

N° d'ordre: 219

50376
1988
45

50376
1988
45

T H E S E

présentée à

L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE FLANDRES ARTOIS

pour l'obtention du grade de

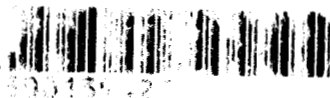
Docteur de l'Université

par



Béatrice Bâcle

*Recherches sur une amyloglucosidase
thermostable. Physiologie de la croissance
et de la production d'un complexe
enzymatique thermostable par
Thermoascus crustaceus
(Apinis et Chester)*



Soutenue le 18 Avril 1988 devant la Commission d'Examen

M. Louis LACOSTE, Président	Professeur au Muséum National d'Histoire Naturelle Paris
M. Gérard VIDAL, Rapporteur	Maître de Conférences, Université de Lille I
M. J.P. LATGE, Rapporteur	Chef de Laboratoire à l'Institut Pasteur
M. J.J. SANGLIER, Examineur	Directeur de Laboratoire à Sandoz, Bâle
M. Ph. VERNET, Examineur	Professeur à l'Université de Lille I

Je tiens à remercier Monsieur le Professeur Louis LACOSTE, Directeur du Laboratoire de Cryptogamie du Muséum National d'Histoire Naturelle de Paris, pour m'avoir accueillie dans son laboratoire et pour les conseils qu'il a su me prodiguer durant ce mémoire.

Ma reconnaissance va également à Monsieur J.J. SANGLIER, Directeur du Laboratoire de Microbiologie de SANDOZ à Bâle, pour son aide précieuse lors de l'analyse des expériences multifactorielles et les nombreuses corrections de ce mémoire.

Que Monsieur VIDAL, Maître de Conférences au Laboratoire de Cryptogamie, soit remercié pour la minutieuse correction de ce mémoire.

Monsieur LATGE, de l'Institut Pasteur de Paris, a bien voulu être rapporteur de ce travail en dernière minute. Je l'en remercie vivement.

Je tiens à remercier également Monsieur le Professeur Ph. VERNET, Directeur du Laboratoire de Génétique des Populations Végétales de Lille, d'avoir accepté de faire partie de ce jury.

Que Noëlle CHAUDORGE, technicienne du laboratoire de Cryptogamie, soit vivement remerciée pour son aide de tous les jours lors de ces expériences et de la réalisation des nombreux graphiques de cette thèse.

Je tiens à remercier vivement Michèle MAETIE, secrétaire du laboratoire pour la dactylographie de ce mémoire et pour sa gentillesse, et également Michèle DELECOURT, pour sa participation à la dactylographie de ce mémoire.

Que ma Famille reçoive toute mon affection pour son aide et son soutien de tous les jours.

Enfin, je ne saurais oublier tous ceux qui, de près ou de loin, ont contribué à l'élaboration de ce mémoire: les stagiaires, B.DEHORTER, pour son aide dans le dosage des enzymes du métabolisme intermédiaire, G.BOUDART, D.TAVERNIER et P.VANACKER.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION

<u>CHAPITRE PRELIMINAIRE</u>	1
I.- PROCESSUS INDUSTRIEL DE TRANSFORMATION DE L'AMIDON EN GLUCOSE.....	3
1.- Le substrat: L'amidon.....	3
a) Isolement.....	3
b) Composition chimique.....	3
2.- La transformation.....	5
a) La liquéfaction.....	5
b) La saccharification.....	5
Conclusion.....	6
II.- MISE EN EVIDENCE ET DOSAGE DES ENZYMES AMYLOLYTIQUES FONGIQUES.....	7
1.- Mise en évidence et dosage de l' α -amylase.....	11
a) Mise en évidence.....	11
b) Dosage.....	11
2.- Dosage de l'amyloglucosidase et de l' α -glucosidase en présence d' α -amylase.....	13
3.- Différenciation et dosage de l' α -glucosidase et de l'amyloglucosidase.....	13
III.- CHOIX D'UN TYPE DE DOSAGE.....	17
CONCLUSION.....	17

1ère PARTIE: SELECTION DE MICROORGANISMES PRODUCTEURS D'ACTIVITE
AMYLOGUCOSIDASIQUE A THERMOSTABILITE AMELIOREE

CHAPITRE I: BIBLIOGRAPHIE

I.- LES PRODUCTEURS D'AMYLOGUCOSIDASE ET D' α -GLUCOSIDASE.....	23
1.- Les bactéries.....	23
2.- Les levures.....	25
3.- Les champignons filamenteux.....	25
a) Les souches produisant une amyloglucosidase ou une α -glucosidase.....	25
b) Les souches industrielles.....	26
Conclusion.....	26
II.- THERMOSTABILITE DES ENZYMES	
1.- Définition et méthodes d'analyse.....	27
2.- Recherche de l'amélioration de la thermostabilité.....	29
a) Modification de l'enzyme.....	29
b) Modification de l'organisme producteur.....	31
c) Changement d'organismes producteur.....	33
Conclusion.....	35

CHAPITRE II: MATERIELS ET METHODES

I.- ISOLEMENT DES SOUCHES.....	39
1.- Origine des souches.....	39
2.- Isolement des souches.....	39
3.- Détermination des souches.....	40
4.- Conservation des souches.....	40
II.- CULTURE EN VUE DE LA PRODUCTION D'ENZYMES.....	40
III.- DOSAGE DES ACTIVITES ENZYMATIQUES.....	41
1.- Activité amyloglucosidasique.....	41
2.- Transglucosidase.....	41
IV.- ANOMERIE DU GLUCOSE LIBERE.....	42

