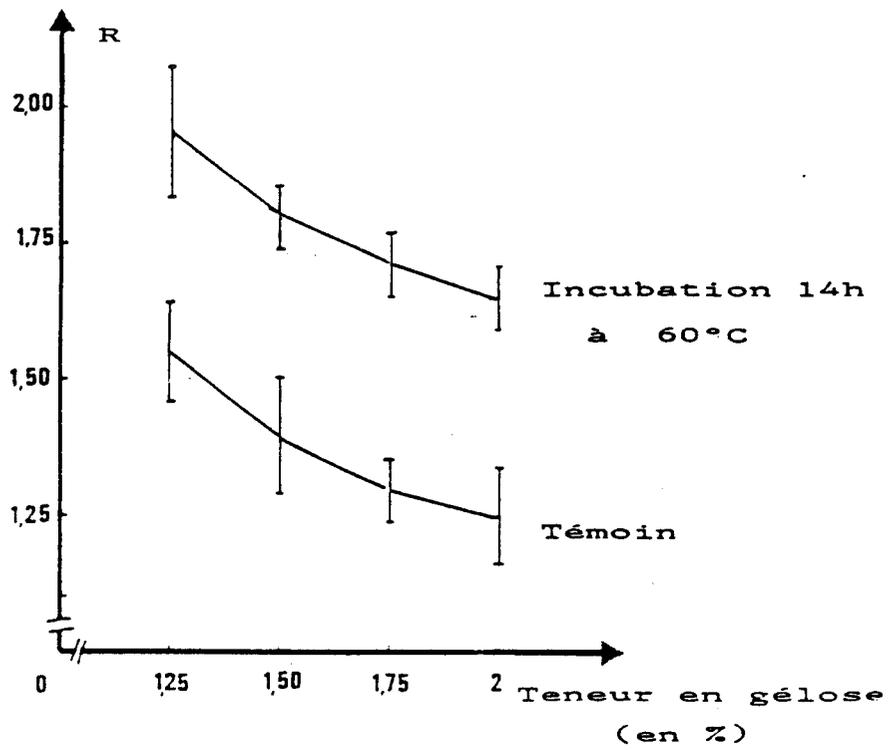
Les tests fondés sur des zones d'hydrolyse mettent en jeu mis à part la qualité du substrat deux facteurs:

- la concentration du substrat
- la teneur en gélose

L'épaisseur de la gélose peut avoir dans certains cas une influence sur la lisibilité du résultat. Pour s'assurer de la standardisation du remplissage des boîtes et donc de l'épaisseur constante du milieu dans les boîtes, le remplissage était effectué à l'aide d'un distributeur automatique (Wheaton Instruments type Unispence II) réglé de manière à distribuer 20ml par boîte. L'évolution de l'hydrolyse du substrat en fonction de ces paramètres (suivi par le rapport R) est représenté sur la figure 19. Plus le substrat est concentré, moindre est la zone d'hydrolyse; moins la gélose est concentrée, plus la zone d'hydrolyse est grande. Une teneur en MDO2 de 5g/l associée à une concentration en gélose de 1,25% donne les meilleurs résultats.

Une première méthode pour réduire l'amplitude du screening aux amyloglucosidases consiste à augmenter la température à laquelle se déroule le test. Comme la souche ne croît guère au delà de 50°C et ne produit que peu d'enzyme à 45°C, il ne pouvait être question de pratiquer la culture en boîte de Pétri à la température de 60°C, optimum d'activité des amyloglucosidases. Par contre, une incubation limitée dans le temps, après la croissance de l'organisme, permet l'expression rapide de

Fig. 20: Influence d'une incubation de 14 heures à 60°C sur le rapport R
(R: diamètre de la zone d'hydrolyse/diamètre de la colonie).



l'activité enzymatique, accroissant la zone d'hydrolyse (fig. 20). Cette méthode a déjà été utilisée par Montenecourt et Eveleigh (1985) pour la sélection de mutants de *T. viride* hyperproducteurs de cellulases.

*** synthèse du pool enzymatique sur milieu solide

Alazard et Baldensperger (1982) ayant montré que la composition des complexes amyliques produits par *A. niger* en milieu liquide ou sur milieu solide pouvait varier, nous avons vérifié que tel n'était pas le cas dans notre test.

Pour récupérer les enzymes ayant diffusé dans le milieu gélosé, 100 cylindres sont prélevés à l'aide d'un emporte-pièce à la périphérie des colonies et transférés dans un tube à hémolyse contenant 5ml de tampon acétate 0,2M pH 4,5. Après une nuit à 4°C, le tampon débarassé des cylindres est récupéré et son activité dosée selon la méthode habituelle (annexe III); un filtrat de culture de 5 jours en milieu liquide sert de témoin. Le dosage est effectué à 60°C et 75°C pour évaluer le décalage éventuel de la température d'activité entre les deux types de complexes.

Le rapport d'activité à 75°C sur activité à 60°C est de $68,8\pm 6,8\%$ dans le cas de l'enzyme extrait du milieu gélosé, de $74,8\pm 8,9\%$ dans le cas de la culture en milieu liquide. La composition du complexe amyloglucosidasique ne semble donc pas être considérablement modifiée selon le type de culture envisagé, liquide ou solide. Dans un premier temps, les tests effectués en boîtes de Petri peuvent donc être utilisés.

b) Action du milieu sur la taille de la colonie

Un des moyens utilisables pour accroître la précision du test et permettre l'installation d'une plus grande quantité de colonies par boîte consiste à restreindre la taille des colonies.

Divers agents ont été utilisés dans ce but:

- le sorbose (Tatum et al., 1949)
- les sels biliaires (Papaviras, 1967; Montenecourt et Eveleigh, 1977)
- le rose bengale (Papaviras, 1967; Curl, 1967)
- le Phosphon-D (2-4 dichlorobenzyltributylphosphonium chlorure)
- les détergents non-ioniques comme la saponine (Ander et Eriksonn, 1975) ou le desoxycholate de sodium (Tatum, 1949)

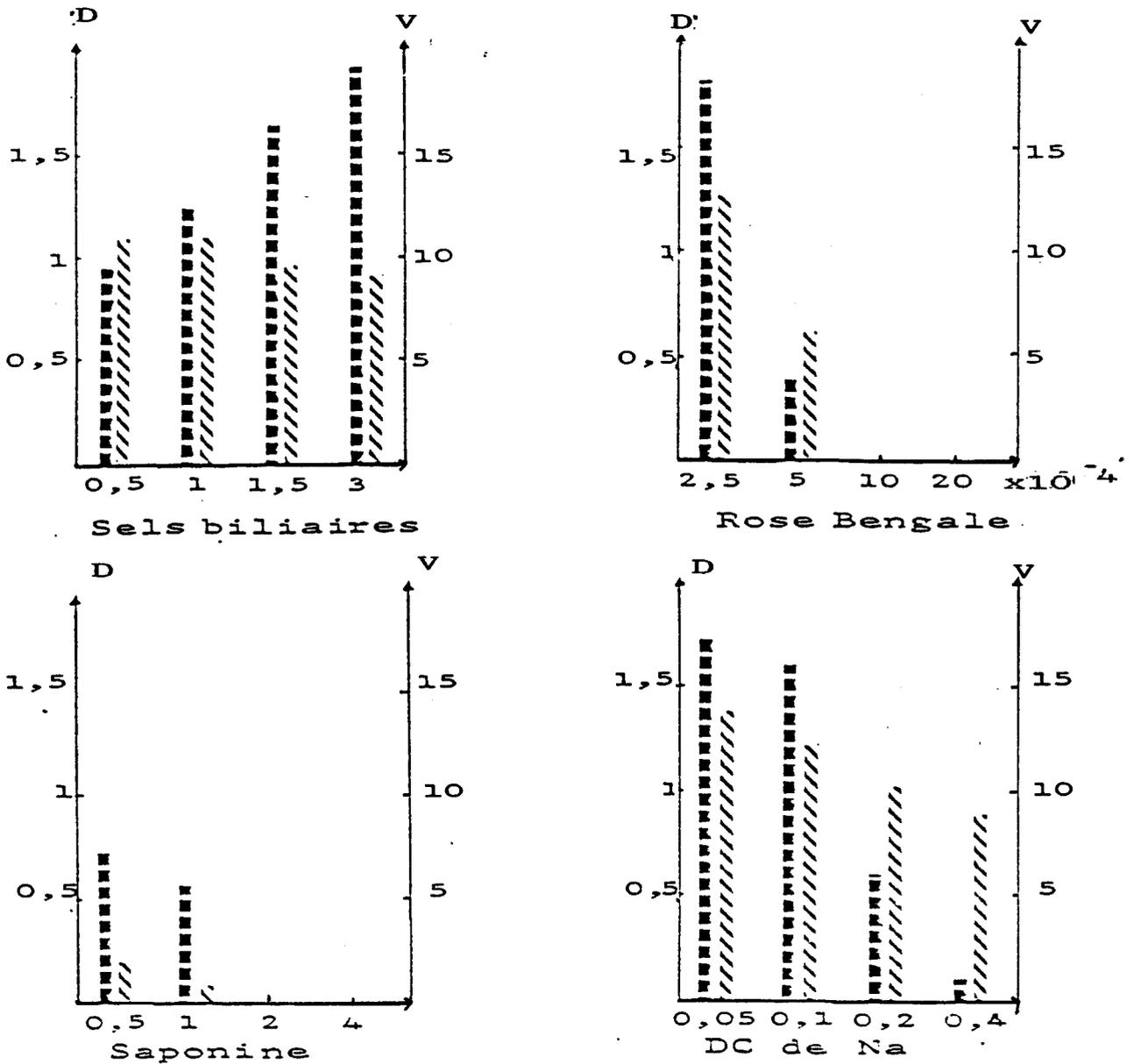
Plusieurs dizaines de colonies peuvent selon les souches ou espèces étudiées être observées dans une seule boîte de Pétri (Montenecourt et Eveleigh, 1977; Mack Intosh et Pritchard, 1963).

Le rose bengale est connu depuis son utilisation par Martin (1950) comme limitant la croissance des champignons. Les inconvénients liés à son utilisation résident dans la coloration du milieu (en général associée à celle des champignons) et la

Tab. 21 : Concentrations de restricteur de croissance utilisées

Restricteur de croissance	Organisme	Concentration utilisée	Références
Desoxycholate de sodium	A.nidulans	80 mg ml ⁻¹	Mac Intosh et Pritchard (1963)
	Phytophthora sp. T.viride Penicillium sp.	400 µg ml ⁻¹	Hankin et Anagnostakis (1975)
	T.viride	400 µg ml ⁻¹	Hankin et Anagnostakis (1977)
Rose bengale	Champignons filamenteux	30 mg ml ⁻¹ 40 à 100 mg ml ⁻¹	Booth (1971) Papaviras (1967)
	T.viride	1 à 2 mg ml ⁻¹ 1,5 mg ml ⁻¹	Papaviras (1967) Montenecourt et Eveleigh (1977)
Sels biliaires			
Saponine	Sporotrichum pulverulentum	80 µg ml ⁻¹	Ander et Eriksson (1976)

Fig. 21 : Influence de différentes concentrations en restricteurs de croissance sur la taille de la colonie et la viabilité des conidies de la souche P6.



Toutes les concentrations sont données en %.

■ ■ ■ Diamètre de la colonie en cm (D)

/// Nombre de colonies par boîte (V)

reprise de croissance après six jours d'incubation sur le milieu (Curl, 1967). Le produit est soluble dans l'eau et autoclavable.

Les sels biliaires ont été utilisés par Papaviras (1967) afin de réduire la taille des colonies de divers *Fusarium* et par Montenecourt et Eveleigh (1977) pour le même effet sur *T.viride*.

L'utilisation de la saponine par Ander et Eriksson (1976) permet d'obtenir une croissance en colonie chez *Sporotrichum pulverulentum* (*Phanerochaete chrysosporium*).

Le Phosphon-D a été choisi parmi quarante deux inhibiteurs de croissance par Curl (1967) pour inhiber la croissance de champignons isolés du sol par contre Montenecourt et Eveleigh (1975) ne l'utilisent pas, son action semblant limitée sur le *T.viride*.

Hankin et Anagnostakis (1975) utilisent le desoxycholate de sodium à une concentration de $400\mu\text{g ml}^{-1}$, concentration inhibant totalement la croissance des *Phytophthora* et réduisant de manière très prononcée celle de *T.viride*. Par contre, il était dégradé par *Fusarium oxysporum*, *F.lycopersici* et *Ustilago maydis* et n'entraînait pas de restriction de croissance chez les *Penicillium* tout en limitant la production d'enzymes pectiques. Son action antibactérienne est également signalée. Les doses d'inhibiteurs de croissance généralement utilisées sont consignées dans le tableau 21.

*Choix d'un restricteur de croissance et concentration utilisée

Nous avons essayé quatre des restricteurs de croissance précédemment utilisés par les auteurs pour réduire la taille des colonies de champignons filamenteux sur la souche P6 cultivée sur le milieu défini An.I. Les résultats sont consignés dans la figure 21.

Les concentrations choisies l'ont été à l'aide des données bibliographiques précédemment citées bien que chaque souche ou espèce présente une sensibilité propre à chaque restricteur de croissance. La létalité du restricteur a également été suivie, les étalements étant réalisés de manière à obtenir 15 colonies par boîte de Pétri.

Le rose bengale et la saponine dans la gamme de concentrations proposées inhibent très rapidement la croissance tout en entraînant une mortalité importante. Les sels biliaires entre 0,5 et 3% diminuent moins la taille des colonies, tout en restant très inférieure au témoin, problème déjà rencontré par Steiner et Watson (1965) avec certains détergeants non-ioniques. La létalité par contre, n'excède pas 33% dans la gamme proposée.

Le desoxycholate de sodium semble réaliser le meilleur compromis entre 0,2 et 0,1%; la létalité n'est pas trop importante alors que la taille des colonies diminue considérablement.

** effets possibles du desoxycholate de sodium

Le desoxycholate de sodium (DS) a initialement été utilisé par Tatum et al. (1949) pour induire une croissance coloniale de *Neurospora* et *Syncephalastrum*. Plus tard, Mack Intosh et Pritchard (1963) dans le but d'appliquer aux champignons filamenteux la technique de réplique velours de Lederberg et Lederberg (1952) l'ont également utilisé, leur publication faisant depuis référence. Les auteurs observent en plus de la restriction de taille des colonies une tendance à produire plus de conidies sur milieu minimum et moins sur milieu complet lors de l'adjonction de DS.

Tatum et col (1949) avaient montré que seuls les détergents anioiques entraînaient la croissance en colonie des champignons utilisés. Van Arkle (1958) indiquant qu'un alkyl-aryl-sulfonate induisait une croissance compacte chez *A.nidulans*, un certain nombre d'agents tensioactifs furent alors essayés pour leurs effets sur la morphologie des colonies, seuls le SDS et le DS permettaient à la fois d'obtenir une croissance limitée tout en n'affectant ni la viabilité ni la conidiogenèse. Mack Intosh et Pritchard (1963) mettent en évidence le phénomène: le tween 80 (non-ionique), le roccal (cationique) n'entraînaient pas la croissance compacte alors que le SDS (sodium dodecyl sulfate-anionique) se comporte comme le DS. Les auteurs ne cherchent pas à élucider le mécanisme d'action de DS tout au plus avancent-ils que la simple réduction de tension de surface du milieu de culture ne peut être tenue comme la seule cause de la croissance en colonie restreinte.

Un autre aspect touchant les détergents est la stimulation de la production d'enzymes par leur adjonction dans le milieu de culture (Jäger et al., 1985).

Reese et Maguire (1969) signalent chez plusieurs champignons filamenteux une augmentation de divers enzymes: cellulases, amylases, β -1,3 glucanases, xylanase, purine nucleosidase et benzolestérase. Récemment, la production de ligninase par *P.chrysosporium* en milieu liquide agité a été obtenue grâce à l'adjonction de Tween 80 dans le milieu (Asther et al., 1987). Cette action des détergents (tween 80 ou monopalmitate de sodium, tous deux détergents anioiques) fut interprétée comme n'étant pas liée à un seul changement de perméabilité cellulaire. En effet, l'effet bénéfique du tween 80 sur la synthèse d'enzymes varie d'un organisme à l'autre et pour différents enzymes d'un même organisme.

Divers enzymes ont été décrits comme pouvant être activés ou inhibés par certains détergents (deshydrogénases, lipases, phosphatases).

En conclusion, si les détergents présentent diverses propriétés intéressantes (restriction de la taille de colonies,

Tab. 22 : Action des restricteurs de croissance sur la production d'enzyme amyloglucosidasiques et la croissance .

Restricteur de croissance	Concentration utilisée (en %)	Poids sec de mycélium (g par fiole de Roux)	Activité du filtrat de culture (en U.I)
Sels biliaires	0,5	0,211 ± 0,032	0,246 ± 0,060
Rose bengale	$5 \cdot 10^{-3}$	0,940 ± 0,072	0,066 ± 0,022
Desoxycholate de sodium	0,175	0,282 ± 0,020	0,455 ± 0,032
Saponine	0,25	0,910 ± 0,041	0,169 ± 0,093
Témoin	-	0,860 ± 0,029	0,480 ± 0,110

Tab: 23 -PROCEDURE DE SELECTION

- 1 - Mutagenèse UV - 1% de survivants
- 2 - Etalement d'un échantillon de spores mutées et témoin: détermination du taux survie et des dilutions à employer pour obtenir 5 à 10 mutants par boîte
- 3 - Etalement des spores mutées et témoins sur milieu gélosé S modifié (source de carbone: MDO2 5 gl^{-1} , DS 0,175 %, gélose 13 gl^{-1}) de manière à obtenir 200 mutants
- 4 - Culture à 37°C pendant 5 jours
- 5 - Repiquage des souches sur milieu malt 15 gl^{-1} , DS 1 gl^{-1} à raison de 50 souches par boîte
- 6 - Mise en évidence des auréoles d'hydrolyse par une solution de lugol et détermination des meilleurs rapports d'hydrolyse
- 7 - Ensemencement des souches retenues en tubes 25 x 200 pour production de spores et conservation. Culture pour la production de spores 3 jours à 45°C
- 8 - Culture en fioles de Roux et dosage de l'activité amyloglucosidasiqne après 5 jours de culture.

excrétion ou synthèse améliorée d'enzymes, activation ou inhibition d'enzymes), les causes exactes de ces phénomènes restent encore à élucider.

*** évaluation de l'effet de différents restricteurs de croissance sur la production d'enzyme

Avant d'effectuer un choix définitif nous avons voulu nous assurer de l'action de ces divers agents en milieu liquide sur la production d'amyloglucosidase.

Les sels biliaires et le desoxycholate de sodium entraînent seuls une perte légère de production enzymatique en fiole de Roux (tableau 22); cultivé en Erlenmeyer, le champignon produit très peu d'enzyme sur le milieu utilisé. De plus, ils apparaissent seuls comme des restricteurs de croissance au regard du poids de matière sèche.

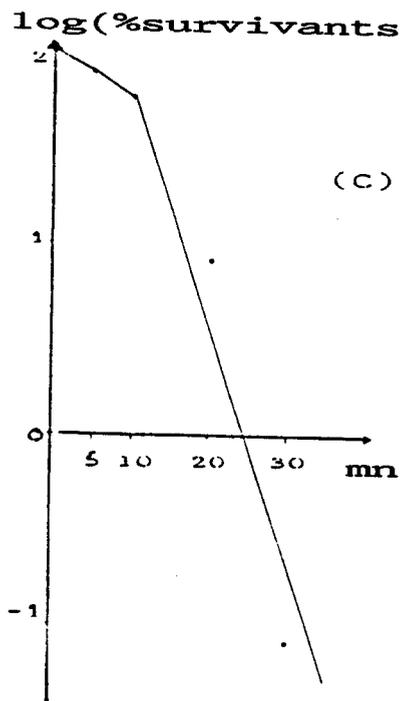
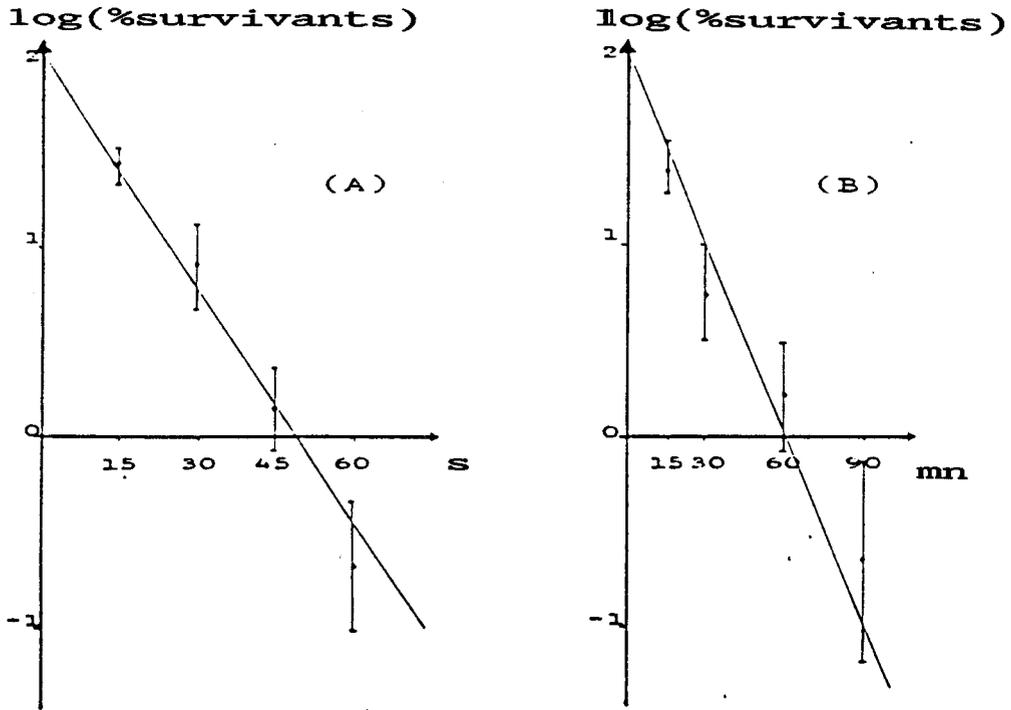
En conséquence, le desoxycholate de sodium a été retenu pour le reste de l'étude comme agent de restriction de croissance.

C.- PROCEDURE DE SELECTION UTILISEE

Les auteurs cités dans la première partie de chapitre consacrée à l'amélioration de production (Kuck et Kidby, 1984, Nevalainen et Palva, 1979, Grigorov, 1982) ont en général testé plusieurs centaines de souches en une étape. Nous avons préféré suivre une procédure type, proposée par Davies (1964), à savoir une sélection opérée en deux étapes avec réduction successive du nombre de souches de 200 à 20 puis 3. 200 souches correspondent environ à 40 boîtes de Pétri, 5 souches en moyenne par boîte pouvant être testées (compte tenu du diamètre des colonies et du chevauchement des auréoles d'hydrolyse.

Le deuxième stade de sélection mené après culture en fioles de Roux peut s'appliquer sur 10 à 20 souches avec trois répliquations par souche. Le choix final portant sur 2 à 3 souches soit 1 à 1,5% de la population initiale de mutants. Le résumé des différentes étapes de la sélection figure dans le tableau 23.

Fig. 22: Survie des conidies de la souche P6 après une étape de mutagenèse.



Légende : (A): UV; (B): NTG; (C): EMS.

III. RESULTATS DE LA MUTAGENESE ET DE LA SELECTION

A.- OBTENTION DE MUTANTS

1.- Mutagenèse U-V

Des conidies de la souche P6 sont recueillies sur des cultures âgées de cinq jours (incubation à 45°C, milieu de sporulation décrit dans le chapitre "matériel et méthodes") et la suspension conidienne est amenée à 10^7 conidies par ml. Celle-ci est alors soumise à une irradiation par rayons ultraviolets (10 Wm^{-2} , 254 nm, lampe Philips TUV 15W G15T8) pendant une durée de temps conduisant à un taux de survie compris entre 1 et 10%. Toutes les manipulations sont réalisées sous lumière rouge (tube Philips TL 40W/15) pour éviter tout phénomène de photoréactivation.

Un premier ensemencement est effectué en vue d'établir les dilutions nécessaires à l'obtention d'un nombre de colonies inférieur ou égal à 10 par boîte. Les spores sont conservées le temps de la première lecture à 18°C et à l'obscurité.

2.- Mutagenèse NTG

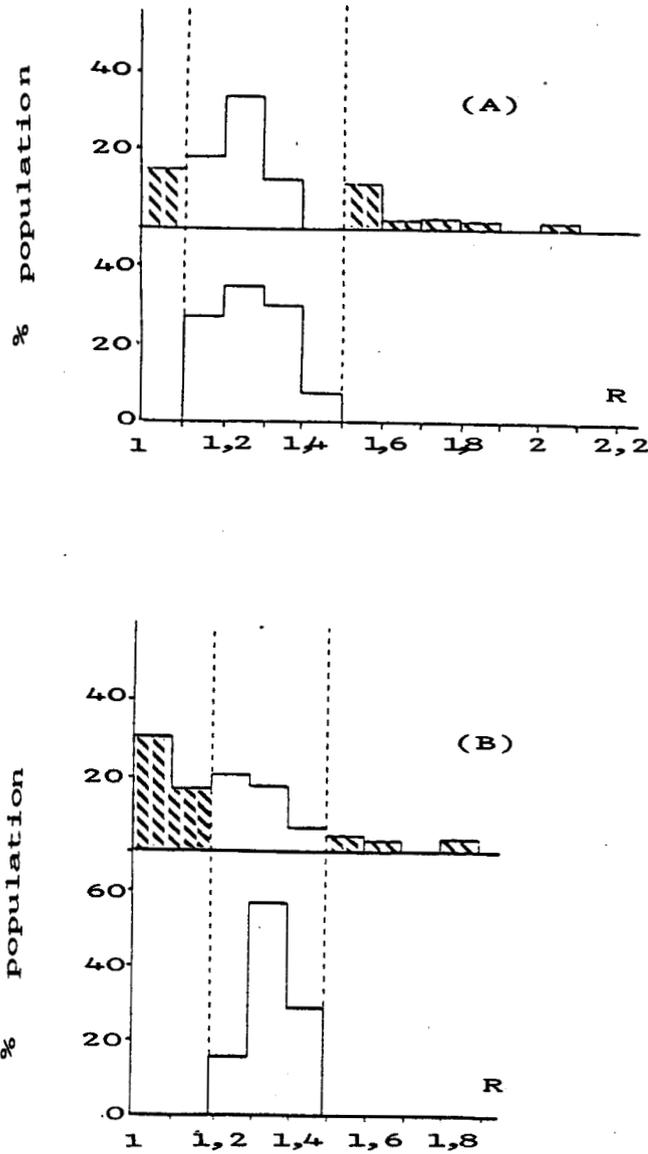
La procédure de Simpson et Caten (1979) a été utilisée pour le traitement des conidies au N-méthyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (NTG). 10 ml de la suspension conidienne obtenue comme précédemment (amenée à 5.10^7 conidies par ml) dans un tampon phosphate 0,05 M pH 6 sont pipetés dans un flacon de 50 ml et 2 mg de NTG dissous dans 10 ml du même tampon sont ajoutés pour commencer le traitement. La concentration finale en NTG est donc de 100 µg par ml. Pendant la mutagenèse, la suspension conidienne est incubée dans un bain-marie agité à 37°C. Des échantillons de 2 ml sont prélevés à intervalles réguliers; les conidies sont lavées deux fois par centrifugation dans de l'eau stérile avant dilution et étalement sur boîte de Pétri.

3.- Mutagenèse EMS

La mutagenèse de conidies à l'éthyl-méthane-sulfonate (EMS) a été menée suivant les indications de Hopwood (1970) et Simpson et Caten (1979). 13,5 ml de suspension conidienne (amenée à 5.10^7 conidies par ml) dans un tampon phosphate 0,01 M pH 7 sont placées dans un flacon de 50 ml, le traitement débutant par l'adjonction de 1,5 ml d'EMS (Kodak). Le flacon est incubé de la même manière que pour le traitement au NTG. Des échantillons de 2 ml sont prélevés à intervalles appropriés et l'agent mutagène est dilué dans une solution de thiosulfate de sodium 0,16 M pour l'inactiver avant étalement sur boîte de Pétri.

Les résultats de ces étapes de mutagenèse sont consignés dans la figure 22.

Fig. 23: Distribution des mutants hyperproducteurs potentiels suivant l'agent mutagène utilisé.



Légende (A): NTG, (B): UV, R: rapport du diamètre de l'auréole d'hydrolyse au diamètre de la colonie.

Partie supérieure des graphes : population de mutants,
Partie inférieure des graphes : population témoin.

B.- AMELIORATION DE PRODUCTION

1.- Premiers essais

* Evaluation de la distribution des mutants selon l'agent mutagène

Cette évaluation est représentée sur les graphes A (mutagenèse NTG) et B (mutagenèse UV) de la figure 23. Le critère choisi pour l'évaluation de l'amélioration de production est le rapport R précédemment défini. Dans les deux cas, le mutagène utilisé provoque l'apparition de mutants hypo ou hyper producteurs potentiels. Au vu des données de la bibliographie (facilité d'utilisation des UV, modifications génétiques très importantes pour le NTG), les UV ont été utilisés pour ce but de l'étude.

* Evaluation du test

De nombreuses souches sélectionnées comme hyperproductrices selon le test ne confirment pas les prédispositions d'hyperproducteurs lors des étapes de vérification de production (culture en milieu liquide).

Ce décalage entre le test réalisé en boîte de Pétri sur milieu gélosé et la culture en milieu liquide se rencontre fréquemment dans la littérature. Meyrath et al (1971) utilisent un test en boîte de Pétri sur milieu solide pour la mise en évidence d'hyper producteurs d'alpha-amylase chez *A. oryzae*. Ils insistent sur la différence fondamentale qui existe au niveau de l'inoculum utilisé:

- 10^7 conidies pour 100 ml de milieu liquide de production
- 1 conidie pour le test en boîte

et attribuent la discordance entre test et production par l'accumulation de produits métaboliques dans le milieu dépendant du nombre de conidies en germination par unité de volume.

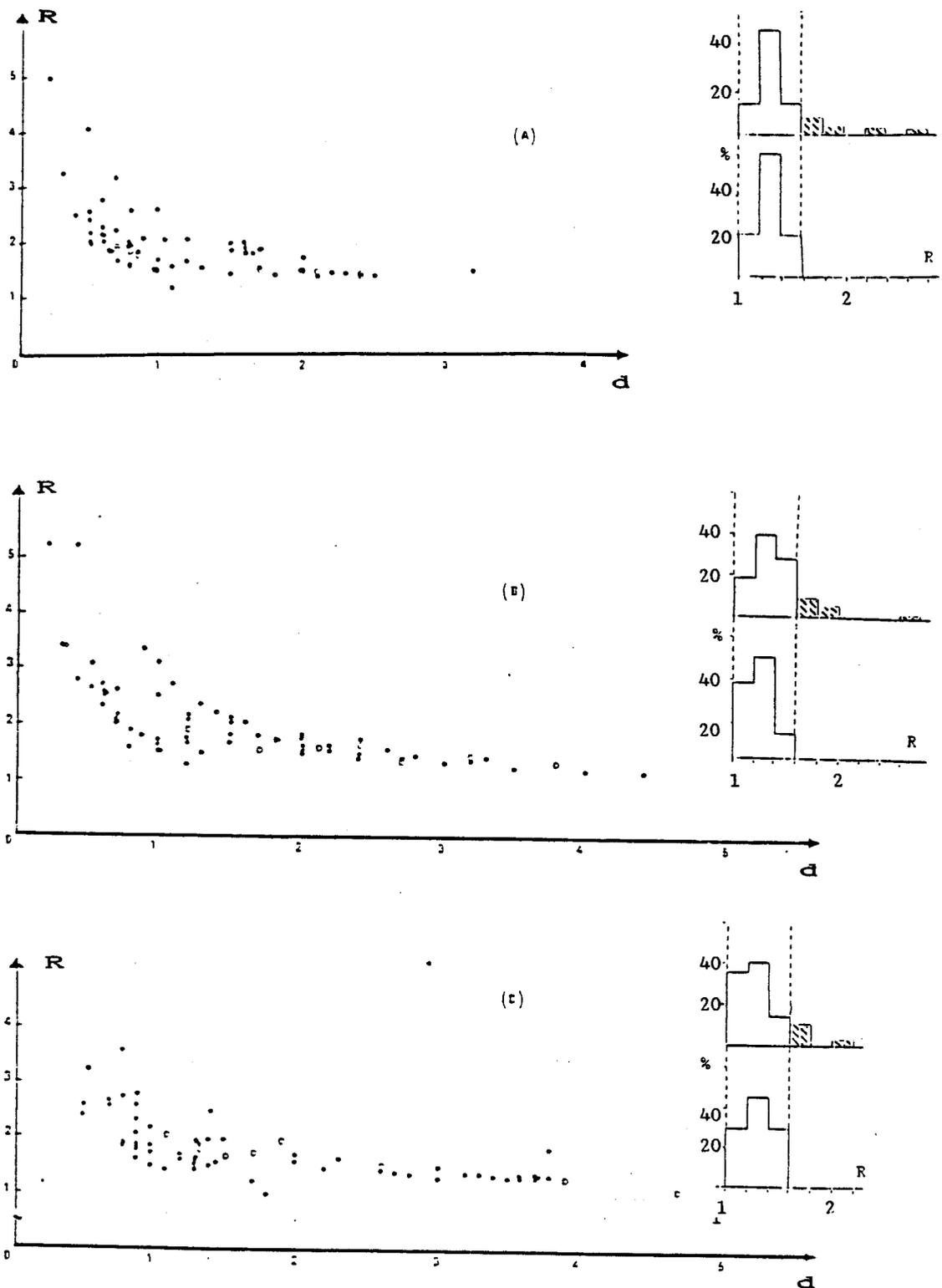
Si ce type d'hypothèse n'est pas à écarter, la discordance entre test en boîte et culture peut provenir de 2 facteurs:

- erreur de sélection au niveau du test
- problème de passage à grande échelle de culture.

Le test peut ne pas conduire à sélectionner les meilleures souches pour les diverses raisons décrites dans la partie bibliographique. Si tel est le cas, une modification du test ou de son interprétation peut éventuellement améliorer la sélection.

Le problème du passage à une grande échelle de culture est par contre incontournable, la différence entre les deux types de culture (test en boîte de Petri et culture en fermenteur) étant considérable. Nous avons dans un premier temps examiné la première hypothèse à l'aide de populations de mutants issues de la première étape de mutagenèse. Si les graphes indiquant la distribution des mutants suivant le rapport R utilisé dans le test montraient toujours qu'un certain pourcentage de la

Fig. 24.: Dépendance des rapports R (diamètre des auréoles d'hydrolyse/diamètre de la colonie) par rapport au diamètre des colonies.



Graphes réalisés à l'aide des mutants des souches N2(A), N8(B), N2(C) soumis à mutagenèse UV 10Wm^{-2} pendant 60 secondes.

en abscisse (d) diamètre des colonies, en ordonnée rapport R

Chaque figure adjointe à droite des graphes correspond à la distribution des populations selon le rapport R (partie inférieure: population témoin, partie supérieure: population mutant).

population possédait un rapport supérieur à celui de la population témoin, les productions ne suivaient pas ce pourcentage. Un autre type de représentation a été adopté mettant en relation le rapport R et le diamètre des colonies (fig. 24).

Il est à remarquer la dispersion très importante des tailles des colonies après l'étape de mutagenèse (de 0,1 à 4,5cm) supérieure à celle des témoins. Ces graphes indiquent la dépendance du rapport R par rapport à d: plus d (le dénominateur du rapport) diminue plus R augmente. Deux limites existent, définies par la technique de mesure: limite inférieure de $R=1$, aucune souche ne présente de diamètre d'auréole d'hydrolyse inférieur au diamètre de colonie, limite inférieure de $d=0,1$ cm diamètre minimal de croissance permettant une mesure. Toute sélection fondée uniquement sur le seul rapport R entraîne la conservation pour les étapes ultérieures de souches à faible diamètre de colonie sans avantage quant à la production d'enzyme (fig. 25) (A B C D, souches composant la courbe moyenne, HIJK rapport supérieur au rapport de la souche mère mais en dessous de la courbe moyenne). Par contre, de nombreux organismes à potentiel intéressant sont abandonnés du fait de leur diamètre de colonie moyen à élevé (EFG). La sélection menée tend donc à conserver des souches à potentiel incertain, la plupart d'entre elles étant caractérisées par un diamètre de colonie faible, inférieur au cm en 5 jours de croissance à 37°C sur le milieu utilisé.

La dispersion des tailles des colonies joue ici un rôle critique dans le test. Ce facteur intervenait nettement moins dans le cas des expériences Ho et Foster (1971) ou Ewaran et Nga (1978) la dispersion des tailles de colonies étant très limitée . Dans ce cas de dispersion faible, le critère de sélection repose pratiquement uniquement sur la taille de l'auréole d'hydrolyse ce qui n'est pas envisageable dans notre cas. Une solution pour éviter ce travers du test peut consister pour chaque échantillon de mutants obtenu à tracer la courbe $R=f(d)$ et ne sélectionner que les souches dont le rapport R se situe nettement au-dessus de la courbe moyenne de la population.

Seize mutants sélectionnés par un R supérieur au R moyen de la population et un diamètre de colonie supérieur à un cm (originaires de mutants des souches précédemment citées) ont été cultivées en fioles de Roux afin de déterminer l'activité amyloglucosidase du filtrat de culture.

Les résultats consignés sur la figure 26 montrent que quatre souches à R élevé ne produisent que peu d'enzyme. Cette faible production est à mettre sur le compte de la production très limitée de spores de ces mutants sur notre milieu, l'ensemencement dans ces cas de figure étant réalisé avec un inoculum très faible. De telles souches bien que présentant un rapport R favorable ne pourront plus être retenues.

En conclusion, la recherche de mutants présentant une production d'amyloglucosidase améliorée peut être envisagée par

Fig. 25: Identification des mutants hyperproducteurs potentiels. Explications dans le texte.

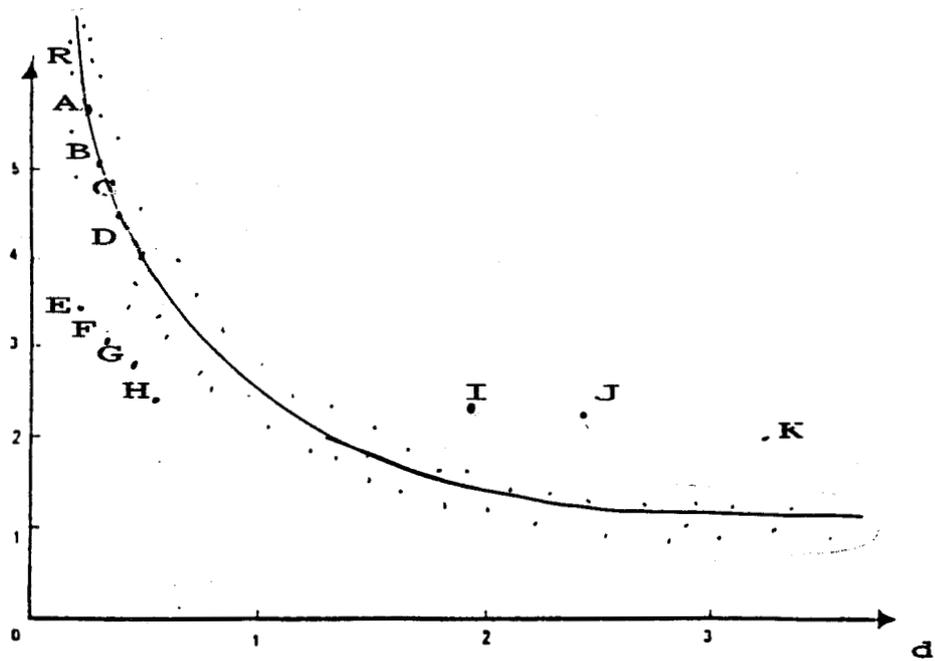


Fig. 26: Production d'amyloglucosidase par seize mutants hyperproducteurs potentiels.

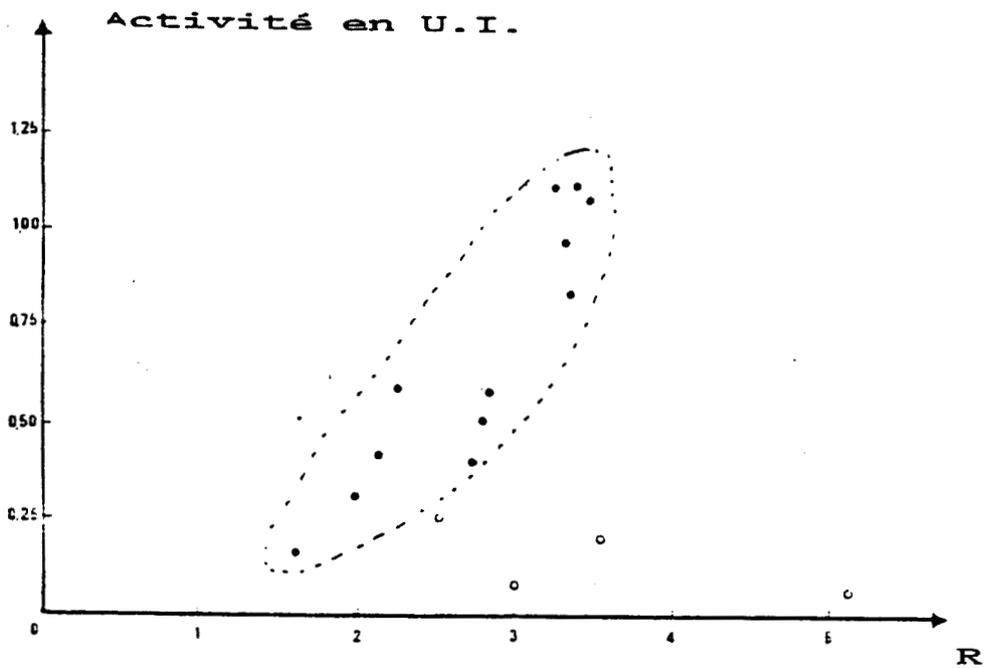


Fig. 27: Amélioration de la production d'enzymes amyloglycosidasiques chez les mutants de la souche P6.

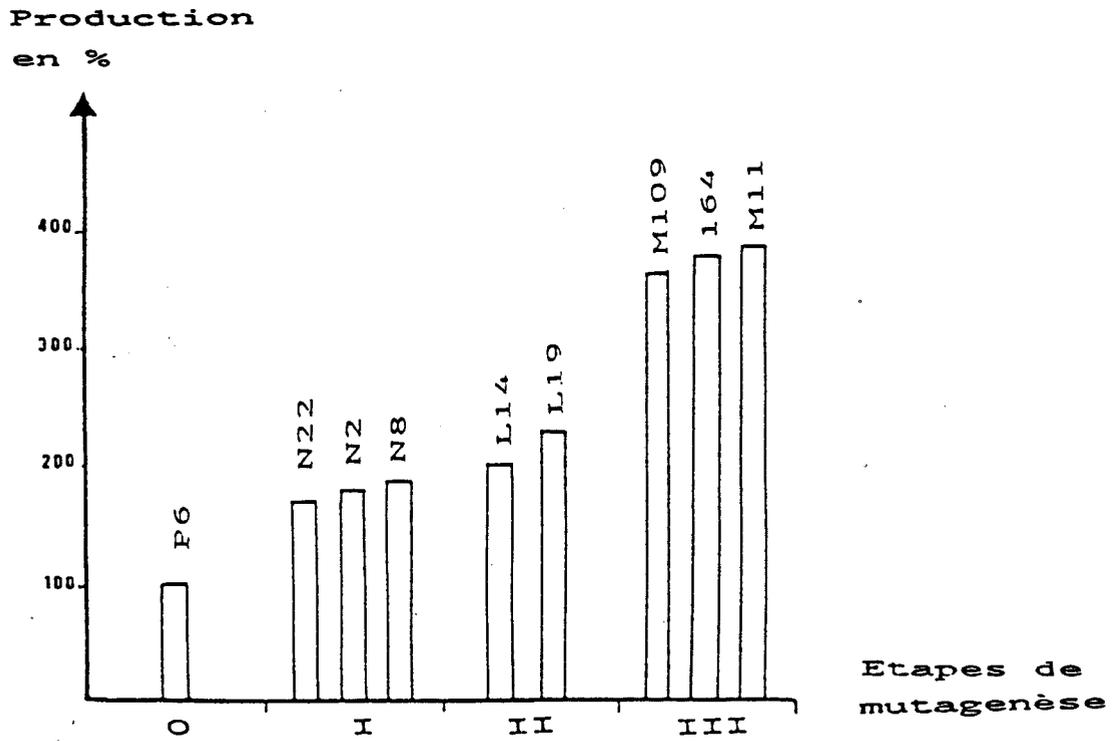
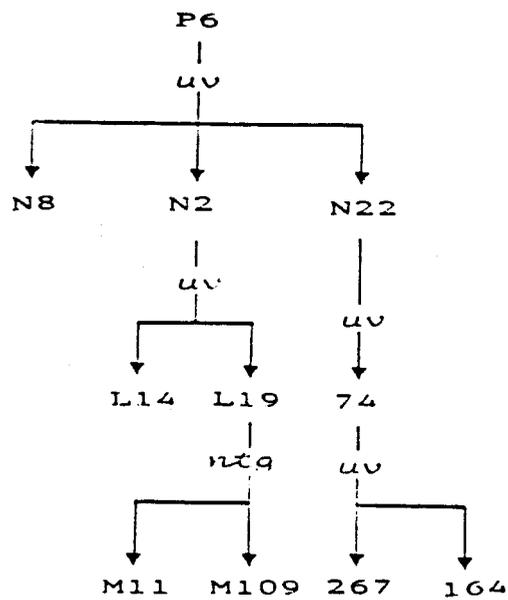


Fig. 28 : Voies de mutation et agents mutagènes utilisés durant la sélection.



le test de Ho et Foster (1971) à condition de:

- sélectionner les souches non seulement sur la seule valeur R mais par rapport à la courbe moyenne de l'échantillon,
- ne pas retenir les souches à conidiogénèse trop faible

2.- Résultat de la sélection

Les étapes mutagenèse et la sélection adoptée nous ont permis d'isoler trois mutants (M109, 164, M11) présentant une amélioration de production comprise entre 200 et 300% (figure 27). Les voies de mutation et sélection suivies sont schématisées sur la figure 28.

Le nombre de souches testées durant ces trois étapes a été voisin de 1000 (à raison de 200 souches par étape de mutagenèse sur les souches P6, N2, N22, L19 et 74 comme indiqué dans le protocole choisi).

Les souches L14 et L19 n'ont pu produire de souches à production améliorée après mutagenèse UV, aussi le NTG a-t-il été utilisé pour poursuivre les étapes de sélection à partir de ces souches. Il est à remarquer que les UV ont néanmoins permis une amélioration de production quasi identique pour les souches issues de la souche N22.

Cette amélioration ne peut être considérée que comme une étape, les chiffres de production restant encore très inférieurs à ceux des souches productrices de l'industrie (d'un facteur 10 environ). Diverses modifications peuvent être envisagées dans ce but (augmentation du nombre de souches testées par étape, changement d'agent mutagène, diminution du taux de survie). Il est à remarquer cependant que cette faible amélioration peut être le reflet d'une prédisposition limitée de l'organisme à être muté en vue d'une hyperproduction d'enzymes. La sélection a toutefois été menée sur un milieu qui n'a pas été optimisé en vue de la production, cette dernière pourrait donc s'en trouver nettement améliorée. D'autre part, les autres souches de *Th. crustaceus* isolées durant la première sélection resteraient éventuellement à tester en vue de sonder les potentialités de l'espèce.

CONCLUSION

Ce chapitre consacré à l'amélioration génétique de la production d'amyloglucosidase par voie de mutagenèse et sélection nous a permis de dégager certains points essentiels.

L'utilisation d'un test mettant en jeu la diffusion de l'enzyme dans le milieu de culture gélosé du champignon a tout d'abord été retenu parmi les tests en milieu liquide ou sur milieu solide envisagés.

Le choix de ce test s'est effectué au vu de sa conception simple (sélection des souches selon le rapport diamètre d'hydrolyse de la MD02 sur diamètre de la colonie) et de manipulations limitées. La mise au point du test a néanmoins

montré l'importance des paramètres intervenant sur la taille de la zone d'hydrolyse.