CHAPITRE III: RESULTATS DE LA SELECTION

I.- ISOLEMENT DES SOUCHES ET PREMIER CRIBLE.....	45
1.- Isolement et détermination des souches étudiées.....	45
2.- Test utilisé lors du premier crible.....	46
3.- Première sélection.....	47
Conclusion.....	55
II.- DEUXIEME SELECTION.....	57
1.- Caractérisation des enzymes amyloglucosidasiques des souches sélectionnées.....	57
a) Mesure de la durée de la demi-vie des enzymes amyloglucosidasiques.....	57
b) Optimums de température et de pH.....	59
2.- Autres données biologiques concernant les souches sélectionnées.....	63
Conclusion.....	65
III.- 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>	67
a) Technique de Chiba et Coll. (1982).....	69
b) Technique de Kujawski et Coll. (1980).....	69
Conclusion.....	70
CONCLUSION DE LA SELECTION.....	70

CHAPITRE IV: LE THERMOASCUS CRUSTACEUS

I.- HISTORIQUE, POSITION SYSTEMATIQUE ET BIBLIOGRAPHIE DU GENRE THERMOASCUS.....	73
II.- THERMOASCUS CRUSTACEUS (souche P6): DESCRIPTION ET CONTRIBUTION AU DETERMINISME DES PHASES SEXUEE ET ASEXUEE.....	77
1.- Description de la souche P6.....	79
2.- Déterminisme des phases sexuée et asexuée.....	79

a) Etude préliminaire de l'effet de la température et du milieu de culture.....	80
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).....	81
Conclusion.....	83
CONCLUSION DE LA PREMIERE PARTIE.....	85

2ème PARTIE: ETUDE DES CONDITIONS CULTURALES DE LA CROISSANCE
ET DE LA PRODUCTION DU COMPLEXE AMYLOGLUCOSIDASIQUE PAR THERMOASCUS
CRUSTACEUS (souche P6).

CHAPITRE I: PRESENTATION DES DONNEES ET BIBLIOGRAPHIE DES
CONDITIONS CULTURALES DU GENRE THERMOASCUS

I.- PRESENTATION DU PROBLEME A ETUDIER.....	93
II.- LES BESOINS NUTRITIONNELS DE LA CROISSANCE ET DE LA PRODUCTION D'ENZYME PAR LE GENRE THERMOASCUS.....	95
Conclusion.....	96

CHAPITRE II: MATERIELS ET METHODES

I.- LA SOUCHE, L'INOCULUM.....	99
II.- LES MILIEUX DE PRODUCTION DE LA SOUCHE ET LES CONDITIONS DE CULTURE.....	99
III.- LES MESURES.....	100
1.- Mesure de la croissance.....	100
2.- Mesure de l'activité amyloglucosidasique et de sa thermostabilité.....	100
3.- Vérification de l'utilisation totale au glucose et de ses polymères en α -1-4 et en α -1-6 de la souche P6.....	100
4.- Mesure du taux de germination des conidies en cellule de VanThieghem.....	101
5.- Mesure de l'activité amyloglucosidasique intracellulaire.....	101

CHAPITRE III: FACTEURS BIOLOGIQUES

I.- CARACTERISTIQUES DE L'INOCULUM.....	105
1.- Age de l'inoculum.....	105
a) conditions d'étude.....	107
b) résultats.....	107
2.- Nature de l'inoculum.....	107
a) conditions d'étude.....	109
b) résultats.....	109
3.- Taux d'ensemencement.....	109
a) conditions d'étude.....	109
b) résultats.....	111
Conclusion.....	111
II.- COMPORTEMENT DU THERMOASCUS CRUSTACEUS SUR LE MILIEU DE PRODUCTION P6.....	113
1.- Cinétiques de croissance et de production enzymatique.....	113
a) croissance.....	113
b) le substrat carboné	113
c) la production du complexe amyloglucosidasique.....	113
d) cinétique du pH de la culture.....	115
Conclusion.....	115
2.- Mesure de l'activité intracellulaire.....	115
a) activité enzymatique intracellulaire du <i>Th. crustaceus</i> (P6) cultivé sur milieu P6.....	115
b) activité enzymatique intracellulaire du <i>Th. crustaceus</i> (P6) cultivé sur plusieurs sources de carbone.....	116
Conclusion.....	116
CONCLUSION.....	116

CHAPITRE IV: LES CONDITIONS PHYSICO-CHIMIQUES DE LA CROISSANCE ET DE LA PRODUCTION ENZYMATIQUE DU THERMOASCUS CRUSTACEUS (P6)