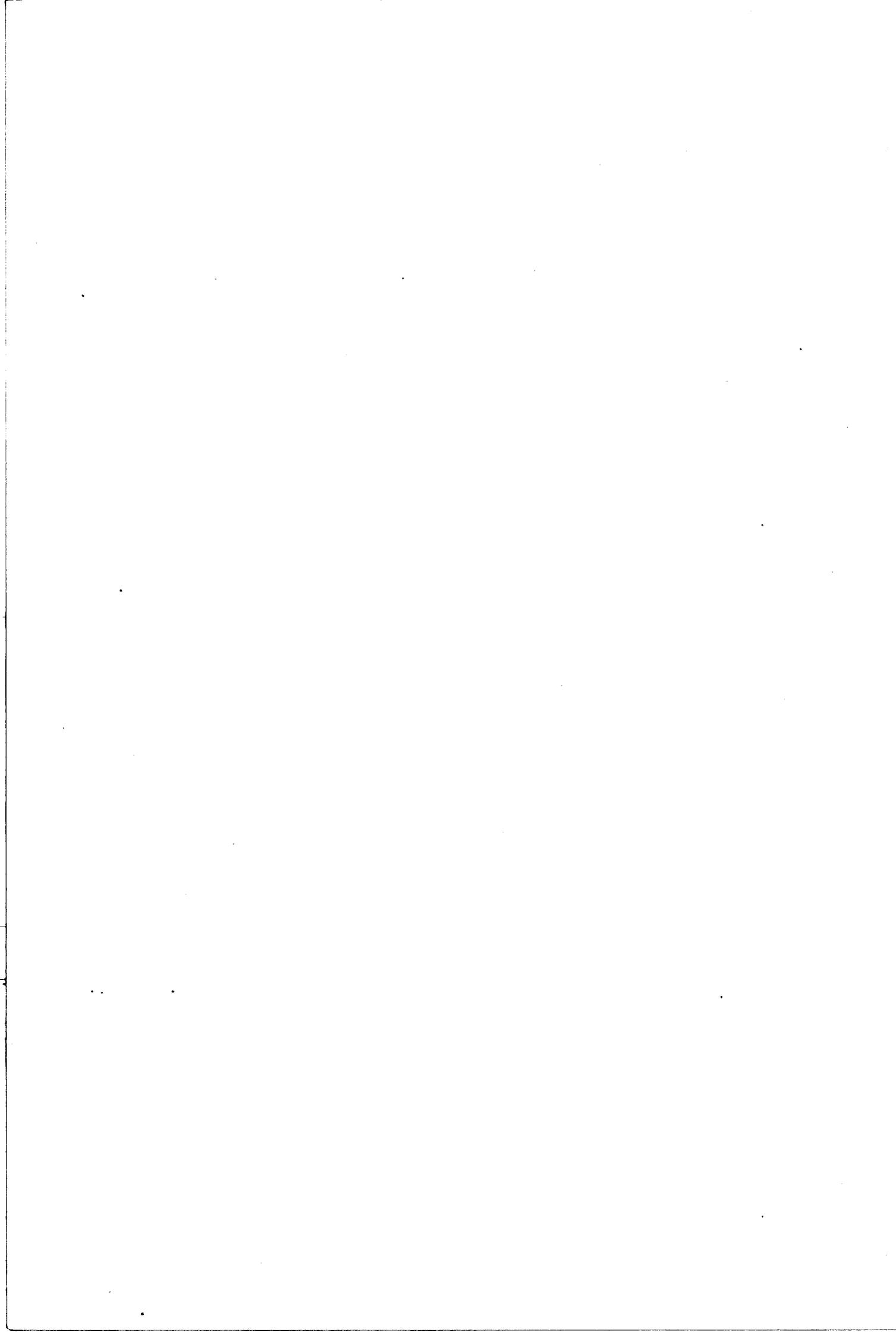
Le desoxycholate de sodium a été choisi comme restricteur de croissance pour permettre la détection de plusieurs souches par boîte, ce détergent n'ayant que peu d'effet sur la synthèse ou l'activité de l'enzyme et sur la viabilité des conidies du *Th. crustaceus*.

Les UV ont été choisis pour commencer les étapes de mutagenèse en raison de leur sécurité d'emploi et leur formation d'un spectre de mutants satisfaisant. Les premiers essais ont montré qu'un nombre élevé de souches apparemment intéressantes ne confirmaient pas le résultat du test lors de cultures en milieu liquide. A l'analyse, il s'est avéré que le type de sélection utilisé, fondé sur le rapport diamètre d'hydrolyse du substrat sur diamètre de la colonie privilégiait les colonies de petites tailles parmi les mutants sans que celles-ci présentent une amélioration réelle de production. La très grande dispersion des tailles des colonies semble à l'origine de cet artéfact.

Il est suggéré pour l'utilisation de ce test de représenter graphiquement le résultat de l'étape de mutagenèse, en utilisant les paramètres R et le diamètre des colonies et ne sélectionner que les souches dont le rapport R se situe au dessus de la courbe moyenne des rapports R de la population. Les souches à conidio-genèse diminuée doivent par ailleurs être écartées, l'inoculum pour celles-ci pouvant devenir un facteur limitant en milieu liquide.

Une amélioration comprise entre 200 et 300% a été obtenue pour quelques souches après trois étapes de mutagenèse. Cette amélioration reste toutefois encore insuffisante en vue d'une production industrielle. L'optimisation du milieu de culture comme des modifications du protocole expérimental de mutagenèse peuvent néanmoins permettre éventuellement une amélioration supplémentaire de production; Au cas où la souche ne devienne réfractaire à toute nouvelle mutagenèse, le recours aux autres souches de la même espèce isolées lors de la première partie de l'étude permettrait d'envisager une solution à cette difficulté.

A ce stade de l'étude, il semblait nécessaire de mieux appréhender les propriétés enzymatiques du complexe amyloglucosidasique excrété par *Th. crustaceus*. La détermination exacte du ou des enzymes responsables de la thermostabilité, leurs propriétés physico-chimiques ainsi que le comportement du complexe en conditions de saccharification constitueront les points principaux de cette étude.



C H A P I T R E I I I

ETUDE ENZYMOLOGIQUE DU COMPLEXE
AMYLOGLUCOSIDASIQUE DE
T. CRUSTACEUS

C H A P I T R E I I I

ETUDE ENZYMOLOGIQUE DU COMPLEXE
AMYLOGLIUCOSIDASEIQUE DE
T. CRUSTACEUS

INTRODUCTION

Une analyse succincte des produits d'hydrolyse de divers substrats par le complexe enzymatique de *Th. crustaceus* nous a permis de mettre en évidence au moins deux enzymes possédant une activité amyloglucosidasique (une alpha-glucosidase et une amyloglucosidase). L'étude bibliographique qui suit est consacrée à la description des techniques usuelles de purification de ces deux enzymes ainsi que de leurs caractéristiques physico-chimiques. La deuxième partie du chapitre est dévolue à l'étude enzymologique du complexe amyloglucosidasique du *Th. crustaceus*. (P6).

I. - ETUDE BIBLIOGRAPHIQUEA. - PURIFICATION DES AMYLOGLUCOSIDASES ET ALPHA-GLUCOSIDASES
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

La récupération et la purification de l'amyloglucosidase fongique sont relativement aisées, l'enzyme étant extracellulaire et généralement stable. Initialement, les amyloglucosidases d'*A. niger* et *Rhizopus delemar* étaient purifiées par précipitation par le sulfate d'ammonium, suivi d'un traitement acide afin d'éliminer les traces d'alpha-amylase (Philipps et Caldwell, 1951). Plus récemment, des combinaisons de différentes procédures telles que l'adsorption sur amidon brut, le fractionnement au sulfate d'ammonium, la gel-filtration et la chromatographie d'échange d'ions ont été appliquées avec succès à la purification des amyloglucosidases de nombreux champignons filamenteux principalement issus du genre *Aspergillus* (Manjunath et al., 1983). Les amyloglucosidases de levures ont pu être purifiées en utilisant les mêmes méthodes (De Mot et al., 1985). Des techniques utilisant une chromatographie d'affinité ont été plus récemment introduites (Paszczynski et al., 1982; Monna et al., 1987).

Les purifications d'alpha-glucosidases utilisent les mêmes procédés préparatifs (Reese et al., 1968; Chiba et al., 1973, Yamasaki et al., 1976, 1977), les deux types d'enzyme se trouvant parfois présents de manière simultanée chez les champignons (Yamasaki et al., 1977).

La procédure type proposée par Manjunath et Raghavendra Rao (1979) est simple et implique trois étapes:

- une concentration par ultrafiltration (cellule Amicon équipée d'une membrane P10)
- une chromatographie de gel-filtration
- une chromatographie d'échange d'ions

Tab. 24: Mise en évidence de multiples formes d'amyloglucosidases chez certains champignons filamenteux.

ORGANISMES	Nbre D'AMYLOGLUCOSIDASES	REFERENCES
Aspergillus awamori	une	Yamasaki et al. (1977)
Aspergillus niger	une	Manjunath et Raghavendra Rao (1979)
Schizophyllum commune	une	Schwalb et Jansons (1973)
Aspergillus awamori	deux	Manjunath et Raghavendra Rao (1979)
Aspergillus candidus	deux	" " "
Aspergillus foetidus	deux	" " "
Aspergillus hennebergii	deux	Alazard et Baldensperger (1982)
Aspergillus phoenicis	deux	Lineback et Bauman (1971)
Aspergillus niger	deux	Pazur et al. (1971)
Rhizopus sp.	deux	Ueda et Kano (1975)
Aspergillus niger	trois	Flemming et al. (1969)
Aspergillus oryzae	trois	Mitsue et al. (1979)
Rhizopus sp.	trois	Takahashi et al. (1985)
Aspergillus oryzae	quatre	Morita et al. (1969)

Pazur et Ando (1959) ont les premiers décrit deux fractions actives d'amyloglucosidase après chromatographie d'échange d'ions du système amylosique d'*A.niger*. Depuis, une à quatre formes d'amyloglucosidase ont pu être mises en évidence selon les espèces ou souches étudiées (tableau 24). Les alpha-glucosidases peuvent également présenter plusieurs formes: ainsi deux alpha-glucosidases sont mises en évidence chez *Paecilomyces varioti* et *Penicillium parvum* (Reese et al., 1968), trois chez *A.awamori* (Yamasaki et al., 1977) ou *A.fumigatus* (Rudick et Elbein, 1974). Chez les levures, la fraction alpha-glucosidasique peut être subdivisée en deux parties très différentes, l'une active sur le maltose, la seconde sur l'isomaltose (Khan et Eaton, 1967, Loi et Axelrod, 1974).

La plupart des auteurs s'accordent pour dire que les multiples formes rencontrées ne proviennent pas des procédures de purification. Smiley et al., (1971) et Pazur et al., (1967) ont désigné ces multiples formes comme des isoenzymes.

Différentes hypothèses ont été énoncées pour expliquer la multiplicité des formes de l'amyloglucosidase.

La première lie la composition du milieu de culture aux synthèses des différentes formes. Barton et al., (1969) montrent ainsi que si le milieu de culture contient du glucose et du chlorure d'ammonium seule l'amyloglucosidase I est synthétisée. *C.pelliculosa* produit deux amyloglucosidases lorsque le milieu de culture contient de l'amidon ou des dextrines de bas dextrose équivalent (ou D.E.), une seule amyloglucosidase dans le cas de dextrines à haut D.E. (Kawamura et Samai, 1968). Alazar et Baldensperger (1982) mettent en évidence deux amyloglucosidases chez *A.hennebergi* lors de cultures en milieu solide, une seule en milieu liquide, la proportion des trois amyloglucosidases excrétées par *A.oryzae* varie de même considérablement selon que l'on cultive le champignon en milieu solide ou liquide (Saha et al., 1978).

Hayashida a le premier émis l'hypothèse d'une digestion "in vitro" d'une amyloglucosidase native créant ainsi les diverses formes rencontrées. En effet, *A.awamori* cultivé en milieu liquide agité produit trois amyloglucosidases (I, I' et II). L'amyloglucosidase I est formée lorsque le champignon croît sur un milieu privé de zinc, les deux autres lorsque le zinc est présent. En l'absence de zinc, la production de protéase est réprimée et l'amyloglucosidase I est protégée de la protéolyse. Yoshino et Hayashida (1978) ont traité l'amyloglucosidase I avec la "pronase" (une préparation commerciale enzymatique de protéase) et obtiennent à partir de l'amyloglucosidase I les formes I' et II. Les auteurs concluent qu'une activité protéasique est la cause probable des différentes formes. Manjunath et al., (1979) ne décèlent par contre aucune activité protéolytique dans les préparations commerciales d'enzyme mais les protéases peuvent être inactivées dans de telles préparations.

Tab.25: Poids moléculaires des amyloglucosidases et alpha-glucosidases

Amyloglucosidases (d'après Manjunath et al., 1983)

Organisme	POIDS MOLECULAIRES		Références
	Amyloglucosidase I	Amyloglucosidase II	
A.foetidus	75,000	54,000	Lineback et al. (1972)
	78,000	60,000	Manjunath et al. (1979)
A.awamori	71,600	67,500	Smiley et al. (1971)
A.oryzae	69,000		Ohga et al. (1966)
A.phoenicis	62,000		Lineback et Bauman (1970)
A.niger	99,000	112,000	Pazur et al. (1971)
A.niger 1	79,000	72,000	Manjunath et al. (1979)
A.niger 2	79,000	60,000	Manjunath et al. (1979)
A.niger 3		60,000	Manjunath et al. (1979)
A.niger	65,000	55,000	Svensson et al. (1982)
A.candidus	75,000	60,000	Manjunath et al. (1979)
A.saitoi	90,000	70,000	Inokuchi et al. (1981)
R.delemar	100,000		Pazur et Okada (1967)
R.javanicus	48,000		Watanabe et Fukimbara (1973)
M.rouxianus	59,000	49,000	Tsuboi et al. (1974)
C.cerebella	48,000		King (1967)
Endomyces sp.	55,000		Hatori et Takeuchi (1961)

Alpha-glucosidases

Organisme	POIDS MOLECULAIRES		Références
	Alphaglucosidase I	Alphaglucosidase II	
A.awamori	125000	140000	Yamasaki et al. (1977)
A.flavus	63000		Olutiona (1981)
A.fumigatus	63560		Rudick et Elbein (1974)
M.racemosus	114000	97000	Yamasaki et al. (1977)
P.purpurogenum	120000		Yamasaki et al. (1976)
S.cerevisiae	68500	64700	Khan et Eaton (1967)
S.logos	270000		Chiba et al. (1973)

Tab. 26: Structure secondaire de certaines amyloglucosidases calculée de différentes manières (Shenoy et al., 1985).

ORGANISME	STRUCTURE II %		
	α	β	γ
A.niger			
Greenfield and Fasman (1969)	15	40	45
Provencher and Glockner (1981)	31	36	33
Chen and Yang method (1971)	18	43	39
METHODE			
A.candidus			
DE			
Greenfield and Fasman (1969)	16	33	51
Provencher and Glockner (1981)	34	24	42
CALCUL			
Chen and Yang method (1971)	17	38	45
Rhizopus sp.			
Greenfield and Fasman (1969)	15	35	50
Provencher and Glockner (1981)	32	33	35
Chen and Yang method (1971)	15	38	47

Le séquençage des deux amyloglucosidases d'*A.niger* a montré que l'amyloglucosidase I était allongée dans la région terminale COOH par un fragment peptidique manquant dans l'amyloglucosidase II (Svensson et al., 1982). Boel et al., (1984) ont récemment mis en évidence deux mRNA codant pour chaque amyloglucosidase d'*A.niger*; le mRNA GI (initiant l'amyloglucosidase I) contient une séquence de 169 paires de bases pouvant être épissée pour donner le mRNA de l'amyloglucosidase II un seul gène étant à l'origine des deux types de mRNA.

L'absence de données relatives aux autres espèces étudiées ne permet pas encore de généraliser le résultat de cette démonstration mais elle peut être considérée comme une hypothèse très intéressante pour comprendre l'existence de multiples formes d'amyloglucosidases. Svensson et al. (1986) suggèrent néanmoins d'après leurs observations que l'amyloglucosidase I provient d'une protéolyse limitée d'une amyloglucosidase de plus haut poids moléculaire. Ils n'excluent pas non plus la possibilité d'intervention des deux phénomènes: épissage de mRNA ou protéolyse, suivant les conditions culturelles.

B.- PROPRIETES PHYSIQUES

1.- Poids moléculaire

La plupart des amyloglucosidases connues possèdent des poids moléculaires compris entre 48000 à 80000 (tableau 25); seules celles d'*A.niger* (Pazur et al., 1971) et *R.delemar* (Pazur, 1967) avec des poids moléculaires de 99000 à 112000 constituent des exceptions.

Aucune sous-unité n'a pu être mise en évidence pour une quelconque des amyloglucosidases étudiées sauf la Diazyme, préparation commerciale d'amyloglucosidase d'*A.foetidus*, (Freedberg et al., 1975). Néanmoins, Lineback et al., (1969) n'ont pas obtenu une structure en sous-unités de cet enzyme en présence d'urée, d'acide ou de β -mercaptoéthanol.

Peu de données sont disponibles sur les structures secondaires ou tertiaires des amyloglucosidases.

L'amyloglucosidase de la Diazyme contient 15 à 25% d'hélice α en plus de la structure β et de la conformation désordonnée (Freedberg et al., 1975). D'autres valeurs sont également données, respectivement 14% d'hélice α et 36% de structure β pour l'amyloglucosidase de *Rhizopus* sp. (Tanaka et al., 1986), 31% d'hélice α et 36% de structure β pour l'amyloglucosidase II d'*A.niger* (Shenoy et al., 1984). Shenoy et col (1985) montrent que les méthodes de calcul utilisées pour la mise en évidence de ces structures génèrent des résultats parfois différents (Tab.26).

Les poids moléculaires des alpha-glucosidases sont compris entre des valeurs de 63000 pour celle d'*A.flavus* (Olutiona, 1981) à 270000 pour celle de *S.logos* (Chiba et al., 1973), cette dernière constituant néanmoins une exception. Deux groupes

Tab. 27 : Composition en acides aminés de quelques amyloglucosidases (d'après Manjunath et al., 1983)

	A.niger						A.foetidus		A.candidatus		A.saitoi		Rhizopus sp.			R.delemaï	R.javanicus	Endomyces sp.
	(1)		(2)		(3)		(4)		(4')		(5)	(6)	(7)			(8)	(9)	(10)
	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II	M ₁	M ₂	I	II	III			
Lys	16	16	12	8	9	8	12	9	19	17	13	12	31	23	26	39	21	24
His	6	6	4	4	3	3	3	3	5	4	5	5	4	4	4	8	2	10
NH ₃	21	53	58	59	NR	NR	63	50	55	60	NR	NR	NR	NR	NR	NR	18	41
Arg	23	22	16	16	12	11	18	11	19	19	18	18	14	14	14	18	8	11
Asp	83	85	62	57	49	44	75	57	49	51	77	72	78	58	63	104	49	62
Thr	104	103	79	62	53	44	79	53	66	64	79	60	62	46	53	88	44	27
Ser	119	121	76	66	58	55	84	62	84	71	94	83	79	55	65	108	44	37
Glu	56	54	42	38	33	27	46	31	42	39	53	43	34	28	28	48	21	30
Pro	29	29	18	17	16	13	22	16	28	27	29	25	28	23	27	31	15	15
Gly	59	63	44	36	33	30	47	36	37	34	61	56	54	44	46	77	30	27
Ala	78	82	62	54	43	41	65	50	48	38	70	62	65	49	54	87	48	29
Val	46	46	28	24	28	33	45	32	30	25	36	23	35	30	30	58	31	20
Cys/2	8	8	8	8	6	6	9	9	NR	NR	10	7	3	3	3	6	6	12
Met	4	4	1	1	2	2	2	2	NR	NR	2	1	11	12	11	6	2	0
Leu	53	56	45	43	30	28	44	33	16	18	46	40	31	39	40	57	28	18
Ile	27	25	18	9	15	13	23	16	16	16	17	11	31	21	24	36	19	38
Tyr	30	29	14	14	20	16	26	17	17	18	27	22	37	22	25	44	18	27
Phe	27	28	20	19	16	14	21	13	14	16	21	19	26	24	25	34	17	15
Trp	30	32	NR	NR	16	15	NR	NR	NR	NR	28	19	13	11	11	36	7	8

Les nombres représentent le nombre de résidus par mole d'enzyme

Références:

- (1) Pazur et al. (1972) (4) Lineback et al. (1972) (8) Pazur et Okada (1967)
 (2) Manjunath et al. (1979) (5) Takahashi et al. (1981) (9) Watanabe et Fukimbara (1973)
 (3) Svensson et al. (1982) (6) Inokuchi et al. (1982) (10) Fukui et Nikuchi (1969)

peuvent être constitués: les alpha-glucosidases dont le poids moléculaire se situe entre 97000 et 140000 (*A. awamori*, *M. racemosus*, *P. purpurogenum*) et celles dont le poids moléculaire se situe aux alentours de 65000 (*S. cerevisiae*, *A. fumigatus*, *A. flavus*). Aucune donnée bibliographique n'est disponible concernant les structures secondaires et tertiaires des alpha-glucosidases.

2.- Effets de la température, du pH et des sels

L'effet de la température a été discuté en détail lors du chapitre préliminaire. Nous rappellerons seulement que les enzymes des *Aspergillus* ont une zone optimale d'activité située entre 50 et 65°C et sont rapidement inactivés au-delà de cette température.

Freedberg et al. (1975) ont observé une chute de la proportion de structure en hélice α lorsque la température est augmentée. Les observations de Shenoy et al. (1985) vont dans le même sens. Les multiples formes d'amyloglucosidases peuvent montrer une même stabilité vis à vis de la température (Lineback et al., 1969) ou certaines posséder une thermostabilité améliorée (Manjunath et Rao, 1979; Manjunath et al., 1983). A l'opposé des alpha-amyloses, le calcium ne protège pas les amyloglucosidases. Les amyloglucosidases sont généralement stables entre pH 3 et 8, le pH optimal d'activité se situant entre pH 4 et 5. Les formes I, II et III d'*A. awamori* présentent des caractéristiques identiques vis à vis de ces deux facteurs de même que celles de *S. cerevisiae* (Masusaka et al., 1977). Aucun ion métallique ne semble par ailleurs nécessaire à l'activité de l'enzyme.

C.- CARACTERISTIQUES CHIMIQUES

1.- Composition en acides aminés et séquences

Le tableau 27 regroupe la composition en acides aminés de plusieurs amyloglucosidases d'origine fongique. De considérables variations existent dans la composition des enzymes selon leur source. Ainsi, le contenu en lysine et acide aspartique de l'amyloglucosidase de *R. delemar* est plus important que celui des autres amyloglucosidases. Le contenu en sérine, thréonine et glycine des amyloglucosidases de *R. javanicus* et *Endomyces* sp. est faible.

De manière générale, on peut néanmoins constater une proportion élevée d'acides hydroxyaminés (thréonine et sérine) et d'acides aminés (acide aspartique et glutamique). La teneur en acides aminés soufrés est faible. Les enzymes d'*A. candidus* contiennent plus d'acides aminés basiques que ceux d'*A. niger* et *A. foetidus*.

Après avoir caractérisé les deux formes d'amyloglucosidases d'*A. niger* (1982), Svensson et al. (1983) séquencent les premiers l'amyloglucosidase de cet organisme. La séquence correspond à un poids moléculaire polypeptidique de 65424, le poids moléculaire

total (incluant les hexosamines et les oses neutres avoisinant 82000. Il est intéressant de remarquer qu'aucune similitude de séquence entre cette amyloglucosidase et les alpha-amylases séquencées n'a pu être mise en évidence (Svensson et col, 1983). Tanaka et collaborateurs (1986) comparent les séquences d'acides aminés de trois amyloglucosidases précédemment déterminées: celle de *A.niger* (Svensson et al., 1983; Boel et col, 1984), celle de *Rhizopus sp* (Ashikari et al., 1985) et celle de *Saccharomyces diastaticus* (Yamashita et al., 1985c). Leur homologie globale est comprise entre 25 et 36% (tableau 28), les amyloglucosidases de *Rhizopus* et d'*Aspergillus* étant les plus voisines parmi les trois. De nouveau aucune homologie n'est constatée avec une séquence déterminée d' α -amylase. Quatre régions (fig. 29) possèdent un haut degré d'homologie dans les trois amyloglucosidases. La plupart des résidus tryptophanes et groupes carboxyliques indispensables pour l'activité catalytique (Clarke et al., 1984) se retrouvent dans les trois séquences et les régions les entourant également. Ces résidus et régions semblent donc constituer le site catalytique de l'amyloglucosidase. Tanaka et collaborateurs (1986) suggèrent que l'amyloglucosidase de *Rhizopus* est constituée de deux domaines possédant des fonctions différentes:

- l'un dans la région N terminale (acide aminé 27 à 134), responsable de la fixation sur l'amidon,
- l'autre dans la région C terminale (acide aminé 135 à 604), responsable de la dégradation de l'amidon.

Une telle interprétation est confortée par l'analyse des comportements de trois amyloglucosidases à extrémité N-terminale différente de *Rhizopus sp* face à l'amidon natif (Takahashi et col, 1985). La comparaison des séquences montre que l'amyloglucosidase de *Rhizopus* possède un domaine supplémentaire dans la région N-terminale (acide aminé 27 à 167), celle d'*A.niger* dans la région C-terminale (acide aminé 428 à 640). Le site de fixation de l'amyloglucosidase d'*A.niger* se trouverait ainsi dans la région C-terminale comme le suggère le fait que dans l'amyloglucosidase II (forme plus petite d'amyloglucosidase) la partie manquante par rapport à l'amyloglucosidase I se situe dans cette région (Boel et al., 1984; Svensson et al., 1983) et que seule cette dernière s'adsorbe sur l'amidon natif (Ueda, 1981).

Peu de données sont disponibles sur la composition en acides aminés des alpha-glucosidases mise à part la publication de Rudick et Elbein (1974) traitant de l'alpha-glucosidase d'*A.fumigatus*. On retrouve chez cet enzyme les proportions élevées en acides hydroxyaminés et acides aminés déjà constatées pour les amyloglucosidases. De même la proportion d'acides aminés soufrés est faible.

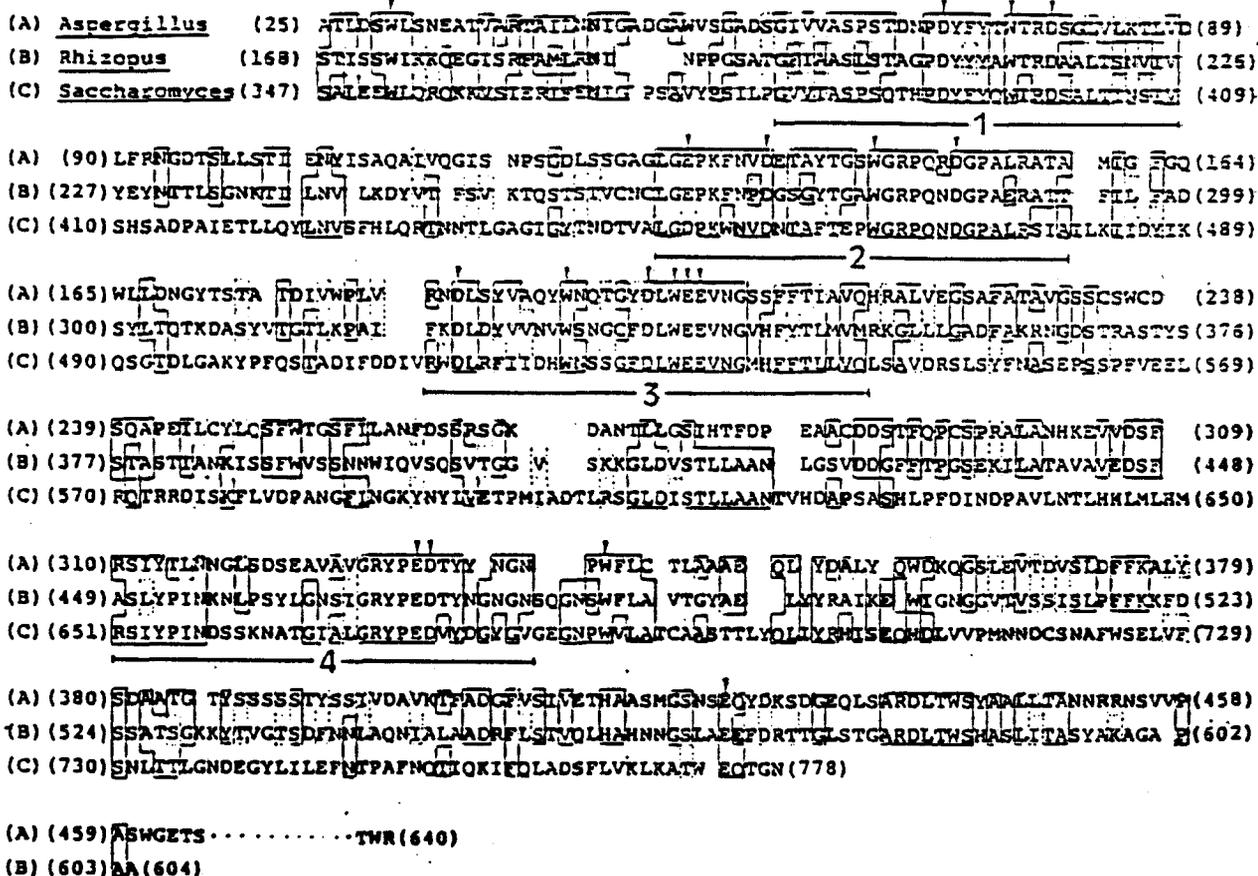
2. Partie glycanique

Pazur et collaborateurs (1963) ont montré que les préparations purifiées des amyloglucosidases I et II d'*A.niger* contenaient des oses et rapportent que ces enzymes sont des

Tab. 28: Degré de conservation des résidus acides aminés dans trois amyloglucosidases (d'après Tanaka et al. 1986)

Amyloglucosidases	Résidus identiques	Insertion délétion	Résidus comparés
(A) Rhizopus et Aspergillus	162 (35.8)	23 (5.1)	453
(B) Rhizopus et Saccharomyces	109 (24.9)	27 (6.2)	438
(C) Aspergillus et Saccharomyces	107 (24.3)	31 (7.0)	440

Fig. 29: Comparaison des séquences de trois amyloglucosidases (Tanaka et al., 1986)



Les acides aminés identiques sont mis en évidence par un encadrement en traits pleins; les quatre régions hautement conservées sont soulignées; les flèches indiquent les résidus tryptophane, acide aspartique et glutamique conservés.

Tab .2^o : Contenu en oses de diverses amyloglucosidases
(d'après Manjunath et al., 1983.

SOURCE	Mol/mol enzyme					Total	Références
	Man	Glc	Gal	Xyl	GlcN		
<i>A.niger</i> (Glucozyme)							
Amyloglucosidase I	41.3	8.0	3.5	0.8	2.9	56.5	Manjunath et al. (1979)
Amyloglucosidase II	44.8	4.2	3.3	1.7	3.4	57.4	
<i>A.niger</i>							
Amyloglucosidase I	68.8	16.0	2.2	-	-	87.0	Pazur et al. (1971)
Amyloglucosidase II	127.6	19.9	3.0	-	-	151.0	
<i>A.foetidus</i> (Diazyme)							
Amyloglucosidase I	39.1	6.9	2.2	-	4.0	52.2	Manjunath et al. (1979)
Amyloglucosidase II	37.3	4.8	2.7	-	3.7	48.5	
<i>A.phoenicis</i>							
Amyloglucosidase II	25.0	13.4	1.7	-	-	40.0	Lineback et al. (1970)
<i>A.candidus</i>							
Amyloglucosidase I	44.0	-	1.8	-	7.1	53.0	Manjunath et al. (1979)
Amyloglucosidase II	43.0	-	3.0	-	6.9	53.0	
<i>A.saitoi</i>							
Amyloglucosidase M ₁	88.3	4.4	5.2	-	4.1	102.0	Inokuchi et al. (1981)
Amyloglucosidase M ₂	43.7	4.2	7.1	-	2.3	57.0	
<i>R.javanicus</i>	27.0	-	-	-	4.8	32.0	Watanabe et Fukimbara (1976)
<i>R.deleamar</i>	68.9	-	-	-	20.0	89.0	Pazur et al. (1971)

glycoprotéines contenant des résidus mannose, glucose et galactose. Toutes les amyloglucosidases étudiées depuis se sont révélées être des glycoprotéines (Shenoy et al., 1985).

a) Contenu en oses et oses représentés

Le tableau 129 regroupe les données concernant les contenus en oses et les monosaccharides présents dans certaines amyloglucosidases.

Les enzymes des *Aspergillus* contiennent en général du mannose, du glucose et du galactose, occasionnellement du xylose et des glucosamines, tandis que l'enzyme des *Rhizopus* possède uniquement du mannose et des glucosamines. Le mannose est l'ose le plus représenté dans tous les cas. La plupart du temps, les deux formes d'enzymes citées contiennent la même proportion d'oses, seules les amyloglucosidases I et II d'*A.niger* étudiées par Pazur et al., (1971) et celles d'*A.saitoi* (Inokuchi et al., 1981) apparaissent comme très dissemblables à ce niveau (tableau III 5).

Les alpha-glucosidases de *Saccharomyces logos* (Chiba et col, 1973), *Aspergillus fumigatus* (Rudick et Elbein, 1974), *Mucor rouxii* (Flores Carreon et Ruiz Herrera, 1972) sont également citées comme étant des glycoprotéines. Pour celle d'*A.fumigatus* qui a été la plus étudiée de ce point de vue, 55 moles de mannose, 3 moles de glucosamine et 5 moles de glucose ont ainsi été mises en évidence par mole d'enzyme.

b) Liaison ose-peptide

Lineback (1968) après avoir traité les amyloglucosidases I et II de la diazyme avec le borohydrate de sodium montre que les mannoses des parties osidiques sont liés grâce à une liaison o-glycosyl au groupe hydroxyl des sérine et thréonine de la chaîne polypeptidique. Des observations similaires ont été rapportées pour les enzymes d'*Aspergillus* et d'*A.candidus* (Manjunath et Raghavendra Rao, 1979; Pazur et al., 1970).

Watanabe et Fukimbara (1974, 1975, 1976) isolent trois glycopeptides à partir d'une digestion de l'amyloglucosidase de *R.javanicus*, deux d'entre eux étant liés à la chaîne polypeptidique par une liaison N-glycosidique impliquant des résidus asparagine et N-acétyl-glucosamine. Ce type de liaison a également été mis en évidence pour l'alpha-glucosidase d'*A.fumigatus* (Rudick et Elbein, 1974) ou la beta-glucosidase du même organisme (Rudick et Elbein, 1973). D'autres glycoprotéines comme la thyroglobuline (Arima et col, 1972), l'ovalbumine (Makino, 1966) ou encore l'alpha-amylase d'*A.oryzae* (Lee et Scoda, 1972) possèdent également des chaînes saccharidiques composées de mannose et de N-acétylglucosamine et une liaison identique à celle de *Mucor javanicus*.

c) Structure de la partie glycanique

Les enzymes des *Aspergillus* et des *Rhizopus* diffèrent nettement au niveau du type de structure osidique et également au niveau de l'aménagement de ces unités sur la partie protéique.

* Structure des parties glycaniques des amyloglucosidases d'*Aspergillus*

Lineback et collaborateurs (1972) indiquent que les structures osidiques sont présentes sous forme d'unités trisaccharidiques dans la "diazyme", la majorité des unités se trouvant sous forme Man-Man-Man ou Man-Glc-Man, les autres structures existant impliquant le galactose. La partie carbohydratée de l'amyloglucosidase II d'*A.niger* se présente sous la forme de résidus monoosidiques de D-mannose (20) disaccharidiques (2-O-D mannoypyranosyl D-mannose, 11) trisaccharidiques (8) et tétrasaccharidiques (5) comprenant des combinaisons variées de D-mannose, D-glucose et D-galactose (Pazur et al., 1980). Manjunath et Raghavendra Rao (1981) ont isolé six fractions glycoprotéiques après digestion de l'amyloglucosidase II d'*A.niger* avec la pronase. Les structures proposées sont présentées dans la figure 30. toutes les unités osidiques sont liées par une liaison O-glycosidique aux résidus thréonine ou sérine. L'amyloglucosidase d'*A.niger* contient deux structures de type I, une de type II et une de type III.

* Structure des parties glycaniques des amyloglucosidases de *Rhizopus*

Watanabe et Fukimbara (1974, 1975, 1976) isolent trois glycopeptides de l'amyloglucosidase de *R.javanicus*. La structure proposée de ce glycopeptide est représentée sur la figure 31. Le troisième type ressemble aux structures des glycopeptides des *Aspergillus* quant à la répétition de la structure disaccharidique, mais celle-ci est homogène (résidus D-mannose uniquement) les structures pouvant être mono ou trisaccharidiques dans les enzymes d'*Aspergillus*.

Les structures des autres types sont très complexes (fig.), composés d'hétérosaccharides branchés et liés au peptide par une liaison N-glycosidique. Aucune structure de ce type n'a pu être mise en évidence pour les amyloglucosidases d'*Aspergillus*.

d) Rôle de la partie glycanique

L'un des aspects les plus intéressants des glycoprotéines touche le rôle des résidus osidiques au niveau moléculaire. Une méthode pour mettre en évidence ce rôle consiste à ôter des glycoprotéines ces résidus osidiques par oxydation au periodate (Lee et Hager, 1970) ou mieux encore grâce à un traitement au fluorure d'hydrogène anhydre (Manjunath et Sairam, 1982). Plus de 75% des résidus osidiques peuvent être enlevés avec seulement 20% de perte d'activité (Manjunath et Raghavendra Rao, 1981).

Tabl. 30 : Importance des résidus osidiques pour la thermostabilité de l'amyloglucosidase d'après Shenoy et al., 1985)

Traitements de l'amyloglucosidase	%			Activité
	α	β	γ	
Témoin				
pH 4.8	31	36	33	100
après 10 jours	22	55	23	100
Traitée au périodate				
Fresh	27	24	49	80
après 10 jours	17	27	56	0
Chauffée				
pH 4.8 (60°C/mn)	20	47	33	60
Traitée au périodate				
(60°C par minute)	3	49	47	0
Réduite avec hydrogène				
et oxyde de platine				
pH 4.8	6	44	50	142
traitée au périodate	5	45	35	100

Shenoy rapporte que pour les amyloglucosidases d'*A.candidus* et de *Rhizopus sp*, 60 et 40% des oses peuvent être enlevés en 20 minutes avec 50 et 30% de perte d'activité respective. Les parties osidiques ne semblent donc pas intervenir dans le mécanisme catalytique. L'effet des oses sur la structure et l'activité des amyloglucosidases d'*A.niger* est rapportée dans le tableau (Shenoy et al., 1985). Le fait d'enlever une partie des résidus osidiques entraîne une chute du contenu des structures en hélice (31 à 27%) ainsi qu'une perte de 20% d'activité. Cependant, le stockage à 4°C pendant dix jours des enzymes oxydés entraîne une perte complète d'activité ainsi qu'une augmentation de structure aléatoire indiquant une perte de structure (Tab.30).

Les groupes osidiques apparaissent donc comme étant nécessaires à la stabilité de la conformation de l'enzyme mais non à son activité. Une chute nette de stabilité vis à vis de la chaleur des enzymes d'*A.niger* intervient après oxydation. Si l'enzyme après une étape de chauffage perd 40% de son activité, l'enzyme oxydée perd à la fois structure et activité. Les groupes osidiques semblent donc jouer un rôle dans la stabilisation de l'enzyme vis à vis de la dénaturation thermique.

Les enzymes oxydés sont d'autre part immunologiquement similaires aux enzymes natifs indiquant que les groupes osidiques ne sont pas nécessaires aux propriétés antigéniques de l'enzyme.

3. Transformations chimiques

L'amyloglucosidase n'est pas inactivée lors de traitements au p-chloromercuribenzoate (PCMB), à l'iodoacétamide, au di-isopropylfluorophosphate et à l'EDTA, il est donc peu probable que des groupes sulfhydryl ou des ions métalliques bivalents soient impliqués dans le site actif de l'enzyme (Barker et col, 1971).

La photooxydation de l'amyloglucosidase en présence de bleu de méthylène (Barker et al., 1971) ou de rose bengale (Jolley et Gray, 1976) entraîne une perte d'activité de l'enzyme. Celle-ci serait due à une modification des résidus tryptophane du site actif de l'enzyme (Jolley et Gray, 1976; Ohnishi et al., 1982; Clarke et Svensson, 1986). La modification de ces mêmes résidus tryptophanes par le N-bromosuccinimide (NBS) (Clarke et Svensson 1984a; Inokuchi et al., 1982; Hiromi et al., 1976; Iwama, 1986) entraîne également une perte d'activité. Néanmoins, le nombre de résidus tryptophane essentiels varie selon les sources. L'oxydation de trois résidus Trp entraîne la perte d'activité de l'amyloglucosidase de *R.niveus* (Ohnishi et al., 1976) alors que quatre ou cinq doivent être oxydés pour entraîner le même effet sur les amyloglucosidases d'un *Rhizopus sp.* (Iwama et al., 1986). Clarke et Svensson (1984b) suggèrent qu'un résidu est impliqué dans la fixation du substrat, le second étant essentiel au fonctionnement du site catalytique.

Des résidus tyrosine ont également été impliqués dans la fixation du substrat mais non dans le processus catalytique

(Hoschke et al. 1980a et 1980b). La modification de ces résidus résulte en une perte partielle d'activité. Les résidus peuvent être présents dans le site actif hors du site catalytique ou encore maintenir la structure native de l'enzyme.

Deux à trois groupes carboxyles ont été identifiés au niveau du site actif de l'enzyme et prennent part au processus catalytique (Barker et al., 1971; Jolley et Gray, 1976; Savel'ev et Firsov, 1982). La modification des groupes carboxyles avec le carbodiimide ou la taurine en présence de carbodiimide (Savel'ev et Firsov, 1983) entraîne une perte totale d'activité catalytique. Un seul site actif de l'amyloglucosidase semble être impliqué dans l'hydrolyse des trois types de liaisons alpha-glucosidiques α -1,4; α -1,6 et α -1,3 (Shenoy et al., 1985).

Les rares études chimiques opérées sur une alpha-glucosidase (inhibition par le tétrazole 1-H diazonium en présence de rose bengale) indiquent la présence d'un résidu histidine essentiel au niveau du site d'activité de l'enzyme de *Mucor javanicus* (Yamasaki et al., 1973) comme pour celui de *Bacillus cereus* (Yamasaki et al., 1974).

CONCLUSION DE L'ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Toutes les amyloglucosidases fongiques sont des glycoprotéines existant la plupart du temps sous plusieurs formes. Ces dernières peuvent apparaître après une action protéasique sur la partie N-terminale ou être le produit de différents mRNA originaires de l'épissage d'un mRNA originel, les deux hypothèses étant encore discutées actuellement. Les amyloglucosidases possèdent une masse moléculaire de 48000 à 80000 sans qu'une structure comprenant des sous-unités ait pu être mise en évidence sauf peut être pour la "Diazyme".

Les enzymes des *Rhizopus sp* possèdent plus d'acides aminés basiques que ceux des *Aspergillus sp*, seules quatre amyloglucosidases sont à l'heure actuelle séquencées.

Les transformations chimiques montrent qu'un groupe tryptophane au moins joue un rôle essentiel au niveau du site catalytique ainsi qu'un groupe carboxyle. Le contenu en résidus osidiques varie de 3 à 30% selon les amyloglucosidases étudiées, l'ose le plus fréquent étant le mannose. Les résidus osidiques sont liés par une liaison O-glycosyl aux résidus sérine ou thréonine de la chaîne protéique, chez les *Rhizopus* des liaisons N-glycosyl existent. Ces groupes osidiques apparaissent comme jouant un rôle très important au niveau de la stabilisation de la structure de l'enzyme vis à vis du stockage et surtout de la chaleur.

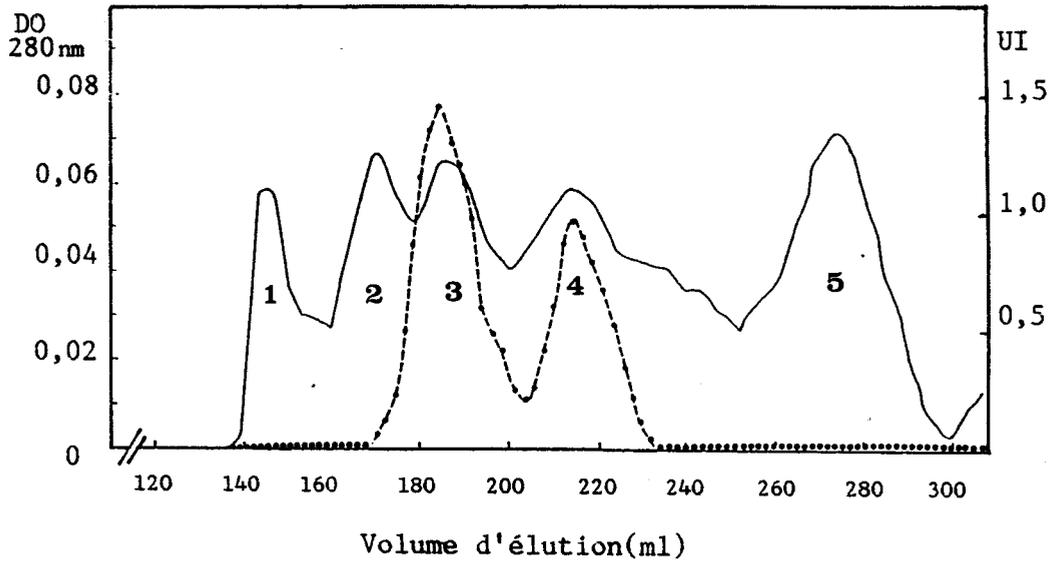
Les données relatives aux alpha-glucosidases sont réduites. Les caractéristiques générales sont assez voisines de celles des

amyloglucosidases. Elles présentent une masse moléculaire de 63000 à 140000 avec une prédominance en certains acides aminés identique à celle des amyloglucosidases. Plusieurs types d'alpha-glucosidases sont parfois synthétisées par un même organisme sans que leur origine ait jamais été discutée.

Un résidu histidine apparaît comme essentiel au niveau du site catalytique de l'enzyme.

Finalement, le type de liaison osidique rencontré est similaire à celui des amyloglucosidases de *Rhizopus sp.*

Fig. 32: Chromatographie de gel-filtration du filtrat de culture concentré de *T. crustaceus* (P6).



Tab. 33: Identification de divers enzymes contenus dans le filtrat de culture de *T. crustaceus*

N°	ENZYME RECHERCHEE	SUBSTRATS	n° pic	INTENSITE DE LA COLORATION
1	Témoin			
2	Phosphatase alcaline	2-naphtyl phosphate	-	-
3	Esterase (C 4)	2-naphtyl butyrate	2	++
4	Esterase Lipase (C 8)	2-naphtyl caprylate	4	+
5	Lipase (C 14)	2-naphtyl myrstate	-	-
6	Leucine arylamidase	L-leucyl-2-naphtylamide	-	-
7	Valine arylamidase	L-valyl-2-naphtylamide	-	-
8	Cystine arylamidase	L-cystyl-2-naphtylamide	-	-
9	Trypsine	N-benzoyl-DL-arginine-2-naphtylamide	-	-
10	α Chymotrypsine	N-glutaryl-phénylalanine-2-naphtylamide	-	-
11	Phosphatase acide	2-naphtyl phosphate	3	+++
12	Naphtol-AS-Bi-phosphonhydrolase	Naphtol-AS-Bi-phosphate	4	+++
13	α galactosidase	6-Br-2-naphtyl- α -D-galactopyranoside	4	+++
14	β galactosidase	2-naphtyl- β -D-galactopyranoside	3	+++
15	β glucuronidase	Naphtol-AS-Bi- β -D-glucuronide	4	++
16	α glucosidase	2-naphtyl- α -D-glucopyranoside	3	++++
17	β glucosidase	6-Br-2-naphtyl- β -D-glucopyranoside	2	++++
18	N-acétyl- β glucosaminidase	1-naphtyl-N-acétyl- β -D-glucosaminide	5	++++
19	α mannosidase	6-Br-2-naphtyl- α -D-mannopyranoside	-	-
20	α fucosidase	2-naphtyl- α -L-fucopyranoside	-	-

II.- TRAVAUX EFFECTUES SUR LE COMPLEXE AMYLOGUCOSIDASIQUE DE THERMOASCUS CRUSTACEUS

Ceux-ci ont été menés d'une part pour mettre en évidence les différents constituants du complexe enzymatique ainsi que leurs propriétés physico-chimiques et, d'autre part, pour observer le comportement des enzymes en conditions industrielles de saccharification.

A.- PURIFICATION DU SYSTEME AMYLOGUCOSIDASIQUE DE THERMOASCUS CRUSTACEUS

Nous avons adopté la procédure utilisée par Manjunath et collaborateurs (1983) pour purifier les amyloglucosidases d'*A.niger*, cette méthode (utilisée également par de nombreux auteurs) étant relativement aisée à mettre en oeuvre.

Les différentes techniques de purification (récupération du filtrat de culture, concentration et chromatographie sur colonnes) sont détaillées dans l'annexe V .

Le résultat de la chromatographie de gel filtration sur colonne ACA 44 est représenté sur la figure 32 ; cinq pics majeurs de protéines apparaissent sur le graphe.

Deux fractions amyloglucosidasiques sont mises en évidence respectivement au niveau des pics (3) et (4) ceci grâce au dosage habituel (annexe III). D'autres enzymes ont pu être identifiés grâce au test API-ZYM (Apisystem SA n°2520) comme l'avaient précédemment fait Satyanarayana et al. (1985) pour les enzymes de quatorze espèces différentes de champignons thermophiles. La trypsine, la chymotrypsine, la beta-glucuronidase, l'alpha-fucosidase n'ont pu être détectées chez aucune des souches étudiées par Satyanarayana et collaborateurs (1985). L'alpha-mannosidase est mise en évidence chez *Thermomucor indiciae-sudaticae* mais avec une très faible activité. Très peu de souches excrétaient d'autre part des aminopeptidases, de l'alpha ou de la beta-galactosidase, l'alpha-glucosidase étant à peine plus représentée. Les enzymes extracellulaires mises en évidence chez la plupart des souches étaient les phosphatases, les estérases et les beta-glucosidases.

La souche de *Th.crustaceus* étudiée échappe quelque peu à cette présentation. En effet, l'alpha, la beta-glucosidase et la glucosaminidase sont apparemment les enzymes du test les plus actives; d'autre part, les galactosidases (alpha et beta) sont également présentes (tableau 31).

On retrouve par contre la présence de phosphatases, d'estérases et l'absence d'aminopeptidases. Il est à remarquer que le pic (V) contenant une activité amyloglucosidasique ne réagit pas avec le test alpha-glucosidase.

Fig.33 : Chromatographie d'échange d'ions (DEAE-Trisacryl) de l'enzyme (A)

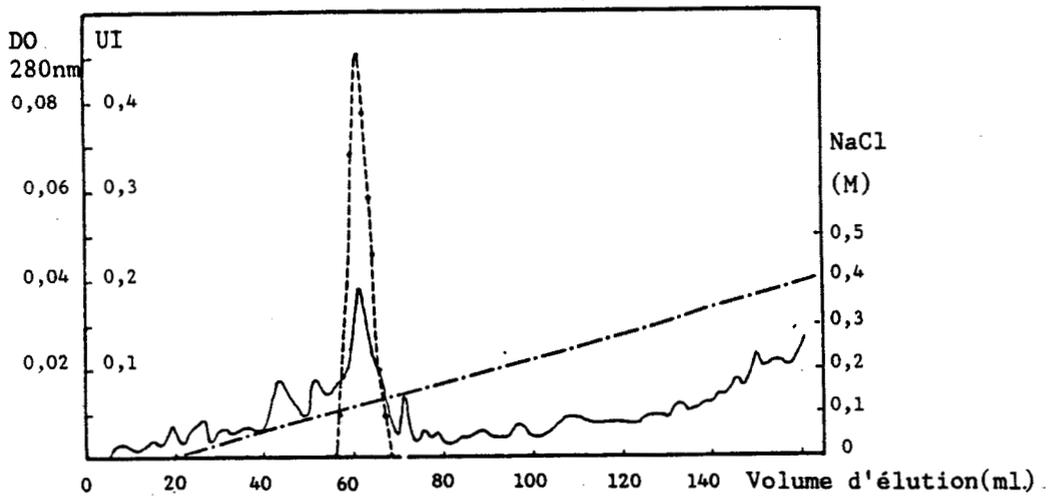


Fig. 34 : Chromatographie d'échange d'ions (DEAE-Trisacryl) de l'enzyme (B)

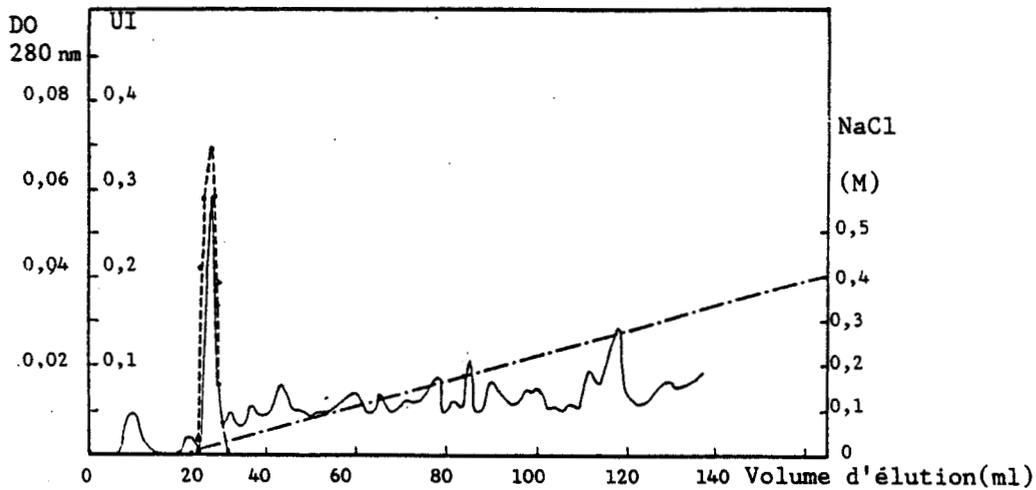
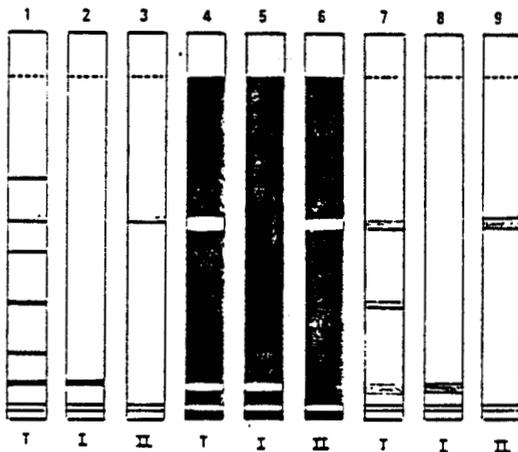


Fig. 35 : Electrophorèse en conditions non-dénaturantes du filtrat de culture et des enzymes purifiés. de *T. crustaceus* (P6)

protéines totales amylases glycoprotéines



T: filtrat de culture
I: enzyme (A)
II: enzyme (B)

Tab. 32: Rapport d'hydrolyse amidon soluble sur maltose par diverses amyloglucosidases et α -glucosidases.

Enzyme	Organisme	Rapport	Références
Amyloglucosidase			
	<i>A. awamori</i>	5,88	Yamasaki et al. (1977)
	<i>A. niger</i>	10	Medda et al. (1982)
	<i>A. oryzae</i>	4 à 10	Miah et Ueda (1977)
	<i>Hypocrea peltata</i>	5,09	Okada (1983)
	<i>Schizophyllum commune</i>	5,05	Schwalb et Jansons (1973)
	<i>F. capsuligenum</i>	5,3 à 7,4	De Mot et Verachtert (1985)
	<i>Candida tsukubaensis</i>	3 à 11,6	De Mot et al. (1985)
Alpha-glucosidase			
	<i>B. cereus</i>	0	Yoshigi et al. (1985)
	<i>A. awamori</i>	0,8 à 1,2	Yamasaki et al. (1977)
	<i>Mucor javanicus</i>	0,48	Yamasaki et al. (1973)
	<i>P. purpurogenum</i>	0,36	Yamasaki et al. (1976)

Tab. 33: Hydrolyse de divers substrats par les enzymes (A) et (B)

SUBSTRAT	ALPHA-GLUCOSIDASE	AMYLOGLUCOSIDASE
Maltose	100	14,2
Maltotriose	66,2	35,1
MDO5	222,5	86,1
MDO2	157,5	92,5
MDO1	75,0	97,0
Amidon sol. Lintner	11,25	100
Amidon de blé	5,0	27,6
Amidon de riz	5,0	8,9
Amidon de maïs	2,5	4,5
Amylose	3,7	12,7
Amylopectine	1,2	5,6
Glycogène	2,5	55,2
Dextran	1,2	0,7
α -méthylglucoside	11,2	-
Pullulan	-	-

(résultats en % par rapport au maltose pour l'enzyme A, à l'amidon soluble pour l'enzyme B)

Cette première étape de purification par chromatographie de gel-filtration suffit apparemment à séparer de manière efficace deux fractions amyloglucosidasiques que nous baptisons avant plus de précision enzyme (A) (pour l'enzyme de poids moléculaire le plus élevé) et enzyme (B).

La seconde chromatographie effectuée sur un gel DEAE Trisacryl M (IBF) a donné les résultats des figures 33 et 34. Les enzymes après cette seconde étape de purification apparaissent comme suffisamment pures pour les étapes ultérieures de cinétique comme le révèlent les électrophorèses (procédures en annexe VI.). Deux bandes apparaissent après électrophorèse en conditions non-dénaturantes comme pouvant dégrader la MDO2. Ces deux bandes correspondant par ailleurs à deux glycoprotéines (fig.35).

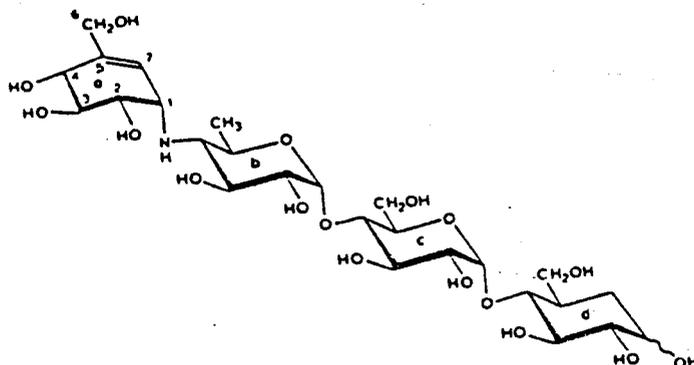
B.- SPECIFICITE D'ACTION ET IDENTIFICATION DES ENZYMES

Une première approche effectuée à la fin des étapes de sélection (chapitre I) avait montré la présence concomitante probable d'au moins une alpha-glucosidase et d'une amyloglucosidase dans le filtrat de culture du *Th. crustaceus*.

Divers substrats oligomères ou polymères de glucose ont été testés en vue de différencier les deux enzymes (tableau 33). Nous avons amplement décrit lors du chapitre préliminaire les problèmes posés par l'identification des alpha-glucosidases et des amyloglucosidases. L'étude du rapport (vitesse d'hydrolyse de l'amidon soluble sur vitesse d'hydrolyse du maltose) permet au prime abord de séparer une nouvelle fois les deux enzymes. Le rapport de 0,11 pour l'enzyme (A) et de 7,04 pour l'enzyme (B) indique que vraisemblablement l'enzyme (A) est une alpha-glucosidase et l'enzyme (B) une amyloglucosidase. En effet, la plupart des amyloglucosidases dégrade l'amidon soluble plus facilement que le maltose, les taux relatifs d'hydrolyse amidon soluble sur maltose se situant entre 5 et 10 suivant les espèces citées (tableau 32). Si certaines alpha-glucosidases hydrolysent préférentiellement l'amidon soluble elles le font dans un rapport moindre (Yamasaki et al. 1980).

D'une manière générale les substrats à haut poids moléculaire (glycogène, amidon) sont plus dégradés par l'enzyme (A). De plus, l'alpha-méthyl-glucoside (utilisé pour doser l'activité trans-glucosidase (une des caractéristiques des alpha-glucosidases) n'est dégradé que par l'enzyme (A). Deux techniques déjà citées dans le chapitre et permettant de différencier alpha-glucosidase et amyloglucosidase ont été retenues pour confirmer cette première hypothèse. La première fait appel à l'inhibition de l'activité de l'enzyme par l'acarbose. Ce tétraose (fig.39) a déjà été cité dès 1977 comme un inhibiteur potentiel des glucosidases. Utilisé en enzymologie pour protéger le site actif d'un enzyme (Svensson et al., 1986), il peut l'être aussi pour différencier l'alpha-amylase ou l'alpha-glucosidase de l'amyloglucosidase, cette dernière se révélant beaucoup plus sensible que les deux premières à l'inhibiteur (tableau 34).

Fig. 36: Représentation de l'acarbose.

Tab. 34: Inhibition de l'activité de l'amyloglucosidase , de l' α -glucosidase et de l' α -amylase par l'acarbose.

Enzyme	Organisme	Quantité d'acarbose nécessaire pour inhiber 50% de l'enzyme (ng ml ⁻¹)	Références
Amyloglucosidase			
	<i>F.capsuligenum</i>	71	De Mot et Verachtert (1985)
	<i>F.capsuligenum</i>	79	De Mot et Verachtert (1985)
	<i>A.niger</i>	40	Truscheit et al. (1981)
	<i>C.tsukubaensis</i>	25	De Mot et al. (1985)
Alpha-amylase			
	<i>A.oryzae</i>	180000	Truscheit et al. (1981)
	<i>B.subtilis</i>	41000	De Mot et Verachtert (1985)
	<i>F.capsuligenum</i>	20000	De Mot et Verachtert (1985)
Alpha-glucosidase			
	<i>Saccharomyces sp.</i>	70000	Truscheit et al. (1981)

Fig.37 : Inhibition de l'activité des enzymes (A) et (B) par l'acarbose.

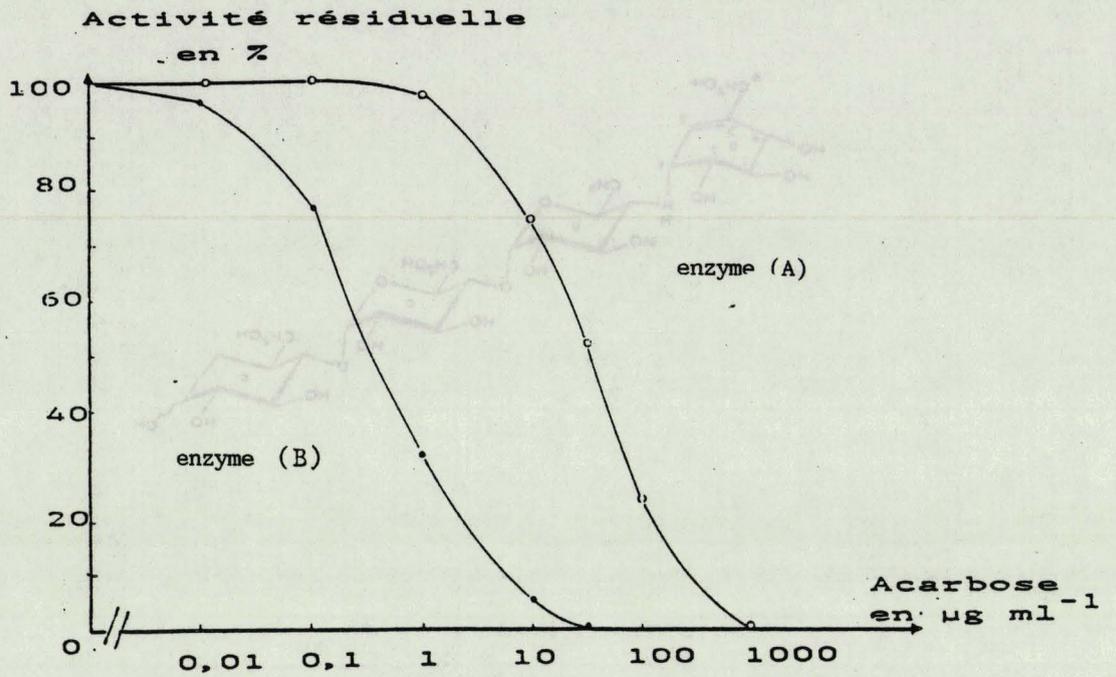
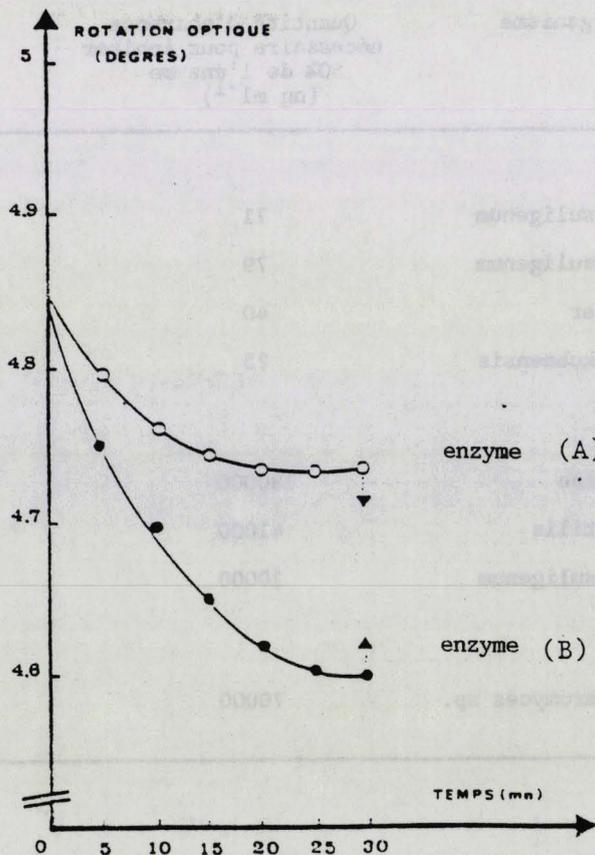


Fig. 38: Etude de l'anomérisation du glucose libéré par l'action des enzymes (A) et (B).



Les valeurs obtenues dans notre cas (figure 37):

- enzyme (A) 35400 ng ml⁻¹
- enzyme (B) 210 ng ml⁻¹

confortent une nouvelle fois l'hypothèse selon laquelle l'enzyme (A) serait une alpha-glucosidase et l'enzyme (B) une amyloglucosidase.

Finalement, l'étude de l'anomérisation du glucose libéré lors de la réaction enzymatique a permis de confirmer définitivement cette hypothèse. Cette analyse a été menée suivant le protocole de Yamasaki et collaborateurs (1977). Un mélange réactionnel consistant en une solution de MDO2 à 1% dans un tampon acétate 0,2M pH 4,5 et l'enzyme est incubé à 40°C. Les mesures de rotation optique sont effectuées à l'aide d'un polarimètre automatique Zeiss, une cellule de 10cm étant utilisée. Lorsque la rotation optique devient constante, on ajoute 10 mg de carbonate de sodium anhydre et la mutarotation du mélange est mesurée. L'addition de carbonate de sodium entraîne un équilibre des formes alpha et beta du glucose. Dans ces conditions, la rotation optique de l'alpha-glucose tend à décroître, celle du beta-glucose à croître (Yamasaki et al., 1977; Hyun et Zeikus, 1985). La figure représente les données relatives à l'enzyme (A) et l'enzyme (B) et montre que les produits d'hydrolyse du premier sont sous la configuration de l'anomère alpha, ceux de l'enzyme (B) sous la configuration beta.(fig.39).

En conclusion, l'observation du rapport vitesse d'hydrolyse de l'amidon soluble sur vitesse d'hydrolyse du maltose, l'inhibition par l'acarbose et la configuration des produits d'hydrolyse montrent que l'enzyme initialement baptisée "enzyme (A)" est une alpha-glucosidase (E.C. 3.2.1.20.), l'enzyme baptisée "enzyme (B)", une amyloglucosidase.

C.- CINÉTIQUE ENZYMATIQUE

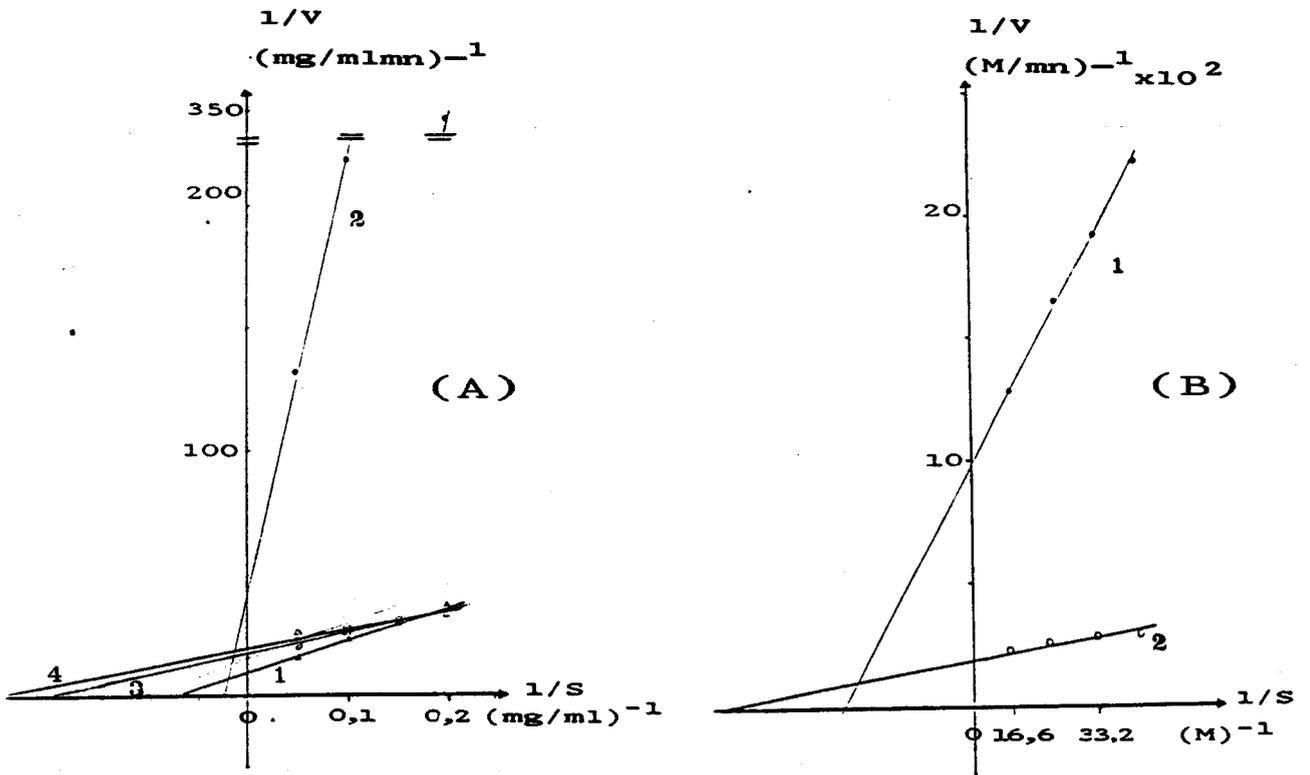
L'estimation des valeurs de Km pour l'alpha-glucosidase et l'amyloglucosidase a été faite à pH 4,5 en utilisant comme substrats la maltodextrine MDO2, le maltose et l'amidon soluble. Les résultats consignés dans la figure 39 révèlent que les Km de l'alpha-glucosidase et de l'amyloglucosidase sont respectivement de 9,9 et 19,2 mM pour le maltose, de 40 et 4 mgml⁻¹ pour l'amidon soluble et de 13,3 et 4,7 mgml⁻¹ pour la MDO2.

D.- PROPRIÉTÉS PHYSIQUES

1.- Poids moléculaire

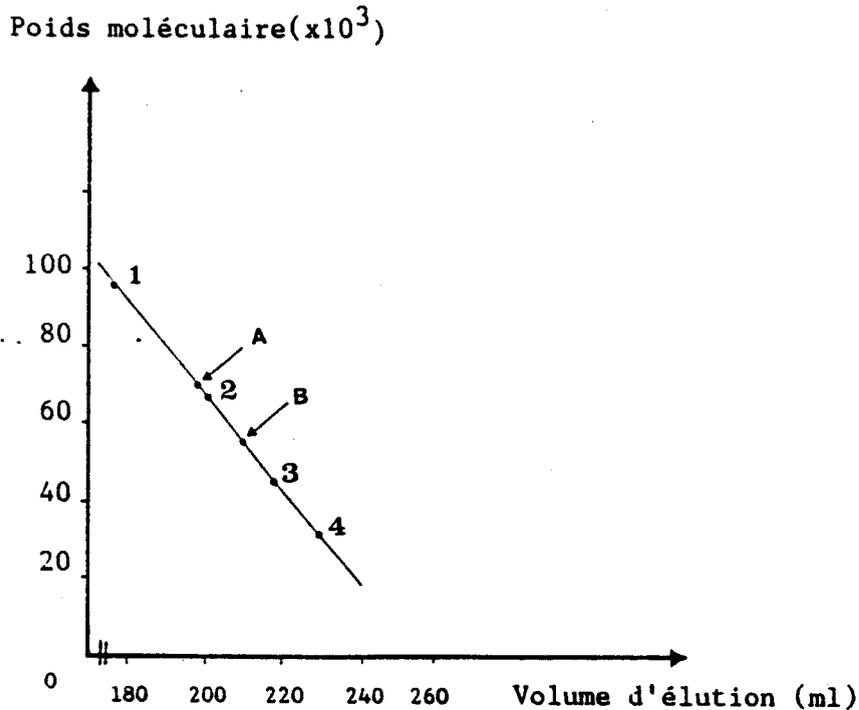
Celui-ci a été estimé à l'aide d'une calibration de la colonne de gel-filtration ACA 44 (IBF) de 82 cm(figure 40). L'alpha-glucosidase possède un poids moléculaire de 69500(±1400) et l'amyloglucosidase de 55000 (±1500).

Fig. 39: Cinétique enzymatique de l' α -glucosidase et l'amyloglucosidase de T.crustaceus; représentation de Lineweaver et Burk.



Légende: A1: MDO2- α -glucosidase; A2: Am.sol.- α -glucosidase; A3: MDO2-amyloglucosidase; A4: Am.sol.-amyloglucosidase; B1: maltose- α -glucosidase; B2: maltose-amyloglucosidase.

Fig. 40: Poids moléculaires de l' α -glucosidase et l'amyloglucosidase de T.crustaceus obtenus par calibration d'une colonne de gel-filtration.



Légende: 1:phosphorylase A (PM=92500); 2:serum albumine(PM=68000)
 3:ovalbumine (PM=43000); 4:inhibiteur de la trypsine(PM=20100)
 (A): -glucosidase; (B): amyloglucosidase de T.crustaceus.

La valeur obtenue pour l'alpha-glucosidase est voisine de celles déjà citées dans la partie bibliographique pour les enzymes d'*A.flavus*, *A.fumigatus* ou *S.cerevisiae* (tableau). Celle de l'amyloglucosidase se situe quant à elle dans les limites des poids moléculaires de l'amyloglucosidase II d'*A.foetidus* et d'*A.niger* ou encore des amyloglucosidases de *M.rouxianus* et *Endomyces sp.* (tableau).

2.- Effets de la température, du pH, et des sels

* Températures optimales d'activité et thermostabilité des deux enzymes

L'alpha-glucosidase possède une température optimale d'activité de 70°C, l'amyloglucosidase de 60°C (figure 41). Si la température optimale d'activité de cette dernière correspond à la température optimale classique des amyloglucosidases (60°C) celle de l'alpha-glucosidase correspond par contre à la température optimale d'activité la plus élevée jamais rapportée pour une alpha-glucosidase avec celle de *Th.aurantiacus* (Obert, 1980-81). La très grande différence entre la thermostabilité des deux enzymes est mise en évidence sur la figure 41 (A,B). Si l'alpha-glucosidase conserve l'intégralité de son activité pendant 4heures à 60°C, l'amyloglucosidase perd plus de 66% de celle-ci après une heure; les différences sont encore plus sensibles aux températures supérieures. La thermostabilité du complexe à 70°C repose donc essentiellement sur l'alpha-glucosidase.

Dans le but de mettre en évidence d'autres activités polysaccharidiques thermostables, des dosages aux deux températures précédemment employées (60°C et 75°C) ont été effectués sur le filtrat de culture brut dialysé (annexe X):

Substrats	Activité à 60°(U.I.)	Activité à 75°(U.I.)
Carboxyméthylcellulose	0,42	0,12
Arabinogalactane	-	-
Laminarine	0,30	0,01
Pectine	-	-
Polygalacturonane	0,03	-
Xylane	0,08	0,05

Aucune des six activités dosées mettant en jeu des substrats à liaisons ou monomères divers n'a permis d'isoler une telle activité. Il convient néanmoins de constater que l'échelle de température (60°C-75°C) permet encore à trois enzymes de fonctionner faiblement à 75°C. Cette manipulation montre que si un organisme thermophile peut posséder un enzyme stable à température très élevée, le pool enzymatique qu'il synthétise ne possède pas obligatoirement la même caractéristique de thermostabilité.

* Effet du pH

Les deux enzymes affichent une bonne stabilité vis-à-vis des pH alcalins ou acides dans les conditions utilisées (tampon acétate 0,2M: pH3-pH6; tampon phosphate 0,2M pH6-pH10, 24heures à 4°C). Même dans les conditions les plus drastiques, la perte maximale d'activité n'excède pas 30% (figure 43).

Le pH optimal d'activité de l'alpha-glucosidase est plus acide que celui de l'amyloglucosidase (3,5 au lieu de 4,5, figure 44) dans les deux cas, les enzymes sont très peu actifs aux pH supérieurs à pH6 conformément aux enzymes précédemment décrits (chapitre I).

Fig. 41: Température optimale d'activité de l' α -glucosidase et de l'amyloglucosidase de *Th. crustaceus* (P6).

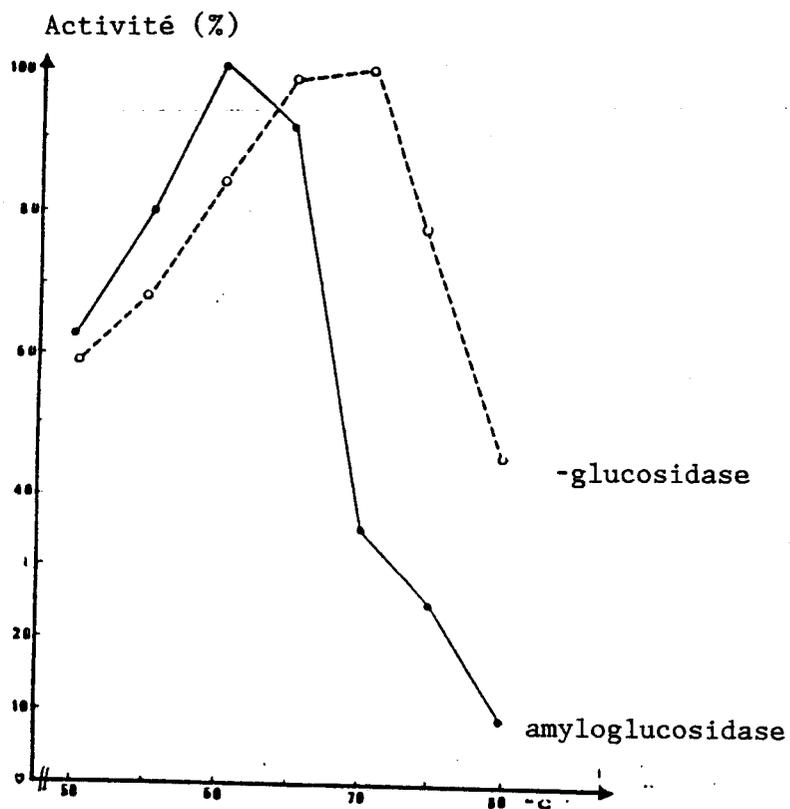
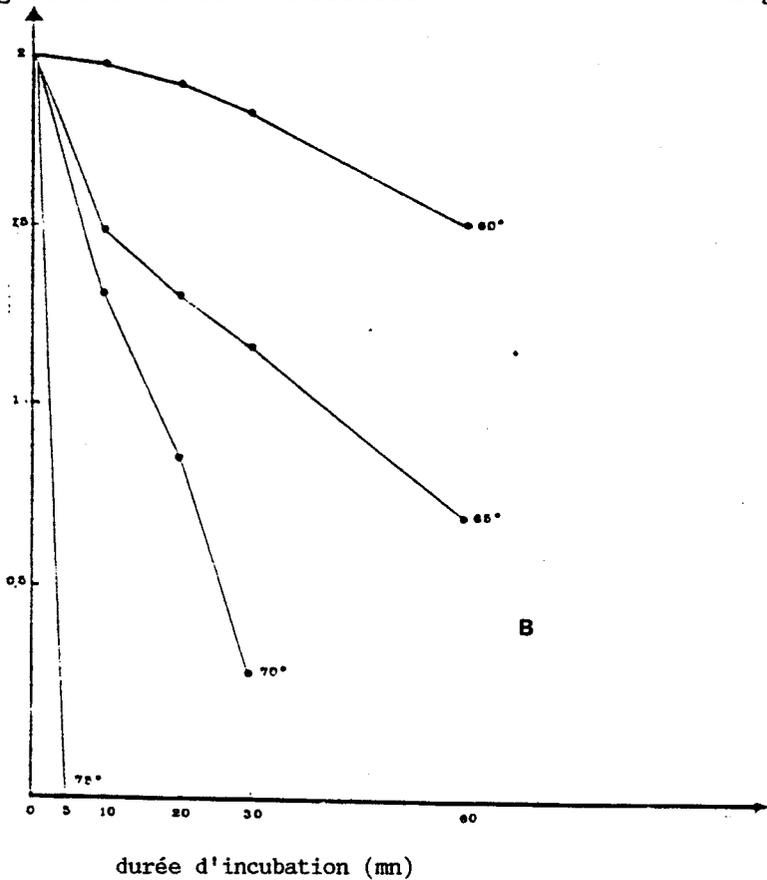
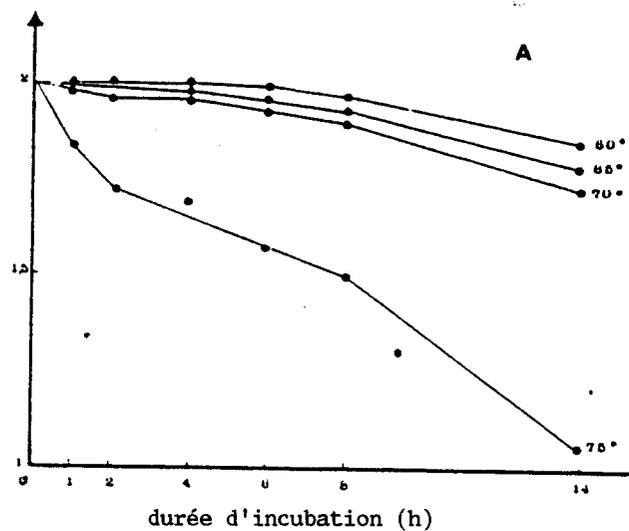


Fig. 42: Thermostabilité de l' α -glucosidase et de l'amyloglucosidase de *Th. crustaceus* (P6)

log de l'activité résiduelle



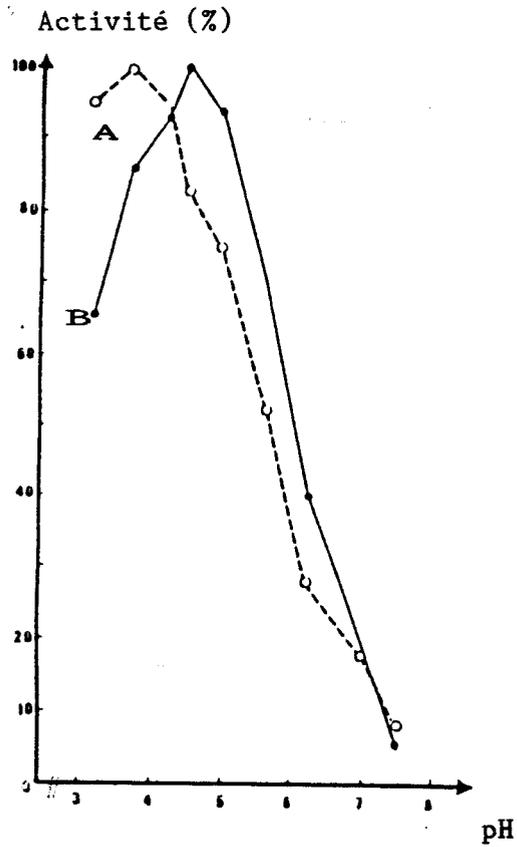
log de l'activité résiduelle



A : α -glucosidase

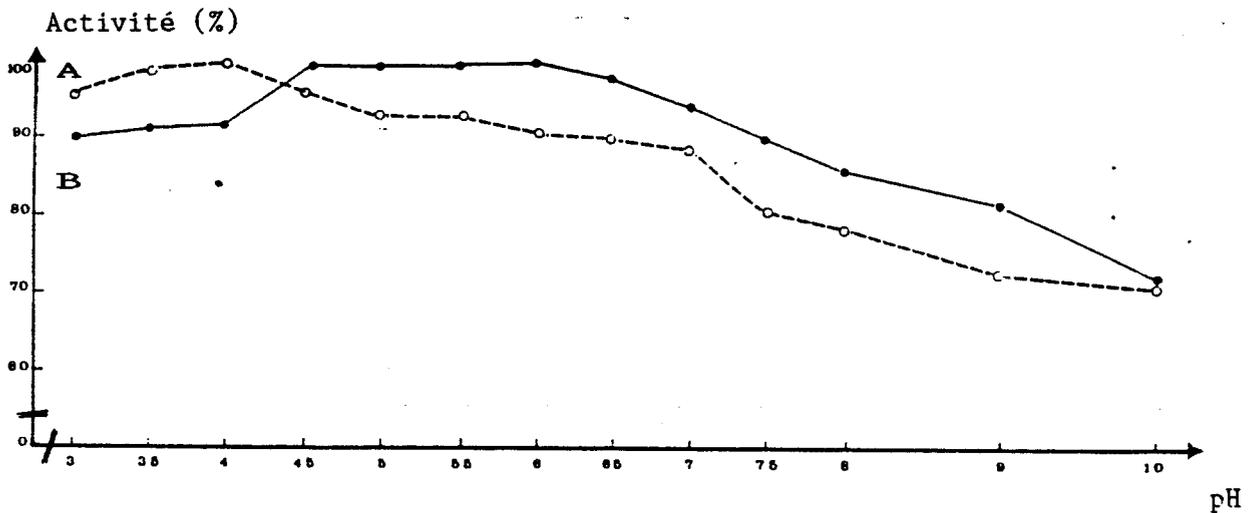
B : amyloglucosidase

Fig. 43: pH optimal d'activité de l' α -glucosidase et de l'amyloglucosidase de *Th. crustaceus* (P6).



A: α -glucosidase, B: amyloglucosidase

Fig. 44: Stabilité vis-à-vis du pH de l' α -glucosidase et de l'amyloglucosidase de *Th. crustaceus* (P6).



A: α -glucosidase; B: amyloglucosidase

* Effet des sels

Quelques métaux même à la faible concentration utilisée (1mM) inhibent partiellement l'alpha-glucosidase (Pb, Ni, Cu, Fe, Hg) ou l'amyloglucosidase (Pb, Hg, Al), le plomb étant dans les deux cas le métal le plus inhibiteur. Le mercure, s'il inhibe partiellement l'enzyme ne cause pas de perte similaire à celle rapportée par Kling (1967). L'EDTA ne cause pas d'inhibition ce qui laisse penser qu'aucun ion métallique n'est impliqué dans l'action des enzymes. L'urée ne cause pas de dommages aux enzymes comme pour les autres amyloglucosidase ou alpha-glucosidases citées par les auteurs (Tab.35).

E.- CARACTERISTIQUES CHIMIQUES

Seule l'alpha-glucosidase, enzyme thermostable du complexe a été étudiée .

1. Composition en acides aminés

L'analyse des acides-aminés entrant dans la composition de l'alpha-glucosidase de *Th. crustaceus* a été réalisée par G. Viala au centre de Physiologie Végétale de l'Université Paul Sabatier de Toulouse. (Tab.36)

Si l'on compare les pourcentages des résidus acides aminés de l'alpha-glucosidase de *Th. crustaceus* et de l'*A. fumigatus* analysé par Rudick et Elbein (1974), on s'aperçoit que le % des résidus His, Glx, Cys, et Gly est plus élevé chez *Th. crustaceus* et le % moindre pour Thr et Asp; les autres % montrent un % voisin. Il aurait été intéressant de mettre en parallèle la composition en acides aminés et la thermostabilité des deux enzymes malheureusement aucune donnée relative à la thermostabilité de l'enzyme étudié par Rudick et Elbein n'est disponible. La plupart des acides aminés promoteurs d'une thermostabilité améliorée (Ala et Arg, Argos et al., 1980; Ala et Leu, Atkinson, 1976 ; ou Pro, Suzuki et al., 1987) sont présents dans les deux enzymes avec des % voisins; seul le rapport AsX/Glx, plus élevé chez les enzymes thermostables critère également cité par Atkinson, est plus faible pour l'enzyme d'*A. fumigatus*. L'intervention des résidus acides aminés dans la thermostabilité s'avère donc difficile à juger ici.

2. Partie glycanique

Les analyses effectuées par la technique phénol-acide sulfurique (Montreuil et Spick, 1963) sur des fractions issues de la seconde chromatographie sur colonne (DEAE Trisacryl, IBF) et dialysées ont montré que l'enzyme contenait 22,3% d'oses totaux (standards effectués sur le D-mannose) indiquant approximativement 93 résidus hydroxylés par mole d'enzyme. Cette quantité d'oses totaux, 22,3%, entre dans les compositions habituellement mises en évidence pour les amyloglucosidase de champignons

Tab. 35: Hydrolyse de la maltodextrine MDO2 par l'alpha-glucosidase et l'amyloglucosidase en présence de divers inhibiteurs potentiels

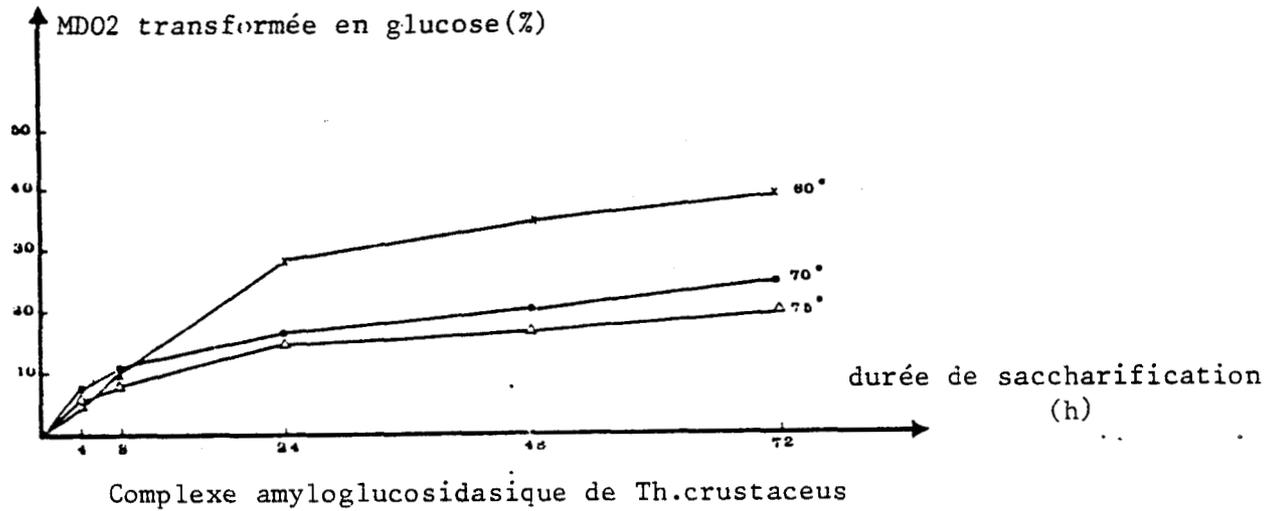
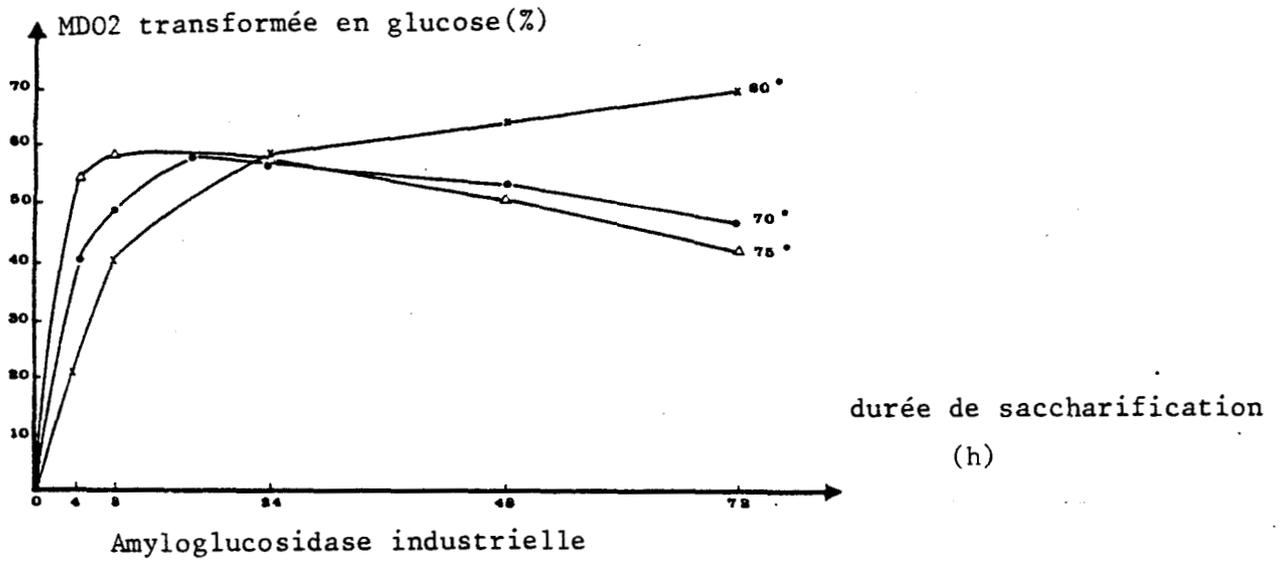
INHIBITEURS (1mM) (sous forme de chlorure)	alpha-glucosidase	amyloglucosidase
Ag	97,6	102,4
Al	95,5	97,6
Ca	100	103,9
Co	103	107,1
Cu	76,1	100,8
Fe	84,6	107,1
Hg	92,3	94,4
Li	100	105,5
Mg	100,7	103,9
Mn	104,6	103,9
Mo	95,4	100
Na	104,6	105,5
Ni	81,8	100
Pb	15,4	31,5
Urée (10mM)	102,3	105,5
Tris (50mM)	97,8	94,4

Résultats exprimés en %. Temoin sans adjonction d'inhibiteur= 100%.

Tab.36: Composition en acides aminés de l'alpha-glucosidase de Th.crustaceus (souche P6)

	alpha-glucosidase de T.crustaceus		alpha-glucosidase d'A.fumigatus (Rudick et Elbein, 1974)	
	nombre de résidus par mole	%		%
Lys	16,1	3,5		2,1
His	13,9	3,0		0,8
AsX	43,0	9,3		12,3
Thr	26,1	5,7		11,7
Ser	57,1	12,4		13,1
GlX	48,3	10,5		7,8
Pro	19,9	4,3		4,0
Gly	68,9	14,9		9,1
Ala	42,7	9,3		10,5
Val	28,1	6,1		6,2
Cys	9,9	2,1		0,9
Met	4,4	0,9		0,5
Leu	29,1	6,3		7,2
Ile	17,1	3,7		3,3
Phe	16,1	3,5		3,6
Trp	ND	ND		ND
Arg	18,9	3,1		2,5

Fig. 45: Comportement du complexe amyloglucosidasique de *T. crustaceus* et d'une amyloglucosidase industrielle en conditions de saccharification (MDO2 à 30% de matière sèche).



filamenteux.

Rudick et Elbein (1974) mettent en évidence 64 résidus osidiques par mole d'enzyme pour l'alpha-glucosidase d'*A.fumigatus*, seule référence disponible pour ce type de résultat.

Il apparaît qu'il serait intéressant d'analyser plus précisément le rôle respectif des acides aminés et de la partie glycanique dans le phénomène de thermostabilité de l'enzyme.

F.- COMPORTEMENT DU COMPLEXE AMYLOGLUCOSIDASIQUE EN CONDITIONS INDUSTRIELLES DE SACCHARIFICATION

Des essais de saccharification avec une amyloglucosidase industrielle et le filtrat de culture concentré de *Th.crustaceus* ont été menés dans des conditions proches de celles existant en industrie:

- 13,25 unités S.I d'enzyme par gramme de MDO2
- substrat composé de MDO2 à 30% de matière sèche

Le premier essai réalisé a été mené à trois températures (60°C, 70°C, 75°C, figure 45). Les concentrations d'enzyme pour les trois températures ont été établies en tenant compte d'une libération équivalente de glucose lors du dosage préliminaire effectué dans les conditions habituelles (annexe). Dans ces conditions, les quantités d'enzyme ajoutées à 70°C et 75°C étaient respectivement 1,2 et 4 fois celles ajoutées à 60°C pour l'amyloglucosidase industrielle (enzyme MKC-glucoamylase L-200), 0,9 et 1,05 fois pour le filtrat de culture concentré du *Th.crustaceus*.

- Trois constatations s'imposent à la lecture de la figure
- le complexe enzymatique du *Th.crustaceus* libère nettement moins de glucose que l'enzyme industriel
 - la quantité maximale de glucose libéré apparaît à 60°C pour le complexe enzymatique du *Th.crustaceus*, l'avantage de la thermostabilité du complexe semblant ici inopérant
 - un phénomène important de réversion est mis en évidence à des températures élevées de saccharification avec les enzymes industriels.