I.- LA TEMPERATURE.....	119
1.- Méthodes d'étude.....	119
2.- Résultats.....	121
a) croissance et production enzymatique.....	121

b) étude de la thermostabilité du complexe en fonction de la température de croissance du <i>Th. crustaceus</i> (P6).....	123
Conclusion.....	123
II.- ACTION DU pH INITIAL DE CULTURE	123
1.- Méthodes d'étude.....	125
2.- Résultats.....	125
CONCLUSION.....	126
<u>CHAPITRE V: LES CONDITIONS NUTRITIVES</u>	
I.- NATURE DE LA SOURCE DE CARBONE.....	129
1.- Conditions d'étude.....	131
2.- Résultats.....	131
a) croissance et production enzymatique à 45°C et par un taux d'azote de 0,32 g/l en fonction de la nature de la source de carbone.....	131
b) production enzymatique à 37°C pour un taux d'azote de 0,95 g/l en fonction de la nature du substrat carboné.....	133
3.- Discussion et conclusion sur la nature de la source de carbone.....	133
II.- NATURE DE LA SOURCE D'AZOTE.....	134
1.- Conditions d'étude.....	135
2.- Résultats.....	135
a) Production et thermostabilité du complexe amylo-glucosidasique par le <i>Th. crustaceus</i> (P6) à 45°C et avec de l'amidon de blé modifié comme source de carbone en fonction de la nature de la source d'azote.....	137
b) production et thermostabilité du complexe enzymatique par le <i>Th. crustaceus</i> (P6) à 37°C et avec du MDO ₂ comme source de carbone en fonction de la source d'azote.....	139
3.- Discussion et conclusion.....	139
III.- EFFET DES TENEURS EN CARBONE ET EN AZOTE ET DU RAPPORT C/N.....	141
1.- Méthodes d'étude.....	143
2.- Résultats.....	143

a) production du complexe enzymatique en fonction des concentrations en carbone et en azote dans le milieu de culture.....	143
b) croissance et production enzymatique en fonction du rapport C/N et des concentrations en carbone et en azote.....	145
c) croissance et production enzymatique en fonction de la quantité de glucose apporté en surplus de la source de carbone.....	147
Conclusion.....	148
CONCLUSION.....	148
 <u>CHAPITRE VI: LES AUTRES EXIGENCES CULTURALES DE LA CROISSANCE ET DE LA PRODUCTION ENZYMATIQUE DU THERMOASCUS CRUSTACEUS (souche P6)</u>	
I.- LES BESOINS EN ELEMENTS MINERAUX.....	151
1.- Méthodes d'étude.....	151
2.- Résultats.....	153
a) croissance, production du complexe enzymatique et de sa thermostabilité par <i>Th. crustaceus</i> en fonction de carence minérale.....	153
b) production du complexe enzymatique et sa thermostabilité en fonction de quelques carences minérales...	155
c) vérification de l'effet du phosphate sur la production du complexe enzymatique et sur sa thermostabilité.....	159
Conclusion.....	159
II.- LES BESOINS EN VITAMINES DE THERMOASCUS CRUSTACEUS (P6).....	161
1.- Méthodes d'étude.....	161
2.- Résultats.....	163
CONCLUSION.....	163
CONCLUSION DE LA 2ème PARTIE.....	165

3^{ème} PARTIE: RECHERCHE DES CONDITIONS OPTIMALES DE LA PRODUCTION
AMYLOGLYCOSIDASIQUE A THERMOSTABILITE AMELIOREE PAR TH.CRUSTACEUS EN
SYSTEME AGITE, PAR L'APPLICATION DE MODELES MULTIFACTORIELS

CHAPITRE I: BIBLIOGRAPHIE DES DIFFERENTES METHODES MULTIFACTORIELLES
ET PRESENTATION DU PROBLEME A ETUDIER

I.- BIBLIOGRAPHIE.....	173
1.- Les méthodes de recherche directe.....	173
2.- Méthodes permettant l'établissement d'un modèle mathématique.....	175
II.- PRESENTATION DES DONNEES ET DU PROBLEME, EXPERIENCES PRELIMINAIRES.....	177
1.- Détermination du problème à étudier.....	177
2.- Détermination des réponses à étudier.....	178
3.- Choix du ou des modèles multifactoriels.....	179
4.- Détermination de la signification des résultats.....	179

CHAPITRE II: MATERIEL ET METHODES

I.- MATERIEL.....	183
II.- METHODES.....	183
1.- L'inoculum.....	183
2.- Mesures.....	183
3.- Calcul statistique.....	183
4.- Les matrices d'Hadamard (Plackett-Burman, 1943).....	183
5.- Les plans factoriels complets à 2 niveaux.....	184
6.- Plan centré composé.....	185

CHAPITRE III: PREMIERE APPROCHE DU PROBLEME PAR L'ETUDE DE FACTEURS
GRACE A L'UTILISATION DE MATRICES D'HADAMARD

I.- PREMIERE MATRICE D'HADAMARD.....	189
1.- Effet de la concentration en azote apporté sous forme de NH ₄ NO ₃ (variation linéuse du rapport C/N).....	193
2.- Effet de la vitesse d'agitation.....	193

3.- Effet du taux de KH_2PO_4	193
4.- Effet du taux de $\text{MgSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$	194
5.- Effet du taux de $\text{Ca} (\text{H}_2\text{PO}_4)_2, 2\text{H}_2\text{O}$	194
6.- Effet du taux de $\text{CuSO}_4, 5\text{H}_2\text{O}$	194
7.- Effet du taux de $\text{ZnSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$	194
8.- Effet de $\text{FeSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$ chélaté par de l'EDTA.....	195
9.- Effet de l'apport de $\text{MnSO}_4, \text{H}_2\text{O}$	195
10.- Effet de l'apport de vitamines.....	195
11.- Effet du pH.....	195
II.- DEUXIEME MATRICE D'HADAMARD.....	196
1.- Effet de la nature de la source d'azote.....	200
2.- Effet du taux d'azote fourni.....	200
3.- Effet de la vitesse d'agitation.....	200
4.- Effet du taux de KH_2PO_4	201
5.- Effet de l'apport de $\text{MgSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$	201
6.- Effet de l'apport de CaCl_2	201
7.- Effet du taux de $\text{CuSO}_4, 5\text{H}_2\text{O}$	201
8.- Effet du taux de $\text{ZnSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$	202
9.- Effet du taux de $\text{MnSO}_4, \text{H}_2\text{O}$	202
10.- Effet de l'apport en biotine et en thiamine.....	202
11.- Effet du pH.....	202
III.- DISCUSSION.....	202
1.- Choix d'une source d'azote.....	202
2.- Etude du taux d'azote.....	203
3.- Effet de la vitesse d'agitation des cultures.....	203
4.- Effet du taux de KH_2PO_4	204
5.- Effet du taux de $\text{MgSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$	204

6.- Effet du calcium.....	204
7.- Effet du $\text{CuSO}_4, 5\text{H}_2\text{O}$	205
8.- Effet du $\text{ZnSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$	205
9.- Effet du $\text{FeSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$	205
10.- Effet du $\text{MnSO}_4, \text{H}_2\text{O}$	206
11.- Effet de la biotine et de la thiamine.....	206
12.- Effet du pH.....	206
CONCLUSION.....	207

CHAPITRE IV: PLAN FACTORIEL COMPLET 2⁴

I.- EFFET DE LA CONCENTRATION EN AZOTE.....	211
II.- EFFET DE LA CONCENTRATION EN KH_2PO_4	211
III.- EFFET DES TENEURS EN BIOTINE ET EN THIAMINE.....	214
IV.- EFFET DE LA VITESSE D'AGITATION DES FIOLES DE CULTURE.....	214
V.- ADEQUATION AUX MODELES.....	215
CONCLUSION.....	215

CHAPITRE V: PLAN CENTRE COMPOSE

I.- LES MODELES QUADRATIQUES.....	219
II.- LA POSITION DES EXTREMUMS (OU NIVEAUX OPTIMAUX DES FACTEURS POUR CHAQUE REPONSE).....	222
III.- REPRESENTATION GRAPHIQUES.....	223
1.- Les courbes d'isoréponses.....	223
2.- Les courbes individuelles centrées.....	227
IV.- DISCUSSION ET CONCLUSION DU PLAN CENTRE COMPOSE.....	229

CHAPITRE VI: ETUDES COMPARATIVES DES MILIEUX OPTIMISES ET
DISCUSSION

I.- CINETIQUES DE PRODUCTIONS ENZYMATIQUES PAR LA SOUCHE P6 DU <i>THERMOASCUS CRUSTACEUS</i>	233
1.- Aspect des cultures.....	233
2.- Croissance pondérale, évolution du pH et de la teneur en glucose.....	235
3.- Production du complexe enzymatique.....	235
Conclusion.....	235
II.- RECAPITULATION DE L'EVOLUTION DE LA REPOSE Y ₃ DANS CETTE ETUDE MULTIFACTORIELLE.....	235
III.- COMPARAISON ET DISCUSSION DES CONSTITUANTS DE MILIEU P6 ET DU MILIEU OPTIMISE.....	237
1.- Nature de la source d'azote.....	237
2.- La teneur en azote dans le milieu de culture.....	237
3.- La teneur en KH ₂ PO ₄	237
4.- Présence et teneur en biotine et thiamine.....	239
IV.- EFFET DE LA NATURE DE LA SOURCE D'AZOTE.....	239
1.- Conditions d'étude.....	239
2.- Résultats.....	239
V.- MESURE DES ACTIVITES ISOCITRATE LYASE ET ISOCITRATE DESHYDROGENASE DU METABOLISME INTERMEDIAIRE DE <i>THERMOASCUS CRUSTACEUS</i>	241
1.- Méthode d'étude.....	241
2.- Résultats.....	243
CONCLUSION.....	243
CONCLUSION GENERALE.....	245
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	249
BIBLIOGRAPHIE.....	267
ANNEXE	

INTRODUCTION GENERALE

Les enzymes d'extraction, des cellules animales et végétales, sont de moins en moins utilisés et sont remplacés par les enzymes de fermentation, synthétisés par les microorganismes. En effet le potentiel génétique de ceux ci permet d'envisager de nombreuses nouvelles applications.

Cependant un discordance existe entre ce potentiel génétique et le petit nombre d'enzymes réellement exploités industriellement, de l'ordre d'une trentaine. Ceci s'explique par le décalage important entre les productions de laboratoire et les contraintes industrielles. De plus, la nécessité pour toute souche microbienne de satisfaire à un contrôle d'autorisation très sévère est indispensable.

Néanmoins le développement industriel amène une demande de plus en plus importante d'enzymes à caractéristiques originales adaptées aux nouveaux procédés biotechnologiques. C'est dans cette optique que la société ROQUETTE FRERES (Lestrem), en association avec un projet MIR, a confié au laboratoire de Cryptogamie de l'Université de Lille Flandres Artois, sous la direction de Monsieur Lacoste, la recherche d'une souche fongique productrice d'un enzyme extracellulaire thermostable dégradant les liaisons α -1,4 des maltodextrines en glucose, lors de la saccharification de l'amidon.