Deux causes pourraient expliquer la faible production de glucose obtenue lors des essais effectués avec le filtrat concentré du *Th.crustaceus*:

- un fort taux de réversion apparaissant dès le début de la saccharification
- une activité diminuée d'un des deux enzymes constituant le complexe amyloglucosidasique

Une analyse en chromatographie sur couche mince (annexe XI) montre que si le complexe produit rapidement de l'isomaltose, ce produit de réversion apparaît néanmoins limité quantitativement par rapport au glucose et ne saurait expliquer le faible taux de glucose obtenu.

Fig. 46 : Comportement de l'amyloglucosidase et de l' α -glucosidase de *T. crustaceus* en présence de concentrations élevées en substrat (MDO2).

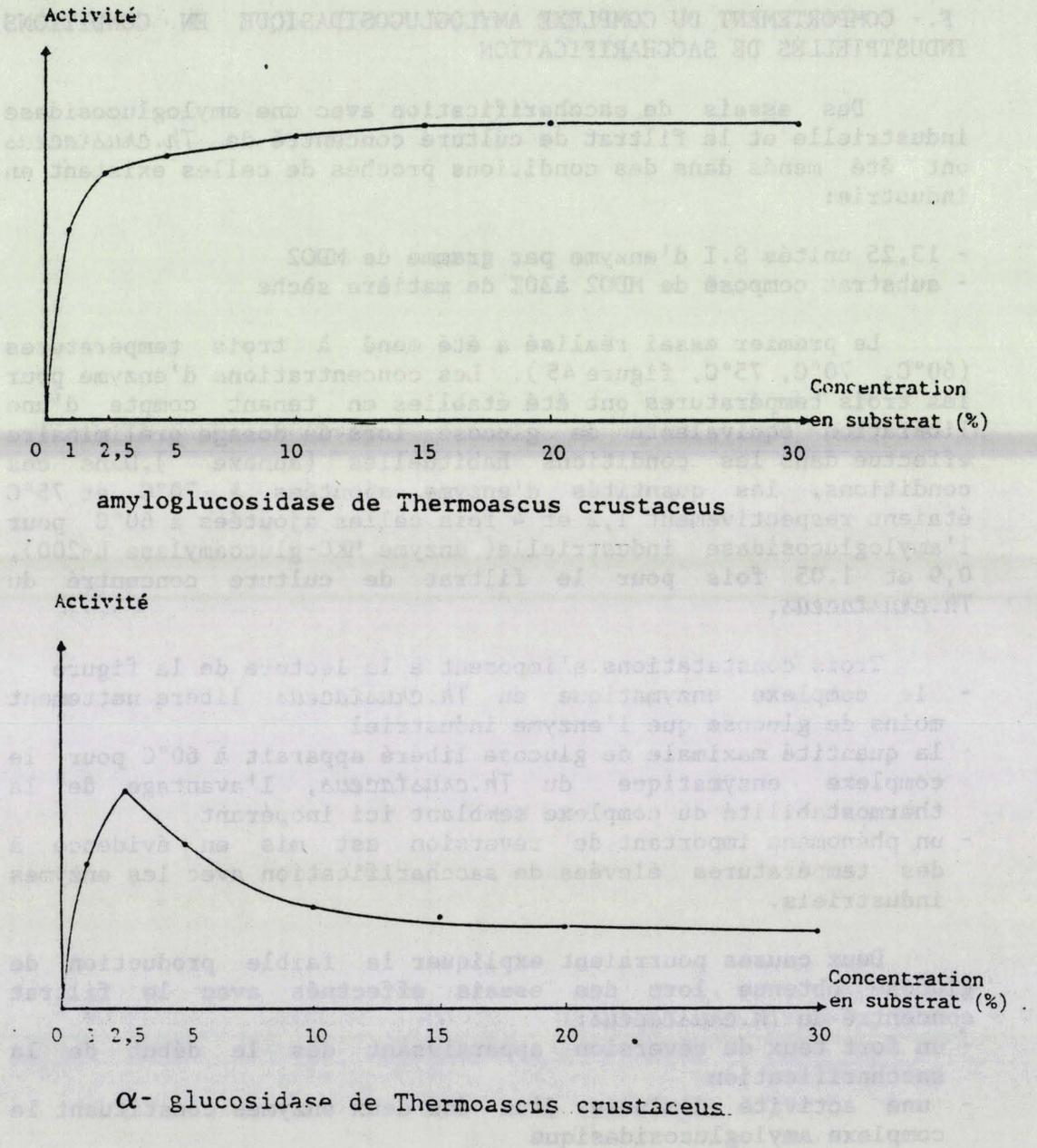


Fig. 47: Comportement d'une amyloglucosidase industrielle, du complexe amyloglucosidasique et de l' α -glucosidase de T.crustaceus en conditions de saccharification.

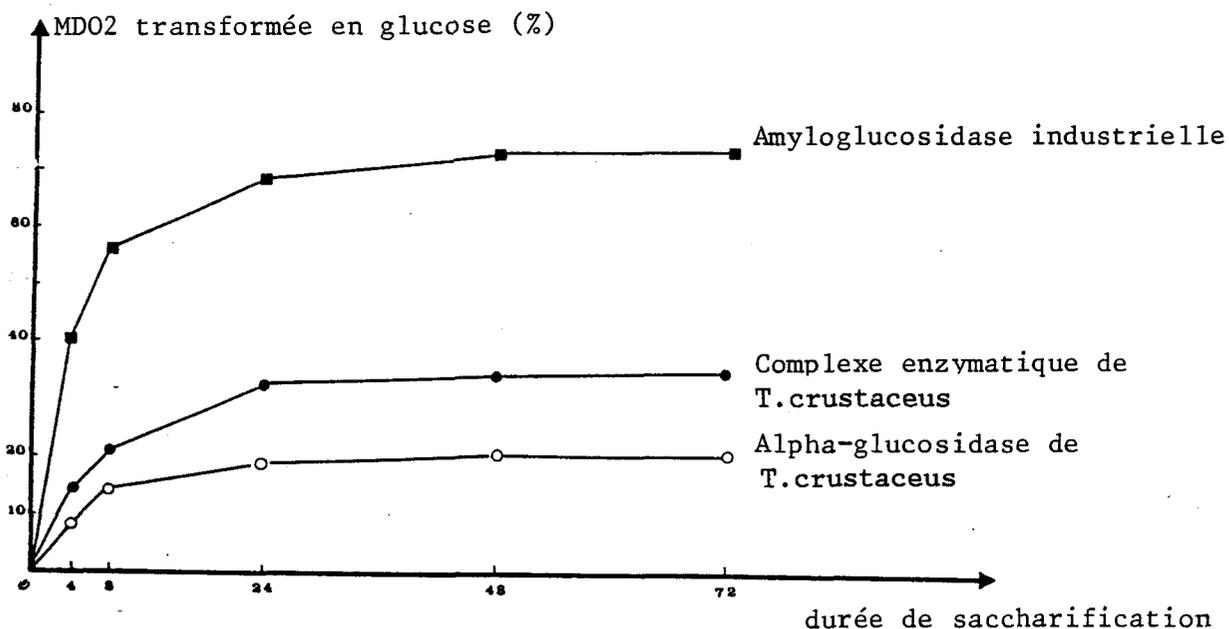
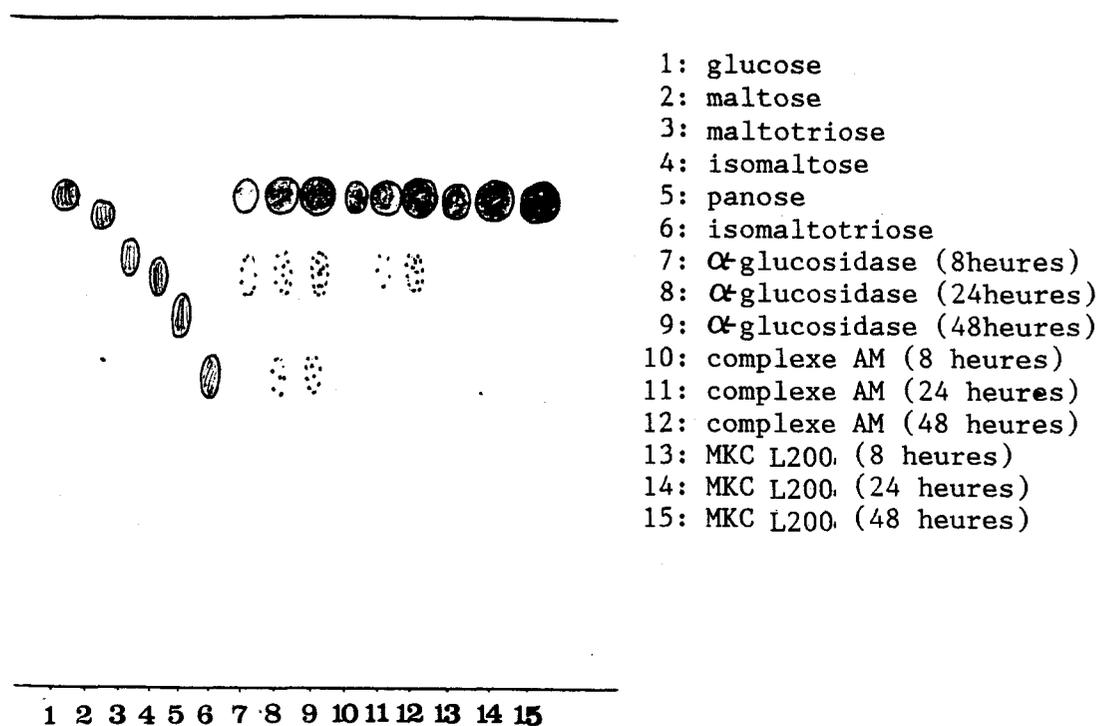


Fig. 48: Chromatographie sur couche mince des produits de saccharification de l' α -glucosidase et du complexe amyloglucosidasique de T.crustaceus et d'une amyloglucosidase industrielle (MKC L200)



L'activité des deux enzymes constituant le complexe a donc été suivie à différentes concentrations en MDO2 et a donné les résultats consignés sur la figure 46 .

En présence de 30% de matière sèche, seule l'amyloglucosidase du complexe apparaît comme efficace; l'alpha-glucosidase est quant à elle inhibée dès que la concentration en substrat dépasse 2,5%. Le rapport d'alpha-glucosidase produit par rapport à l'amyloglucosidase varie au cours de la culture; cette évolution peut être suivie grâce aux données enzymatiques (rapport d'hydrolyse amidon soluble sur maltose, thermostabilité) deux enzymes seulement étant présents. Le rapport de production alpha-glucosidase sur amyloglucosidase de 1,1 après deux jours de culture, passe à 2,7, 3,7 et 4,2 après respectivement cinq, sept et dix jours de culture. En conséquence, seul un quart de l'activité enzymatique totale du complexe est disponible pour une saccharification.

Le glucose libéré n'est pas responsable de cet effet inhibiteur; l'adjonction de glucose jusqu'à 4% dans le mélange réactionnel de dosage n'entraîne pas d'inhibition de l'enzyme. Le maltose exerce d'autre part le même effet inhibiteur que le MDO2 sur l'enzyme. Toutes les alpha-glucosidases fongiques ne possèdent pas cette propriété: un test effectué dans les mêmes conditions de teneur croissante en MDO2 avec une alpha-glucosidase de levure (Boehringer Manheim n°635 324) n'a pas permis de mettre en évidence un tel phénomène.

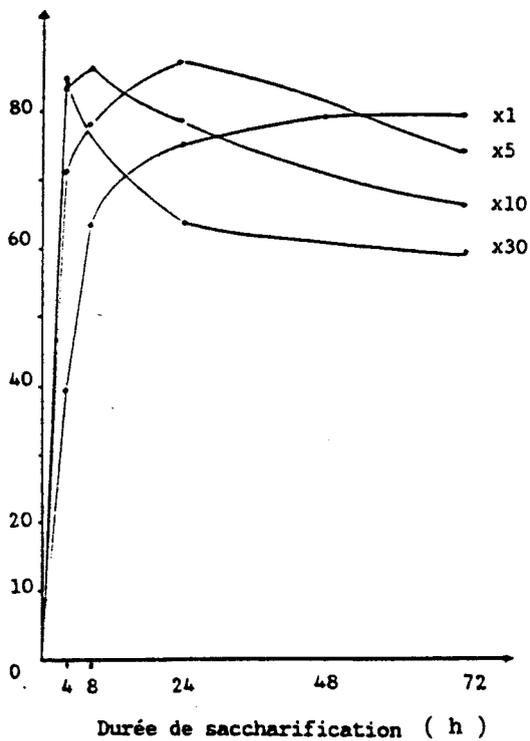
Un second essai de saccharification a été effectué à 60°C en comparant l'amyloglucosidase MKC-L 200, le complexe enzymatique concentré du *Th.crustaceus* (amyloglucosidase et alpha-glucosidase) et l'alpha-glucosidase seule du *Th.crustaceus*. Les résultats précédemment obtenus avec l'enzyme industriel et le complexe enzymatique du *Th.crustaceus* sont vérifiés; la saccharification menée à l'aide de l'alpha-glucosidase seule donne un résultat encore plus faible qu'avec le complexe enzymatique et confirme la faible aptitude de l'enzyme à fonctionner en présence de hautes concentrations en substrat (Fig47).

Une analyse en chromatographie couche mince des produits obtenus après 8, 24 et 48 heures de saccharification a été effectuée ceci pour les trois solutions enzymatiques. Un phénomène de transglycosylation est mis en évidence pour l'alpha-glucosidase qui catalyse la formation d'isomaltose et d'isomaltotriose. Néanmoins, les quantités apparues ne semblent pas pouvoir expliquer à elles seules le faible taux de glucose obtenu. Une analyse quantitative effectuée par chromatographie en phase gazeuse ou H.P.L.C. permettrait de lever le doute à ce sujet (fig.48).

Un brevet récent (Harvey et al.,1986) fait état de saccharifications menées à hautes températures (70, 75°C) et à concentrations élevées d'enzymes (de 5 à 30 fois les concentrations usuelles), ceci pendant un temps relativement

Fig.49: Comportement du complexe amyloglucosidasique de *T.crustaceus* et d'une amyloglucosidase industrielle en conditions de saccharification pour des concentrations élevées d'enzyme.

MDO2 transformée
en glucose (en %)

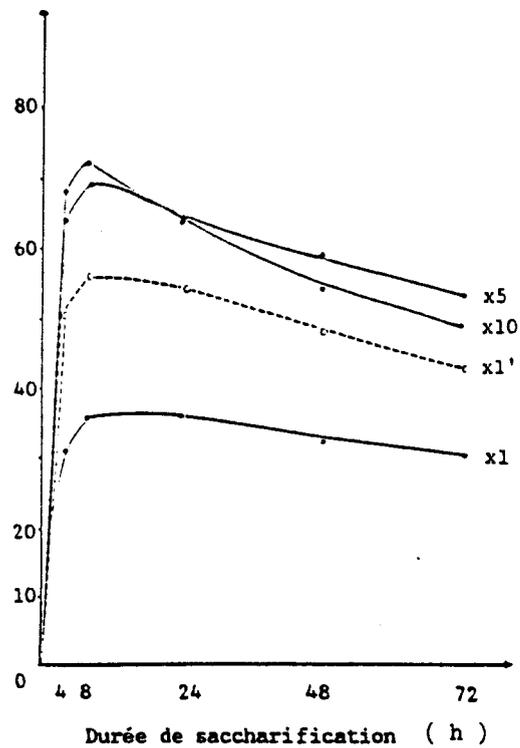


(60°C)

Amyloglucosidase industrielle

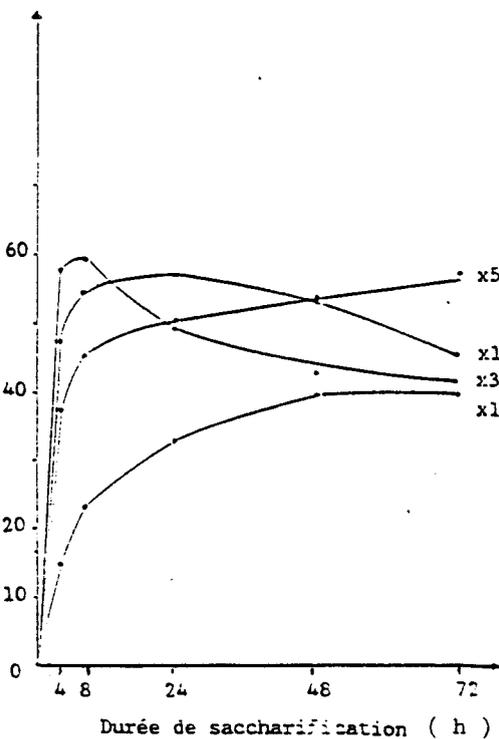
(75°C)

MDO2 transformée
en glucose (en %)



MDO2 transformée

en glucose (en %)

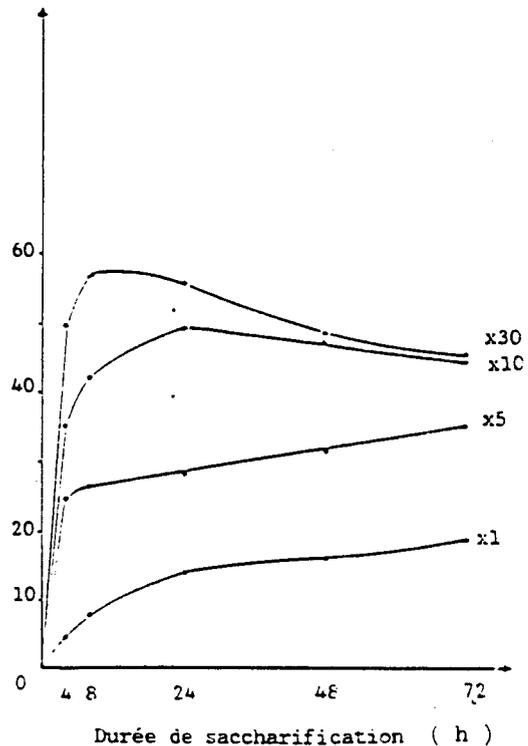


(60°C)

Complexe amyloglucosidasique

(75°C)

MDO2 transformée
en glucose (en %)



du *Thermoascus crustaceus*

court (quelques heures) pour éviter tout phénomène de réversion. L'application de ce procédé à l'amyloglucosidase industrielle et au complexe enzymatique du *Th. crustaceus* n'a pas permis d'augmenter la capacité de d'hydrolyse de hautes concentrations en substrat par les enzymes du *Th. crustaceus* (figure 49) .

G.- DISCUSSION

L'étude enzymologique a révélé deux points:

- l'enzyme responsable de la thermostabilité du complexe amyloglucosidasique est une alpha-glucosidase
- cet enzyme est inhibé par une concentration en substrat supérieure à 2,5% ce qui en interdit toute utilisation lors d'une saccharification.

Dès l'étude bibliographique, nous avons signalé l'impossibilité de différencier, au niveau de la sélection, amyloglucosidases et alpha-glucosidases. Cette impossibilité était due au choix du substrat de dosage de l'étape initiale de sélection. A la suite des étapes de purification, nous avons constaté que les deux types d'enzymes étaient présents. Des tests plus précis nous ont permis d'affirmer que la thermostabilité du complexe reposait sur la seule alpha-glucosidase.

Comme nous l'avons déjà souligné, cet écart par rapport au but initial: "recherche d'une amyloglucosidase à thermostabilité améliorée" n'a que peu d'importance pour le résultat final. En effet industriellement l'action demandée à l'amyloglucosidase est tout à fait réalisable par une alpha-glucosidase, les essais d'hydrolyse de diverses maltodextrines l'ont montré.

En conséquence, un tel enzyme pourrait être utilisé à la place d'une amyloglucosidase pour peu qu'il possède un quelconque avantage par rapport à celle-ci. Le fait qu'industriellement une telle possibilité n'ait jamais été réalisée est probablement lié à l'utilisation rentable de l'amyloglucosidase dans les conditions actuelles de saccharification et à son obtention facile. Comme il a été signalé dans le chapitre préliminaire, certaines amyloglucosidase (particulièrement bactériennes) n'ont jamais subi d'étude enzymatique prouvant leur vraie désignation; certaines d'entre elles pourraient être des alpha-glucosidases.

Pour être plus sûr de ne sélectionner que des souches productrices d'amyloglucosidases, le dosage de l'étape de sélection aurait pu être effectué sur l'amidon soluble comme substrat. Un tel dosage qui privilégie les amyloglucosidases aurait probablement créé une toute autre répartition des souches sélectionnées.

Au regard de cette découverte, il apparaissait intéressant de savoir si le gain en thermostabilité du complexe amyloglucosidasique des souches sélectionnées après la première étape de sélection était dû à une amyloglucosidase ou une alpha-glucosidase.

En conséquence, les filtrats de culture des trois souches offrant une thermostabilité nettement améliorée du complexe amyloglucosidasique (*Th. crustaceus*, *Th. aurantiacus*, et *A. du gr. fumigatus type I*) ont été étudiés avant et après une étape de chauffage à 70°C détruisant les fractions thermolabiles et

Tab. 37: Evolution du rapport d'hydrolyse amidon soluble
sur maltose après chauffage de la solution enzymatique

Complexes	I	II
Complexe thermolabile		
A.niger (amyloglucosidase MKC L 200)	5,44	4,65
Complexes thermostables		
A.gr.fumigatus I	6,22	5,90
Th.crustaceus	2,09	0,48
Th.aurantiacus	2,35	0

I: avant étape de chauffage

II: après étape de chauffage (70°C, pendant une durée de temps
correspondant à la demi-vie du complexe enzymatique.

comparés à une solution diluée d'amyloglucosidase industrielle MKC-L200, (tableau 37).

Deux types de solutions sont discernables: celles dont le rapport d'hydrolyse amidon soluble sur maltose n'évolue pas au cours du temps de chauffage (*A.niger*, *A.gr.fumigatus* I) et celles dont le rapport chute après l'étape de chauffage (*Th.crustaceus* et *Th.aurantiacus*). L'évolution du rapport fait intervenir :

- les quantités relatives d'enzymes présents (amyloglucosidase et alpha-glucosidase) avant le chauffage
- la thermostabilité des enzymes (après le chauffage)

Dans un filtrat présentant un caractère de thermostabilité, une amyloglucosidase thermolabile entraînera une chute du rapport quelles que soient les quantités respectives d'enzyme initialement présentes (*Th.crustaceus* et *Th.aurantiacus*). Après chauffage, le complexe enzymatique du *Th.aurantiacus* ne dégrade plus l'amidon soluble, la fraction amyloglucosidasique apparaît donc comme thermolabile; d'autre part la ou les alpha-glucosidases responsables de la thermostabilité ne dégradent donc pas du tout l'amidon soluble.

Un rapport constant peut indiquer soit une amyloglucosidase thermostable (rapport initial élevé), soit une alpha-glucosidase thermostable (rapport initial faible). Pour l'*A. gr.fumigatus* I, le rapport demeure constant et supérieur à 6; il est probable que la thermostabilité du complexe repose ici sur une amyloglucosidase thermostable.

En conséquence, si ce dernier résultat se confirme, seul l'*A. gr.fumigatus* I semble avoir produit le résultat désiré initialement: une amyloglucosidase à thermostabilité améliorée par rapport à l'enzyme industriel.

Certes, nous avons restreint l'étude initiale aux seuls biotopes chauds et amylicés et l'ensemble des champignons qui évoluent dans ces biotopes n'a pas été isolé de manière exhaustive pas plus que tous les biotopes mentionnés n'ont été sondés; néanmoins, il est frappant de constater que la sélection nous ait conduit à ce seul organisme producteur d'amyloglucosidase plus thermostable et produite en quantité suffisante pour qu'on puisse la détecter de manière convaincante (ce qui n'a pas été le cas pour certaines espèces comme les *Humicola* sp, les *Talaromyces* sp ou *Penicillium* sp).

L'amyloglucosidase apparaît être un enzyme à thermostabilité limitée par une barrière située vers 70°C chez les champignons filamenteux; la température optimale d'activité est comprise entre 60°C et 70°C, la demi-vie de l'enzyme n'excédant jamais 40 minutes à 70°C sans substrat; ce dernier résultat est par ailleurs très inférieur à celui des alpha-glucosidases excrétées par les deux *Thermoascus* de l'étude.

Une autre source d'amyloglucosidases à thermostabilité améliorée pourrait être les bactéries; celles-ci occupent en effet des biotopes encore plus chauds que les champignons (une douzaine d'espèces sont capables de croître au-delà de 70°C), les enzymes de ces organismes affichant parallèlement des thermostabilités élevées (Stellwagen et Wilgus, 1978). Cependant, comme il a été signalé dans le chapitre préliminaire, peu de rapports concernant les amyloglucosidases bactériennes existent.

L'A. du gr. *fumigatus* I a été écarté lors des premières étapes de sélection par suite de la pathogénicité et de la toxicité pesant sur le groupe des *A. fumigatus*. Il serait néanmoins utile de vérifier que la souche d'A. du gr. *fumigatus* I en notre possession présente bien ces caractères. Il apparaît en effet opportun de constater les avantages que pourrait retirer l'industrie d'un tel champignon:

- culture et physiologie proche de celles de l'*A. niger*
- conidiogenèse d'obtention aisée
- production d'enzymes thermostables (amyloglucosidase) ou cellulolytique (cellulases et xylanases), de ligninases
- production d'acides organiques (acide trans-époxy-succinique)

Le problème de la pathogénicité de l'*A. fumigatus* a été abordé par la recherche de mutants thermosensibles de cette espèce ne croissant pas à une température inférieure à 45°C. Malheureusement, cette tentative n'a pas été couronnée de succès, les mutants obtenus étant peu stables et sujets à une réversion importante (Nielsen et Gregory, 1978; Lewadoux et al., 1981; Arsenaux et al., 1981).

Dans ces conditions, l'utilisation d'un tel organisme à des fins industrielles semble peu envisageable. Par contre, les développements de la biologie moléculaire, appliqués ces dix dernières années aux champignons filamenteux laissent entrevoir la possibilité de transférer les gènes codant pour les métabolites ou les enzymes recherchés dans le génome d'un organisme déjà utilisé industriellement, *A. niger* ou *A. oryzae* par exemple. Cet aspect sera envisagé dans le chapitre suivant.

Le deuxième point qui retient notre attention est l'inhibition de l'alpha-glucosidase de *Th. crustaceus* aux concentrations élevées en substrat. Les cas d'enzymes présentant une telle inhibition sont assez rarement décrits par les auteurs. Bedino et collaborateurs (1986) montrent ainsi qu'une beta-glucosidase de *Th. aurantiacus* est inhibée par une concentration de P-nitrophény-Béta-glucoside supérieure à 0,5M et une concentration supérieure à 2,8M pour le cellobiose. Adya et Elbein (1977) décrivent de même une alpha-galactosidase d'*A. niger* inhibée par une concentration en substrat (P-nitrophényl-alpha-D-galactopyranoside) de $5 \cdot 10^{-4}$ M.

Diverses hypothèses peuvent expliquer ce comportement:

- une inhibition créée par la concentration élevée en substrat elle même
- une rétroinhibition due au produit formé, le glucose
- une transglycosylation (le produit dosé est transformé en un ou plusieurs autres)

Les deux dernières possibilités ont été vérifiées soit en ajoutant du glucose dans le mélange réactionnel soit en étudiant les produits formés au cours d'une saccharification. Ces deux tentatives n'ont pas permis d'expliquer totalement l'inhibition constatée même si une transglycosylation a pu être mise en évidence, le glucose formé étant partiellement transformé en isomaltose et isomaltotriose. Nous n'avons pas cherché à comprendre plus précisément le processus d'inhibition de l'enzyme. Des études biochimiques plus précises seraient à envisager pour appréhender les mécanismes exacts entrant en jeu.

G.- CONCLUSION

L'étude enzymologique menée sur le filtrat de culture de *Th. crustaceus* nous a permis de mettre en évidence deux enzymes possédant une activité amyloglucosidasique, une alpha-glucosidase (EC 3.2.1.20.) et une amyloglucosidase (EC 3.2.1.3.). La thermostabilité du complexe amyloglucosidasique de *Th. crustaceus* repose uniquement sur la première citée (demi-vie de 14 heures à 70°C, sans substrat), la seconde exhibant une thermostabilité comparable à celle des amyloglucosidasés utilisés industriellement (demi-vie de 10 minutes à 70°C, sans substrat).

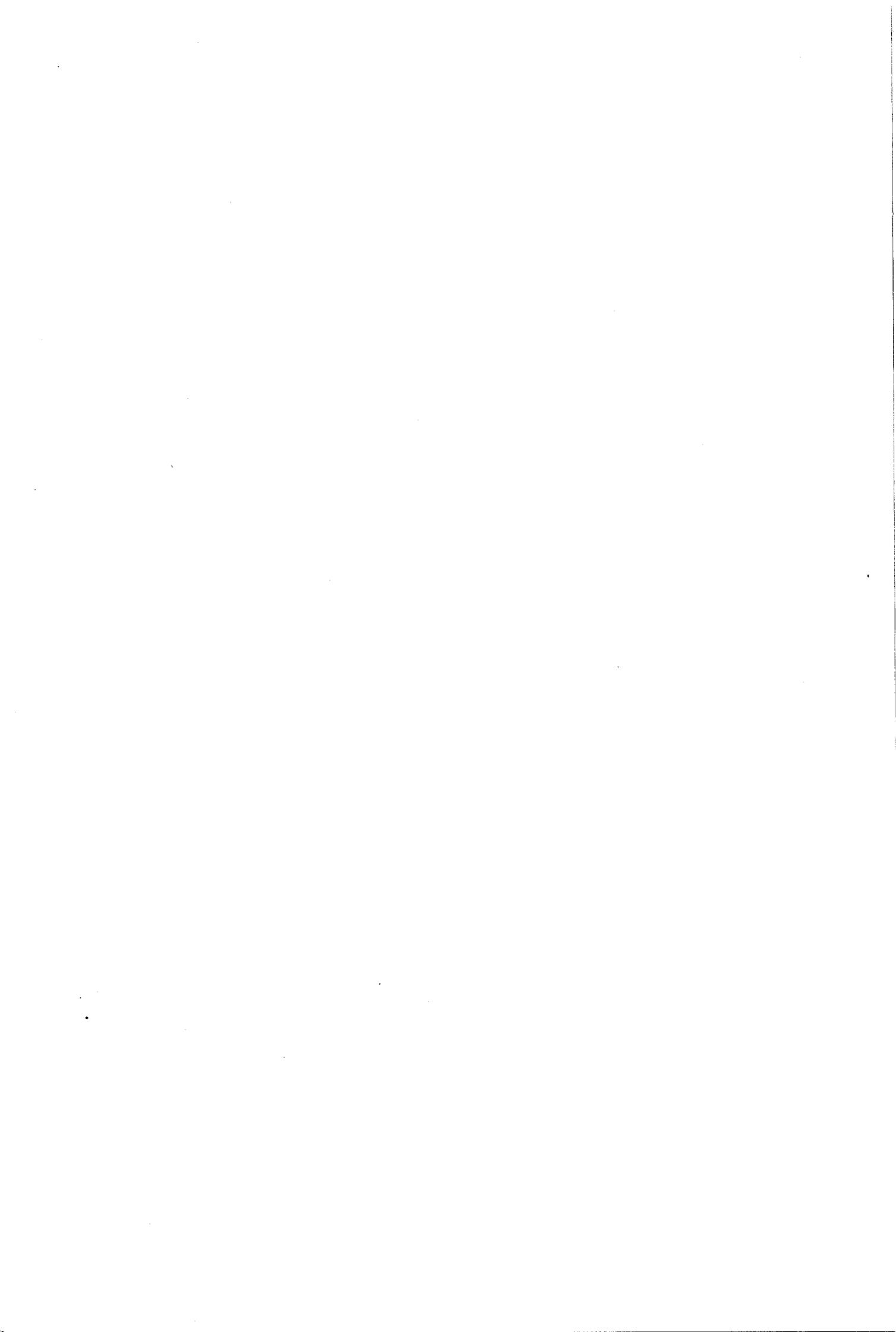
Les propriétés physiques des deux enzymes (poids moléculaires, action du pH, de la température et des sels) permettent également de les différencier.

La thermostabilité exprimée par l'alpha-glucosidase n'est malheureusement pas utilisable en conditions industrielles, l'alpha-glucosidase étant inhibée par des concentrations en MDO2 supérieures à 2,5%.

Dans ces conditions, le complexe enzymatique de l'*Aspergillus* du groupe *fumigatus* type I, qui semble quant à lui composé d'une ou de plusieurs amyloglucosidasés thermostables d'après les premiers essais effectués, suscite un regain d'intérêt.

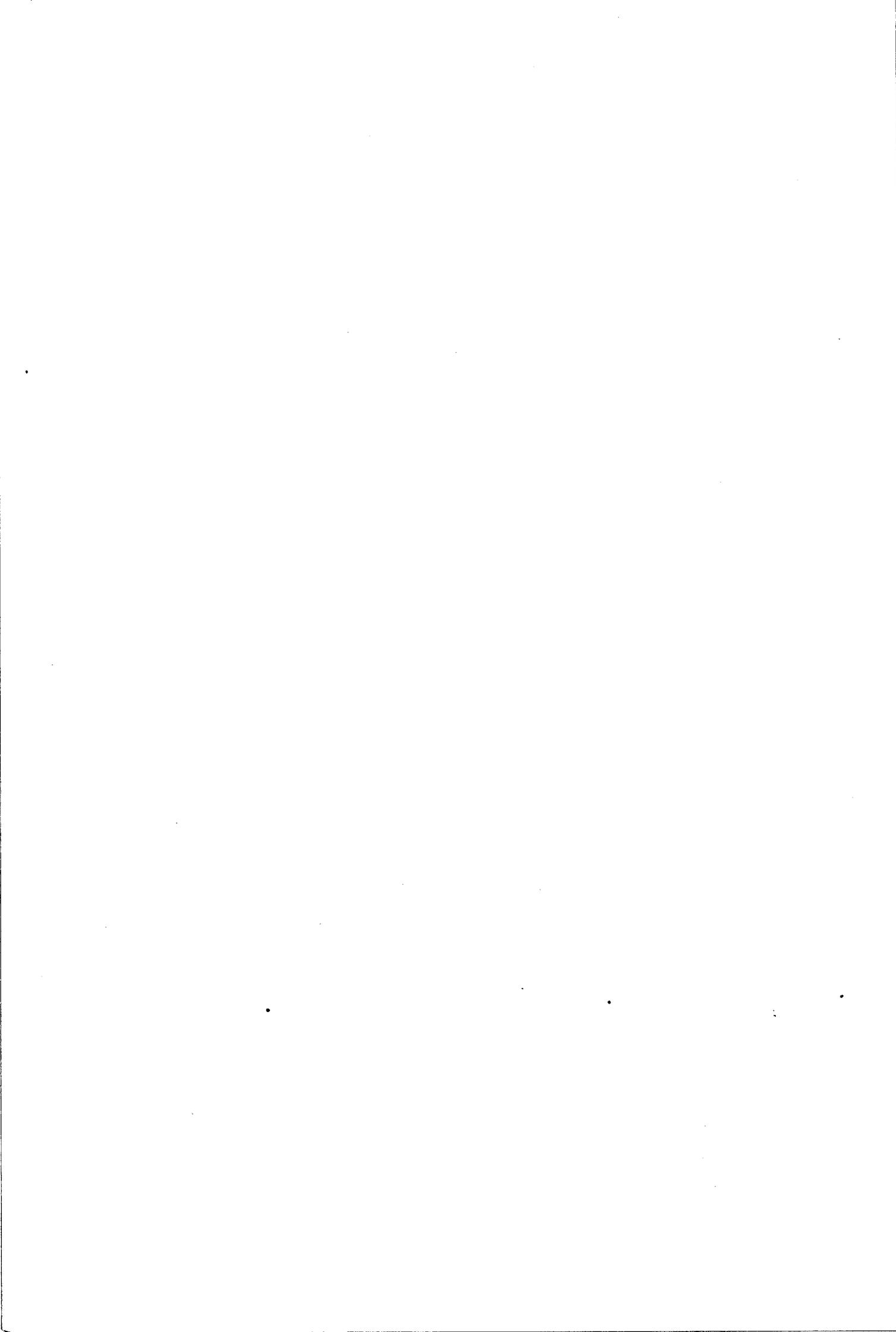
Le caractère pathogène de son groupe d'appartenance pose néanmoins un problème majeur. L'isolement du gène codant pour l'enzyme thermostable afin de permettre son expression dans un organisme dépourvu de toute pathogénicité et producteur légal d'enzyme permettrait de lever cette hypothèse.

Le chapitre suivant est consacré à l'approche de cette question.



C O N C L U S I O N

G E N E R A L E



Le but de notre étude consistait à substituer à l'amyloglucosidase actuellement utilisée en saccharification industrielle un enzyme à thermostabilité nettement améliorée.

Un tel enzyme permettrait d'augmenter la vitesse de réaction, d'obtenir une meilleure fluidité du sirop de glucose et surtout d'éviter les contaminations bactériennes possibles à 60°, température optimale d'activité des amyloglucosidases usuelles. Parmi les voies d'étude envisagées, les données bibliographiques nous ont orienté vers la recherche de nouvelles souches fongiques productrices.

La première partie de l'étude a consisté en un isolement sur milieu à base d'amidon de 846 souches fongiques issues de biotopes chauds ou amylicés et à tester la thermostabilité des enzymes amyloglucosidasiques de ces isolats. Cette sélection, dans laquelle la thermostabilité améliorée était estimée par l'augmentation de la température optimale d'activité, a permis de mettre en évidence les qualités des enzymes produits par certains *Aspergillus* des groupes *niger* et *fumigatus* ainsi que deux espèces de *Thermoascus*, *Th.aurantiacus* et *Th.crustaceus*.

Une deuxième phase de sélection, dans laquelle la thermostabilité était suivie par un test de demi-vie pratiqué à 70°C en présence de substrat (maltodextrine à 30% de matière sèche) et en son absence, a montré la nette prédominance des enzymes des deux *Thermoascus* sur ceux des *Aspergillus niger*; les *Aspergillus* du groupe *fumigatus* ont été éliminés au vu de la réputation de pathogénicité de ces champignons. Le *Thermoascus aurantiacus* présentant divers désavantages en vue d'une utilisation industrielle (activité amyloglucosidasique spécifique faible, activité transglucosidasique relative élevée, présence de polysaccharides dans le filtrat de culture, nécessité de cultiver le champignon à haute température, 45°C) le choix final, effectué en accord avec les responsables de Roquette Frères, s'est porté sur le *Th.crustaceus*.

La production d'enzyme du *Th.crustaceus* étant jugée trop faible pour une utilisation industrielle, une amélioration de production a été envisagée. Elle a été recherchée par voie génétique. Nous avons obtenu des mutants de la souche retenue de *Th.crustaceus* produisant quatre fois plus d'enzyme que la souche initiale, ceci après trois étapes de mutagenèse. Cette amélioration reste néanmoins encore insuffisante pour une exploitation industrielle; par ailleurs, la souche utilisée ne semble guère permettre une amélioration conséquente de la production par les techniques employées. Deux possibilités sont envisageables pour continuer l'amélioration dans cette direction: changer les conditions de mutagenèse (taux de survie diminué, agent mutagène différent) ou encore essayer de provoquer une amélioration de production par mutagenèse chez les autres souches de la même espèce, isolées lors de la première étape de sélection.

Les différents enzymes du complexe amyloglucosidasique de *Th.crustaceus* ont été purifiés. Une amyloglucosidase et une

alpha-glucosidase ont ainsi été mises en évidence, la thermostabilité du complexe reposant sur la seconde.

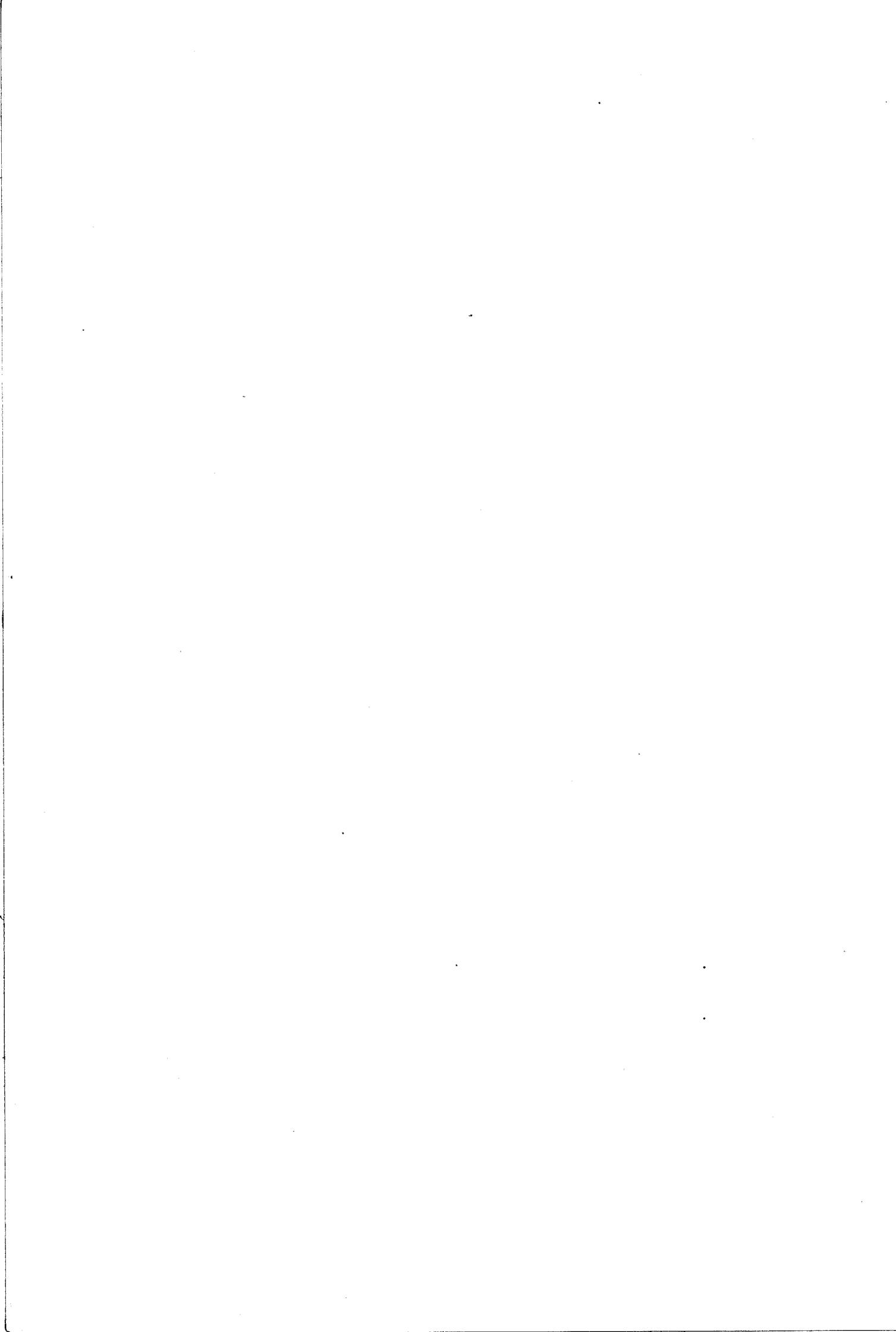
Des essais de saccharification menés dans des conditions proches de celles existant en industrie ont montré que le complexe enzymatique de *Th. crustaceus* produisait moins de glucose que l'enzyme industriel utilisé comme témoin. Un suivi de l'activité des deux enzymes constituant le complexe à différentes concentrations en substrat a montré que l'alpha-glucosidase était inhibée par une concentration en substrat supérieure à 2,5%. Le complexe enzymatique, bien que thermostable et efficace à cette faible concentration en substrat n'est donc pas utilisable en conditions industrielles.

Bénéficiant de la méthodologie mise au point avec le *Thermoascus crustaceus*, nous avons voulu vérifier les potentialités des *Aspergillus* du groupe *fumigatus*, l'un de ses membres, sélectionné au cours de la première partie de notre étude proposant un complexe amyloglucosidasique à thermostabilité améliorée. L'analyse de ce complexe a montré que les enzymes responsables de cette thermostabilité étaient des amyloglucosidases et qu'elles conservaient leur activité à des concentrations élevées en substrat. Le groupe des *A. fumigatus* étant suspecté de pathogénicité, la souche retenue n'est donc pas utilisable en industrie. L'idée d'une recombinaison du gène codant pour l'amyloglucosidase thermostable est apparue comme pouvant lever cet obstacle. Parmi les diverses voies existant, le transfert du gène chez un organisme producteur, *A. niger* ou *A. oryzae*, a été envisagé.

Cette méthode permet d'effectuer un choix limité au sein du génome de la souche et ainsi de limiter la possibilité de transfert de l'éventuel caractère pathogène. La procédure proposée pour réaliser le transfert pose certains problèmes tels que l'obtention d'une sonde ou encore la reconnaissance des souches fongiques transformées. L'utilisation d'une sonde oligonucléotidique dont la séquence suivrait les données bibliographiques relatives aux gènes d'amyloglucosidases séquencés serait une solution au problème. Des mutants amyloglucosidase(-) pourraient de même être envisagés comme souches réceptrices, un test en boîte pouvant être adopté pour identifier les transformées.

Un des rôles joué par la partie glycanique de l'enzyme a pu être mis en évidence, l'ablation de celle-ci entraînant une chute de la thermostabilité de l'enzyme. Cette dernière expérience met l'accent sur le problème plus général du transfert de gènes codant pour des glycoprotéines chez des organisme même phylogénétiquement voisins. Dans le cas où la glycosilation est indispensable pour obtenir l'effet désiré, la possibilité de se trouver confronté à une glycosilation différente pose un problème. Dans notre cas, seul le transfert effectif du gène codant pour l'enzyme permettra de répondre à cette question.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES



- ADACHI S., UEDA Y., and K. HASHIMOTO, 1984. Kinetics of formation of maltose and isomaltose through condensation of glucose by glucoamylase. *Biotechnol. Bioeng.*, 26, p. 121-27.
- ADAMS P.R. and J.J. DEPLOY, 1978.- Enzymes produced by thermophilic fungi. *Mycologia*, 70, p. 906-910.
- ADYA S. and A.D. ELBEIN, 1977.- Glycoprotein enzymes secreted by *Aspergillus niger*: purification and properties of α -galactosidase. *J. Bact.*, 129, p. 850-56.
- AFANAS'EVA V.P. and G.V. ZAITSEVA, 1977.- Effect of nitrosoguanidine and ultraviolet light on the glucoamylase producer *Endomycopsis fibuligera*. *Microbiology*, 46, (4), p. 580-583.
- AHERN T.J., CASAL J.I., PETSKO A. and A.M. KLIBANOV, 1987.- Control of oligomeric enzyme thermostability by protein engineering. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84, p. 675-679.
- AINSWORTH G.C., 1973.- Introduction and keys to the higher taxa. in *The Fungi: an advanced treatise*. Vol 4A: A taxonomic review with keys. Eds G.C. AINSWORTH, K.F. SPARROW, A.S. SUSSMAN, Academic press, N.Y.
- ALAZARD D. and J.F. BALDENSPERGER, 1982.- Amylolytic enzymes from *Aspergillus hennebergii*: purification and characterization of amylases from the solid and liquid culture. *Carbohydr. Research*, 107, p. 231-241.
- ALAZARD D. and M. RAIMBAULT, 1981.- Comparative study of amylolytic enzymes production by *Aspergillus niger* in liquid and solid state cultivation. *Eur. J. Appl. Microb. Biotechnol.*, 12, (2), p. 113-117.
- ALBER T. and J.A. WOZNIAK, 1985.- A genetic screen for mutations that increase the thermal stability of phage T4 lysozyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82, p. 747-750.
- ALDERSON T. and A.M. CLARK, 1966.- Interlocus specificity for chemical mutagens in *A.nidulans*. *Nature*, 210, p. 593-95.
- ALDERSON T. and J. HARTLEY, 1969.- Specificity for spontaneous and induced forward mutation at several gene loci in *Aspergillus nidulans*. *Mutat. Res.*, 8, p. 255-64.
- ALIKIHANIAN S.I., 1962.- Induced mutagenesis in the selection of microorganisms. *Adv. Appl. Microbiol.*, 4, p. 1-50.
- AL-MUSALLAM A., 1980.- Revision of the black *Aspergillus* species. *Thèse de Doctorat*, Utrecht.
- ANDER P. and K.E. ERIKSSON, 1976.- The importance of phenol oxidase activity in lignin degradation by the white-rot fungus *Sporotrichum pulverulentum*. *Arch. Microbiol.*, 109, p. 1-8

- ANONYME, 1987.- Brevets : du dépôt à la mise à disposition des microorganismes. *Biofutur*, 56, p. 51-56.
- APINIS A.E., 1967.- *Dactylomyces* and *Thermoascus*. *Trans. Br. Mycol. Soc.*, 50, p. 573-582.
- APINIS A.E. and C.G.C. CHESTERS, 1964.- Ascomycetes of some salt marshes and sand dunes. *Trans. Br. Mycol. Soc.*, 47, p. 419-435.
- ARGOS P., ROSSMAN M.G., GRAU U.M., ZUBER H., FRANK G. and J.D. TRATSCHIN, 1980.- Thermal stability and protein structure. *UCLA Forum*, 21, p. 159-169
- ARIMA T., SPIRO M. and R.G. SPIRO, 1972.- in RUDICK M.J. and A.D. ELBEIN, 1974. Glycoprotein enzymes secreted by *Aspergillus fumigatus*. *Arch Biochem. Biophys.*, 161, p. 281-290.
- ARSENEAU A.J. and GREGORY K.F., 1981.- Sequential cold-sensitive mutations in *Aspergillus fumigatus*. III. Mechanism of cold sensitivity. *Can. J. Microbiol.*, 27, p. 304-10.
- ASHIKARI T., NAKAMURA N., TANAKA Y., KIUCHI N., SHIBANO Y. and H. YOSHIZUMI, 1985.- Glycoamylase gene. Brevet EP 0186 066.
- ASHIKARI T., NAKAMURA N., TANAKA Y., KIUCHI N., SHIBANO Y., TANAKA T., AMACHI T. and YOSHIZUMI H., 1986.- *Rhizopus* raw starch degrading glucoamylase: its cloning and expression in yeast. *Agric. Biol. Chem.*, 50, p. 957-64.
- ASHIKARI T., NAKAMURA N., TANAKA Y., KIUCHI N., SHIBANO Y., TANAKA T., AMACHI T. and YOSHIZUMI H., 1985.- Cloning and expression of the *Rhizopus* glucoamylase gene in yeast. *Agric. Biol. Chem.*, 49, p. 2521-23.
- ASTHER M., CARRIEU G., MONTIES B. and E. ODIER, 1987.- Ligninases - l'INRA fait feu de tout bois. *Biofutur*, 60, p. 55-60.
- ATKINSON A., 1976.- Thermostable enzymes. *J. appl. Chem. Biotechnol.*, 26, (10), p. 577-578.
- AZEVEDO J.L. and J.A. ROPER, 1967. in BURNETT J.H., 1975.
- BALANCE D.J., BUXTON F.P. and G. TURNER, 1983.- Transformation of *Aspergillus nidulans* by the orotidine-5'-phosphate decarboxylase gene of *Neurospora crassa*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 112, (1), p. 284-289.
- BALL C., 1973. Improvement of penicillin productivity in *Penicillium chrysogenum* by recombination. in *Genetics of Industrial Micro-organisms 1970*. Volume II: Actinomycetes and Fungi, p. 227-37. VANEK Z. HOSTALEK Z. and J. CUDLIN. Amsterdam, London and New York: Elsevier.
- BALL C., LAWRENCE A.J.; BUTLER J.M. and K.B. MORRISON, 1978.- Improvement in amyloglucosidase production following genetic recombination of *Aspergillus niger* strains. *Europ. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 5, p. 95-102.