Cette recherche, dans un premier temps, a consisté à isoler de biotopes chauds des souches fongiques aptes à dégrader l'amidon à température élevée. Après un vaste screening une espèce à activité enzymatique particulièrement thermostable a été retenue: le *Thermoascus crustaceus*. Nous avons ensuite entrepris une étude physiologique du développement mycélien et de la production enzymatique de ce champignon. En effet la connaissance très précise de la physiologie d'une souche microbienne est indispensable pour obtenir une production maximale et avant d'envisager une étude métabolique de la production enzymatique, une étude génétique et une adaptation au niveau industriel.

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

FIGURE 1: Localisation des traitements enzymatiques dans les chaînes d'ensemble d'amidonnerie-glucoserie de maïs et de blé. d'après Segard (1985).

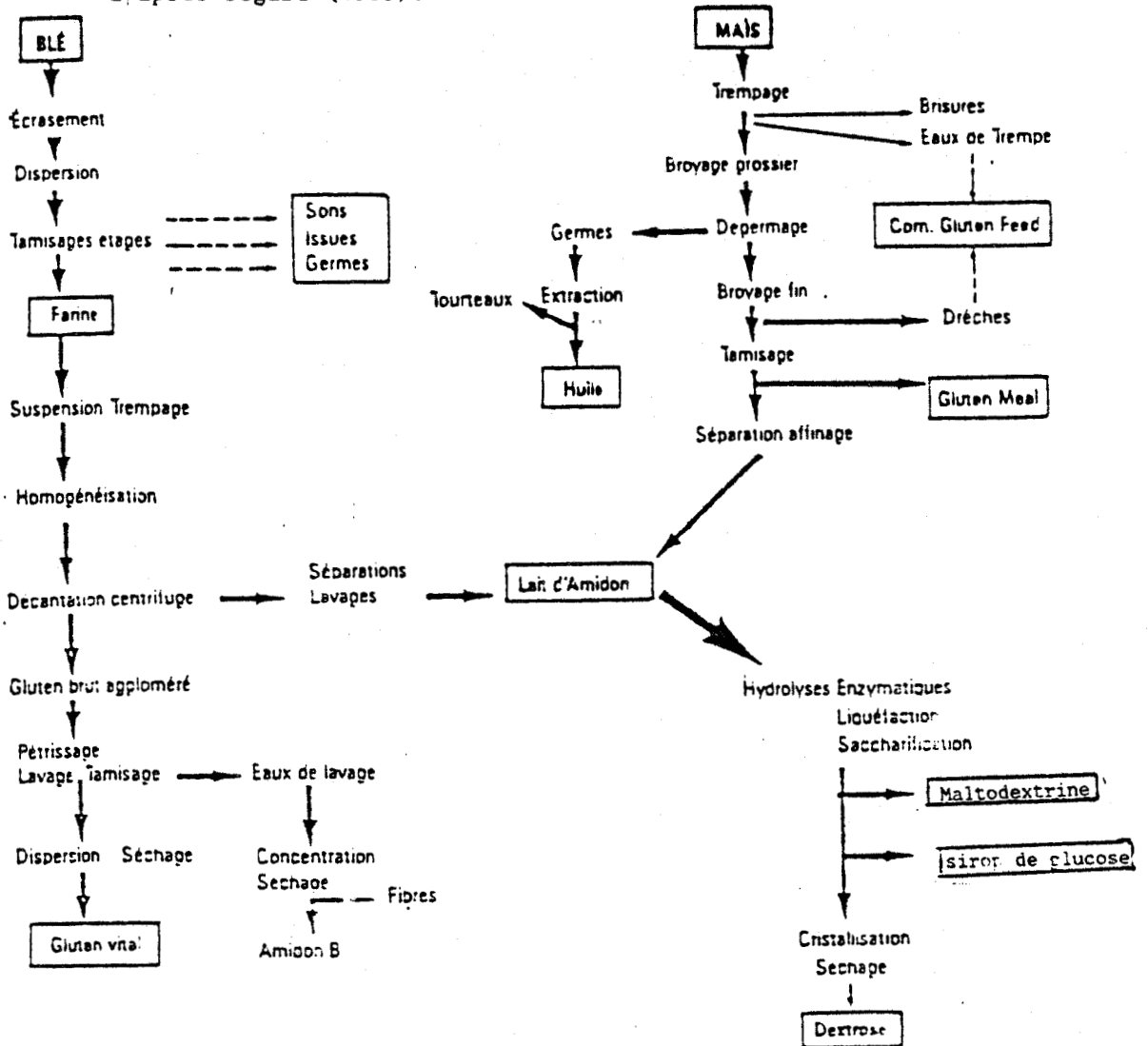


Tableau 1 : Composition non glucidique et teneur en amylose de différents amidons (résultats exprimés p.100 d'amidon sec)

AMIDON	PROTEINES (N x 6,25)	LIPIDES	CENDRES	P	AMYLOSE
CEREALES					
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

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 microorganisme 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

1.- 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.

a) 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 SO_2 , 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.

b) Composition chimique

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.

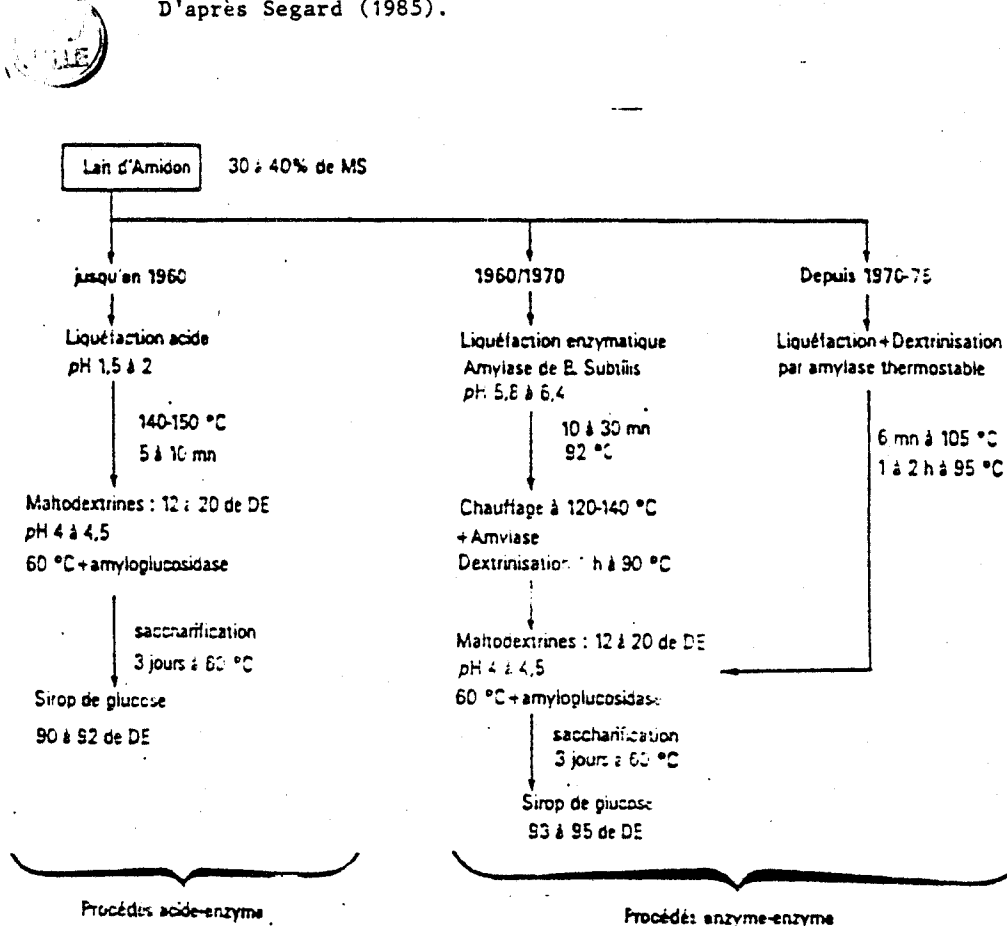
L'amidon est un polymère de D-anhydro glucose. Les unités D-anhydro glucose sont reliées entre elles par des liaisons $\alpha 1,4$ et 4 à 5 % de liaisons $\alpha 1,6$. Le grain d'amidon est constitué d'au moins trois types de composants glucidiques : l'amylose, macromolécule linéaire, l'amylopectine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

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

	AMYLOSE	AMYLOPECTINE
STRUCTURE GENERALE	Enchainement linéaire de motifs D-anhydroglucose au moyen de liaisons Alpha-1,4	Structure branchée où des fragements constitués d'enchainements 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 -amylolyse	68 à 78 %	57 à 58 %
Longueur moyenne des enchainements 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

FIGURE 2: Historique des procédés enzymatiques de glucoserie.
D'après Segard (1985).



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).

2.- La transformation

a) 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 désorganisation 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.

b) 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 transglucosidasiq (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*.

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.

FIGURE 3: Sites d'action des différentes amylases sur la molécule d'amylopectine.