- BANKS G.R., 1983. Transformation of *Ustilago maydis* by a plasmid containing yeast 2-Micro DNA.- *Curr. Genet.*, 7, p. 73-77.
- BARKER S.A., GRAY C.J., M.E. JOLLEY, 1971.- Photooxidation of glucoamylase I from *Aspergillus niger*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 45, p. 654-58.
- BARNEY M.C., JANSEN G.P. and J.R. HELBERT, 1980.- Use of spheroplast fusion and genetic transformation to introduce dextrin utilization into *Saccharomyces uvarum*. *ASBC J.*, 38, (1), p.1-5.
- BASAVESWARA RAO V., SASTRI N.V.S. and P.V. SUBBA RAO, 1981.- Purification and characterization of a thermostable glucoamylase from the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosa*. *Biochem J.*, 193, p. 379-387.
- BASAVESWARA RAO V., MAHESWARI R., SASTRY N.V.S. and P.V. SUBBA RAO, 1979.- A thermostable glucoamylase from the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosa*. *Curr. Science*, 48, (3), p. 113-115.
- BEDINO S., TESTORE G. and F. OBERT, 1985.- Comparative study of glucosidases from the thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus* Miehe. Purification and characterization of intracellular β -glucosidase. *Ital. J. Biochem.*, 34, p. 341-355.
- BEDINO S., TESTORE G. and F. OBERT, 1986.- Kinetic properties and mechanism of action of an intracellular β -glucosidase from *Thermoascus aurantiacus* Miehe. *Ital. J. Biochem.*, 35, p.207-220.
- BEGGS J.D., 1978.- Transformation of yeast by a replicating hybrid plasmid. *Nature*, 275, p. 104-108.
- BEGUERET J., RAZANAMPAVARY Y., PERROT M. and C. BARREAU, 1984. Cloning gene Ura 5 for the orotydic acid pyrophosphorylase of the filamentous fungus *Podospora anserina*; transformation of protoplasts. *Gene*, 32, p. 487-92.
- BENDER H., 1981.- A bacterial glucoamylase degrading cyclodextrins. *Eur. J. Biochem.*, 115, (2), p. 287-291.
- BENSON C.P., KELLY C.T. and W.M. FOGARTY, 1982.- Production and quantification of transglucosidase from *Aspergillus niger*. *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, 32, p. 790-798.
- BERNARD B.A., NEWTON S.A. and K. OLDEN, 1983.- Effect of size and location of the oligosaccharide chain on protease degradation of bovine pancreatic ribonuclease. *J. Biol. Chem.*, 258, (20), p. 2196-202.
- BISSET J., 1984. A revision of the genus *Trichoderma* 1- section *Longibrachiatum* sect.- nov. *Can. J. Bot.*, 62, p. 924-31.
- BLOMHOFF H.K. and T.B. CHRISTENSEN, 1983.- in WASSERMAN, 1984.

- BLOMHOFF H.K. and T.B. CHRISTENSEN, 1983.- in WASSERMAN B.P., 1984.
- BOBKOVA A.F., VELIKODVORSKAYA G.A., TIKCHONENKO G.I., LEBED E.S., EGOROV A.A. and Y.E. BARTOSHEVICH, 1975.- Viruses infective for bacteria in strains of *Penicillium chrysogenum* with various antibiotic activity. *Antibiotiki*, 20,-p. 600-606.
- BOCK K. and H. PEDERSEN, 1984.- The solution conformation of acarbose. *Carbohydr. Res.*, 132, p. 142-49.
- BOEL E., HANSEN M.T., HJORT I., and N.P. FILL, 1984.- Two different types of intervening sequences in the glucoamylase gene from *Aspergillus niger*. *Embo J.*, 3, (7), p. 1581-84.
- BOEL E., HJORT I., SVENSSON B., NORRIS F., NORRIS K.E. and FILL N.P., 1984.- Glucoamylases G1 and G2 from *Aspergillus niger* are synthesized from two different but closely related mRNAs. *Embo J.*, 3, (5), p. 1097-1102.
- BON E., FREIRE D.G., MENDES M.F. and V.F. SOARES, 1984a.- Immobilization of glucoamylase on inexpensive supports: a comparative evaluation. *Biotechnol. Bioeng. Symp. n°14*, p. 447-455.
- BON E., FREIRE D.G., MENDES M.F., MOREIRA C.P. and V.F. SOARES, 1984b.- Immobilization of glucoamylase on chitin. *Biotechnol. Bioeng. Symp. n°14*, p. 485-492.
- BOTTON B., BRETON A., FEVRE M., GUY Ph., LARPENT J.P. et P.VEAU, 1985.- Moisissures utiles et nuisibles. Importance industrielle. Masson.
- BREVET BELGE n° 878-466, 1979.- Préparation enzymatique de glucoamylase à haute thermostabilité, sa production et ses applications. by C.P.C. International Inc.
- BREVET EUROPEEN n° 135-138, 1984.- A novel thermostable glucoamylase and method for its production. By C.P.C. International Inc.
- BREVET EUROPEEN n° 189-838, 1986.- Thermal stabilization of alpha-amylase. by Miles laboratories, Inc.
- BROWN D.K., MILITZER W. and C.E. GEORGI, 1957. in PRASAD A.R.S. and R. MAHESHWARI, 1978.
- BROWN W.F. and R.P. ELANDER, 1966.- Some biometrics considerations in an applied antibiotic AD-464 strain developpement program. *Devel. Ind. Microbiol.*, 7, p. 114-23.
- BULL H.B. and K. BREESE, 1973b.- Thermal stability of proteins. *Arch. Biochem. Biophys.*, 158, p. 681-86.
- BULL H.B. and K. BREESE, 1973a.- Thermal transitions of proteins. *Arch. Biochem. Biophys.*, 156, p. 604-612.
- BURNETT J.H., 1975. *Mycogenetics*. W.Clowes & Sons Ltd., 375p.

- BUXTON F.P., GWYNNE D.I., and R.W. DAVIES, 1985.- Transformation of *Aspergillus niger* using the *argB* gene of *Aspergillus nidulans*. *Gene*, 37, p. 207-14.
- CALAM C.T., 1964.- The selection, improvement and preservation of microorganisms. *Prog. Ind. Microbiol.*, 5, p. 1-53.
- CALAM C.T., DAGLISH L.B., and E.P. McCANN, 1976.- Penicillin: tactics in strain improvement. in *Genetics of Industrial Micro-organisms 1974*, p.273-87, Macdonald K.D., London, New York and San Farnsisco, Academic Press.
- CAMPBELL L.L., 1955. in PRASAD A.R.S. and R.MAHESHWARI, 1978.
- CASE M.E., SCHWEIZER M., KUSHNER S.R. and N.H. GILES, 1979.- Efficient tranformation of *Neurospora crassa* by utilizing hybrid plasmid DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.USA*, 76, p. 5259-63.
- CERDA-OLMEDO E.R. and R. RUIZ-VAZQUEZ, 1979.- Nitrosoguanidine mutagenesis. in *Genetics of Industrial Microorganisms 1978*, p. 15-20 , SEBEK O.K. and A.I. LASKIN. Washington : American Society for Microbiology.
- CHEN Y.H. and H.T.YANG, 1971.- New approach to the calculation of secondary structure of globular proteins by optical rotary dispersion and circular dichroism. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 44, p. 1285-89.
- CHIBA S. and T. SHIMOMURA, 1965.- Comparative biochemical studies on α -glucosidases. III.- Transglucosidation action of α -glucosidase of *Schizosaccharomyces pombe*. *Agric. Biol. Chem.*, 29, p. 536-540.
- CHIBA S., KIMURA A. and H. MATSUI, 1983.- Quantitative study of anomeric forms of glucose produced by α -glucosidases and glucoamylases. *Agric. Biol. Chem.*, 47, (8), p. 1741-1746.
- CHIBA S., SACKI T. and T. SHIMOMURA, 1973.- Purification and some properties of *Saccharomyces logos* α -glucosidase. *Agric. Biol. Chem.*, 37, (8), p. 1823-1829.
- CHU F.K., TRIMBLE R.B. and F. MALEY, 1978.- The effect of carbohydrate depletion on the properties of yeast external invertase. *J. Biol. Chem.*, 253, (24), p. 8691-93.
- CLARKE A.J. and B. SVENSSON, 1984,a.- The role of tryptophanyl residues in the fonction of *Aspergillus niger* glucoamylase G₁ and G₂. *Carlsberg Res. Commun.*, 49, p.111-112.
- CLARKE A.J. and B. SVENSSON, 1984,b.- Identification of an essential tryptophanyl residue in the primary stucture of glucoamylase G₂ from *Aspergillus niger*. *Carlsberg. Res. Commun.*, 49, p. 559-66.
- COONEY D.G. and R. EMERSON, 1964.- *Thermophilic fungi. An account of their biology, activities and classification*. Freeman W.H. & compagny, San Francisco & London, 183 pages.

- CRISAN E.V., 1973.- Current concepts of thermophilism and the thermophilic fungi. *Mycologia*, 65, p. 1171-1178.
- CURL E.A., 1968.- Value of a plant growth retardant for isolating soil fungi. *Can. J. Microb.*, 14, p. 182-83.
- DALBADIE-McFARLAND G., COHEN L.W., RIGGS A.D., MORIN C., TAKURA K. and J.M. RICHARDS, 1982.- Oligonucleotide directed mutagenesis as a general and powerful method for studies of protein fonction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79, p. 6409-6413.
- DAHL S.G., WAALER T., THOMASSEN S., OYSTESE B. and T. HOYLAND, 1972.- Testing error in the screening of bacitracin producing strains for high yielding mutants. *Pharm. Acta Helvetiae*, 47, p. 424-432.
- DAVIES O.L., 1964.- Screening for improved mutants in antibiotic research. *Biometrics*, 20, p.576-591.
- DEHORTER B., 1985.- Déterminisme et physiologie de la reproduction sexuée du *Nectria galligena* Bres. Thèse d'état, université de LILLE I.
- DE MOT R. and H. VERARCHTERT, 1985c.- Purification and characterization of extracellular amylolytic enzymes from the yeast *Filobasidium capsuligenum*. *Appl. Env. Microbiol* 50, (6), p. 1474-1482.
- DE MOT R. and H. VERARCHTERT, 1986a.- Secretion of α -amylase and multiple forms of glucoamylase by the yeast *Trichosporon pullulans*. *Can. J. Microbiol.*, 32, p. 47-51.
- DE MOT R. and H. VERARCHTERT, 1986b.- Enhanced production of extracellular α -amylase and glucoamylase by amylolytic yeasts using α -cyclodextrin as carbon sources. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 24, p. 459-462.
- DE MOT R., VAN OUDEN DIJCK E. and H. VERARCHTERT, 1984.- Production of extracellular debranching activity by amylolytic yeasts. *Biotechnol. Lett.*, 6, p. 581-586.
- DE MOT R., VAN OUDEN DIJCK E. and H. VERARCHTERT, 1985a.- Purification and charaterization of an extracellular glucoamylase from the yeast *Candida tsukubaensis* CBS 6389. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 51, p. 275-287.
- DE MOT R., VAN DIJK K., DONKERS A. and H. VERARCHTERT, 1985b.- Potentialities and limitations of direct alcoholic fermentation of starchy material with amylolytic yeasts. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 22, p. 222-226.
- DE MOT R., VAN OUDEN DIJCK E., HOUGAERTS S. and H. VERARCHTERT, 1986.- Effect of medium composition on amylase production by some starch degrading yeasts. *FEMS Microbiol. Lett.*, 25, p. 169-173.

- DEPREZ J., 1977.- Rapport de travail sur *Aspergillus oryzae*.
Laboratoire de Cryptogamie, Université de Lille I.
- DESMAZEAUD M.J., 1985.- Enzymes utilisables en industrie
alimentaire. Contrainte législatives. *Biofutur*, 35, p.
29-32.
- DUPRAT F., GALLANT D., GUILBOT A., MERCIER C. and J.P. ROBIN,
1980.- L'amidon. in *Les polymères végétaux*, p. 176-231. Ed.
B. Monties, Bordas, 345 pages.
- DURAND H., SOUCAILLE P. and G. TIRABY, 1984.- Comparative study
of cellulases and hemicellulases from four fungi: mesophilic
Trichoderma reesei and *Penicillium sp* and thermophilic
Thielavia terrestris and *Sporotrichum cellulophilum*. *Enz.*
Microb. Technol., 6, p. 175-180.
- DURIEZ T., WALBAUM S., TAILLIEZ R. and J. BIGUET, 1976.- Etude
enzymologique comparée de souches de *Aspergillus fumigatus*
et de *A. fischeri* d'origine saprophytique ou isolées de
lésions humaines ou animales. Repercussion pratiques d'ordre
diagnostique. *Mycopathol.*, 59, (2), p.81-90.
- DURMISHIDZE S.V., KRESITADZE G.V. and G.N. KOKONASHVIHI, 1974.-
Glucoamylase of *Aspergillus awamori*. *Chem. Abstr.*, 81,
165287
- ELANDER R. P., 1979. Mutations affecting antibiotic synthesis
in fungi producing β -lactam antibiotics. in *Genetics of*
Industrial Micro-organisms 1978, p. 21-35. SEBEK O.K. and
A.I. LASKIN. Washington: American Society for Microbiology.
- ELLIS D.H., 1981a.- Ultrastructure of thermophilic fungi: I.-
Ascocarp morphology of *Thermoascus aurantiacus*, *Trans. Br.*
Mycol. Soc., 76, (1), p. 457-466.
- ELLIS D.H., 1981b.- Ultrastructure of thermophilic fungi: II.-
Ascus and ascospore development in *Thermoascus aurantiacus*,
Trans. Br. Mycol. Soc., 76, (1), p. 467-478.
- ERRATT J.A. and A. NASIM, 1984.- The characterisation and cloning
of glucoamylase genes from *Saccharomyces diastaticus*. *Can.*
Bionergy R. and D. Semin. Proc., p. 560-64.
- ERRATT J.A. and A. NASIM, 1986.- Cloning and expression of
Saccharomyces diastaticus glucoamylase gene in *Saccharomyces*
cerevisiae and *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Bact.*, 166, p.
484-90.
- ESSER K. and G. MOHR, 1986.- Integrative transformation of
filamentous fungi with respect to biotechnological
application. *Process Biochem.*, 21, p. 153-59.
- ESWARAN S. and B.H.NGA, 1978.- Methods for the screening of
amylase -producing mutants in *Aspergillus niger*. *J. Appl.*
Bacteriol., 45, p. 287-89.
- FAIRBAIN D.A., PRIEST F.G. and J.R. STARK, 1986.- Extracellular
amylase synthesis by *Streptomyces limosus*. *Enz. Microb.*
Technol., 8, p. 89-92.

- FANTINI A.A., 1962.- Genetics and antibiotic production of *Emericellopsis* species. *Genetics*, 47, p. 161-77.
- FEDERICI F., 1984.- Glucoamylase production by *Aureobasidium pullulans*. *Mycologia*, 76, (4), p. 643-649.
- FEDERICI F. and M.D'ELIA, 1983.- Growth and amylolytic activity of *Aureobasidium pullulans* in starch limited culture. *Enz. Microb. Technol.*, 5, p. 225-226.
- FERGUS C.L., 1969.- The production of amylase by some thermophilic fungi. *Mycologia*, 61, p. 1171-75.
- FERRER S., RAMON D., SALOM J., VICENTE E. and F. URUBURU, 1985.- Protoplasts from *Podospora anserina*: isolation, purification and transformation. *Cur. Microbiol.*, 12, p. 301-6.
- FIEDUREK J., ILCZUK Z. and A. PASZCZYNSKI, 1984.- Synthesis of amylases by mixed cultures of different strains of moulds. *Starch/Stärke*, 36, (10), p. 358-61.
- FLANNIGAN B. and P.N. SELLARS, 1977.- Amylases, β -glucosidase and β -xylosidase activity of thermotolerant and thermophilic fungi isolated from barley. *Trans. Br. Mycol. Soc.*, 69, (2), p. 316-317.
- FLORES-CARREON A. and J.RUIZ-HERRERA, 1972.- Purification and characterisation of α -glucosidase from *Mucor rouxii*. *Biochim. Biophys. Acta*, 258, p. 496-515.
- FOGARTY W.M. and C.P. BENSON, 1983.- Purification and properties of a thermophilic amyloglucosidase from *Aspergillus niger*. *Eur. J. Appl. Microb. Biotechnol.*, 18, p. 271-278.
- FOGARTY W.M. and C.T. KELLY, 1979.- Starch degrading enzymes of microbial origin. *Prog. Ind. Microbiol.*, 15, p. 87-150.
- FOGARTY W.M. and C.T. KELLY, 1980.- Amylases, amyloglucosidases and related glucanases. in *Economic Microbiology*, p.115-170. Ed. Rose A.H., Academic Press, N.Y. and London.
- FREEDBERG I.M., LEVIN Y., KAY C.M., Mc CUBBIN W.D. KATCHALSKI KATZIR E., 1975.- Purification and characterization of *Aspergillus niger* exo-1,4-glucosidase. *Biochim. Biophys. Acta.*, 391, p.361-81.
- FRENCH D. and D.W. KNAPP, 1950. in KELLY C.T. and W.M. FOGARTY, 1983.
- FUGI M. and Y. KAWAMURA, 1985.- Synergistic action of α -amylase and glucoamylase on hydrolysis of starch. *Biotechnol. Bioeng.*, 27, p. 260-265.
- GIBLIN M., KELLY C.T. and W.M. FOGARTY, 1987.- Thermostable α -glucosidase produced by *Bacillus caldovelox* DSM 411. *Can. J. Microbiol.*, 33, p. 614-618.

- GOOSEN T., BLOEMHENNEL G., GYSLER C., A de BIE D., VAN DEN BROEK H.W.J. and K. SWART, 1987. Transformation of *Aspergillus niger* using the homologous orotidine-5'-phosphate-decarboxylase gene. *Curr. Genet.*, 11, p. 499-503.
- GRAF U., BORMANN E.J., ROTH M. and M. NEIGENFIND, 1986.- Mutants of *Streptomyces hygroscopicus* deregulated in amylase and α -glucosidase formation. *Biotechnol. Lett.*, 8, (9), p. 615-620.
- GRAJEK W., 1986.- Temperature and pH optima of enzyme activities produced by cellulolytic thermophilic fungi in batch and solid state cultures. *Biotechnol. Lett.*, 8, (8), p. 587- 590.
- GRAJEK W., 1987.- Comparative studies on the production of cellulases by thermophilic fungi in submerged and solid state fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 26, p. 126-127.
- GREENFIELD N.J. and G.D. FASSMAN, 1969. Computed circular dichroism spectra for the evaluation of protein conformation. *Biochemistry*, 8, p. 4108-16.
- GRIFFITHS M.W. and T.K. SUNDARAM, 1973.- Isocitrate-lyase from thermophilic *Bacillus*- effect of salts on enzyme activity. *J. Bact.*, 11, p. 1160-1169.
- GRIGOROV V.S., ZHEREBTSOV N.A. and V.V. SHCHEGOLEV, 1983.- Isolation of a thermotolerant mutant of *Rhizopus pygmaeus* with higher glucoamylase activity. *Microbiology*, 52, (3), p. 319-323.
- GRINDLE M., 1963.- Heterokaryon compatibility of closely related strains in the *Aspergillus nidulans* group. *Heredity*, 18, p. 191-204.
- GROSS V., TRANN-THI T., SCHWARZ R.T., ELBEIN A., DECKER K. and P.C. HEINRICH, 1986.- Different effects of the glucosidase inhibitors 1-deoxynojirimycin, N-methyl-1-deoxynojirimycin and castanospermine on the glycosylation of rat α 1-proteinase inhibitor and α 1-acid glycoprotein. *Biochem. J.*, 236, p. 853-60.
- GRUNINGER H. and A. FIECHTER, 1986.- A novel highly thermostable D-xylanase. *Enz. Microb. Technol.*, 8, p. 309-314.
- GUNNARSSON A., SVENSSON B., NILSSON B. and S. SVENSSON, 1984.- Structural studies on the O-glycosidically linked carbohydrate chains of glucoamylase G1 from *Aspergillus niger*. *Eur. J. Biochem.*, 145, p. 463-467.
- HABERSTICH H.V. and H. ZUBER, 1974.- Thermodaptation of enzymes in thermophilic and mesophilic cultures of *Bacillus stearothermophilus* and *Bacillus caldotenax*. *Arch. Microbiol.*, 98, p. 275-287.
- HALVORSON H.O. and L. ELLIAS, 1958.- *Biochim Biophys. Acta*, 30, p. 28. Cité par Kelly C.T. et W.M. Fogarty, 1983, in *Process Biochem.*, 18, (3), p. 6-12.

- HAMLYN P.F. and C. BALL, 1979.- Recombination studies with *Cephalosporium acremonium*. in *Genetics of Industrial Micro-organisms* 1978, p. 185-91, SEBEK O.K. and A.I. LASKIN. Washington : American Society for Microbiology.
- HANKIN L. and S.L. ANAGNOSTAKIS, 1977.- Solid media containing carboxymethyl cellulose to detect α -cellulase activity of microorganisms. *J. Gen. Microbiol.*, 98, p. 109-115.
- HANKIN L and S.L. ANAGNOSTAKIS, 1975.- The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. *Mycologia*, 67, p. 597-607.
- HANSEN S.A., 1975.- Thin-layer chromatographic method for identification of oligosaccharides in starch hydrolysates. *J. Chromatogr.*, 105, p. 388-90.
- HARVEY R.D. and P.R. WITT, 1986.- Production of high D.E. syrups. US patent n° 4622299. HAYASHIDA S., 1975.- Selective submerged productions of 3 types of glucoamylases by a black koji mold. *Agr. Biol. Chem.*, (39), (11), p. 2093-2099.
- HAYASHIDA S. and E. YOSHINO, 1978.- Formation of active derivatives of glucoamylase I during digestion with fungal-acid protease and mannosidase. *Agric. Biol. Chem.*, 42, p.927-33.
- HECHT M.H., STURTEVANT J.M. and R.T. SAVER, 1984.- Effect of single amino acid replacement on the thermal stability of the NH₂-terminal domain of phage repressor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81, 5685-5689.
- HENDRIX J. and N.E. WELKER, 1985.- Isolation of a *Bacillus stearothermophilus* mutant exhibiting increased thermostability in its restriction endonuclease. *J. Bact.*, 162, p. 682-92.
- HINNEN A., HICKS J.B., and G.R. FINK, 1978.- Transformation of yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75, (4), p. 1929-33.
- HIROSE S., TAKEUCHI K. and Y. SUZUKI, 1982.- *In vitro* characterisation of the fibroin gene promoter by the use of single-base substitution mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79, p. 7258-62.
- HOCKENHULL D.J.D. and D. HERBERT, 1945.- The amylase and maltase of *Clostridium acetobutylicum*. *Biochem. J.*, 39, p. 102-109.
- HO H.H. and B. FOSTER, 1972.- Starch utilisation by *Phytophthora* sp. *Mycopath. Mycol. Appl.*, 46, (4), p. 335-339.
- HOPWOOD H., 1970.- The isolation of mutants . in *Methods in Microbiology* vol. 3A. NORRIS J.R. and D.W. RIBBONS , Academic Press, London - New York.
- HOSCHKE A., LASZLO E. and J. HOLLO, 1980.- The active center of amylolytic enzymes II. A study of the role of histidine side-chains at the active center of amylolytic enzymes. *Carbohydr. Res.*, 81, p.145

- HOSCHKE A., LASZLO E. and J. HOLLO, 1980.- The active center of amylolytic enzymes, III. A study of the role of tyrosine groups at the active center of amylolytic enzymes. *Carbohydr. Res.*, 81, p. 157.
- HUTCHISON C.A., PHILLIPS S., EDGELL M.H., GILLAM S., JAHNKE P. and M.SMITH, 1978.- Mutagenesis at specific position in a DNA sequence. *J. Biol. Chem.*, 253, (18), p. 6551-6560.
- HYNES M.J., 1986.- Transformation of filamentous fungi; *Exp. Mycol.*, 10, p. 1-8.
- HYUN H.H. and J.G. ZEIKUS, 1985a.- General biochemical characterization of thermostable extracellular α -amylase from *Clostridium thermosulfurogenes*. *Appl. Env. Microb.*, 49, (5), p. 1162-1167.
- HYUN H.H. and J.G. ZEIKUS, 1985b.- General biochemical characterization of thermostable pullulanase and glucoamylase from *Clostridium thermohydrosulfuricum*. *Appl. Env. Microb.*, 49, (5), p. 1168-1173.
- IKEDA Y and T. BEPPU, 1983.- *Proceedings of the fourth International Symposium on the Genetics of industrial Microorganisms 1982*. Kodansha Ltd, Tokyo.
- ILCZUK Z. and J. FIEDUREK, 1985.- Synthesis of glucoamylase by somatic diploids of *Aspergillus niger* in submerged culture conditions. *Starch/Stärke*, 12, p. 428-431.
- IMANAKA T., SHIBAZAKI M. and M. TAKAGI, 1986.- A new way of enhancing the thermostability of proteases. *Nature*, 324, p. 695-697.
- INNIS M.A., HOLLAND M.J., MC CABE P.C., COLE G.E., WITTMAN V.P., TAL R., WATT K.W.K., GELFAND D.H., HOLLAND J.P., and J.H. MEADE, 1985.- Expression, glycosylation and secretion of an *Aspergillus* glucoamylase by *Saccharomyces cerevisiae*. *Science*, 228, p. 21-6.
- INOKUCHI N., TAKAHASHI T. and M. IRIE, 1981.- Purification of a minor glucoamylase from *A. saitoi*. *J. Biochem.*, 90, p. 1055-67.
- INOKUCHI N., TAKAHASHI T., YOSHIMOTO A. and M. IRIE, 1982.- N bromosuccinimide oxidation of a glucoamylase from *Aspergillus saitoi*. *J. Biochem.*, 91, p. 1661-1668.
- ISONO K., 1970.- Enzymological differences of α -amylase from *Bacillus stearothermophilus* grown at 37°C and 55°C. *Biochem. Biophys. Res. Com*, 41, (4), p. 852-857.
- IWAMA M., INOKUCHI N., OKAZAKI Y., TAKAHASHI T., YOSHIMOTO A. and M. IRIE, 1986.- Oxidation of a glucoamylase from a *Rhizopus* sp with N- bromosuccinimide. *Chem. Pharm. Bull.*, 34, (3), p. 1355-1361.

- JI T.H., 1983.- Bifonctionnal reagents. in *Methods in Enzymology*, vol. 91, HIRS C.H.W. and S.N. TIMASHEFF. Academic Press : New York.
- JOLLEY M.E. and C.E. GRAY, 1976.- Tryptophanyl and carboxylic residues of the active centre of glucoamylase I from *Aspergillus niger*. *Carbohydr. Res.*, 49, p. 361-70.
- JOHNSTONE I.L., HUGHES S.G. and A.J. CLUTTERBUCK, 1985.- Cloning an *Aspergillus nidulans* developmental gene by transformation. *Embo J.*, 4, p. 1307-11.
- KAWAMORI M., TAKAYAMA K.I. and S. TAKASAWA, 1987.- Production of cellulases by a thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus* A-131. *Agric. Biol. Chem.*, 51, (3), p. 647-654.
- KELLY C.T. and W.M. FOGARTY, 1983.- Microbial α -glucosidases. *Process Biochem.*, 18, (3), p. 6-12.
- KELLY C.T., GIBLIN M. and W.M. FOGARTY, 1986.- Resolution, purification and characterization of two extracellular glucohydrolases, α -glucosidases and maltase of *Bacillus licheniformis*. *Can. J. Microb.*, 32, (4), p. 342-347.
- KELLY C.T., MORIARTY M.E. and W.M. FOGARTY, 1985.- Thermostable extracellular α -amylase and α -glucosidase of *Lipomyces starkeyi*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 22, p. 352-358.
- KELLY J.M. and HYNES M.J., 1985.- Transformation of *Aspergillus niger* by the amd S gene of *Aspergillus nidulans*. *Embo. J.*, 4, (2), p.475-79.
- KILBEY B.J., 1974.- Determinants of the mutagenic specificity of chemical or physical agents in microorganisms. *Rad. Research*, 59, p. 966-975.
- KING N.J., 1967.- The glucoamylase of *Conidiophora cerebella*. *Biochem. J.*, 105, p. 577-83.
- KOLHEKAR S.R., MAHAJAN P.B., AMBEDKAR S.S. and P.S. BORKAR, 1985.- Purification and characterisation of glucoamylase from a higher yielding mutant of *Aspergillus candidus* Link var. *aureus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 22, p. 181-86.
- KRUMPHANZL V., SITYNA B. and Z. VANEK, 1982.- Overproduction of Microbial Products. *F.E.M.S. Symposium n° 13*. Academic Press London -New York.
- KUEK C. and D.K. KIDBY, 1985.- Determination of glucoamylase EC 3.2.1.3 in culture filtrates containing other amylolytic enzymes. *Starch/stärke*, 37, (5), p. 161-162.
- KUEK C. and D.K. KIDBY, 1984.- Screening fungi for improved glucoamylase productivity using buffered dextran broth cultures. *Biotechnol. Lett.*, 6, (9), p. 561-66.
- KUJAWSKI M. and M. WEGRZYN, 1980.- On the possibility of α -glucosidase activity determination in the presence of glucoamylase. *Starch/stärke*, 32, (2), p. 63-66.

- KWON-CHUNG K.J., FOLKS T. and K.W. SELL, 1984.- Unusual isolates of *Thermoascus crustaceus* from three monocytes culture of AIDS patients. *Mycologia*, 76, (2), p. 375-379.
- LACOSTE L., 1965.- Biologie naturelle et culturale du genre *Leptosphaeria*. Cesati et de Notaris. Déterminisme de la reproduction sexuelle. Thèse doctorat d'Etat. Toulouse.
- LANGER P.R., WALDROP A.A. and D.C. WARD, 1981.- Enzymatic synthesis of biotin-labeled polynucleotides: novel nucleic acid affinity probes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78, (11), p.6633-37.
- LEARY J.J., BRIGATI D.J. and D.C. WARD, 1983.- Rapid and sensitive colorimetric method for visualizing biotin-labeled DNA probes hybridized to DNA or RNA immobilized on nitrocellulose: Bioblots. *Pro. Natl. Acad. Sci. USA*, 80, p. 4045-49
- LEBACQ P., 1987.- Du séquençage à la synthèse de peptides et de sondes à ADN. *Biofutur*, Technoscope n° 11, p.1-18.
- LEDERBERG J. and LEDERBERG E.M., 1952.- Replica plating and indirect selection of bacterial mutants. *J. Bact.*, 63, p. 399-
- LEE J.M. and P.F. FOX, 1985.- Purification and characterisation of *Paecilomyces lilacinus* dextranase. *Enz. Microb. Technol.*, 7, p. 573-577.
- LEE T. and L.P. HAGER, 1970.- in MANJUNATH P. et al., 1983.
- LEE Y.C. and J.R. SCOCCA, 1972.- in RUDICK M.J. and A.D. ELBEIN 1974.
- LEMKE P.A., NASH C.H. and S.W. PIEPER, 1973.- Lytic plaque formation and variation in virus titre among strains of *Penicillium chrysogenum*. *J. Gen. Microbiol.*, 76, p. 265-75.
- LENDERS J.P., GERMAIN P. and R.R. CRICHTON, 1985.- Immobilisation of a soluble chemically thermostabilized enzyme. *Biotechnol. Bioeng.*, 27, p. 572-578.
- LEWADOUX W.L., GREGORY K.F. and A.TAYLOR, 1981.- Sequential cold-sensitive mutations in *Aspergillus fumigatus*. I. Analysis by the parasexual cycle. *Can. J. Microbiol.*, 27, p. 295-303.
- LIAO H., MCKENZIE T. and R. HAGEMAN, 1986.- Isolation of a thermostable enzyme variant by cloning and selection in a thermophile *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83, p. 576-580
- LINDSAY P.R., SCOTNICKI M.L. and J. SHINE, 1983.- Engineered *E.coli* to produce glucoamylase. Australian Patent Abstract, AN-A- 15456/83.
- LINEBACK D.R., 1968.- The carbohydrate-polypeptide linkages in a fungal glucoamylase. *Carbohydr. Res.*, 7, p.106-8.

- LINEBACK D.R. and W.E. BAUMAN, 1970.- Properties of a glucoamylase from *Aspergillus phoenicis*. *Carbohyd.Res.*, 14, p. 341-53.
- LINEBACK D.R., RUSSEL I.J. and C. RASMUSEN, 1969.- Two forms of the glucoamylase of *Aspergillus niger*. *Arch. Biochem. Biophys.*, 134, p 539,53.
- LODISH H.F., KONG N., SNIDER M. and G.J.A.M. STROUS, 1983. Hepatoma secretory proteins migrate from rough endoplasmic reticulum to Golgi at characteristic rates. *Nature*, 304, p. 80-83.
- LOWRY O.H., ROSEBROUGH N.J., FARR A.L. and R.L. RANDALL, 1951.- Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J.Biol Chem.*, 193, p. 265-75.

- MACDONALD K.D., HUTCHINSON J.M. and W.A. GILLET.- Heterozygous diploids of *Penicillium chrysogenum* and their segregation patterns. *Genetica*, 36, p. 387-97.
- MACK INTOSH M.E. and R.M. PRITCHARD, 1963.- The production and replication of micro-colonies of *Aspergillus nidulans*. *Genet. Res. Camb.*, 4, p. 320-22.
- Mc WETHY S.J. and P.A. HARTMAN, 1979.- Extracellular maltase of *Bacillus brevis*. *Appl. Env. Microbiol.*, 37, p. 1096-1102.
- MAKINO M. and L. YAMASHINA, 1966.- in RUDICK M.J. and ELBEIN A.D. 1974. Glycoprotein enzymes secreted by *Aspergillus fumigatus*. *Arch. Biochem. Biophys.*, 161, p.281-290.
- MANGALLAM S., SUBRAHMANYAM A. and K.S. GOPALKRISHNAN, 1977.- Preliminary observation on the production of amyloglucosidase by thermophilic fungi. *Current Science*, 46, (1), p. 16.
- MANJUNATH P. and M.R. RAGHAVENDRA RAO, 1979.- Comparative studies on glucoamylases from three fungal sources. *J. Biosci.*, 1, (4), P. 409-25.
- MANJUNATH P. and M.R. RAGHAEVNDRA RAO, 1981.- Studies on carbohydrate moities of *Aspergillus niger* glucoamylase II isolation, purification and characterization of glycopeptides. *J. Biosci.*, 3, p.333-42.
- MANJUNATH P. and M.R. SAIRAM, 1982.- Biochemical, biological and immunological properties of chemically deglycosylated human choriogonadotropin. *J. Biol. Chem.*, 257, p. 7109-7115.
- MANJUNATH P., SHENOY B.C. and M.R. RAGHAVENDRA RAO, 1983.- Fungal glucoamylases. *J. Appl. Biochem.*, 5, p. 235-260.
- MARCY R.M., ENGELHARDT T.C. and J.M. UPADHYAH, 1984.- Isolation, partial purification and some properties of protease I from a thermophilic mold *Thermascus aurantiacus* var. *levisporus*. *Mycopathol.*, 87, p. 57-65.
- MARSHALL J.J., 1978.- Quantitative determination of α -amylase in glucoamylase preparations. *Anal. Biochem.*, 85, p. 541-549.
- MARTIN J.P., 1950.- Use of acid , rose bengal and streptomycin in the plate method of estimating soil fungi. *Soil Sci.*, 69, p. 225-232.
- MATEESCU M.A., CORNOIV I. and H.D. SCHELL, 1980.- Simultaneous determination of associated - and glucoamylase using cross linked amylase. *Anal. Lett.*, 13, (B18), p. 1567-1577.
- MATSUSAKA K., CHIBA S. and T. SHIMOMURA, 1977.- in KELLY C.T. and W.M. FOGARTY, 1983.- Microbial α -glucosidases. *Process Biochem.*, 18, (3), p. 6-12.
- MEDDA S., CHANDRAN SAHA B. and S. UEDA, 1982.- Glucoamylase I of black *Aspergillus*. *J. Fac. Agr. Kyushu Univ.*, 26, (2-3), p. 139-149.

- MERCIER R., 1985.- Les enzymes amylolytiques. in *Hydrolases et dépolymérasés, enzymes d'intérêt industriel*. Eds. Mouranche A. and C. Costes. Bordas, 359 pages.
- MEYER R.M., 1952.-in W.M. FOGARTY and C.T. KELLY, 1980. *Economic microbiology*, p. 115-170. Ed. A.H. ROSE, Academic Press, N.Y. & London.
- MEYRATH J., BAHN M., HAN H.E. and H. ALTMAN, 1971.- Induction of amylase-producing mutants in *Aspergillus oryzae* by different irradiations. in *Radiation and radioisotopes for industrial microorganisms*, p. 137-55. International Atomic Energy Agency, Vienna.
- MIAH M.N.N. and S. UEDA, 1977.- Multiplicity of glucoamylase of *Aspergillus oryzae*. Part. 2: enzymatic and physicochemical properties of three forms of glucoamylase. *Die Stärke*, 29, (7), p. 235-239.
- MIEHE H., 1907.- Die Selbsterhitzung des Heus. Eine biologische Studie. Gustav Fisher, Jena.
- MILLER H.M. and M.G. SHEPPERD, 1972.- Purification and properties of 6-phosphogluconate dehydrogenase from *Penicillium duponti* and *Penicillium notatum*. *Can. J. Microbiol.*, 18, p. 1289-1298.
- MITRA J. and P.V. SANE, 1981.- A mutant strain of *Aspergillus niger* producing a thermo- and acid-tolerant amyloglucosidase in high yields. *India J. Microbiol.*, 21, (4), p. 278-282.
- MITSUE T., SAHA B.C., and S. UEDA, 1979.- Glucoamylase of *Aspergillus oryzae* cultured on steamed rice. *J. of Appl. Biochem.*, 1, p. 410-22.
- MITSUTOMI M. and A. OHTAKARA, 1984.- A simplified procedure for purification and crystallization of thermostable α -galactosidase from *Pycnoporus cinnabarinus*. *Agric. Biol. Chem.*, 48, (12), p. 3153-3155.
- MONNA M., MIKUNI K., ISHIGAMI H. and V. KAINUMA, 1987.- Purification of the glucoamylase components of *Chalara paradoxa* by affinity chromatography and chromatofocusing. *Carbohydr. Res.*, 159, p. 255-261.
- MONTENECOURT B.S. and D.E. EVELEIGH, 1977.- Semi-quantitative plate assay for determination of cellulase production by *Trichoderma viride*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 33, (1), p.178-83.
- MONTENECOURT B.S. and D.E. EVELEIGH, 1979.- Selective screening methods for the isolation of high yielding cellulase mutants of *Trichoderma reesei*. *Adv. Chem. ser.*, 181, p. 289-301.
- MONTREUIL J. et SPICK G., 1963.- Microdosage des glucides. Fasc.1. Doc. Interne Lille. 146 p.

- MORIJAWA S., NODA A., NAKANISHI K., MATSUNO R. and T.KAMIKUBO, 1980.- Thermal stability of immobilized glucoamylase entrapped in polyacrylamide gels and bound to SP-Sephadex C-50. *Agric. Biol. Chem.*, 44, (9), p. 2047-2054.
- MORITA Y, OHGA M. and L. KORENAGA, 1969.- in MANJUNATH P. et al. , 1983.
- MOURANCHE A. et COSTES C., 1985.- Hydrolases et dépolymérasés-enzymes d'intérêt industriel. Bordas, Paris. 360p.
- MURAYAMA T. and T. ISHIKAWA, 1973.- Mutation in *Neurospora Crassa* affecting some of the extracellular enzymes and several growth characteristics. *J. Bacteriol.*, 115, (3), p. 796-804
- MUTHUKUMARAN N. and S.C. DHAR, 1983.- Purification and properties of a glucoamylase fraction from the culture filtrate of *Rhizopus nodosus*. *Italian J. of Biochemistry*, 32, (4), p. 239-253.
- NAKADAI T. and S. NASUNO, 1977.- Hyperproduction of peptidase and proteinase by mutants of *Aspergillus oryzae*. *J. Ferment. Technol.*, 55, (3), p. 273-76.
- NEGRAO O.L., FONTANA J.D. and G.T. ZANCAN, 1981.- Production of glucoamylase by *Dactylium dendroïdes*. *Rev. Microbiol. (Sao Paulo)*, 12, (4), p. 170-175.
- NELSON S.R., 1944.- in SOMOGYI M., 1952.
- NIELSEN O. and K.F. GREGORY, 1978.- Sequential cold-sensitive mutations in *Aspergillus fumigatus*. *Can. J. Microbiol.*, 24, p. 84-88.
- NUNBERG J.H., FLATGAARD J., INNIS M., GELFAND D. and J.MEADE, 1984.- Glucoamylase cDNA. Brevet WO 84/02921.
- NUNBERG J.H., MEADE J.H., COLE G., LAWYER F.C., MC CABE P., SCHWEICHART V., TAL R., WITTMAN V.P., FLATGAARD J.E. and M.A. INNIS, 1984.- Molecular cloning and characterisation of the glucoamylase gene of *Aspergillus awamori*. *Mol. Cell Biol.*, 4, p. 2306-2315.
- NUNBERG J.H., FLATGAARD J.E., INNIS M.A., GELFARD D.H. and MEADE J.H., 1984.- Glucoamylase cDNA. Brevet WO 84/02921.
- OBERT F., 1978-1979.- Sul metabolismo di mono-, oligo- E polisaccaridi in *Thermoascus aurantiacus* Miede. *Allionia*, 23, p. 79-82.
- OBERT F., 1980-81. - Su una α -glucosidasi del micelio di *Thermoascus aurantiacus* Miede. *Allionia*, 24, p. 79-84.
- OBERT F., 1983-1984.- Su un'amilasi secreta da *Thermascus aurantiacus* Miede osservazioni preliminari. *Allionia*, 26, p. 49-53.
- OKADA G., 1983.- Purification and properties of a glucoamylase from *Hypocrea peltata*. *J. Jpn Soc. Starch Sci.*, 30, (1), p. 48-56.

- OLUTIOLA P.O., 1981.- Extracellular maltase from *Aspergillus flavus*. *Mycologia*, 73, p. 1130-1142.
- OMAR I.C., HAGASHI M. and S. NAGAI, 1987.- Purification and some properties of a thermostable lipase from *Humicola lanuginosa* n°3.. *Agric. Biol. Chem.*, 51, (1), p. 37-45.
- OHNISHI M. and K. HIROMI, 1976.- Studies on the subsite structure of amylases (IV). Tryptophan residues of glucomaylase from *Rhizopus niveus* studied by chemical modificatino with N-Bromosuccinimide. *J. Biochem.*, 79, p. 11-16.
- OREN A., 1983.- A thermophilic amyloglucosidase from *Halobacterium sodomense*, a halophilic bacterium from the dead sea. *Curr. Microbiol.*, 8, p. 225-230.
- PAPAVIRAS G.C., 1967.- Evaluation of various media and antimicrobial agents for isolation of *Fusarium* from soil. *Phytopathology*, 57, p. 848-52.
- PARDO J.M., POLAINA J. and A. JIMENEZ, 1986.- Cloning of the STA2 and SGA genes encoding glucoamylases in yeasts and regulation of their expression by the STA10 gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucl. Acid. Res.*, 14, (12), p.4701-18.
- PASZCZYNSKI A., MIEDZIAK I. TOBARZEWSKI J., KOCHMANSKA J. and TROJANOWSKI J., 1982.- A simple method of affinity chromatography for the purification of glucoamylase obtained from *Aspergillus niger* C. *FEBS Lett.*, 149, (1), p.63-66 .
- PAZUR J.H. and T. ANDO, 1959.- in MANJUNATH and al., 1983.
- PAZUR J.H., CEPURE A. and KNUL H.R., 1971.- Glycoenzymes: structures and properties of the two forms of glucoamylase from *Aspergillus niger*. *Carbohydr. Res.*, 20, P83-90.
- PAZUR J.H. and K. KLEPPE, 1962.- The hydrolysis of --D glycosides by amyloglucosidase from *Aspergillus niger*. *J. Biochem.*, 237, (4), p. 1002-1005.
- PAZUR J.H., KLEPPE K. and E.M. BALL, 1963.- Glycoprotein nature of fungal carbohydrases. *Arch. Biochem. Biophys.*, 103, (3),p. 515-6.
- PAZUR J.H., KNUL H.R. and A. CEPURE, 1971.- Glycoenzymes: structure and properties of the two forms of glucoamylase from *Aspergillus niger*. *Carbohydr. Res.*, 20, p. 83-96.
- PAZUR J.H. and S. OKADA, 1967.- Properties of the glucoamylase from *Rhizopus delemar*. *Carbohydr. Res.*, 4, P 371-79.
- PERRY L.J. and R. WETZEL, 1984.- Disulfide bond engineered into T4 lysozyme: stabilisation of the protein toward thermal inactivation. *Science*, 226, p. 555-557.
- PORE R.S. and H.W. LARSH, 1967.- First occurrence of *Thermoascus aurantiacus* from animal and human sources. *Mycologia*, 59, p. 927-928.

- PRASAD A.R.S. and R. MAHESWARI, 1978.- Purification and properties of trehalase from the thermophilic fungus *Hemicola lanuginosa*. *Biochim. Biophys. Acta*, 525, p. 162-170.
- PRETORIUS I.S., MODENA D., VANOVI M., ENGLARD S. and J. MARMUR, 1986.- Transcriptional control of glucoamylase synthesis in vegetatively growing and sporulating *Saccharomyces* species. *Mol. Cell. Biol.*, 6, (9), p. 3034-41.
- PRETORIUS I.S., CHOW T., and J. MARMUR, 1986.- Identification and physical characterisation of yeast glucoamylase structural genes. *Mol. Gen. Genet.*, 203, p. 36-41.
- PROVENCHER S.W. and J. GLOCKNER, 1981.- Estimation of globular protein secondary structure from circular dichroism. *Biochemistry*, 8, p. 33-37.
- QUEENER S.W., INGOLIA T.D., SKATRUD P.L., CHAPMAN J.L. and K.R. KASTER, 1985.- in K.ESSER and G.MOHR.1986.
- QUEROL E. and A. PARRILLA, 1987.- Tentative rules for increasing the thermostability of enzymes by protein engineering. *Enzyme Microb. Technol.*, 9, p. 238-244.
- RAMACHANDRAN N., SREEKANTIAH K.R. and V.S. MURTHY, 1978.- Studies on the thermophilic amylolytic enzymes of a strain of *Aspergillus niger*. *Starch/Stärke*, 30, (8), p. 272-275.
- RAMASESH N. SREEKANTIAH K.R. and V.S. MURTHY, 1982.- Studies on the two forms of amyloglucosidase of *Aspergillus niger* Van Tieghem. *Starch/Stärke*, 34, (10), p. 346-351.
- RAPER K.B. and D.I. FENNEL., 1965.- *The genus Aspergillus*. Williams and Wilkins company, Baltimore.
- RAZZAQUE A. and S. UEDA, 1978.- Glucoamylase of *Aspergillus oryzae*. *J. Ferment. Technol.*, 56, p. 296-302.
- REESE E.T., MAGUIRE A.H. and F.W. PANISH, 1968.- Glucosidases and exoglucanases. *Can. J. Biochem.*, 46, p. 25-34.
- REESE E.T. and A.H. MAGUIRE, 1969.- Surfactants as stimulants of enzyme production by microorganisms. *Appl. Microbiol.*, 17, p. 242-45.
- RIFAI M.A., 1969.- A revision of the genus *Trichoderma*. *Mycol. Pap.*, 116, p. 1-56.
- RINDERKNECHT H., WILDING P. and B.J. HAVERBACK, 1967.- A new method for the determination of α -amylase. *Experimentia*, 23, (10), p. 805.
- ROWLANDS R.T., 1983.- Fungal technology. in *The filamentous fungi* vol. 4, SMITH J.E., BERRY D.R. and B. KRISTIENSEN, p. 346-72. E. Arnold Ed., 401p

- ROWLANDS R.T., 1984.- Industrial strain improvement: mutagenesis and random screening procedures. *Enzyme Microb. Technol.*, 6, p. 3-10.
- RUDICK M.J. and A.D. ELBEIN, 1974.- Glycoprotein enzymes secreted by *Aspergillus fumigatus*, purification and properties of an α -glucosidase. *Arch. Biochem. Biophys*, 161, p.281-290
- SAHA B.C., MITSUE T. and S. UEDA, 1979.- Glucoamylase produced by submerged culture of *Aspergillus oryzae*. *Starch/Stärke*, 31, (9), p.307-314.
- SAMSON R.A., 1974.- *Paecilomyces* and some allied hyphomycetes. *Stud. Mycol.*, (6), 119 pages.
- SANCHEZ F., LOZANO M., RUBIO V. and M.A. PENALVA, 1987.- Transformation in *Penicillium chrysogenum*. *Gene*, 51, p. 97-102
- SAVEL'EV A.N. and L.M. FIRSOV, 1982.-Carboxyl groups in active site of glucomamylase from *Aspergillus awamori*. *Biochemistry*, 47, (10), P.1365-67.
- SAVEL'EV A.N. and L.M. FIRSOV, 1983.- Effect of modification of some radicals on enzymatic activity of glucoamylase from *Aspergillus awamori*; *Biochemistry*, 48, (8), p.1125-31.
- SCHELLART J.A., VISSER F.M.W., ZANDSTRA T. and W.J. MIDDLEHOVEN, 1976.- Starch degradation by the mould *Trichoderma viride*. I. The mechanism of starch degradation. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 42, p. 229-238.
- SCHWALB M.N. and V.K. JANSONS, 1973.- Comparison of developmental controlled glucoamylase from normal and mutant strains of the basidiomycete *Schizophyllum commune*. *Biochem. Genet.*, 9, (4), p. 359-367.
- SCHWARZ R.T. and R. DATEMA, 1982.- The lipid pathway of protein glycosylation and its inhibitors: the biological significance of protein-bound carbohydrates. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, 40, p. 287-379.
- SCHWARZ R.T. and R. DATEMA, 1984.- Inhibitors of trimming: new tools in glycoprotein research. *TIBS*, Jan. 1984, p. 32-34.
- SEARLE B.A. and R.S. TUBB, 1981.- Regulation of amyloglucosidase production by *Saccharomyces diastaticus*. *J. Inst. Brew.*, 87, p. 244-247.
- SEGARD E., 1985.- Les enzymes- outil de valorisation des produits naturels. *Biofutur*, 35, p. 43-49.
- SEKINE H., NASANO S. and N. IGUCHI, 1969.- Isolation of highly proteolytic mutants from *Aspergillus sojae*. *Agr. Biol. Chem.*, 33, p. 1477-82.

- SELLARS P.N., MCGILL C.E.G. and FLANNIGAN B., 1976.- Degradation of barley by *Aspergillus fumigatus* Fres. Proceedings of the third international biodegradation symposium. J.Miles Sharpley and A.M. Kaplan, Ed., p.635-643.
- SERMONTI A. , 1959.- Genetics of *Penicillium chrysogenum* III: cytoplasmic inheritance in *Penicillium*. in Selected scientific papers from the Instituto Superiore di Sanito Roma, vol. II, part.III, p. 407-15.
- SHENOY B.C., APPU RAO A.G. and M.R. RAGHAVENDRA RAO, 1984.- Structure and stability of glucoamylase II from *Aspergillus niger*, a circular dichroism study. *J. Biosci.*, 6, (5), p. 601-11.
- SHENOY B.C., KATWA L.C., APPU RAO A.G. and M.R. RAGHAVENDRA RAO, 1985.- Fungal glucoamylases. *J. Biosci.*, 7, (3,4), p. 399-419.
- SHORTLE D. and D. NATHANS, 1978.- Local mutagenesis: a method for generating viral mutants with base substitutions in preselected regions of the viral genome. *Proc. Natl. Acad. Sci(USA)*, 75, (5), p. 2170-2174.
- SHOUJUN Y., SUGUO G., SHUZHENG Z. and Z. AILE, 1984.- Studies on the conformation of glucoamylase from *Monascus rubiginosus* (Sato). *Scientia Sinica (serie B)*, 27, (9), p. 911-917.
- SICARD P.J., 1982.- Applications industrielles des enzymes. in *Les enzymes: production et utilisations industrielles*. p. 121-164. Eds. G. Durand et P. Monsan, Bordas, 352 pages.
- SIDLER W. and H. ZUBER, 1972.- Neutral proteases with different thermostabilities from a facultative strain of *Bacillus stearothermophilus* grown at 40°C and 50°C. *FEBS Lett.*, 25, (2), p. 292-294.
- SIGMUND R.D., Mc NALLY M.T., LEE D.B. and S.J. FREE, 1985.- Neurospora glucoamylase and a mutant affected in its regulation. *Biochem. Gen.* 23, (1/2), p. 89-103.
- SILLS A.M. and G.G. STEWART, 1982.- Production of amylolytic enzymes by several yeasts species. *J. Inst. Brew.*, 88, p. 313-316.
- SIMONIN P.A. and P.E. PILET, 1974.- Amylases of the lentil roots. *Experimenta*, 30, (1), p. 23-25.
- SIMPSON I.N. and C.E. CATEN, 1979.- Induced quantitative variation for penicillin. Titre in clonal populations of *Aspergillus nidulans*. *J. Gen. Microbiol.*, 110, p.1-12.
- SIMPSON I.N. and C.E. CATEN, 1980.- Genetics of penicillin titre in lines of *Aspergillus nidulans* selected through recurrent mutagenesis. *J. Gen. Microbiol.*, 47, p. 161-77.
- SINCLAIR J.H., STEVENS B.J. SANGHAVI P. and M.RABINOWITZ, 1967.- in K.Esser and G. Mohr, 1986.

- SINGLETON R. and R.E. AMELUNXEN, 1973.- Proteins from thermophilic microorganisms. *Bacteriol. Review*, 37, (3), p. 320-342.
- SMILEY K.L., HENSLEY D.E., SMILEY M.J. and GASDORF M.J., 1971.- Kinetic patterns of glucoamylase isozymes isolated from *Aspergillus sp.* *Arch. Biochem. Biophys.*, 144, p.694- 699.
- SMITH B., PEBERDY J.F. and K.D. MACDONALD, 1980.- Can sexuality be introduced into *Penicillium chrysogenum* by interspecific protoplast fusion? *Vith International Fermentation Symposium* held at London, Ontario. Abstract 4.5.4.
- SOMOGYI M., 1952.- Notes on sugar determination. *J. Biochem.*, 195, p. 19-23.
- SOPP O.J.O., 1912.- Monographie der pilzgruppe *Penicillium* mit besonderer berücksichtigung der in Norwegen gefunderen aiten. *Videnskapselskapet Skrifter. J. Mat. Naturv. K.L.*, 11, p. 35-42.
- SREEKANTIAH K.R., JALEEL S.A. and T.N. RAMACHANDRAN RAO, 1973.- Effect of cultural and nutrional variation on certain exo-enzymes secreted by fungi. *Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm.*, 2, p. 42-48.
- SRIVASTAVA R.A.K., 1984.- Studies on extracellular and intracellular purified amylases from a thermophilic *Bacillus stearothermophilus*. *Enz. Microb. Technol.*, 6, p. 422-426.
- STAHL U, LEMKE P.A., TUDZYNSKI P., KUCK U. and K. ESSER , 1978.- Evidence for plasmid like DNA in filamentous fungus, the ascomycete *Podospora anserina*. *Mol.Gen. Genet.*, 162
- STAHL U., TUDZYNSKI P., KUCK U. and K. ESSER, 1982. Replication and expression of a bacterial-mitochondrial hybrid plasmid in the fungus *Podospora anserina*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79, p. 3641-45.
- STELLWAGEN E. and H.WILGUS, 1978.- Thermostability of proteins. in *Biochemistry of thermophily* .Ed.S.M. Friedman. Academic Press. p.223-232.
- STOHL L.L. and A.M. LAMBOWITZ, 1983.- in K.ESSER and G.MOHR, 1986.
- STOLK A.C., 1965.- Thermophilic species of *Talaromyces* Benjamin and *Thermoascus* Miehe. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 31, p. 262-276.
- STRUHL K., 1983.- The new yeast genetics. *Nature*, 305, p. 391-97.
- SUBRAHMANYAM A., 1980.- Studies on *Thermoascus aurantiacus* Miehe. *Acta Mycol.*, 14, (1), p. 121-131.
- SUBRAHMANYAM A., MANGALLAM S. and K.S. GOPALKRISHNAN, 1977.- Amyloglucosidase production by *Torula thermophila* (thermophilic fungi). *Indian J. Exp. Biol.*, 15, p. 495-496.

- SUBRAMANIAN C.V. and R. RAJENDRAN, 1980.- Developmental morphology of ascomycetes. VI *Thermoascus aurantiacus*. *Cryptogamie, Mycologie*, tome 1, p. 175-185.
- SUZUKI Y., IKEMOTO T. and S. ABE, 1978.- Purification and some properties of maltases I and II from thermophilic *Bacillus* sp. KP 1035. *J. Ferment Technol.*, 56, p.8-14.
- SUZUKI Y., KISHIGAMI T. and S. ABE, 1976.- Production of extracellular α -glucosidase by a thermophilic *Bacillus* species. *Appl. Env. Microb.*, 31, p. 807-812.
- SVENSSON B., CLARKE A.J. and B. SVENDSEN, 1986.- Influence of acarbose and maltose on the reactivity of individual tryptophanyl residues in glucoamylase from *Aspergillus niger*. *Carlsberg Res. Commun.*, 51, p. 61-73.
- SVENSSON B., LARSEN K., SVENDEN I. and E. BOEL, 1983.- The complete amino-acid sequence of the glycoprotein, glucomalyse G1 from *Aspergillus niger*. *Carlsberg Res. Commun.*, 48, p. 529-544.
- SVENSSON B., PEDERSEN T.G., SVENDSEN I., SAKAI T. and M. OTTASEN 1982.- Characterisation of two forms of glucoamylase from *Aspergillus niger*. *Carlsberg Res. Commun.*, 47, p. 55-69.
- SWANSON, 1948.- in FOGARTY W.M. and KELLY C.T., 1979.
- TAI T., YAMASHITA K., OGATA-ARAKAWA M., KOIDE N., MURAMATSU T., IWASHITA S., INOUE Y and A. KOBATA, 1975.- Structural studies of two ovalbumin glycopeptides in relation to the endo- β -acetylglucosaminidase specificity. *J. Biol. Chem.*, 250, (21), p. 8569-75.
- TAKAHASHI T., 1970.- in Searle B.A. and R.S. Tubb, 1981.
- TAKAHASHI T., INOKUCHI N. and M. IRIE, 1981.- Purification and characterization of a glucoamylase from *Aspergillus saitoi*. *J. Biochem.*, 89, p. 125-134.
- TAKAHASHI T., KATO K., IKEGAMI Y. and IRIE M., 1985.- Different behavior towards raw starch of three forms of glucoamylase from a *Rhizopus* sp., *J. Biochem.*, 98, p.663-71.
- TAKAHASHI T., TSUCHIDA Y. and M. IRIE, 1978.- Purification and some properties of three forms of glucoamylase from a *Rhizopus* sp. *J. Biochem.*, 84, P.1183-94.
- TAKEDA Y., MATSUI H., TANIDA M., TAKAO S. and S. CHIBA, 1985.- Purification and substrate specificity of glucoamylase of *Paecilomyces variotii* AHU 9417. *Agric. Biol. Chem.*, 49, (6), p. 1633-1641.
- TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES LIMITED (1977).- Production of cephalosporin C. *Brit. Pat. n° 1 488 1 822*.
- TALMUD P.J., 1977.- Mutational synergism between p-fluorophenyala nine and UVin *Coprinus lagopus*. *Mutat.Res.*, 43, p. 13-22.

- TAMAKI H., 1980.- Purification of glucoamylase isozymes produced by *Saccharomyces diastaticus*. *Doshisha Joshi Daigaku*, 31, p.270-86.
- TAN L.U.L., MAYERS P. and J.N. DADDLER, 1987.- Purification and characterization of a thermostable xylanase from a thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus*. *Can. J. Microbiol.*, 33, p. 689-692.
- TANAKA Y., ASHIKARI T., NAKAMURA N., KIUCHI N., SHIBANO Y., AMACHI T. and H. YOSHIMUZY, 1984.- Glucoamylase produced by *Rhizopus* and by a recombinant yeast containing the *Rhizopus* glucoamylase gene. *Agric Biol. Chem.*, 50, p. 1737-42.
- TANAKA Y., ASHIKARI T., NAKAMURA N., KIUCHI N., SHIBANO Y., AMACHI T., and H. YOSHIMUZY, 1986.- Comparison of amino-acid sequences of three glucoamylases and their structure-function relationships. *Agric. Biol. Chem.*, 50, p.965-69.
- TARENTINO A.L., PLUMMER T.H. and F. MALEY.- The release of intact oligosaccharides from specific glycoproteins by endo-N-acetylglucosaminidase H. *J. Biol. Chem.*, 249,(3), p.818-824.
- TATUM E.L., BARRATT R.W. and V.M. CUTTER, 1949.- in MACK INTOSH ME. and PRITCHARD R.H., 1963.
- TAYLOR P.M., NAPIER E.J. and I.D. FLEMING, 1978.- Some properties of a glucoamylase produced by the thermophilic fungus *Humicola lanuginosa*. *Carbohydr. Res.*, 61, p. 301-308.
- TENDLER M.D., KORMAN S. and M. NISHIMOTO, 1967.- Effects of temperature and nutrition on macromolecule production by thermophilic *Eumycophyta*. *Bull. Torrey. Bot. Club.*, 94, p. 175-181.
- THOM Ch and K.B.RAPER, 1945.- *A manual of the Aspergilli*. Williams and Wilkins company. Baltimore.
- THOMPSON P.J. and T.L. THOMPSON, 1962.- Some characteristics of a purified heat-stable aldolase. *J.Bact.* vol.84, p.694-699.
- TILBURN J., SCHAZZUCHIO C., TAYLOR C.G., ZABICKY-ZISSMAN J.H., LOCKINGTON R.A and R. WAYNE DAVIES, 1983.- Transformation by integration in *Aspergillus nidulans*. *Gene*, 26, p.205-221.
- TONG C.C., COLE A.L. and M.G. SHEPERD, 1980.- Purification and properties of cellulases from the thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus*. *Biochem. J.*, 191, p. 83-94.
- TRIMBLE R.B. and F. MALEY, 1977.- Subunit structure of external invertase from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, 252, (12), p. 4409-12.
- TRIMBLE R.B. and F. MALEY, 1984.- Optimizing hydrolysis of N-Linked high-mannose oligosaccharides by endo- β -N-acetylglucosaminidase H. *Anal. Biochem.*, 141, p. 515-22

- TRIMBLE R.B., MALEY F. and W. WATOREK, 1981.- Subunit structure and carbohydrate composition of the extracellular acid phosphatase of *Rhodotorula glutinis*. *J. Biol. Chem.*, 256, (19), p.10037-43.
- TRUSCHEIT E., FROMMER W., JUNGE B., MULLER L., SCHMIDT D.D. and W. WINGENDER, 1981. *Chemie und Biochemie mikrobieller α -glucosidasen-Inhibitoren*. *Angew. Chem.*, 93, p. 738-55.
- TUCKER M., GROHMANN K. and M. HIMMEL, 1985.- Isolation and characterisation of a glucoamylase from *Saccharomyces diastaticus*. *Biotechnology and bioengineering symposium n° 14*, p. 279-293.
- TURGEON B.G., GARBER R.C. and O.C. YODER, 1985. Transformation of the fungal maize pathogen *Cochliobolus heterostrophus* using the *Aspergillus nidulans* *amds* gene. *Mol. Gen. Genet.*, 201, p. 450-53.
- UEDA S., 1981.- Fungal glucoamylases and raw starch digestion. *Trens Biochem. Sci.*, 6, p.89-90.
- UEDA S. and S.I. UDAGAWA, 1983.- *Thermoascus aegyptiacus*, a new thermophilic ascomycete. *Trans. Mycol. Soc. Japan*, 24, p. 135-142.
- UEDA S. and S. KANO, 1975.- Multiple forms of glucoamylase of *Rhizopus* species. *Die Stärke*, 4, P. 123-28.
- ULMER K.M., 1983.- Protein engineering. *Science*, 19, p. 666-671.
- ULMER K.M., 1985.- La naissance du protein engineering. *Biofutur*, 35, p. 36-39.
- UPADHYAH J.M., M.S. FARMELO, S.G. GOETZ and M.A. MELAN, 1984.- A new variety of a thermophilic mold, *Thermoascus aurantiacus* var. *levisporus*. *Mycopathologia*, 87, p. 71-80.
- VAN ARKLE G.A., 1958.- in MACK INTOSH M.E. and R.H. PRITCHARD, 1963.
- VAN CLEVE J.W., SCHAEFER W.C. and C.E. RIST, 1956.- The structure of NRRL-6512 Dextran, methylation studies. *J. Am. Chem. Soc.*, 78, p.4435-4438.
- VAN HEESWIJCK R. and M.I.G. RONCERO, 1984.- High frequency transformation of *Mucor* with recombinant plasmid DNA. *Carslberg Res. Commun.*, 49, p.691-702.
- VENKATARAMU K., MANJUNATH P. and M.R. RAGHAVENDRA RAO, 1975.- Glucoamylase of *Aspergillus niger* NRRL 330. *Ind. J. Biochem. Biophys.*, 12, p. 107-14.
- VIDAL G., 1983.- Relations entre le métabolisme intermédiaire, le métabolisme lipidique et la reproduction sexuée du *Leptosphaeria typhae* (Auersw) Karsten. *Thèse de Doctorat d'état*, Université de Lille I.

- VON ARX, J.A. 1970.- The genera of fungi sporulating in pure culture. p. 84, Ed. J. Cramer, Lehre.
- WALBAUM S., TAILLIEZ R. and S. MOREAU, 1975.- Toxicité et pathogénicité comparées de *Aspergillus fumigatus* et *Aspergillus fischeri*. Les mycotoxines, INSERM 46, p. 133-44.
- WANG L.H. and P.A. HARTMAN, 1976.- Purification and some properties of an extracellular maltase from *Bacillus subtilis*. Appl. Env. Microb., 31, p. 108-118.
- WASSERMAN B.P., 1984.- Thermostable enzyme production. Food Technol., 38, (2), p. 78-98.
- WATANABE K., 1976.- The structure of a glycopeptide (GP II) isolated from *Rhizopus saccharogenic* amylase. J. Biochem. 80, p. 379-87.
- WATANABE K and T.FUKIMBARA, 1974.- The amino-acid sequence and peptide-carbohydrate linkage of GP-I and GP-Ib, glycopeptides from *Rhizopus saccharogenic* amylase. Agr. Biol. Chem., 38 (9), p.1643-47.
- WATANABE K. and T. FUKIMBARA, 1975.- The structure of the carbohydrate moiety of a glycopeptide GP-Ib from *Rhizopus saccharogenic* amylase. Agr. Biol. Chem., 39, p. 1711-17.
- WELLS A.J. and D.B. POWERS, 1986.- In vivo formation and stability of engineering disulfide bonds in subtilisin. J. Biol. Chem., 261,(14), p. 6564-6570.
- WERNARS K., WILKINSON B. and G.TURNER, 1986.- in ESSER K. and G.MOHR, 1986.
- YAMASAKI Y. and H. KONNO, 1985.- Three forms of α -glucosidase from the suspension cultured of rice cells. Agric. Biol. Chem., 49, (12), p. 3383-3390.
- YAMASAKI Y. and Y. SUZUKI, 1974.- Purification and properties of α -glucosidase from *Bacillus cereus*. Agric. Biol. Chem., 38, (2), p. 443-454.
- YAMASAKI Y. and Y. SUZUKI, 1980.- Two forms of α -glucosidase from sugar beet seeds. Planta, 148, p. 354-361.
- YAMASAKI Y., SUZUKI Y. and J. OZAWA, 1976.- Purification and properties of α -glucosidase from *Penicillium purpurogenum*. Agric. Biol. Chem., 40, (4), p. 669-676.
- YAMASAKI Y., SUZUKI Y. and J. OZAWA, 1977.- Certain properties of α -glucosidase from *Mucor racemosus*. Agr. Biol. Chem., 41, p.1559-1568.
- YAMASAKI Y., SUZUKI Y. and J. OZAWA, 1977.- Three forms of α -glucosidase and a glucoamylase from *Aspergillus awamori*. Agr. Biol. Chem., 41, p. 2149-2161.
- YAMASHITA I and S. FUKUI, 1984.- Secretion of *Saccharomyces diastaticus* glucoamylase from *Schizosaccharomyces pombe*. Agric. Biol. Chem., 48, p. 1931-32.

- YAMASHITA I and S. FUKUI, 1984.- Isolation of glucoamylase non producing mutants in the yeast *Saccharomyces diastaticus*. *Agric. Biol. Chem.*, 48, p. 131-34.
- YAMASHITA I and S. FUKUI, 1984.- Genetic background of glucoamylase production in the yeast *Saccharomyces*. *Agric. Biol. Chem.*, 48, p. 137-41.
- YAMASHITA I., and S. FUKUI, 1983. Molecular cloning of a glucoamylase producing gene in the yeast *Saccharomyces*. *Agric. Biol. Chem.*, 47, p. 2689-92.
- YAMASHITA I, ITOH T. and S. FUKUI, 1985.- Cloning and expression of the *Saccharomycopsis fibuligera* glucoamylase gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 23, p. 130-133.
- YAMASHITA I., MAEMURA T., HATANO T. and S. FUKUI, 1985.- Polymorphic extracellular glucoamylase genes and their evolutionary origin in the yeast *Saccharomyces diastaticus*. *J. Bact.*, 161, p. 574-82.
- YAMASHITA I., SUZUKI K. AND FUKUI S., 1985.- Nucleotide sequence of the extracellular glucoamylase gene STA1 in the yeast *Saccharomyces diastaticus*. *J. Bact.*, 161, p. 567-73.
- YELTON M.M., HAMER J.E. and W.E. TIMBERLAKE, 1984.- Transformation of *Aspergillus nidulans* by using a trpC plasmid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 81, p. 1470-1474.
- YOSHIGI N., CHIKANO T. and M. KAMIMURA, 1985.- Purification and properties of --glucosidase I from *Bacillus cereus*. *J. Jpn Soc. Starch Sci.*, 32, (4), p. 273-79.
- YOSHINO E. and S. HAYASHIDA, 1978.- Enzymatic modification of glucoamylase of *Aspergillus awamori* var *Kawachi*. *J. Ferment. Technol.*, 56, (4), p. 289-95.
- YU E.K.C., TAN L.U.L., CHAN M.K.H., DESCHATELETS L. and J. SADDLER, 1987.- Production of thermostable xylanase by a thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus*. *Enz. Microb. Technol.*, 9, p. 16-24.
- YUTANI K., SASAKI I. and K. OGASAHARA, 1973.- Comparison of thermostable --amylases from *Bacillus stearothermophilus* grown at different temperatures. *J. Biochem.*, 74, p. 573-579.
- YUTANI K., OGASAHARA K., TSUJITA T. and Y. SUGINO, 1987.- Dependence of conformational stability on hydrophobicity of the amino acid residues in a series of variant proteins substituted at a unique position of Tryptophane synthetase α -subunit. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84, (13), p. 4441-45.
- ZUBER H., 1979.- Structure and fonction of enzymes from thermophilic microorganisms. in *Strategies of microbial life in extreme environments*, p. 393-416. Edit. by M. Shilo, Verlag Chemie-Weinheim, 590 p.

A N N E X E S

ANNEXE I

ISOLEMENT DES SOUCHES

1. Origine des souches

De nombreux milieux naturels sont disponibles dans lesquels la température excède souvent 45°C, favorisant les microorganismes thermophiles et thermotolérants. Les fumiers, les litières animales, les sols de pays à fort ensoleillement et les terrils houillers en sont quelques exemples. Divers échantillons de ces biotopes ont été collectés, la liste de ceux-ci est présentée dans la partie résultats du chapitre I.

Les microorganismes amylolytiques ont été également recherchés dans des échantillons de farine, de graines de céréales ou de légumineuses provenant de silots de stockage ou encore dans des colles industrielles.

2. Isolement des souches.

Dans un erlenmeyer contenant 100 ml d'eau physiologique (NaCl 0,75%) stérile, on place 5 grammes d'échantillon (terre, fumier, etc...). Une mise en suspension des spores et des mycéliums est obtenue en plaçant l'erlenmeyer sous agitation pendant 30 minutes. On dépose 0,5 ml de cette suspension dans une boîte de Petri auquel on ajoute 20 ml du milieu gélosé suivant (milieu d'isolement) encore liquide (température inférieure à 50°C).

Milieu d'isolement: KH_2PO_41,6g
 $\text{Ca}(\text{PO}_4\text{H}_2)_2, 2\text{H}_2\text{O}$1,2g
 MgSO_41,2g
 $\text{ZnSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$0,02g
 $\text{MnSO}_4, \text{H}_2\text{O}$0,02g
 $\text{CuSO}_4, 5\text{H}_2\text{O}$0,01g
 NH_4NO_30,94g
MDO2.....25,00g
 H_2O distillée.....QSP.1000ml
Gélose BIODAR type E....15,00g

Le pH est ajusté à 5,8 avant stérilisation.

Le contenu de la boîte est homogénéisé avant solidification de la gélose et les boîtes sont mises en culture à 28°C et à 45°C pour permettre la croissance des souches mésophiles et thermophiles.

Les cultures sont observées quotidiennement afin d'effectuer les prélèvements dans les meilleures conditions; on repique les colonies apparues sur les boîtes dans des tubes 16/160 contenant 6 ml de milieu au malt (Malt DIFAL 1,5%) gélosé. L'incubation a lieu à 28°C ou 45°C selon la température d'isolement. Après vérification de la pureté de la souche, cette dernière est conservée à fins de description et détermination.

3. Détermination des souches

Les souches isolées dans les conditions décrites au paragraphe précédent sont cultivées en boîtes de Petri pour permettre leur détermination (milieu Malt-Agar; milieu CZAPEK, CZAPECK, 1902-1903; DOX, 1910). La détermination est réalisée grâce aux manuels couramment utilisés à cet effet, et cités ci-dessous.

OUVRAGES GENERAUX:

- BARNETT M.L. (1960). Illustrated genera of imperfect fungi. Burgess Publishing Compagny. 225 p.
- BARRON G.L. (1972). The genera of hyphomyces from soil, RE. Krieger Publishing Compagny. 364 p.
- BOTTON B. et al. (1985). Moisissures utiles et nuisibles. Importance industrielle. Masson. 364 p.
- COONEY D.G. and R. EMERSON (1964). Thermophilic fungi. W.H. Freeman Compagny. 190 p.
- ELLIS M.B. (1971). Dematiaceous hyphomycetes. The Eastern Press LTD. 608 p.
- ELLIS M.B. (1976). More dematiaceous hyphomycetes. The Cambrian News LTD. 507 p.
- GILMAN J.C. (1966). A manuel of soil fungi. The Iowa State University Press. 450 p.
- VON ARX S.A. (1970). The genera of fungi sporulating in pure culture. Verlay Von J.Cramer. 288 p.

OUVRAGES TRAITANT D'UN GROUPE FONGIQUE PRECIS:

Genre *Aspergillus*

- AL-MUSALLAM A. (1980). A revision of the black *Aspergillus* species. PhD Thesis Utrech. 92 p.
- RAPER K.B. and FENNEL D.I. (1965). The genus *Aspergillus*. RE Krieger Publishing Compagny.
- SAMSON R.A. (1979). A compilation of the *Aspergilli* described since 1965. Studies in Mycologia, 18, p.1-37.
- THOM C. and RAPER K.B. (1945). Manuel of the *Aspergilli*. Williams and Wilkins Compagny. 373 p.

Genre *Paecilomyces*

- SAMSON R.A. (1974). *Paecilomyces* and some allied hyphomycetes. Studies in Mycology, 6, p. 1-116.

Genre *Penicillium*

- PITT J.I. (1979). The genus *Penicillium*. Academic Press. 634 p.

Classe des Mucorales

- NAUMOV N.A. (1939). Clé des Mucorinées. Paul Lechevalier. 173 p.
- SCHIPPER M.A.A. (1978). On certain species of *Mucor* with a key to all accept species. Studies in Mycology, 17, p.1-53.

Levures

- LODDER J. and N.J.W. KREGER-VAN RIJ (1952). The Yeasts. 2ND edition. North Holland Publishing Compagny. 713 p.

Genre *Trichoderma*

- RIFAI M.A.(1969). A revision of the genus *Trichoderma*. Mycol. pap. 116 p 1-56.

4. Conservation des souches

Elle est pratiquée dans des tubes 16/160 contenant 6 ml de milieu Malt (malt DIFAL 1,5%) gélosé. Après incubation pendant au moins 5 jours à la température optimale de croissance, les souches sont placées à 4°C et à l'obscurité pour conservation, pendant 6 mois.

ANNEXE II

CULTURE EN VUE DE LA PRODUCTION D'ENZYMES

Les souches sont cultivées en tubes de 25/200 contenant 20 ml de milieu malt-agar (précédemment décrit) à 28°C ou 45°C selon leur thermotolérance pendant au moins 5 jours. A ce stade on ajoute 10 ml d'eau distillée stérile dans le tube. Après grattage de la surface de la gélose et homogénéisation du liquide surnageant, la suspension obtenue est filtrée sur coton de verre pour ne recueillir que les conidies. La richesse en spores de la suspension est alors évaluée à l'hématimètre (lame Petit-Salumbeni).

4.10⁶ spores sont ajoutées à chacune des fioles d'Erlenmeyer de 1 litre contenant 200 ml de milieu d'isolement non gélosé.

Lors de la sélection des souches, l'utilisation d'un milieu chimiquement défini a été préférée à celle d'un milieu "naturel" afin d'éviter les variations fréquentes de ces derniers substrats.

La partie minérale du milieu d'isolement a été choisie pour son emploi au cours de différentes études réalisées au laboratoire de Cryptogamie (USTL, LILLE I): pour la reproduction sexuée du *Leptoshaeria typhae* (Lacoste, 1965; Vidal, 1983) et pour la production d' α -amylase par *Aspergillus oryzae* (Deprez, 1977).

La source d'azote utilisée (NH_4NO_3) est métabolisée par de nombreux microorganismes, dont les producteurs classiques de l'amyloglucosidase: *Aspergillus niger* et *A. oryzae*.

La source de carbone est une maltodextrine MDO2 (Glucidex 12; Roquette Frères, Lestrem) substrat le plus proche du produit provenant de la liquéfaction de l'amidon.

L'incubation se fait sur table d'agitation BIOLAFITTE (type AS 850) à 140 tours par minute pendant 120 heures à 28°C ou 45°C selon la température optimale de croissance.

Au terme des 120 heures, le contenu de chaque fiole est filtré sous vide sur un filtre DURIEUX n°111 sans cendre et l'activité enzymatique est dosée sur le filtrat de culture.

ANNEXE III

DOSAGE DES ACTIVITES ENZYMATIQUES

Deux types d'activité enzymatique ont été dosés lors de cette première partie d'étude:

-L'activité amyloglucosidasique (désignant soit l'amyloglucosidase, EC 3.2.1.3, soit l' α -glucosidase, EC 3.2.1.20).

-L'activité transglucosidasique correspondant à la glucosyl-transférase, EC 2.4.1.24).

1. Activité amyloglucosidasique

Le dosage de base de l'étude (modifié suivant les différents cribles utilisés par la suite pour l'échantillonnage) est le suivant:

- 1 ml de filtrat de culture (dilué si nécessaire) est ajouté à 1 ml d'une solution de MDO2 à 4% dans un tampon acétate 0,2 M pH 4.5. Le mélange réactionnel est incubé à 60°C pendant une heure, la réaction est arrêtée en portant les tubes au bain-marie à 100°C pendant 5 minutes.

Le dosage du glucose, produit final de la réaction, est réalisé grâce à un doseur de glucose YSI modèle 27.

L'activité est exprimée en Unités Internationales (μ M de glucose libéré par minute) par ml de filtrat.

2. Transglucosidase

La transglucosidase est dosée selon la méthode décrite par Benson et al. (1982) légèrement modifiée.

Le substrat utilisé est l' α -méthyl-glucoside à 2% dans un tampon acétate 0,1M à pH 5.0. L'incubation est pratiquée à 60°C pendant 5 heures, puis le glucose, produit de la réaction, est dosé comme précédemment après arrêt de la réaction au bain-marie à 100°C pendant 5 minutes.

ANNEXE IV

ANOMERIE DU GLUCOSE LIBERE

Ce procédé fait appel à la mise en évidence des anomères - ou - du glucose par chromatographie en phase gazeuse, selon la technique décrite par Chiba et al. (1982).

100 μ l de maltose à 2% dans un tampon acétate sont mis en présence de 100 μ l d'enzyme pendant 10 min à 60°C. L'échantillon est alors congelé instantanément dans l'azote liquide et lyophilisé à -50°C.

L'échantillon est ensuite transformé en composé triméthylsilylé grâce à l'apport de 100 μ l de réactif SIL A (SIGMA n°139-1) composé de triméthylchlorosilane, hexaméthylidisilazane et pyridine dans un rapport de 1:3:9. La réaction est achevée après 15 min à température ambiante.

La chromatographie en phase gazeuse est effectuée sur un chromatographe INTERSMAT IGC 12 DFL équipé d'un détecteur à ionisation de flamme. La colonne employée est une colonne inox (1/8" x 1,5 m) SE 30 à 10% de silicone sur chromosorb PAW (60-80 mesh).

L'azote est employé comme gaz vecteur sous une pression de 1 Kbar, la température de la colonne monte de 10°C par minute de 150°C à 280°C, puis est maintenue constante. Les températures d'injection et de détection sont, respectivement, de 280°C et de 300°C.

ANNEXE V

PURIFICATION DES PROTEINES

1) Récupération du filtrat de culture

Le milieu de culture (environ 2000ml) est séparé des débris mycéliens par filtration sur verre fritté de porosité 4 et filtre sans cendre Durieux n°111. Le filtrat ainsi obtenu est centrifugé (10000g pendant 15mn à 2°C) avant l'étape de concentration.

2) Concentration du filtrat de culture

Cette étape consiste principalement en une ultrafiltration pratiquée dans une cellule Amicon modèle 52 munie d'une membrane Amicon PM 10 de 76mm (molécules de poids moléculaires >10000 retenues). Lorsque le filtrat est concentré jusqu'à 20ml, une première dialyse est pratiquée en tubes à dialyse retenant les molécules de poids moléculaires >12000. A l'issue de cette dialyse, l'étape de concentration précédente est de nouveau effectuée. Si un volume trop peu important est récupéré pour la cellule Amicon, la concentration est achevée grâce à une évaporation sur évaporateur rotatif, la température du bain-marie n'excédant pas 30°C. La solution concentrée d'enzymes est finalement filtrée sur membrane Millipore 0,45 µm et conservée en tube stérile à -20°C.

3) Première étape de chromatographie

La solution concentrée d'enzymes est appliquée (1 ml) sur une colonne (82cm x 2,6cm) d'Ultrogel ACA 44 (IBF) et éluée à 4°C à l'aide d'un tampon Tris-HCl 0,1 M pH 7,5 contenant KCl 0,1 M et 0,04% d'acide de sodium. Des fractions de 2 ml sont collectées à un débit de 25 mlh⁻¹. La présence de protéines est estimée par l'absorbance UV à 280nm et l'activité de type amyloglucosidasique dosée comme précédemment.

4) Deuxième étape de chromatographie

La deuxième chromatographie est pratiquée sur une colonne de DEAE-tris acryl M (IBF) de 1,6 x 11cm. La régénération de la colonne s'effectue par passage d'un volume de NaCl 0,5 M dans un tampon Tris-HCl 50 mM à pH 7 suivi de trois volumes de tampon Tris-HCl 50 mM pH 7.

Des échantillons des pics de protéine issus du passage sur la colonne ACA 4 et présentant une activité amyloglucosidasique sont dialysés une nuit contre un tampon Tris-HCl 50 mM, pH 7. 5ml sont déposés sur la colonne (vitesse de la pompe 50ml.h⁻¹). Les protéines retenues sont éluées par un gradient de NaCl (0 à 500 mM) dans le tampon Tris-HCl 50 mM pH 7 à un débit de 100ml.h⁻¹. Des fractions de 2ml sont prélevées dans lesquelles l'activité amyloglucosidasique est recherchée.

ANNEXE VI

ELECTROPHORESE DES PROTEINES

L'électrophorèse en conditions non dénaturantes est réalisée à l'aide d'un Multiphor LKB 2117 (électrophorèse horizontale). La composition du gel employé est la suivante:

- Acrylamide (Merck n°10784) Bisacrylamide (Biorad n°161-0200).
25ml (30%, 0,8%)
- Tampon de résolution Tris-HCl 0,1M, pH 7,5..... 12,5ml
- Persulfate d'ammonium 1,5%.....5ml
- T.E.M.E.D.....0,015ml
- H₂O.....57,5ml
(pour 100ml de gel)

Le tampon de migration est constitué d'un tampon Tris-Citrate (0,1M pH 7). L'échantillon (1ml provenant de l'étape de purification précédente (ultrafiltration et passage sur colonnes et lyophilisé) est dissous dans 20µl d'un tampon d'échantillon constitué du tampon de résolution dilué au centième et de Bleu de Bromophénol à 0,02%.

L'électrophorèse est menée durant 6 heures à 100 V, la vitesse de migration du Bleu de Bromophénol étant voisine dans les conditions utilisées de 1cm.h⁻¹.

L'étape de fixation est réalisée conjointement avec la coloration à l'aide du mélange A.T.C.A., H₂O, Bleu brillant de Coomassie (50:50:0,1) pendant 1 heure à température ambiante.

Le gel est décoloré dans plusieurs bains d'acide acétique 7%, additionné de quelques grammes de DOWEX D 50, résine échangeuse d'ions, qui absorbe le colorant.

1) Mise en évidence d'une activité amylolytique

Les bandes recélant une activité amylolytique sont localisées après électrophorèse en immergeant les gels pendant 15mn dans une solution à 2% de maltodextrine MD 02 dans un tampon acétate 0,2 M pH 4,5 à 20°C. Les gels sont ensuite placés pendant 10mn dans le même tampon sans MD 02 à 60°C puis colorés à l'aide d'une solution d'iode (0,3% I₂ dans 3% KI) pendant 5mn. L'activité enzymatique apparaît sous forme de bandes jaunes sur les gels colorés en rouge.

2) Mise en évidence des glycoprotéines

La coloration Acide périodique-réactif de Schiff a été utilisée pour la détection des glycoprotéines. A la suite de l'électrophorèse, les gels sont maintenus pendant 1 heure dans une solution d'acide acétique à 7,5% à température ambiante puis immergés dans une solution d'acide périodique (2%) à 4°C pendant 45mn. Les gels sont ensuite mis en contact avec le réactif de Schiff à 4°C puis décolorés à température ambiante dans plusieurs bains d'acide acétique à 10%, les glycoprotéines produisant des bandes colorées en rose.

ANNEXE VII

TEST API-ZYM, MODE OPERATOIRE

L'échantillon est réparti à raison de 65 μ l par cupule. La boîte est ensuite mise à incuber pendant 3 heures à 45°C.

Après incubation, 30ml de réactif A puis 30 μ l de réactif B sont ajoutés dans chaque cupule.

réactif A: tri-hydroxy-méthyl-amino-méthane.....250g
acide chlorydrique à 37%.....110ml
laurylsulfate.....100g
eau distillée.....qsp 1000ml

réactif B: Fast-Blue.....3,5g
méthoxy-éthanol.....qsp 1000ml

On laisse se développer les colorations pendant 5 minutes. L'exposition à la lumière du soleil ou au rayonnement d'une lampe puissante pendant quelques minutes supplémentaires permet d'éliminer le fond jaune éventuel.

ANNEXE VIII

DOSAGE DES SUCRES REDUCTEURS PAR LA TECHNIQUE AU PHENOL-SULFURIQUE (Montreuil et Spik, 1963)

Dans un tube "Pyrex" 25 x 200 on place:

- 2ml de la solution à doser
- 1ml de phénol à 10%

On ajoute rapidement à l'aide d'une pipette à extrémité cassée 5ml d'acide sulfurique.

Le tube est porté dans un bain marie à 100°C pendant 5 minutes avant d'être refroidi.

La lecture des résultats s'effectue au spectrophotomètre à 485mn. Une gamme étalon de D-mannose est faite de 0 à 100 μgml^{-1} .

ANNEXE IX

DOSAGE DES PROTEINES PAR LA METHODE DE LOWRY et al. (1951)

réactifs:

1- réactif Folin Ciocalteu (Merck) dilué de moitié

2- mélanger:

- CuSO_4 à 1% dans H_2O lml
- tartrate d'acide de sodium et potassium..... lml
- Na_2CO_3 à 2% dans NaOH 0,1 N
qsp.1000ml

protocole expérimental:

Mélanger:

- 1V de solution à doser
- 3V du réactif 2

Attendre 10mn

Ajouter 0,3V du réactif 1

Attendre 30mn

Gamme étalon de serum albumine bovine (Sigma) 0 à $80\mu\text{g ml}^{-1}$

Lowry O.M., N.J. Rosebraegh, Al. Farr et R.J. Randall (1951)
Protein measurement with Folin phenol reagent. J.Biol. Chem.
193, p.265-275

ANNEXE X

Le dosage des activités polysaccharidiques s'effectue par un dosage des sucres réducteurs libérés (méthode de Nelson et Somogyi).
Conditions de réaction: 1 vol. de substrat (1%) + 1 vol. de filtrat, 15 min aux températures indiquées.

DOSAGE DES SUCRES REDUCTEURS , METHODE DE NELSON (1944) MODIFIEE PAR SOMOGYI (1952).

1) Réactif cuprotartrique alcalin

Dissoudre dans 250ml d'eau distillée: 24g de Na_2CO_3 anhydre
12g de Tartrate K et Na

ajouter une solution de $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ (4g dissous dans 40ml d'eau) sous agitation.

Ajouter 16g de NaHCO_3

Préparer une solution de Na_2SO_4 anhydre (18g dissous dans 500ml d'eau). Faire bouillir. Laisser refroidir.

Mélanger la solution de Na_2SO_4 à la solution cuprotartrique

Compléter le volume à 1000ml avec de l'eau distillée.

Laisser le réactif séjourner quelques jours. Filtrer pour éliminer le précipité de Cu_2O formé.

2) réactif arséniomolybdique

Dissoudre 25g de molybdate d'ammonium dans 450ml d'eau

Ajouter 21 ml d' H_2SO_4 sous agitation
puis une solution d'hydrogéoarséniate de Na (3g dissous dans 25ml)

Placer le réactif 24h au Bain Marie à 37°C

3) Dosage, mode opératoire

Mélanger: - 1V de solution à doser
- 1V de réactif cuprotartrique alcalin

Porter au Bain Marie à 100°C pendant 20mn, précipité de Cu_2O

Refroidir sous eau courante

Ajouter 1V de réactif arséniomolybdique. Attendre que tout le Cu_2O soit dissous

Diluer à 25V avec H_2O distillée. La coloration est stable pendant plusieurs heures

Lire à 500nm

ANNEXE XI

CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE . PROCEDURE DE HANSEN (1975)

Pour assurer une meilleure reproductibilité, des plaques de silica-gel prêtes à l'emploi pour la chromatographie couche mince sont utilisées (gel de silice 60 sans indicateur fluorescent, Merck Art.5721). Les plaques sont conditionnées dans un four à 120°C pendant une heure et refroidies à température ambiante dans un dessiccateur avant emploi ; des dépôts de 1µl sont alors effectués. Une concentration en oligosaccharide de 0,2 à 0,5% est facilement détectable.

Lorsque les dépôts sont secs, les plaques sont placées verticalement dans une cuve à chromatographie; le mélange de solvants employé pour la migration est constitué d'isopropanol-acétone-acide lactique 1M dans un rapport 4:4:2; ce mélange est à préparer extemporanément. Après 3 heures de migration, le solvant aura migré d'environ 15 cm; la plaque est alors retirée et séchée dans un courant d'air chaud. La visualisation des mono et oligosaccharides s'effectue en pulvérisant sur la plaque un réactif constitué d'aniline (4ml), de diphénylamine (4g), d'acétone (200ml) et d'acide phosphorique à 85% (30ml), puis en plaçant la plaque dans un four à 120°C pendant 30mn. Les sucres apparaissent en bleu ou vert sur un fond incolore.

Annexe XII

Caractéristiques des souches déterminées de la première
étape de sélection.