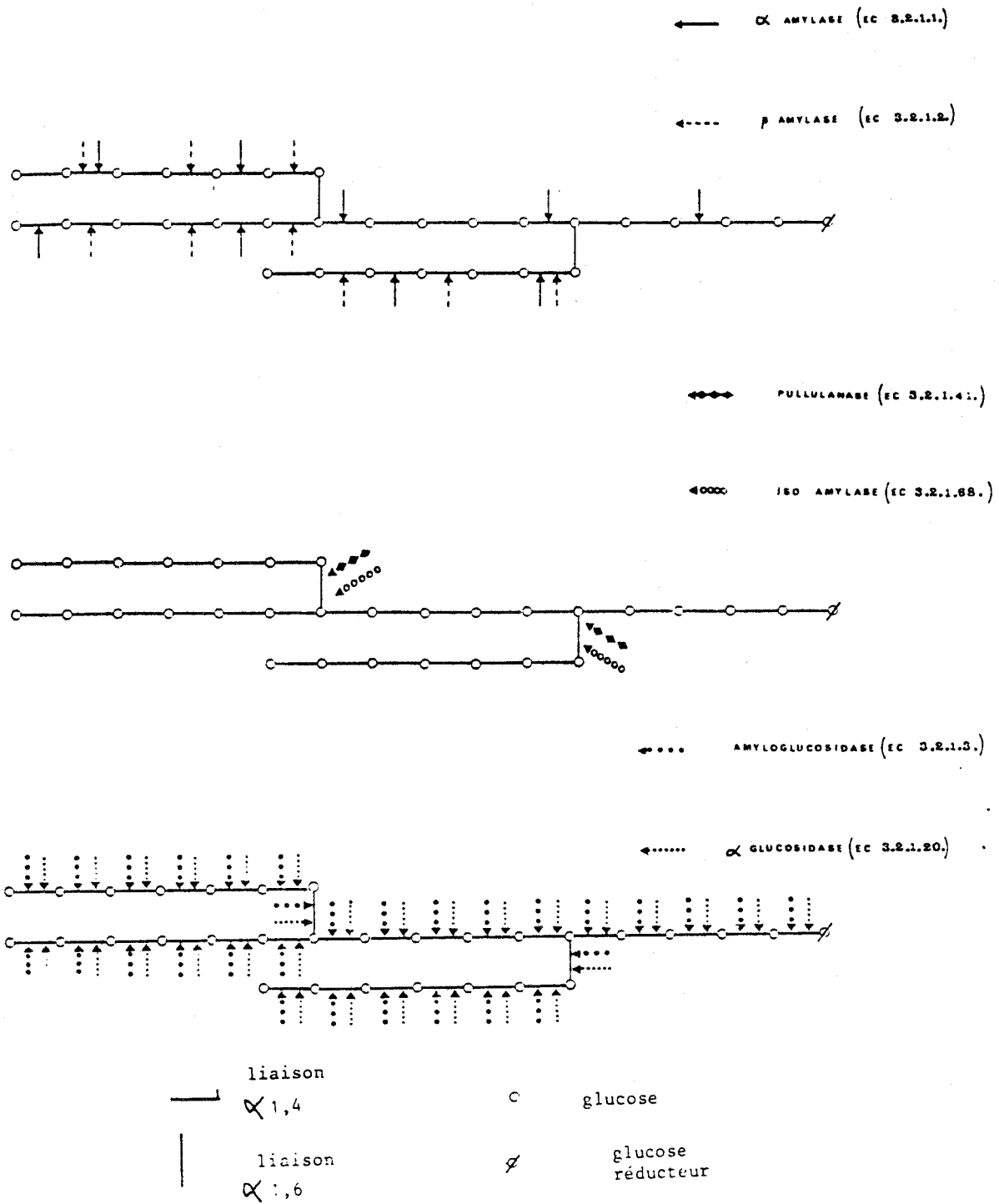


TABLEAU 3: Principaux enzymes intervenant dans la dégradation de l'amidon.

Enzymes	Nomenclature	liaisons hydrolysées	substrats hydrolysés	substrats limite	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
Isoamylase	EC 3.2.1.2.	α -1,4	Amylose, amylopectine	maltotétraose (2)	maltose sous configuration, Dextrines limites
Pullulanase	EC 3.2.1.41	α -1,6	Pullulan, (3) amylopectine	maltosyl-maltose (4)	maltotriose (pullulan), Dextrines débranchées (amylopectine)
α -Amylase	EC 3.2.1.68.	α -1,6	Amylopectine, glycogène	maltosyl-maltotriose (5)	maltotriose Dextrine débranchées (amylopectine)
Amyloglucosidase	EC 3.2.1.3.	α -1,4 α -1,6	amylose, amylopectine	maltose	glucose sous configuration
α -Glucosidase	EC 3.2.1.20.	α -1,4 α -1,6	Oligosaccharides	maltose	glucose sous configuration
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

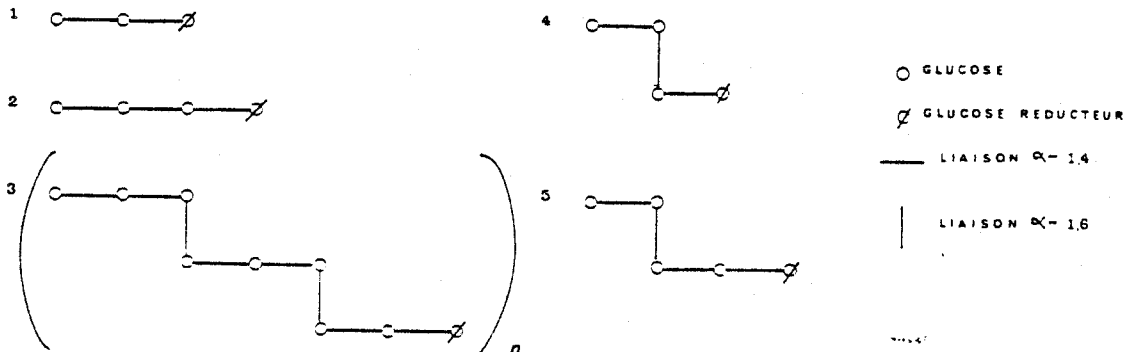


TABLEAU 4: Conditions de dosage des trois enzymes amyliques principaux.

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

FIGURE 4: Evolution de la coloration à l'iode en fonction de l'apparition des sucres réducteurs provenant de l'action d'une endoamylase ou d'une exoamylase.
D'après Fairbain et collaborateurs (1986).