Mucor racemosus f. *racemosus*

Systématique:

Classe des Zygomycètes
Sous-classe des Zygomycetidae
Ordre des Mucorales
Famille des Mucoraceae

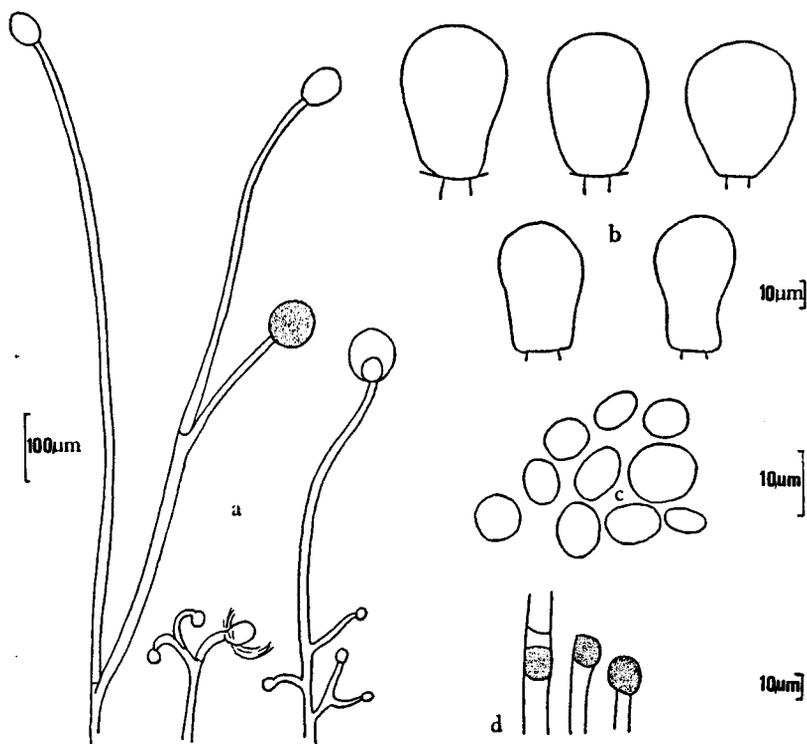
Description:

Caractères cultureux:

Mycélium gris de 2cm de hauteur, constitués de sporangiophores mélangés de petite et grande taille

Observation microscopique:

Sporangiophores de 14 à 15µm de diamètre à branchement sympodial et monopodial.
Sporanges hyalins bruns (80 à 90µm de diamètre)
Columelle obovoïde, ellipsoïdale ou pyriforme à base tronquée. 55 x 37µm en général.
Spores ellipsoïdales à subglobuleuses 5,5-8,5 x 4-7µm



(d'après Schipper, 1978)

Intérêt potentiel:

Non décrit

Effets nuisibles:

Croissance sur produits laitiers, oeufs, fruits et légumes, céréales. Peut provoquer une fermentation alcoolique en milieu mal aéré (Botton et al., 1985)

Origine des souches:

Collection du laboratoire de Cryptogamie de l'USTLFA

Mucor zonatus

Systematique:

Classe des Zygomycètes
Sous-classe des Zygomycetidae
Ordre des Mucorales
Famille des Mucoraceae

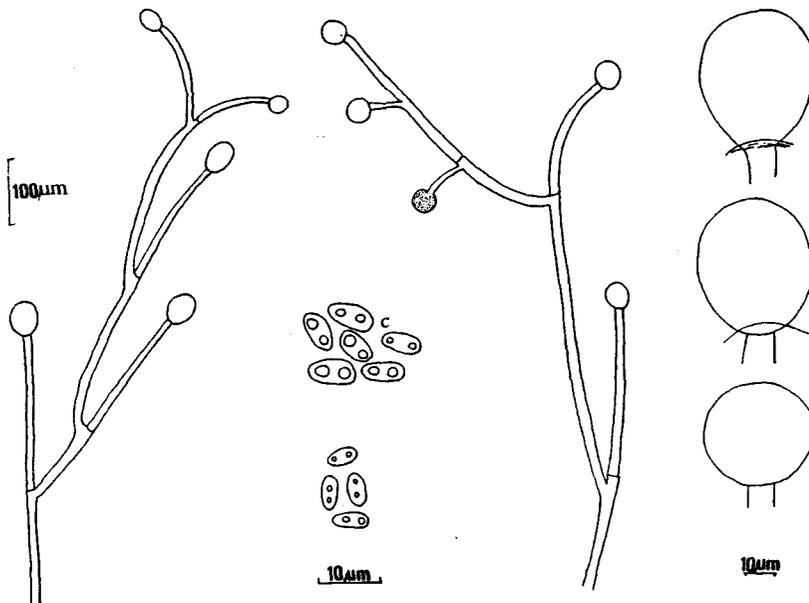
Description:

Caractères cultureux:

Colonies ramées de manière irrégulière jusqu'à 4mm de haut, de couleur gris-pâle, légèrement aromatique

Observation microscopique:

Sporangiosphères jusqu'à 13µm de diamètre à branchement sympodial.
Sporanges d'abord blanchâtre puis brun, hyalin jusqu'à 80µm
Columelle globuleuse à subglobuleuse 30 à 40µm de diamètre
Spores ovales 2,5-3,5 x 6-7,5µm



(d'après Schipper, 1978)

Intérêt potentiel

Non décrit

Effets nuisibles

Non décrit

Origine des souches

Ensilage.
Isolement au laboratoire de Cryptogamie de l'USTLFA

Rhizomucor miehei

Systematique:

Classe des Zygomycètes
Sous-classe des Zygomycetidae
Ordre des Mucorales
Famille des Mucoraceae

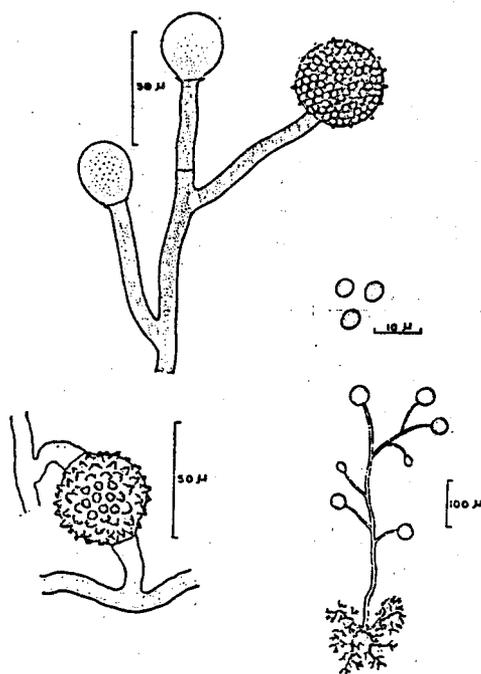
Description:

Caractères cultureux:

Homothallic, épaisseur 2mm, croissance de 25 à 57°C

Observation microscopique:

Sporangiophores branchés, la plupart sympodiques sans couleur. Sporangies sphériques 30-60µm, paroi échinulée
Zygosporos nombreuses, subsphériques, tuberculées, brun rouge à vert, 30-50µm



(d'après Cooney et Emerson, 1964)

Intérêt potentiel:

Enzymes

α-amylase, lipases, (Mouranche et Costes, 1985)
Présure (Botton et al., 1985)

Effets nuisibles:

Croissance sur céréales en stockage
Pathogène pour les animaux

Origine des souches:

Terre du Congo
Isolement au laboratoire de Cryptogamie de l'USTLFA

Talaromyces thermophilus

Systématique:

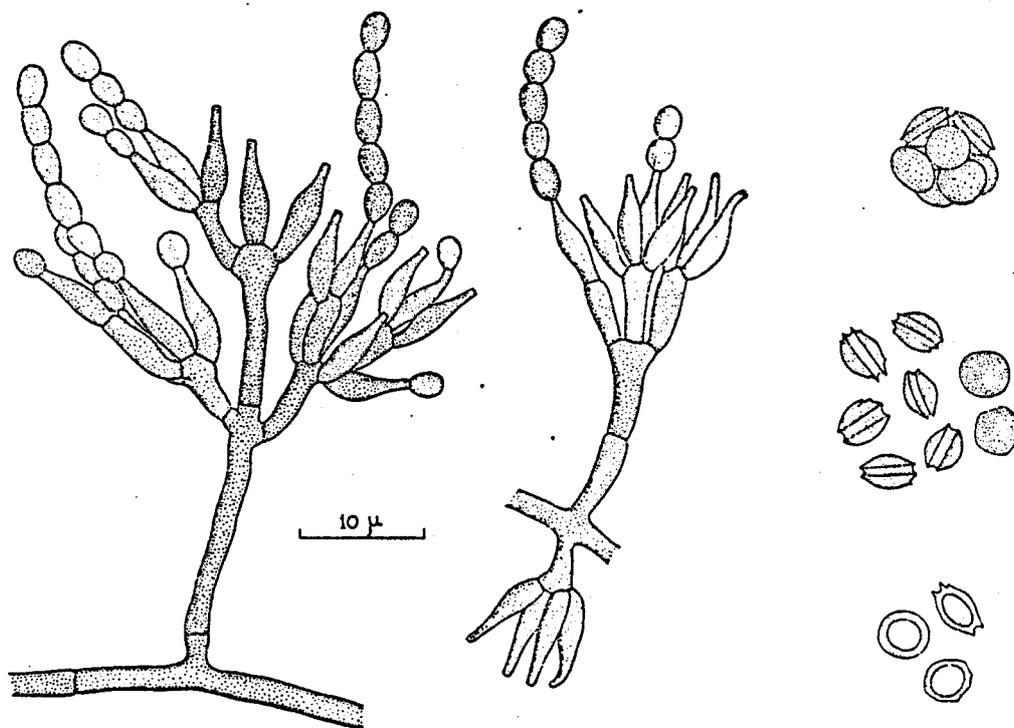
Classe des Ascomycètes
Sous-classe des Plectomycetidae
Ordre des Eurotiales
Famille des Eurotiaceae

Description:**Caractères cultureux:**

Pigment soluble brun typiquement présent (CYA)
Conidies colorées le plus souvent brun à rouge.
Croissance 27°C à 59°C

Observation microscopique:

Stipes 5-15 (35) x (1-5)-40-30µm lisses, portant des pénicilles irréguliers ; la plupart du temps avec des métules terminales ou subterminales. Métules en verticilles irréguliers de 3 à 5 (7-10 x 2-3µm). Phialides 3 à 5 par métule, ampouliiformes (5-8 x 2-2,2µm) Conidies ellipsoïdales à cylindriques 30-40 (50) x 1-8-45µm à paroi lisse à finement rugueuse en chaînes courtes et désordonnées. Chlamydozoospores présentes en général subsphériques 5-6µm



(d'après Cooney et Emerson, 1964)

Intérêt potentiel:

Hémicellulases, Amyloglucosidase (Mouranche et Costes, 1985)

Effets nuisibles:

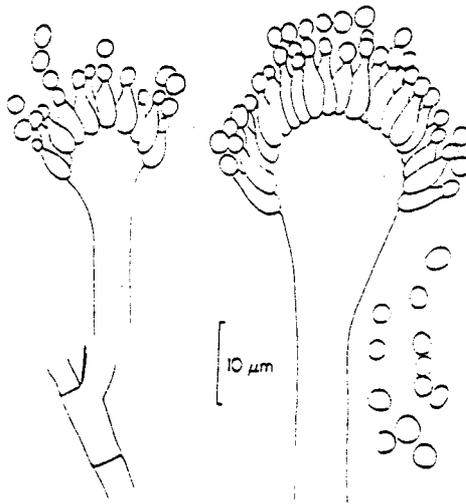
Non décrit

Origine des souches:

Litière de cheval; fumier horticole et de poule;
compost de champignonnière
Isolement au laboratoire de Cryptogamie de l'USTLFA

Aspergillus fumigatus Fres.

Systematique :	Classe des Hyphomycètes Sous-classe des Hyphomycetidae Ordre des Hyphomycetales Famille des Moniliaceae
Description :	
Caractères cultureux	Têtes conidiennes en colonnes compactes, d'abord bleu-vert puis virant au vert bronze. Croissance de 12 à 52°C.
Observations microscopiques	Conidiophores courts et lisses (300 à 500µm) s'élargissant au sommet en vésicule sub-hémisphérique, stérigmates unisériés. Vésicules de 20 à 30µm, fertiles dans leur moitié supérieure. Conidies sub-globuleuses à globuleuses de 2 à 3,5µm, échinulées



(d'après Botton et al., 1985)

Intérêt: potentiel	Acides organiques: Antibiotiques:	Acide trans-epoxysuccinique (Botton et al., 1985) Fumigatine, acide helvéolique, gliotoxine (Raper et Fennel, 1965); Fumigilline, acide aspergillique (Botton et al., 1985)
	Enzymes: Biomasse:	Cellulases, ligninase (Mouranche et Costes, 1985) sur farine de manioc, teneur en protéines de 35% (Botton et al., 1985)

Effets nuisibles:	Pathogénéicité humaine et animale Croissance sur coton, jute, laine, caoutchouc brut et certains plastifiants Corrosion (par le biais de leurs métabolites) de parois de réservoirs de fuel.
-------------------	--

Origine des souches:	Fumiers de canard, porc, d'ois, de poules, horticole Litière de vache et cheval, compost de champignonnières, graines, terres de Tunisie, du Burkina Faso, de Guinée Conakry, de Grèce, du Burkina Faso, terrils Isolément au laboratoire de Cryptogamie de l'USTLFA Laboratoire de Microbiologie de Roquette Frères Laboratoire de Cryptogamie de l'Université de Toulouse
----------------------	---

Aspergillus foetidus

Systematique:

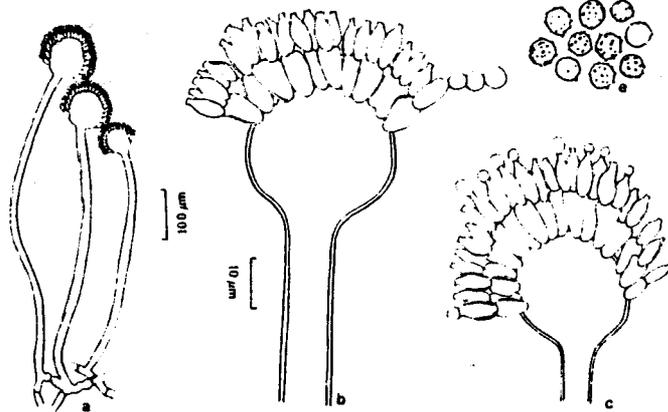
Classe des Hyphomycètes
Sous-classe des Hyphomycetidae
Ordre des Hyphomycetales
Famille des Moniliaceae

Description:**Caractères cultureux:**

Thalle à croissance relativement lente sur milieu de Czapek, à mycélium blanc ou jaune, à revers jaune ou orangé virant au brun. Odeur très prononcée d'Actinomycètes dans l'espèce, mal définie dans les variétés pallidus et acidus. Têtes conidiennes bisériées, globuleuses à radiées, restant entières pour la variété acidus mais se scindant en plusieurs colonnes sporales pour l'espèce et la variété pallidus, brun-olive à brun grisâtre.

Observation microscopique:

Conidiophores 500-1000 μ m, lisses, hyalins ou brunâtres vers le haut. Vésicules sub-globuleuses ou un peu allongées, 25-35 (50) μ m pour l'espèce, 50-60 μ m pour la variété pallidus, 80-85 μ m pour la variété acidus. Métules brunâtres, 7-15 (40) X 3-6 μ m. Phialides brunâtres, 7-10 X 2,4-4 μ m. Conidies globuleuses, brunes, presque lisses à finement verruqueuses, 3,5-4,5 μ m.



(d'après AL Musallam, 1980)

Intérêt potentiel: Enzymes

α -amylase, amyloglucosidase, protéases, inulinase

Effets nuisibles:

Non décrit

Origine des souches:

Terre du Zimbabwe
Isolement au laboratoire de Cryptogamie de l'USTLFA

Aspergillus aculeatus

Systematique:

Classe des Hyphomycètes
Sous-classe des Hyphomycetidae
Ordre des Hyphomycetales
Famille des Moniliaceae

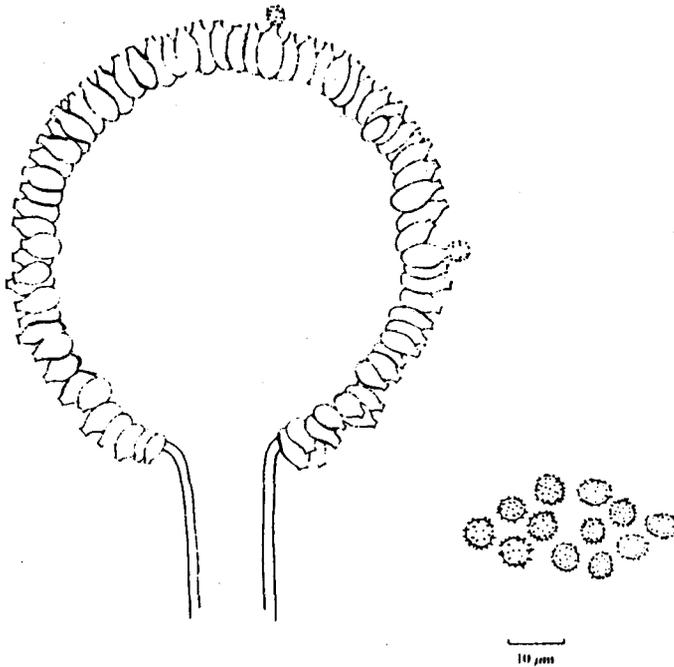
Description:

Caractères cultureux:

Colonies sur milieu de Czapek atteignant 5,5 cm en 14 jours
Revers incolore devenant brun
Têtes conidiennes globuleuses à radiées divergeant en en colonnes nettement définies, noires en masse

Observation microscopique:

Conidiophores lisses (350)-1000-(4500) μm de long ,
9-13,5 μm de large
Vésicules brunes (30 à 90 μm) portant des phialides
(7,5-10x4,5 μm) sur toute la surface
Conidies hyalines, échinulées, subglobuleuses à ellipsoïdales, 4,5x3,5-4,5 μm
Sclérotos produits abondamment chez certaines souches en zones concentriques, 450 à 800 μm de diamètre



(d'après Al musallam, 1980)

Intérêt potentiel: Enzymes Cellulases

Effets nuisibles: Non décrit

Origine des souches: Terre du Zimbabwe
Isolement au laboratoire de Cryptogamie de l'USTLFA

Aspergillus carbonarius

Systématique:

Classe des Hyphomycètes
Sous-classe des Hyphomycetidae
Ordre des Hyphomycetales
Famille des Moniliaceae

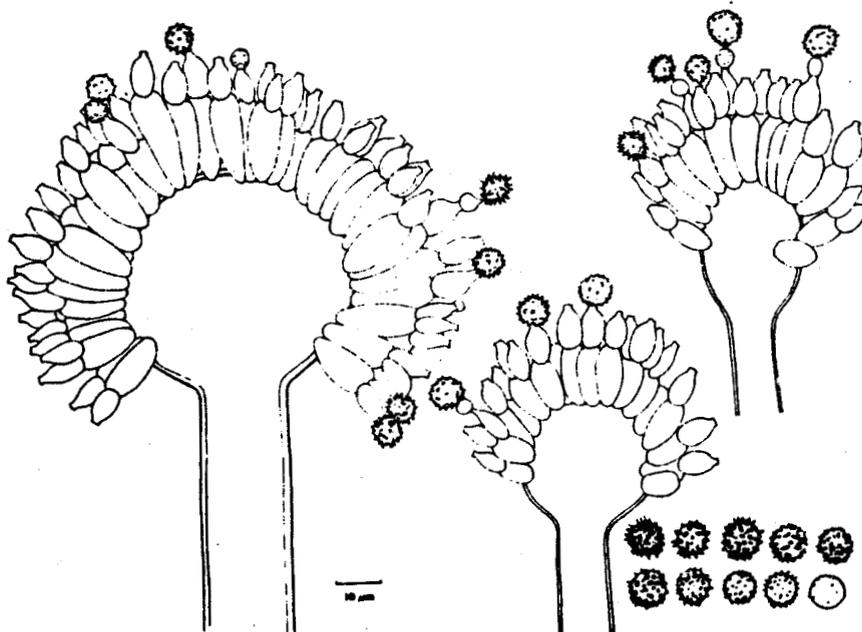
Description:

Caractères cultureux:

Colonies sur milieu de Czapek atteignant 3 à 3,5 cm en 7 jours.
Mycélium submergé fin couvert d'un feutrage jaune pâle
Têtes conidiennes noires souvent scindées en colonnes

Observation microscopique:

Conidiophores lisses ou ponctués, 2,5 à 4 μm x 1,5 à 6 μm de long
Vésicules globuleuses à subglobuleuses 70-94 μm de diamètre
Phialides 2 à 4 par métule 12,5 x 7 μm
Conidies verruqueuses à échinulées (7 à 9 μm de diamètre)
Sclérotos nus ou absents.



(d'après Al Musallam, 1980)

Intérêt potentiel:

Enzymes

pectinases

Effets nuisibles:

Non décrit

Origine des souches:

Terres du Congo, du Zimbabwe; pollutions diverses
Isolement au laboratoire de Cryptogamie de l'USTLFA

Aspergillus japonicus

Systématique:

Classe des Hyphomycètes
Sous-classe des Hyphomycetidae
Ordre des Hyphomycetales
Famille des Moniliaceae

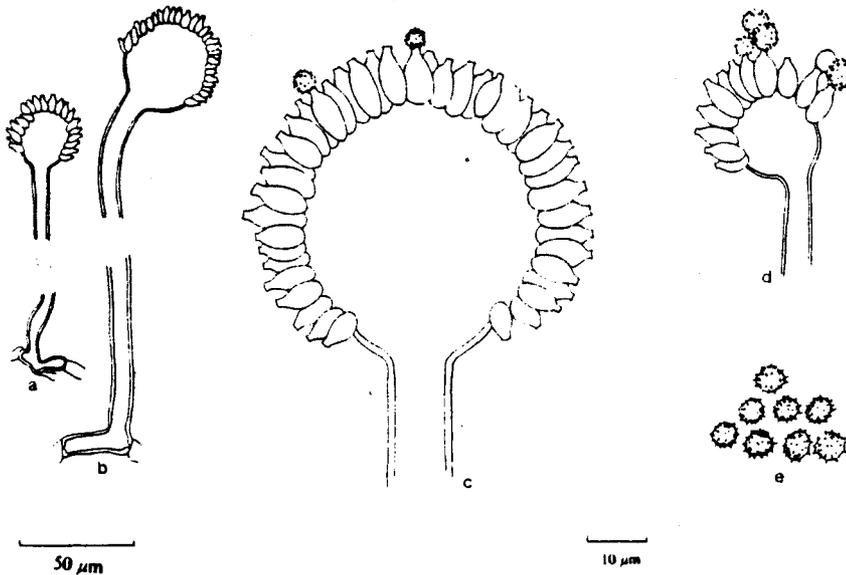
Description:

Caractères cultureux:

Avec *A. aculeatus* Ilizuka, *A. japonicus* se singularise du groupe niger par des têtes conidiennes strictement unisériées, d'un pourpre-brun à maturité

Observation microscopique:

Vésicules petites, (15) 20-35(45) μ m. Conidies globuleuses, échinulées, 3-5 μ m. Sclérotés différenciés par certaines souches, blancs à crème, atteignant jusqu'à 500 μ m.



(d'après Al Musallam, 1980)

Intérêt potentiel:

Enzymes

Pectinases

Effets nuisibles:

Produit un antibiotique inhibiteur de levures indésirables dans la fabrication de sauces de soja au Japon

Origine des souches:

Terre de Tunisie. Zimbabwe
Isolement au laboratoire de Cryptogamie de l'USTLFA

Aspergillus niger var. *awamori*

Systematique:

Classe des Hyphomycètes
Sous-classe des Hyphomycetidae
Ordre des Hyphomycetales
Famille des Moniliaceae

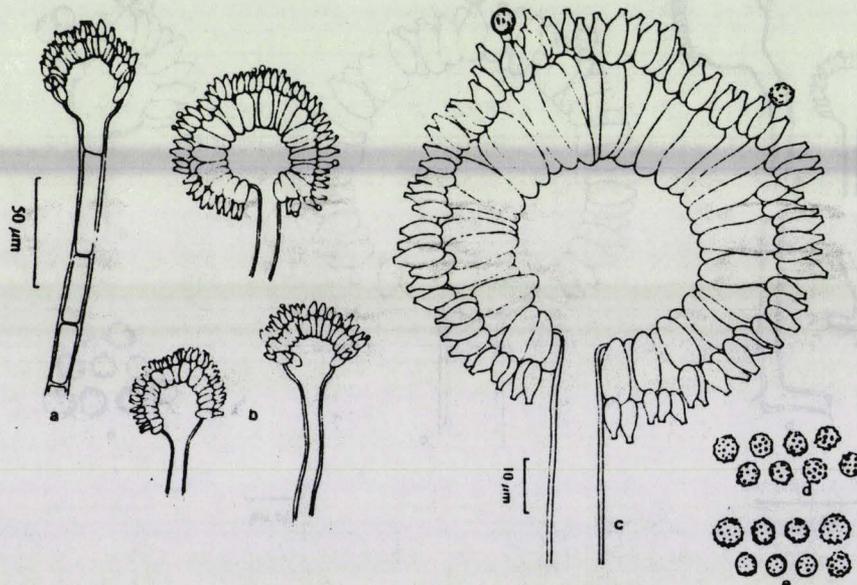
Description:

Caractères cultureux:

Thalle à sporulation abondante, parfois limitée à des aires mycéliennes floconneuses; revers incolore ou brun à brun-rouge. Têtes conidiennes bisériées, radiées ou divisées en plusieurs colonnes sporales mal définies, d'abord brun verdâtre foncé puis brun-noir foncé.

Observation microscopique:

Conidiophores lisses, fragiles, 200 (1000-1500) 3000µm. Vésicules globuleuses, brun clair, 10 (25-50) 80µm, entièrement fertiles. Métules 5 (10-20) 40 X 3,5 (4,5-7) 10µm. Phialides 5,5-10 X 3-4 µm. Conidies globuleuses à sub-globuleuses, 3,5-5 (6)µm échinulées ou garnies de crêtes.



(d'après Al Musallam, 1980)

Intérêt potentiel:

Enzymes

α -amylase, amyloglucosidase, pectinases, cellulases, protéases (Mouranche et Costes, 1985)

Effets nuisibles:

Production de malfamines toxiques pour les animaux et à l'origine de malformations d'organes végétaux (Botton et al., 1985)

Origine des souches:

Terre de Guinée Conakry et du Zimbabwe
Isolement au laboratoire de Cryptogamie de l'USTLFA
Collection du laboratoire de Microbiologie de Roquette Frères (Lestrem)

Aspergillus niger f. *hennebergii*

Systematique

Classe des Hyphomycètes
Sous-classe des Hyphomycetidae
Ordre des Hyphomycétales
Famille des Moniliaceae

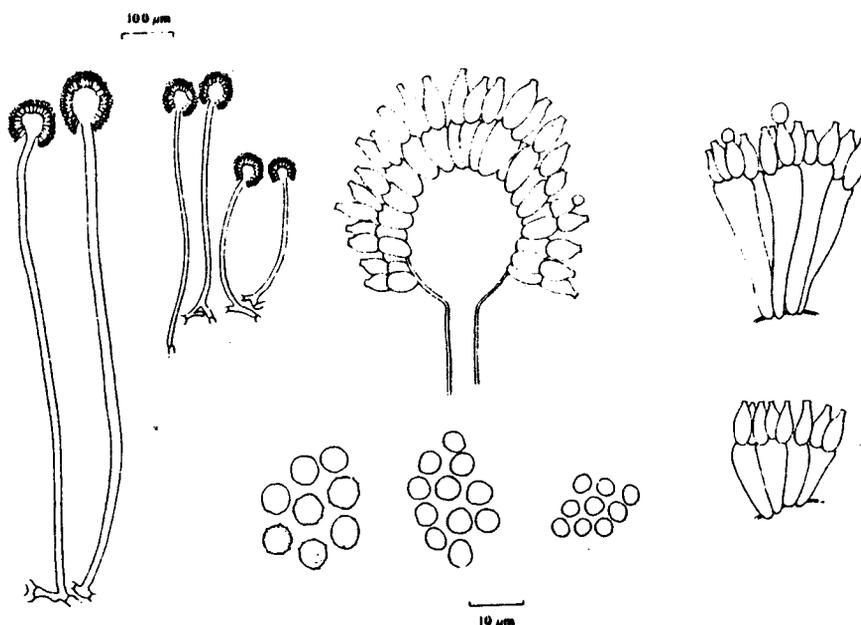
Description

Caractères cultureux

Colonies sur milieu de Czapek atteignant 2 à 4 cm en 7 jours consistant en un mycélium blanc à jaune brillant conidies brunes en masse

Observation microscopique

Conidiophores de taille très variable (300 à 3000 µm)
Vésicules globuleuses à subglobuleuses (23 à 60 µm)
Métules de 13 x 46 µm - phialides 8-10µm x 3-4 µm
Conidies lisses parfois très finement échinulées (3,5 à 5,5 µm)



(d'après Al Musallam, 1980)

Intérêt potentiel

Amyloglucosidase (Alazard et Baldensperger, 1982)

Effets nuisibles

Non décrit

Origine des souches

Centraalbureau Voor Schimmelcultures (BAARN)

Aspergillus niger var. *niger*

Systématique:

Classe des Hyphomycètes
Sous-classe des Hyphomycetidae
Ordre des Hyphomycetales
Famille des Moniliaceae

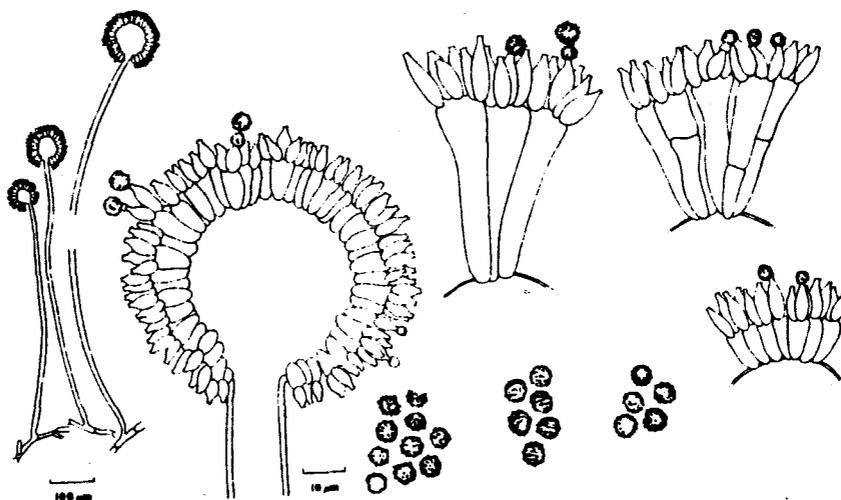
Description:

Caractères cultureux:

Thalle à croissance lente sur milieu de Czapek, à mycélium blanc ou jaune et revers souvent incolore. Têtes conidiennes bisériées, radiées, se scindant généralement en plusieurs colonnes, noir brunâtre foncé ou noires.

Observation microscopique:

Conidiophores 1,5-3mm, lisses, hyalins ou brunâtres dans leur moitié supérieure. Vésicules globuleuses (30)45-75 (100) μ m. Métules brunâtres, variables, 20-30(70) X 5-6(10) μ m. Phialides 7-10 X 3-3,5 μ m. Conidies globuleuses, parfois légèrement aplaties, 3,5-5 μ m, brunes, échinulées à très verruqueuses. Sclérotos parfois différenciés, 0,8-1,2mm, d'abord crème à chamois foncé, puis virant à chamois vinacé.



(d'après Al Musallam, 1980)

Intérêt potentiel: Enzymes

α -amylase, Amyloglucosidase, α 1-6 glucosidase, β -glucanases, xylanase, pectinases, cellulases, lipases, inulinase, chitinase, glucose oxidase

Acide organique : Acide gluconique, Acide citrique, Gluconolactone

Effets nuisibles:

Production de flavaspérone, de malfamines et d'aflatonines pour certaines souches

Origine des souches:

Terres de Tunisie, de Guinée Conakry, du Zimbabwe
Pollutions diverses, fumiers de poule
Isolement au laboratoire de Cryptogamie de l'USTLFA
Collection du Laboratoire de Cryptogamie du Museum National d'Histoire Naturelle de Paris

Aspergillus terreus

Systematique:

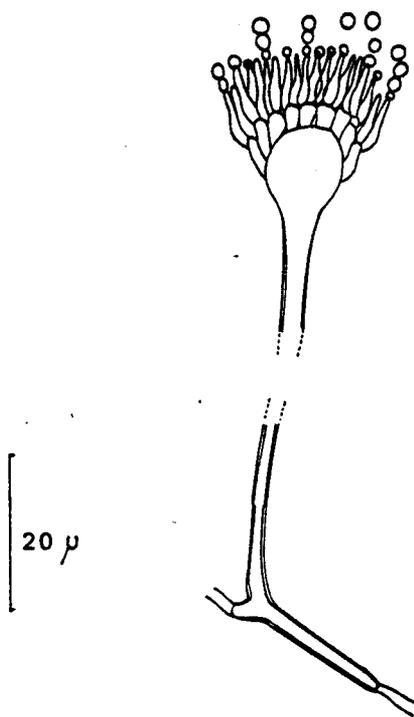
Classe des Hyphomycètes
Sous-classe des Hyphomycetidae
Ordre des Hyphomycétales
Famille des Moniliaceae

Description:**Caractères culturaux:**

Thalle velouté à floconneux à revers jaune à brun
exsudat ambré
Têtes conidiennes bisériées, longues et cylindriques
de couleur cannelle à brun orangé.

Observation microscopique:

Conidiophores lisses, hyalins 100-200µm
Résicules hémisphériques 10-20µm
Métules 5-7µm x 2-2,5µm ne couvrant que la moitié
supérieure de la vésicule, phialides parallèles
5-8 x 1,5-2µm
Conidies globuleuses à elliptiques, lisses 1,8-2,5µm



(d'après Botton et al., 1985)

Intérêt potentiel:

Enzymes	Hémicellulases et Cellulases (Mouranche et al. 1985)
Acides organiques	Acide itaconique (Smith et Berry, 1975)
Toxines	Flavipine (Botton et al., 1985)
Transformations	Stéroïdes (Botton et al., 1985)

Effets nuisibles:

Lésions hépatiques et rénales de poulets nourris
avec du blé infecté
Croissance sur tourteaux d'arachide, coton,
plastifiants (Botton et al., 1985)

Origine des souches:

Terrils et sol (Tunisie, Zimbabwe, Burkina Faso)
Isolement au laboratoire de Cryptogamie de l'USTLFA

Cladosporium cladosporioides

Systematique:

Classe des Hyphomycètes
Sous-classe des Hyphomycetidae
Ordre des Moniliales
Famille des Moniliaceae

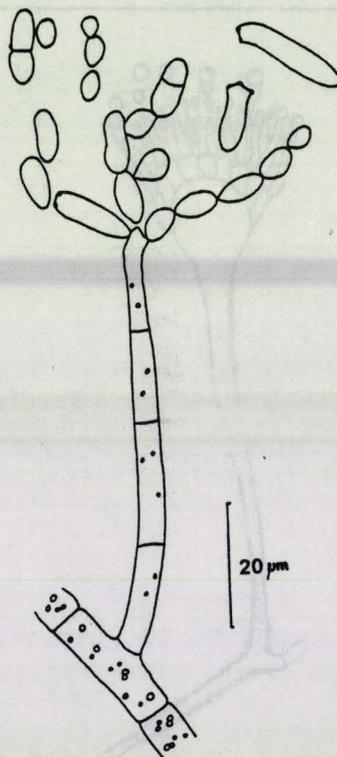
Description:

Caractères cultureux:

Thalle velouté brun olivacé à revers noir verdâtre

Observation microscopique:

Conidiophores atteignant 400µm de long, 2-6 µm de large, sans renflements, lisses ou verruqueux. Conidies brunes à brun verdâtre, lisses ou finement verruqueuses; ramoconidies plus ou moins cylindriques uni- ou bicellulaires, 30 x 3-5µm, les autres elliptiques ou citrifformes, 3-11 x 2-5µm, généralement nicellulaires.



(d'après Cooney et Emerson, 1964)

Intérêt potentiel:

Enzymes

Hémicellulases, Cellulases (Botton et al.1985).

Effets nuisibles:

Croissance sur oeuf, Bananes, céréales, pâte à papier, produits pétroliers, textiles, peintures

Origine des souches:

Pollutions diverses

Isolement au laboratoire de Cryptogamie de l'USTLFA

Myrothecium verrucaria

Systématique:

Classe des Hyphomycètes
Sous-classe des Hyphomycetidae
Ordre des Hyphomycétales
Famille des moniliaceae

Description:

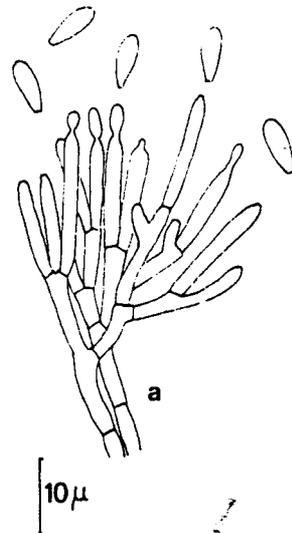
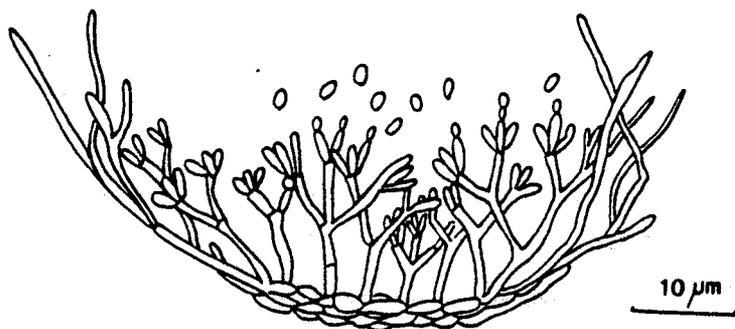
Caractères cultureux:

Masse de conidies vertes à moires entourée d'une zone de mycélium blanc.

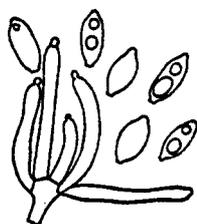
Observation microscopique:

Conidiophores groupés sur un nodule mycélien plusieurs fois ramifiés en 2 à 4 ramifications par étage.
Phialides en groupes de 3 à 6, cylindriques, 10,5-14,5 x 1,5-2µm
Spores elliptiques avec une extrémité tronquée, l'autre atténuée avec appendice en éventail 6,5-8 x 2,5-5µm

(d'après Botton et al., 1985)



(d'après Ellis, 1971)



(d'après Von Arx, 19...)

Intérêt potentiel:

Hemicellulases (xylanase, glucomannase, laminanninase, cellulases, lichininas (Mouranche et Costes, 1985)

Effets nuisibles:

Croissance sur textiles, papier (Botton et al, 1985)

Origine des souches:

Collection du laboratoire de Cryptogamie du Muséum d'Histoire Naturelle de Paris

Humicola insolens

Systematique:

Classe des Hyphomycètes
Sous-classe Hyphomycetidae
Ordre des Hyphomycetales
Famille des Moniliaceae

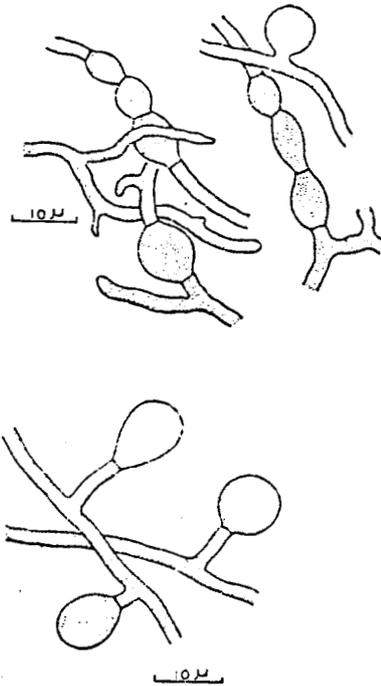
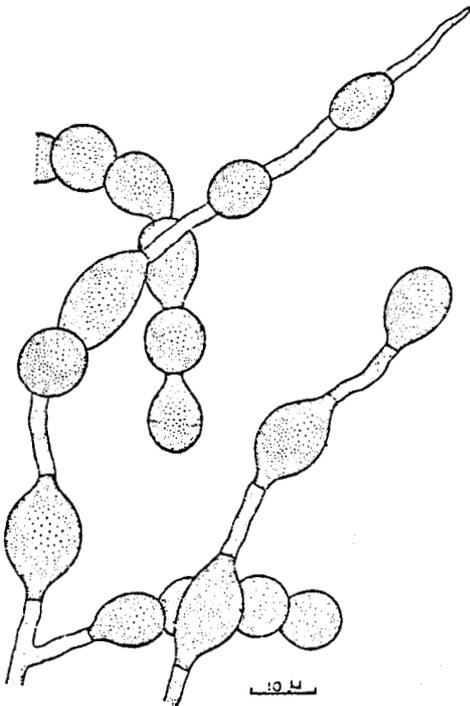
Description:

Caractères cultureux:

Cultures jeunes blanches devenant grises (coloration des hyphes) à brunes (coloration des spores)
Croissance de 23 à 55°C (Cooney et Everson)

Observation microscopique:

Aleuriospores globuleuses à subglobuleuses (7,5-12,5µm de diamètre) occasionnellement (lorsqu'il y a un intercalaire) allongées (14-20 x 8-15µm).



(d'après Cooney et Emerson, 1964)

Intérêt potentiel:

Cellulases (Mouranche et Costes, 1985)

Effets nuisibles:

Non décrit

Origine des souches:

Compost de champignonière, fumier de cochon, d'oies
litières de vache et cheval
Isolement au laboratoire de Cryptogamie de l'USTLFA

Humicola grisea var. *thermoidea*

Systematique:

Classe des Hyphomycètes
Sous-classe des Hyphomycetidae
Ordre des Hyphomycetales
Famille des Moniliaceae

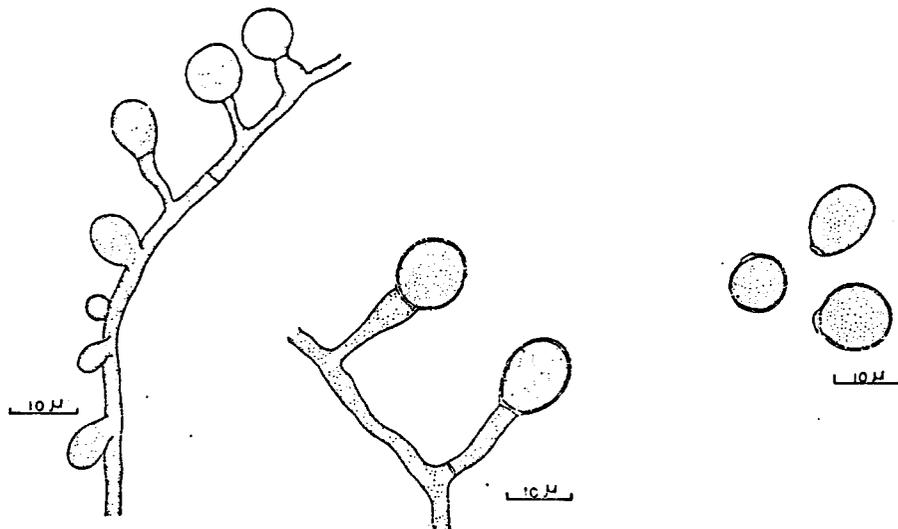
Description:

Caractères culturaux:

Mycélium épais. Couleur blanche en début de croissance, puis devenant gris foncé puis noire. Absence de substances colorées dans le milieu gélosé.
Croissance de 24 à 56°C

Observation microscopique:

Hyphes 0,5-4,5 par diamètre
Aleuriospores incolores devenant brun pâle
Globuleuses (1-17µm) apparaissant généralement de manière solitaire sur les aleuriophores latéraux



(d'après Cooney et Emerson, 1964)

Intérêt potentiel:

Enzymes

Cellulases (Mouranche et Costes, 1985)
Pectinases, ligninase (Botton et al. 1985)

Effets nuisibles:

Non décrit

Origine des souches:

Compost de champignonnière; fumier de canard
Isolement au laboratoire de Cryptogamie de l'USTLFA

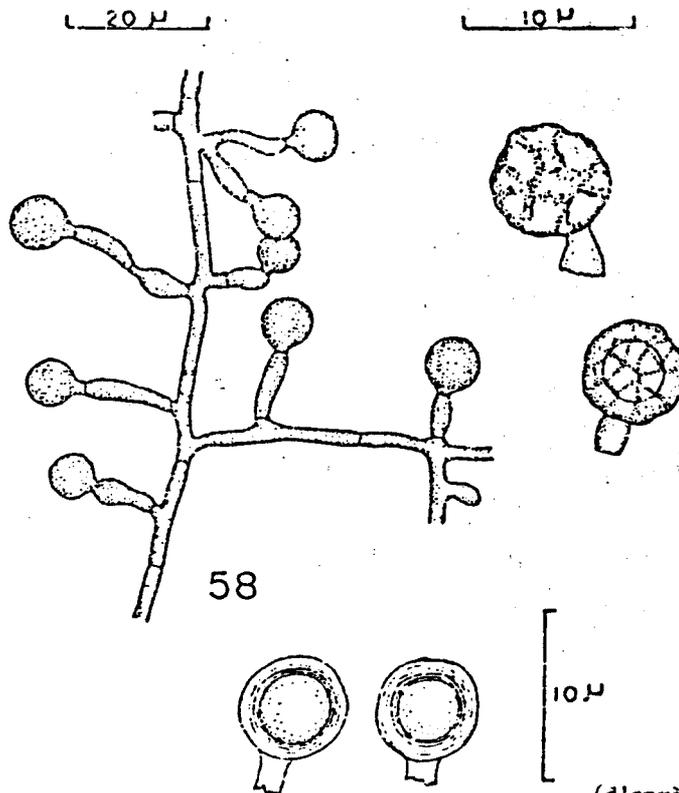
Humicola lanuginosa

Systématique: Classe des Hyphomycètes
Sous-classe Hyphomycetidae
Ordre des Hyphomycetales
Famille des Moniliaceae

Description:

Caractères cultureux: Thalle hyalin puis gris à brun-noir
Pigmentation rouge du milieu gélosé
Croissance de 30 à 60°C

Observation microscopique: Aleuriophores de 10 à 15µm prenant naissance à angle droit sur les hyphes. Aleuriospores uniques au sommet des aleuriophores, incolores lorsqu'immatures devenant par la suite noires, à paroi épaisse et verruqueuse de 6 à 10µm de diamètre.



(d'après Cooney et Emerson, 1964)

Intérêt: Enzymes Amyloglucosidase (Taylor et al., 1979), Lipase (Che Omar, 1987), Trehalase (Prasad et al., 1978),
potentiel α-amylase (Barnett et al., 1986), Cellulases (Onions et al., 1986)

Effets nuisibles: Croissance sur certains plastifiants (Botton et al., 1985)

Origine des souches: Compost de champignonnières
Isolement des souches effectué au laboratoire de Cryptogamie de l'Université de Lille I

Malbranchea pulchella var. *sulfurea*

Systématique:

Classe des Hyphomycètes
Sous-classe des Hyphomycetidae
Ordre des Hyphomycetales
Famille des Moniliaceae

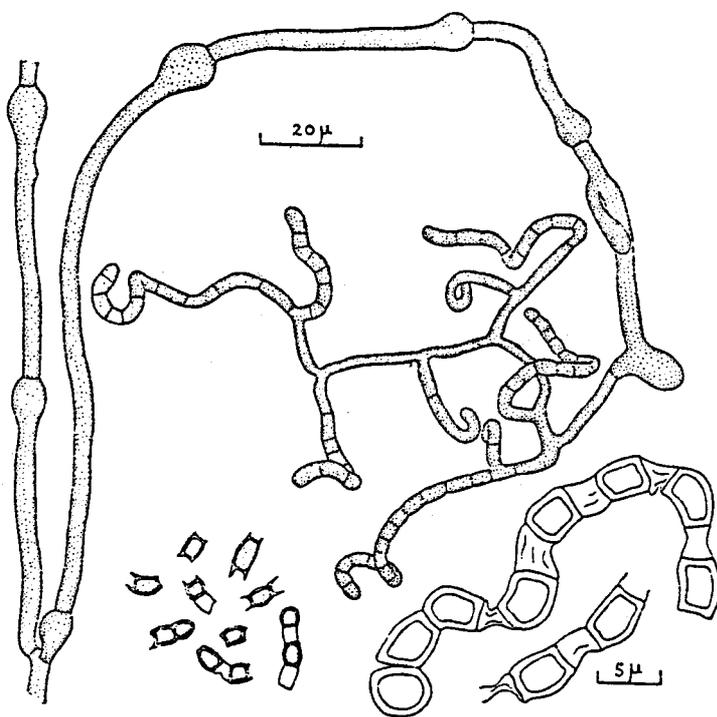
Description:

Caractères cultureux:

Coloration brun ocre au centre des colonies à jaune or à la périphérie. Exsudat jaune au centre de la colonie. Epaisseur 1mm. Croissance 27-56°C (optimum vers 45°C)

Observation microscopique:

Hyphes fertiles, systés de manière irrégulière à la base avec des renflements proches des septa (de 3 à 4µm de diamètre)
Cellules ou groupes de cellules devenant des spores à paroi épaisse séparée par des cellules fines et à paroi fine. Spores jaune pâle ou incolores, subcylindriques. 3,7 x 3-4,5µm



(d'après Cooney et Emerson, 1964)

Intérêt potentiel:

Enzymes

β-galacturonase, lipases
Cellulases (Mouranche et Costes, 1985)

Effets nuisibles:

Non décrit

Origine des souches:

Fumier horticole, de poule; terre de Grèce, du Pérou
Isolement au laboratoire de Cryptogamie de l'USTLFA

Paecilomyces variotii

Systématique:

Classe des Ascomycètes
Sous-classe des Plectomycetidae
Ordre des Eurotiales
Famille des Eurotiaceae

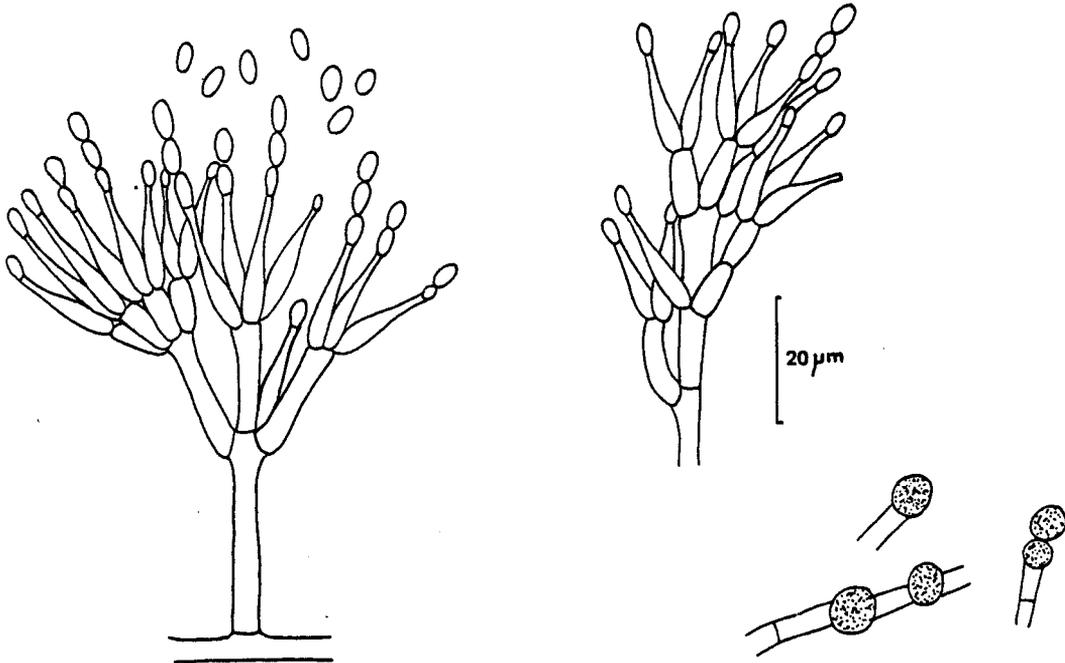
Description:

Caractères cultureux:

Thalle à croissance rapide, brun-pâle ou brun-jaune, d'aspect poudreux, à odeur aromatique. Croissance jusqu'à 50°C

Observation microscopique:

Phialides solitaires ou en groupes, 10-12µm de long. Conidies subglobuleuses à elliptiques, hyalines à jaunes, 3-7 x 2-4µm, disposées en longues chaînes divergentes. Certains isolats produisent de nombreuses chlamydo-spores, isolées ou en courtes chaînes, d'un brun plus ou moins isolé, lisses ou légèrement rugueuses, subglobuleuses à piriformes, 4-10µm.



(d'après Botton et al., 1985)

Intérêt potentiel:

Enzymes
Acides organiques divers

Protéases (Mouranche et Costes, 1985)
Acide Transepoxy succinique (Smith et Berry, 1975)
Epuration d'effluents d'usines (Botton et al. 1985)
Production de variotine (antifongique)

Effets nuisibles:

Altération de gousses et graines d'arachides (Botton et al. 1985)
Croissance sur jute, caoutchouc vulcanisé plastifiants, cosmétiques, papiers, céréales (Botton et al. 1985)
Toxicité: suspect (Botton et al. 1985)

Origine des souches:

Fruit de Côte-d'Ivoire
Isolement au laboratoire de Cryptogamie de l'USTLFA
Collection du laboratoire de Cryptogamie du Museum d'Histoire Naturelle de Paris

Pour les souches du genre *Penicillium*, les caractères culturels sont définis sauf contre indication par une culture effectuée sur:

Le milieu CYA (Czapek Yeast Autolysate Agar) Pitt (1973)

K_2HPO_4 10g
Milieu de Czapek concentré... 10ml
Extrait de levure..... 5g
Saccharose..... 30g
Agar..... 15g
 H_2O1000ml

Milieu de Czapek concentré

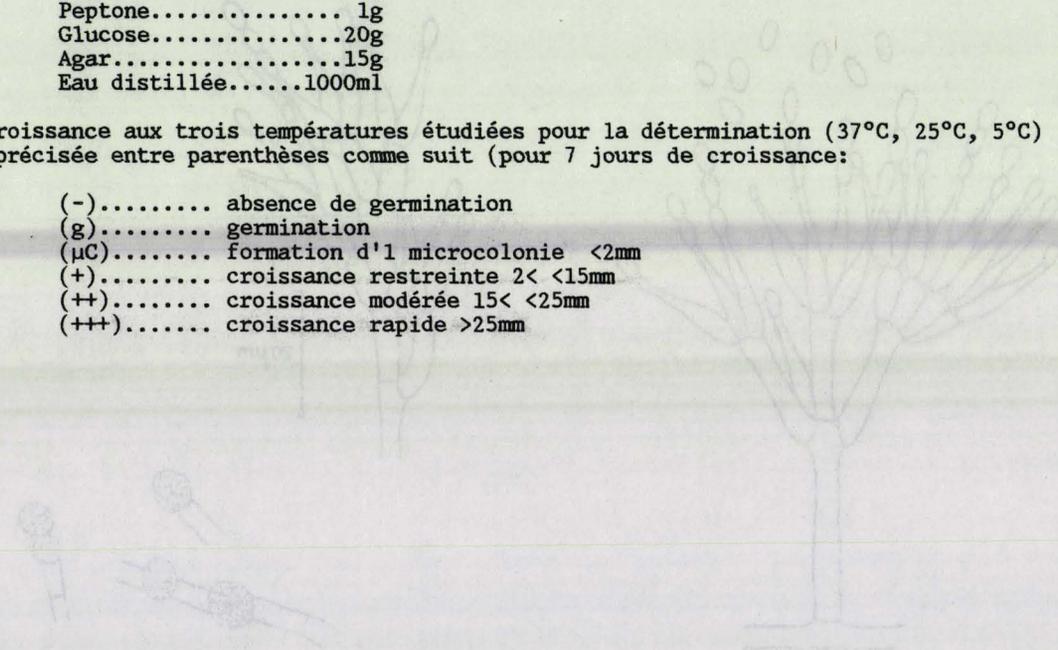
$NaNO_3$30g
KCl.....5g
 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$5g
 $FeSO_4 \cdot 7H_2O$0,1g
 H_2O1000ml

ou le milieu MEA d'après Blakeslee (1915)

Extrait de Malt.....20g
Peptone..... 1g
Glucose.....20g
Agar.....15g
Eau distillée.....1000ml

La croissance aux trois températures étudiées pour la détermination (37°C, 25°C, 5°C) est précisée entre parenthèses comme suit (pour 7 jours de croissance):

- (-)..... absence de germination
- (g)..... germination
- (μ C)..... formation d'1 microcolonie <2mm
- (+)..... croissance restreinte 2< <15mm
- (++)..... croissance modérée 15< <25mm
- (+++)...... croissance rapide >25mm



Penicillium decumbens

Systematique:

Classe des Hyphomycètes
Sous-classe des Hyphomycetidae
Ordre des Hyphomycétales
Famille des Moniliaceae

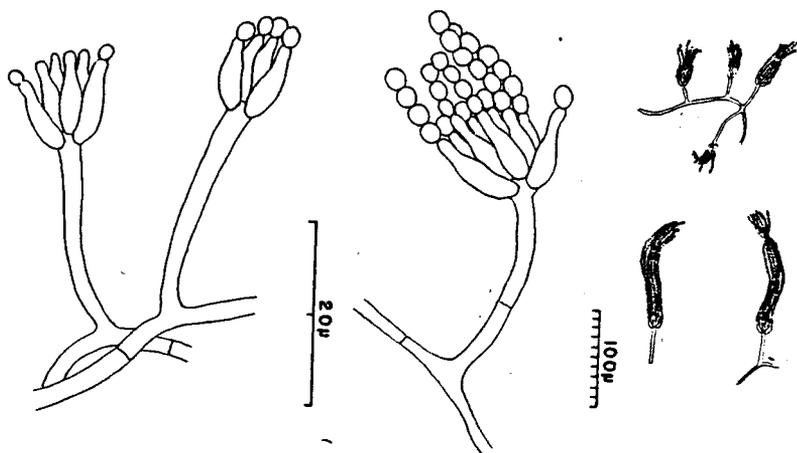
Description:

Caractères cultureux:

Croissance sur CYA 37°C (+), 25°C (++), 5°C (µC)
Thalle à croissance lente, velouté à légèrement floconneux, à marge large, vert-gris à gris-bleu. Revers pâle, brun-jaune ou olive.

Observation microscopique:

Pénicilles monoverticillés.
Conidiophores 20-60 (100) x 1,8-2,5µm, lisses renflés au sommet et terminés par un verticille de 5-8 phialides ampoulliformes longues et étroites, 8-14 x 2-3µm.
Conidies elliptiques, lisses, 2, 5-4 x 2-3µm.



(d'après Raper et Thom, 1949)

Intérêt potentiel:

Non décrit

Effets nuisibles:

Polluant de fromages à pâte molle
Dégradation de fresques (Botton et al., 1985)
Elabore une substance toxique, la decumbine

Origine des souches:

Terre du Gabon
Isolement au laboratoire de Cryptogamie de l'USTLFA

Penicillium chrysogenum

Systématique:

Classe des Hyphomycètes
Sous-classe des Hyphomycetidae
Ordre des Hyphomycétales
Famille des Moniliaceae

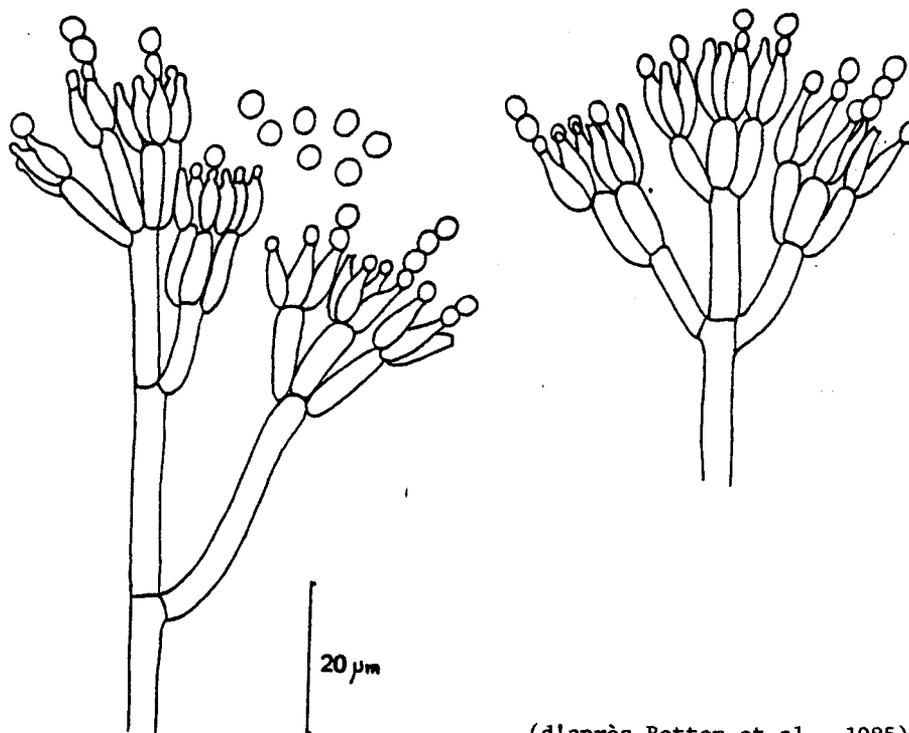
Description:

Caractères cultureux:

Thalle à croissance rapide, vert-bleu ou vert-jaune devenant gris ou brun, souvent surélevé au centre, sillonné radialement, velouté ou un peu floconneux. Revers jaune vif à brun-jaune, parfois brun-rouge. Exsudat jaune plus ou moins foncé à brun-jaune et pigment jaune diffusible généralement présent. Odeur aromatique.

Observation microscopique:

Pénicilles asymétriques et souvent complexes, à ramifications divergentes. Conidiophores 200-1000 x 3-4,5µm, lisses.
Métules par 3-5, 8-15 x 2,4-4µm. Phialides par 4-7, ampulliformes, 7-10 x 2-2,5µm. Conidies subglobuleuses 2,5-4 x 2,2-3,8µm, lisses, disposées en longues colonnes irrégulières.



(d'après Botton et al., 1985)

Intérêt potentiel:	Acides organiques	Acide erythorbique, (Botton et al., 1985)
	Enzymes	Acide gluconique Glucoseoxydase, catalase (Botton et al. 1985), lipases (Mouranches et Costes, 1985)
	Antibiotiques	Pénicillines (Botton et al., 1985)

Effets nuisibles:

Pollution de salaisons et de fromages à pâte molle
Détérioration de fresques.
Biodégradation d'insecticides organochloré
Production de Notatine (toxique, perturbant le transport d'oxygène dans le sang, Botton et al. 1985)

Origine de la souche:

Terre de Syrie
Isolement au laboratoire de Cryptogamie de l'USTLFA

Penicillium fellutanum

Systematique:

Classe des Hyphomycètes
Sous-classe des Hyphomycetidae
Ordre des Hyphomycétales
Famille des Moniliaceae

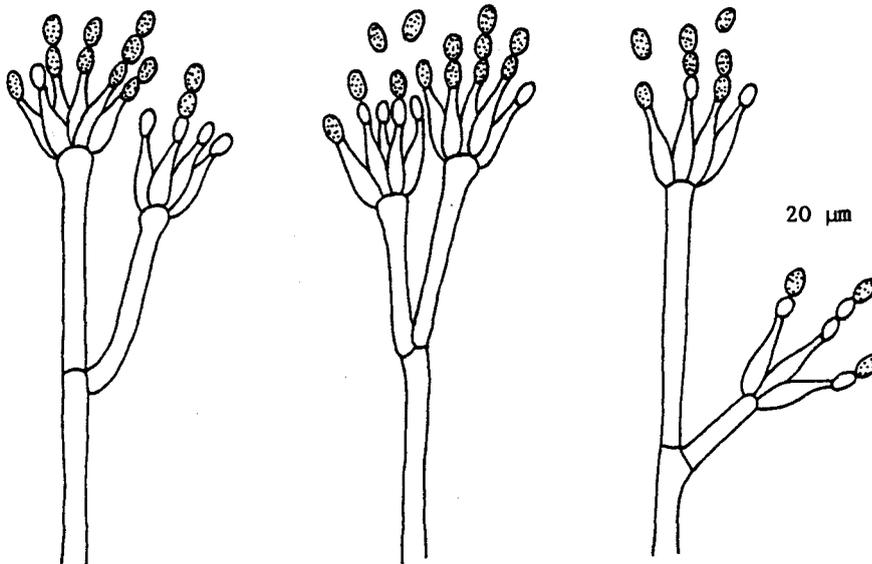
Description:

Caractères cultureux:

Croissance sur CYA 37°C (-), 25°C (+), 5°C (-)
Thalle à croissance lente, très dense, sillonnée radialement, velouté mais surélevé et floconneux au centre, vert sombre à gris verdâtre. Revers pâle pigment soluble absent.

Observation microscopique:

Pénicilles parfois monoverticillés, plus souvent biverticillés asymétriques.
Conidiophores formés sur le mycélium aérien, lisses de longueur variable, renflés au sommet. Métules 10-30 x 2-2,5µm. Phialides densément groupées par 8-12, ampulliformes, (5) 7-8 (10) x 1,5-2,5µm.
Conidies elliptiques, 2,5-3 x 2-2,5µm, lisses ou finement rugueuses, en longues colonnes irrégulières.



(d'après Botton et al., 1985)

Intérêt potentiel:

Non décrit

Effets nuisibles:

Croissance sur graines (Botton et al., 1985)

Origine des souches:

Terre de Syrie.
Isolement au Laboratoire de Cryptogamie de l'USTLFA

Penicillium funiculosum

Systematique

Classe des Ascomycètes
Sous-classe des Plectomycetidae
Ordre des Eurotiales
Famille des Eurotiaceae

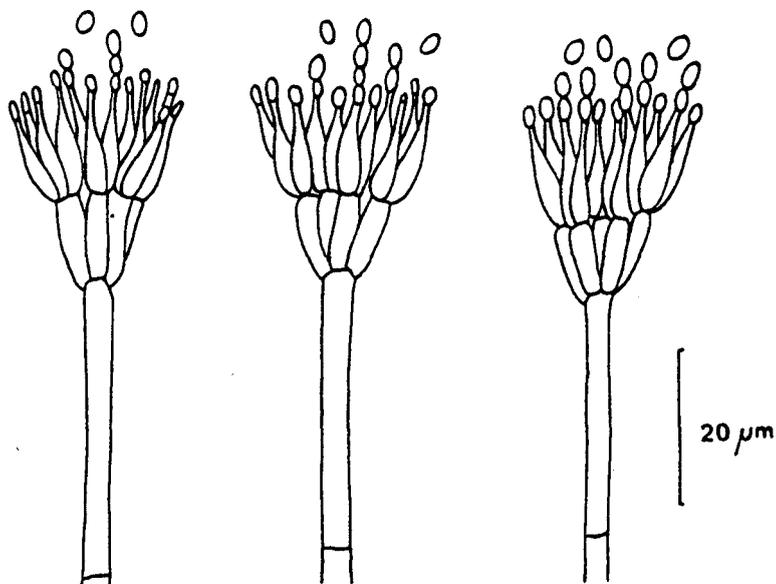
Description

Caractères cultureux

37°C (+++), 25°C (+++), 5°C (-)
Thalle à croissance rapide, mycélium coloré, revers souvent rose à rouge, exsudat clair et pigment rose présents. Couleur vert grisâtre.

Observation microscopique

Pénicilles biverticillés, symétriques
Conidiophores lisses (25-60µm x 2,5-3µm)
Métules par 5-8 (9-13µm x 2,5-3µm), phialides en verticilles de 5 à 8 par métule (9-12µm x 2-2,5µm)
Conidies elliptiques, lisses (2-3µm x 1,5-2,5µm)



(d'après Botton et al., 1984)

Intérêt potentiel

Acides organiques

Acide gluconique (Botton et al., 1985)
Cellulases (Botton et al., 1985), lipases et dextranase (Mourranche et Costes, 1985)
Adsorption de l'uranium

Bioremediation

Effets nuisibles

Croissance sur fromages à pâte molle (défaut d'aspect et de goût) sur soja et polyuréthanes (Botton et al., 1985)
Toxicité non signalée

Origine des souches

Collection du laboratoire de Cryptogamie du Muséum d'Histoire Naturelle (Paris)

Penicillium olivicolor

Systematique:

Classe des Hyphomycètes
Sous-classe des Hyphomycetidae
Ordre des Hyphomycétales
Famille des Moniliaceae

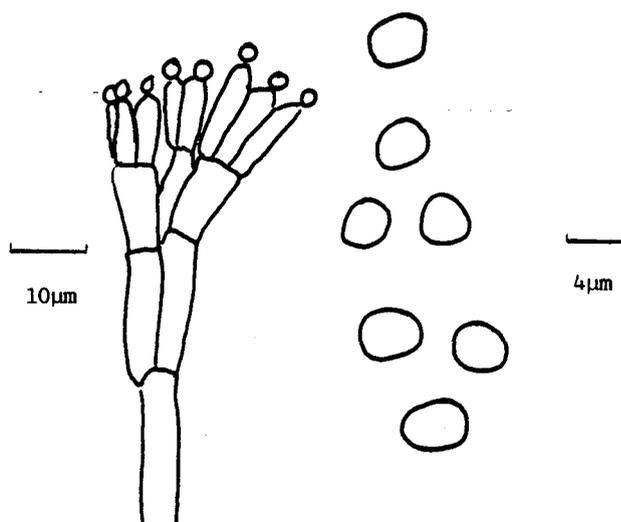
Description:

Caractères cultureux:

Croissance à 37°C (-), 25°C (+++), 5°C (µC)
Exsudat clair parfois présent (CYA), pigment soluble absent (MEA et CYA). Revers rouge brun (CYA) à orange (MEA)
Conidies vertes en masse à la marge des colonies brunes au centre.

Observation microscopique:

Pénicilles triverticillés
Stipes 200 à 400µm x 3-4µm le plus souvent rugueux
1 à 2 rami par pénicille (15-25 x 3,0-4,0µm)
métulles en verticille de 3 à 5, 10-15 x 3,0-4,0µm
phialides de 5 à 8 par métulles, ampouliiformes
conidies sphéroïdales, 2,5 à 4,0µm à paroi rugueuse, en chaînes désordonnées.



(d'après Pitt, 1979)

Intérêt potentiel:

Non décrit

Effets nuisibles:

Non décrit

Origine des souches:

Pollutions diverses, terres du Zimbabwe, de Guinée du Burkina Faso et de Grèce.
Isolement au laboratoire de Cryptogamie de l'USTLFA.

Penicillium purpurogenum

Systematique:

Classe des Hyphomycètes
Sous-classe des Hyphomycetidae
Ordre des Hyphomycétales
Famille des Moniliaceae

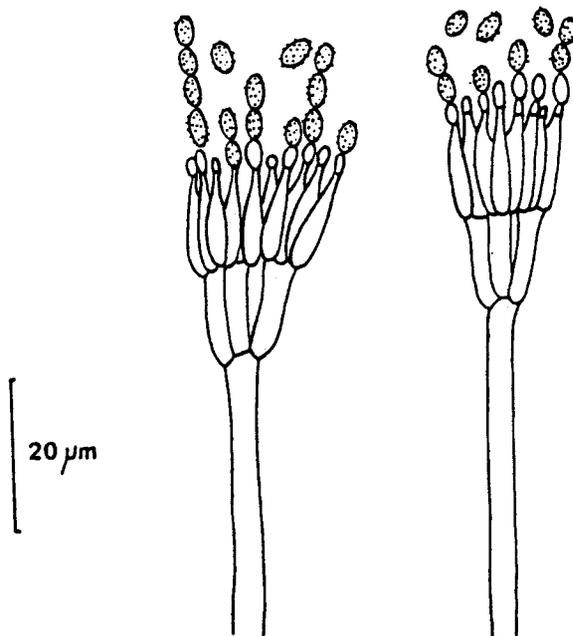
Description:

Caractères cultureux:

Croissance sur CYA 37°C (++) , 25°C (++) , 50C (-)
Exsudat orange à rouge parfois présent (CYA 25°C),
pigment soluble produit de manière caractéristique
sur CYA (25°C)
Conidies vert foncé en masse

Observation microscopique:

Pénicilles biverticillés, symétriques, étroits,
compacts. Conidiophores 70-300 x 2,5-3,5µm, lisses.
Métules par 6-8, 10-14 x 2,5-3µm. Phialides en
verticille de 5-7 par métule, lancéolées, 10-12 x
2-2,5µm.
Conidies elliptiques à subglobuleuses, 3-3,5x2,5-3µm
finement granuleuses à verruqueuses, parfois lisses.



(d'après Botton et al., 1985)

Intérêt potentiel:

Enzymes

Hydrolase des glucanes de levure (Mouranche et Costes, 1985)

Acide organique

Acide gluconique (Smith et Berry, 1975)

Effets nuisibles:

Dégradation de peintures et adhésifs (Botton et al. 1985)
Croissance sur graines et tourteaux d'arachides (Botton et al., 1985)
Responsable de graves mycotoxines et d'allergies
Elabore de l'acide gluconique, de la phoenicine (Botton et al., 1985)

Origine des souches:

Sols du Zimbabwe
Isolement au laboratoire de Cryptogamie de l'USTLFA

Penicillium verrucosum

Systematique:

Classe des Hyphomycètes
Sous-classe des Hyphomycetidae
Ordre des Hyphomycétales
Famille des Moniliaceae

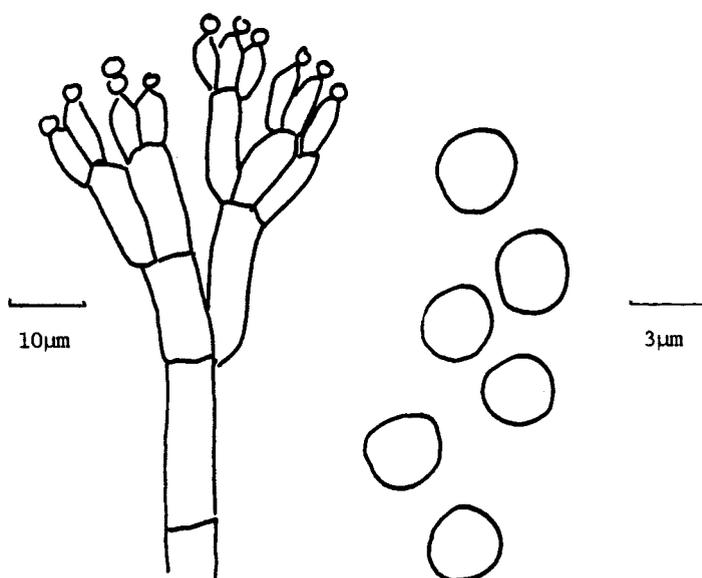
Description:

Caractères cultureux:

37°C (-), 25°C (++)°, 5°C (µC)
Croissance jaune pâle, pigment soluble absent,
Revers jaune à brun (CYA) à vert (MEA)
Conidies en masse verte

Observation microscopique:

Pénicilles triverticillés
Stipes 200-500µm x 3,5-4µm, parois rugueuses
1-2 rami par stipe 10-20 x 2,5-5µm parfois
rugueux
Métules en verticilles de 2 à 5 (7-15µm x 2,5-4µm)
Phialides 4-7 par métule 7-9 x 2,5-3µm
Conidies sphériques 2,5-3µm, parois lisses, chaînes
désordonnées.



(d'après Pitt, 1979)

Intérêt potentiel:

Non décrit

Effets nuisibles:

Polluant en fromagine à pâte molle
Céréales
Toxicité, production d'acide pénicillique,
acide émodique, acide cyclomazomique (Botton et
1985)

Origine de la souche:

Polutions diverses
Isolement au laboratoire de Cryptogamie de l'USTLFA

Penicillium waksmanii

Systematique:

Classe des Hyphomycètes
Sous-classe des Hyphomycetidae
Ordre des Hyphomycétales
Famille des Moniliaceae

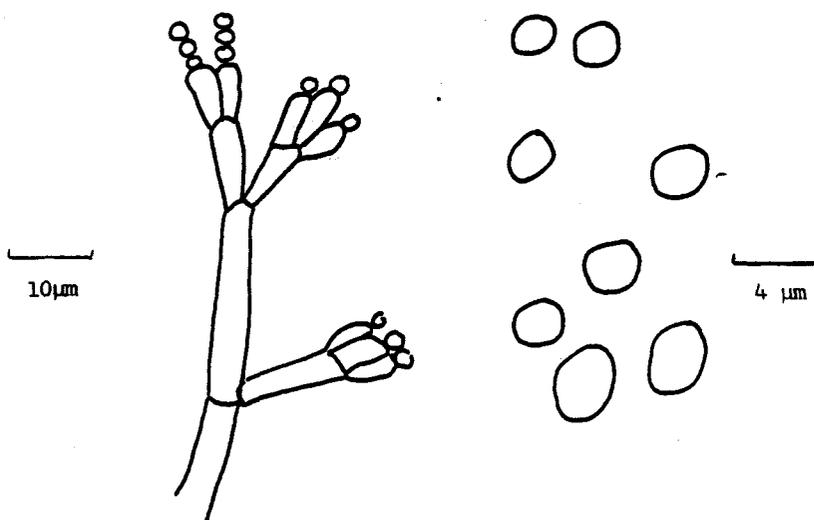
Description:

Caractères cultureux:

Croissance sur CYA 37°C (-), 25°C (+), 5°C (µC)
Exsudat clair parfois présent (CYA 25°C°), pigment soluble absent et revers de la colonie pâle occasionnellement jaune foncé (MEA et CYA)
Conidies grises en masse

Observation microscopique:

Pénicilles biverticillés irréguliers
Conidiophores lisses 100-200 x 2,5-3,0µm
Métules par 3 à 5 (7-20 x 2,5-3,0µm)
Phialides en verticilles de 5 à 8 par métule, ampouliformes (6-8 x 2,5-3,0µm)
Conidies sphéroïdales, lisses à finement rugueuses, 2,5-3,5µm de diamètre en chaînes courtes et désordonnées



(d'après Pitt, 1979)

Intérêt potentiel:

Non décrit

Effets nuisibles:

Biodégradation des insecticides organophosphorés
(Botton et al., 1985)

Origine des souches:

Bois de stockage
Isolement au laboratoire de Cryptogamie de
l'USTLFA

Trichoderma atroviride

Systématique:

Classe des Ascomycètes
Sous-classe des Pyrénomycetidae
Ordre des Nectriales
Famille des Hypocreaceae

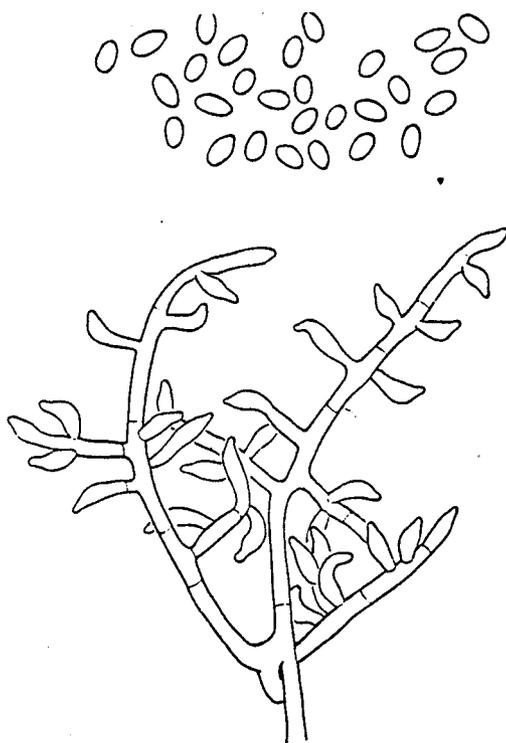
Description:

Caractères cultureux:

Mycélium aérien blanc ou jaune. Conidies en pustules de 2mm de diamètre, initialement blanches puis vertes
Revers jaune à vert. Exsudat à couleur jaune, pas d'odeur.
Température optimale de croissance 33°C, maximale 42°C

Observation microscopique:

Hyphes hyalins lisses 2-14µm de diamètre.
Chlamydozoospores abondantes, lisses, à ellipsoïdales 4-12µm de diamètre.
Conidiophores hyalins, lisses, 5µm à la base, 2 à l'apex
Phialides solitaires parfois verticilles de 2 à 3 (5,2-10 x 2,1-3,3µm). Conidies lisses ellipsoïdes (4,3-7) x 2,7-3,9µm)



(d'après Bisset, 1984)

Intérêt potentiel:

Non décrit

Effets nuisibles

Non décrit

Origine de la souche:

Terre du Congo
Isolement au laboratoire de Cryptogamie de l'USTLFA

Trichoderma harzianum Rifai aggr.

Systématique:

Classe des Ascomycètes
Sous-classe des Pyrenomycetidae
Ordre des Nectriales
Famille des Hypocreaceae

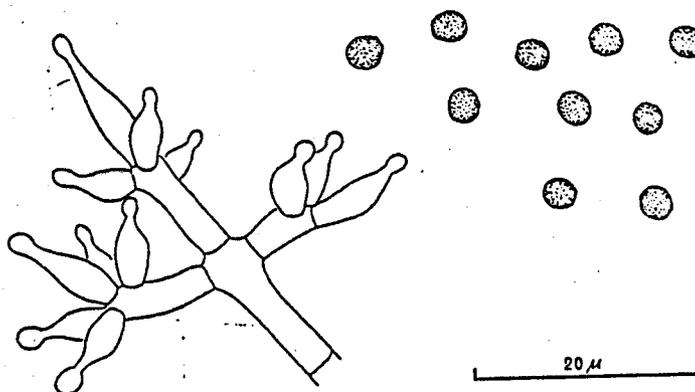
Description:

Caractères cultureux:

Thalle d'abord blanc puis vert-olive dans les régions sporogènes. Revers incolore.

Observation microscopique:

Conidiophores très ramifiés. Phialides ampulliformes 5-7 (18) x 3-3,5µm, en groupes de 2-5. Conidies sub-globuleuses, lisses, vertes, 2,8-3, 2 x 2,5-2,8µm. Chlamydospores globuleuses, hyalines, 6-12µm de diamètre



(d'après Rifai, 1969)

Intérêt potentiel:

Chitinase, lyposyme, protéases, lipases (M)
Cellulase (Botton et al.1985)
laminarinase, chitinase (Botton et al. 1985)

Effets nuisibles:

Croissance sur céréales, papiers, textiles

Origine des souches:

Bois de stockage
Isolement au laboratoire de Cryptogamie de l'USTLFA
Collection du laboratoire de Cryptogamie du Museum
d'Histoire Naturelle de Paris

Trichoderma koningii

Systématique:

Classe des Ascomycètes
Sous-classe des Pyrenomycetidae
Ordre des Nectriales
Famille des Hypocreaceae

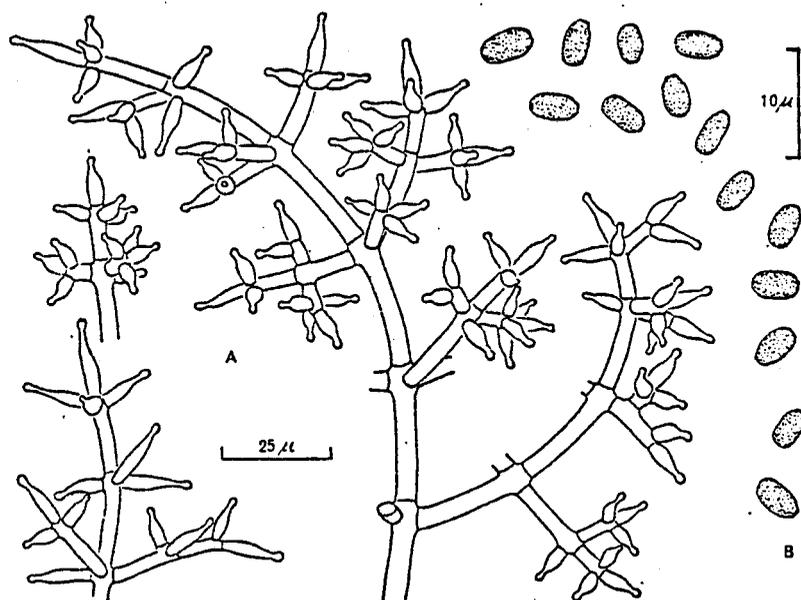
Description:

Caractères cultureux:

Croissance rapide, mycélium blanc devenant floconneux particulièrement aux limites des boîtes de Pétri
revers incolore (vert pâle à olive)
spores vertes en masse

Observation microscopique:

Phialides alternés ou en opposition, 6-14 x 2,5-3µm
Spores elliptiques à obovoïdes, 3,6-6,5 x 2,2-3µm
Conidiophores longs et peu ramifiés
Phialides souvent solitaires
Conidies obovoïdes (2 x 3µm) vertes
Chlamydo-spores sphériques atteignant 8µm de diamètre



(d'après Rifai, 1969)

Intérêt potentiel:

Enzymes

Xylanase (Royer et al., 86), Laminarinase (Sharwa et al., 1986), Pectinases, Cellulases (Durand et al., 1984) Protéases (Botton et al. 1985)

Métabolite primaire

Production de lipides (Botton et al. 1985)

Effets nuisibles:

Non décrit

Origine des souches:

Bois de stockage de papeterie, isolement au laboratoire de cryptogamie de l'USTLFA

Trichoderma longibrachiatum
Syn. *T. reesei*

Systematique

Classe des Ascomycètes
Sous-classe des Pyrenomycetidae
Ordre des Nectriales
Famille des Hypocreaceae

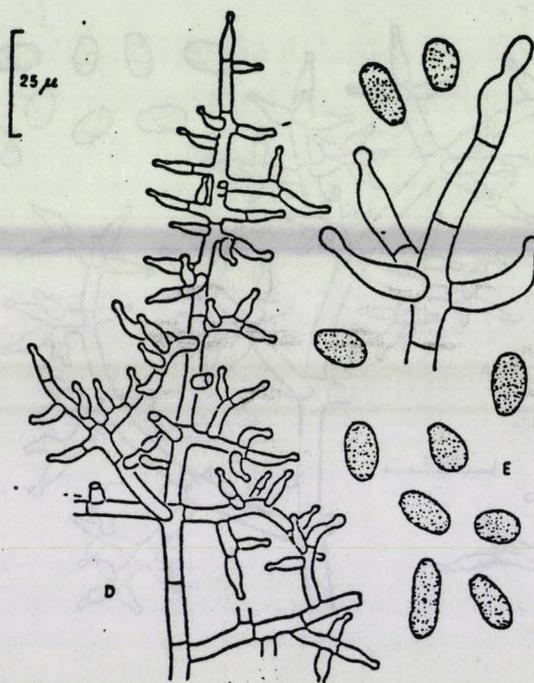
Description

Caractères cultureux

Croissance rapide, mycélium blanc devenant floconneux particulièrement aux limites des boîtes de Pétri.
Revers incolore (vert pâle à olive)
Spores vertes en masse

Observation microscopique

Conidiophores longs et peu ramifiés
Phialides souvent solitaires, alternés ou en opposition, 6-14 x 2,5-3µ
Spores elliptiques à obovoïdes, 3,6-6,5 x 2,2-3µ
Chlamydo-spores sphériques atteignant 8µm de diamètre



(d'après Rifai, 1969)

Intérêt potentiel

Enzymes

Xylanase (Royer et al., 1986), Laminarinase (Sharwa et al., 1986), Pectinases, Cellulases (Durand et al., 1984), Protéases (Botton et al., 1985).

Métabolite primaire

Production de lipides (Botton et al., 1985)

Effets nuisibles

Non décrit

Origine des souches

Bois de stockage de papeterie
Isolement au laboratoire de Cryptogamie de l'USTLFA.

Trichoderma pseudokoningii Rifai

Systematique:

Classe des Ascomycètes
Sous-classe des Pyrenomycetidae
Ordre des Nectriales
Famille des Hypocreaceae

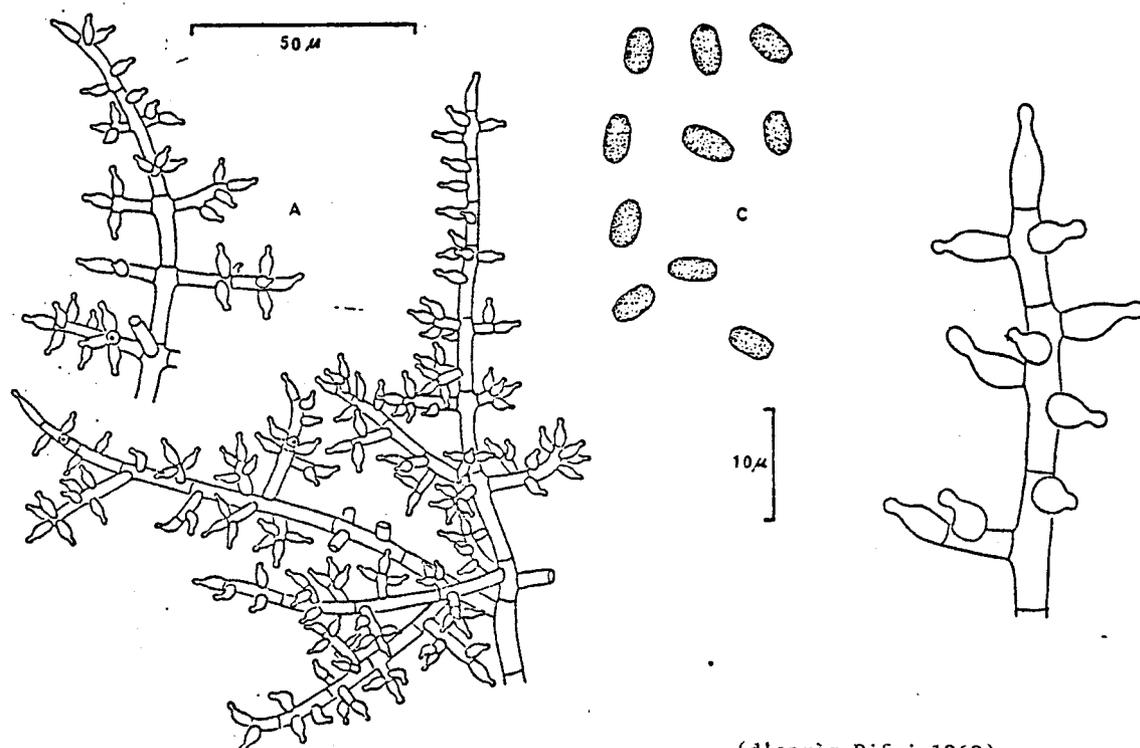
Description:

Caractères culturaux:

Croissance très rapide (8-9 de diamètre en 4 jours à 20°C)
Mycélium aérien limité floconneux bleu à jaune pâle. Conidies blanches à jaune pâle devenant vertes. Odeur indistincte. Revers incolore.

Observation microscopique:

Hyphes lisses 1 à 12µm de largeur.
Chlamydospores produits par le mycélium submergé solitaires, intercalaires, terminales, lisses à paroi épaisse, hyalines à vertes, subglobuleuse à ellipsoïdale 4-12 x 3-9µm.
Conidiophores hyalins, lisses
Phialides en verticilles de 2 à 5, ou solitaires et alternés (3,8-7,6 x 2-0-3,3µm)
Conidies lisses ellipsoïdales 3,5 x 2µm



(d'après Rifai, 1969)

Intérêt potentiel:

Enzymes

Hémicellulases (Mouranches et Costes, 1985)

Effets nuisibles:

Non décrit

Origine des souches:

Bois de sockage
Isolement au laboratoire de cryptogamie de l'USTLFA

Trichoderma viride

Systématique:

Classe des Ascomycètes
Sous-classe des Pyrénomycetidae
Ordre des Nectriales
Famille des Hypocreaceae

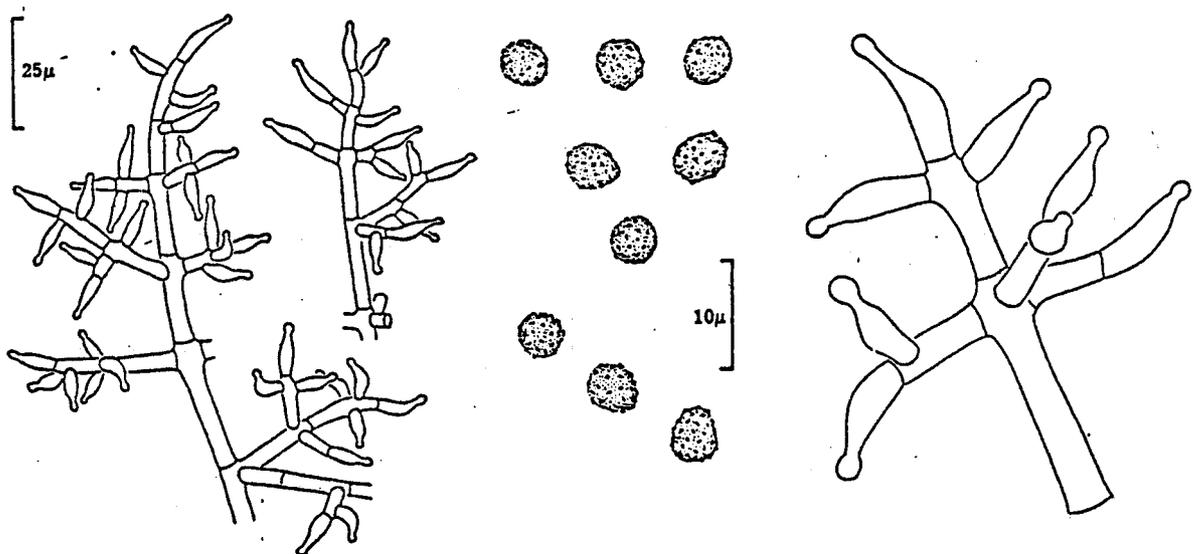
Description

Caractères cultureux:

Thalle d'abord blanc, puis vert-bleu dans les régions conidiogènes. Revers incolore.

Observation microscopique:

Conidiophores très ramifiés, à ramifications de plus en plus courtes vers l'apex et formant de ce fait un ensemble pyramidal. Phialides par 2-4, en forme de quille, droites ou incurvées, 8-14 (20) x 2,5-3µm. Conidies globuleuses, 3,5-4,5µm granuleuses
Chlamydospores globuleuses, hyalines, atteignant 14µm de diamètre.



(d'après Rifai, 1969)

Intérêt potentiel:	Enzymes	Cellulases (exo β -1,4 glucanase, endo β -1-4 glucanase β -glucosidase, Amyloglucosidase hémicellulases pectinases (Mouranche et Costes, 1985)
	Divers	Dépollution d'eaux de traitement de Maïs (Botton et al., 1985)

Effets nuisibles:

Toxicité de la trichodermine et un antifongique, la griséofulvine (Botton et al.1985)
Croissance sur céréales, arachides, tomates, agrumes, patates douces (Botton et al.1985) fromages
Dégradation d'insecticides organochlorés et organo-phosphorés
Pathogène d'*Agaricus bisporus*

Origine des souches:

Bois de stockage et pollutions diverses
Isolement au laboratoire de Cryptogamie de l'USTLFA

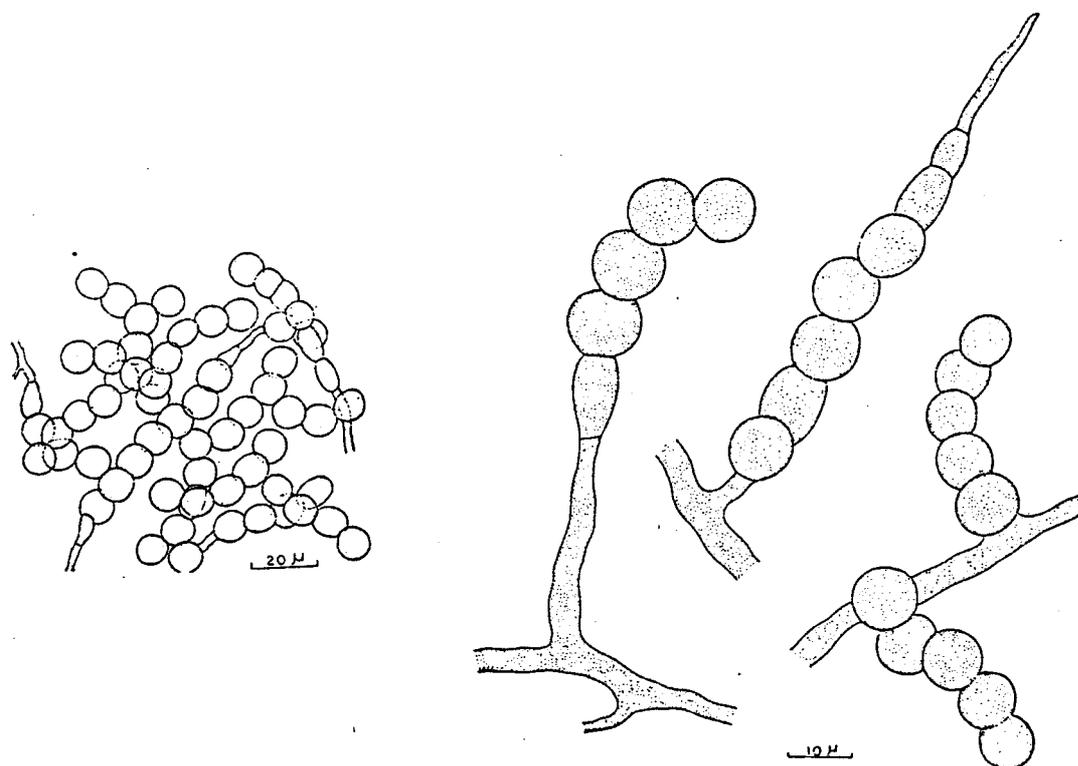
Torula thermophila

Systématique: Classe des Hyphomycètes
Sous-classe des Hyphomyceteae
Ordre des Hyphomycétales
Famille des Moniliaceae

Description:

Caractères cultureux: Conidies blanches devenant noires
Croissance 23 à 58°C (optimum 40°C)

Observation microscopique: Hyphes 2 à 5µm de diamètre
Spores brun foncé à paroi lisse, généralement globuleuse (8 à 12,5µm de diamètre) à ovale (10-12,5 x 7,5-10µm) produites en chaînes ou développées de manière intercalaire.

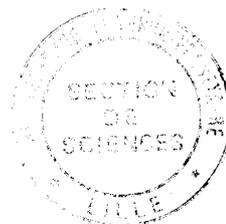


(d'après Cooney et Ermerson, 1964)

Intérêt potentiel: α-amylase (Mouranche et Costes, 1985)

Effets nuisibles: Non décrit

Origine des souches: Compost de champignonnière; fumier de canard et d'oies
litière de cheval et vache
Isolement au laboratoire de Cryptogamie de l'USTLFA



RESUME

Notre objectif consistait à substituer à l'amyloglucosidase actuellement utilisée en saccharification industrielle un enzyme à thermostabilité nettement améliorée.

Un tel enzyme permettrait d'augmenter la vitesse de réaction, la fluidité du sirop de glucose et surtout d'éviter les contaminations bactériennes possibles à 60°C, température optimale d'utilisation des amyloglucosidases usuelles. Les données bibliographiques ont orienté notre travail vers la recherche de nouvelles souches fongiques productrices.

La sélection opérée à partir d'environ 850 souches provenant de biotopes chauds ou amylacés a permis de mettre en évidence des amyloglucosidases ou alpha-glucosidases à thermostabilité nettement supérieure à celle des amyloglucosidases industrielles. Après trois étapes de sélection, le *Thermoascus crustaceus* a été choisi pour mener à bien des études plus approfondies tant génétiques qu'enzymatiques.

Une amélioration de la production d'enzyme a pu être obtenue par mutation et sélection; l'étude enzymatique a montré que le complexe amyloglucosidasique de *Th. crustaceus* était constitué d'une amyloglucosidase thermolabile et d'une alpha-glucosidase thermostable. Malheureusement, cette dernière est inhibée par des concentrations en substrat supérieures à 2,5 %, interdisant tout développement industriel.

Bénéficiant de la méthodologie mise au point avec le *Th. crustaceus*, nous avons vérifié les potentialités d'une autre souche sélectionnée lors de la première partie de l'étude mais frappée d'interdiction d'utilisation industrielle pour cause de pathogénicité potentielle. Le complexe amyloglucosidasique de celle-ci est apparu comme constitué de deux amyloglucosidases thermostables et actives aux concentrations en malto-dextrines de saccharification. La thermostabilité de ces amyloglucosidases est liée en grande partie au rôle protecteur des glycannes enrobant la protéine. Un transfert du gène codant pour l'amyloglucosidase thermostable est proposé avec ses intérêts et ses risques.

Mots-clefs

Amyloglucosidase - Alpha-glucosidase - Thermostabilité -
Saccharification - *Thermoascus* -