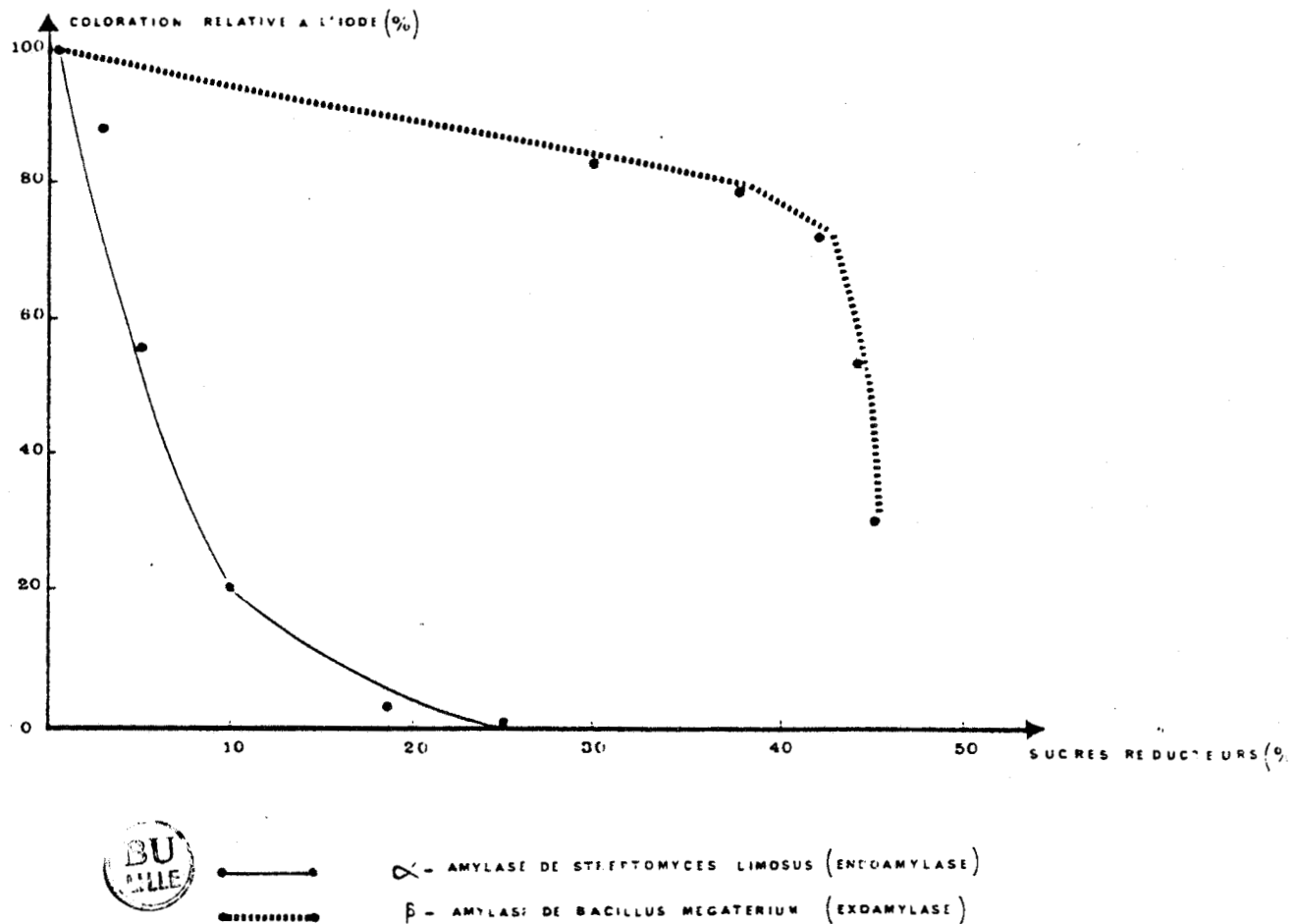


Tableau 5: Evolution de la teneur en sucres réducteurs (S.R), du degré d'hydrolyse (D.H), du glucose (Glc) et du rapport S.R/Glc chez *Piricularia oryzae*, *A. niger* et une préparation commerciale d'amyloglucosidase (Glc SB).

	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
Glc SB (Amyloglucosidase et α -amylase)	15	15	37	6	2.50
	30	20	51	15	1.33
	60	26	65	22	1.19

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.

1.- Mise en évidence 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.

a) 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.

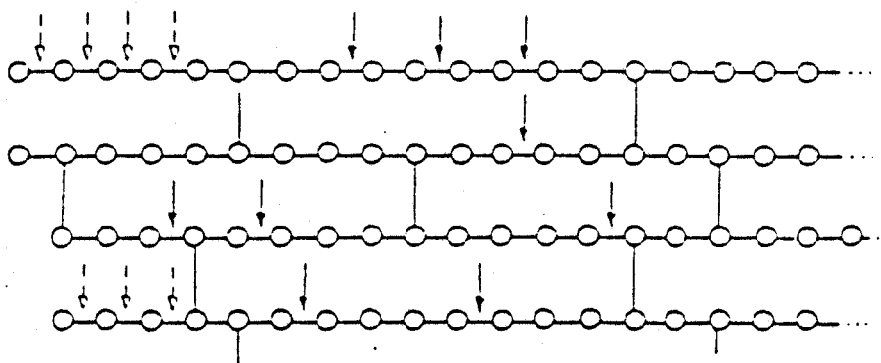
Si ces techniques ne permettent pas un dosage de l'activité α -amylasique, elles n'en autorisent pas moins une mise en évidence aisée.

b) 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.

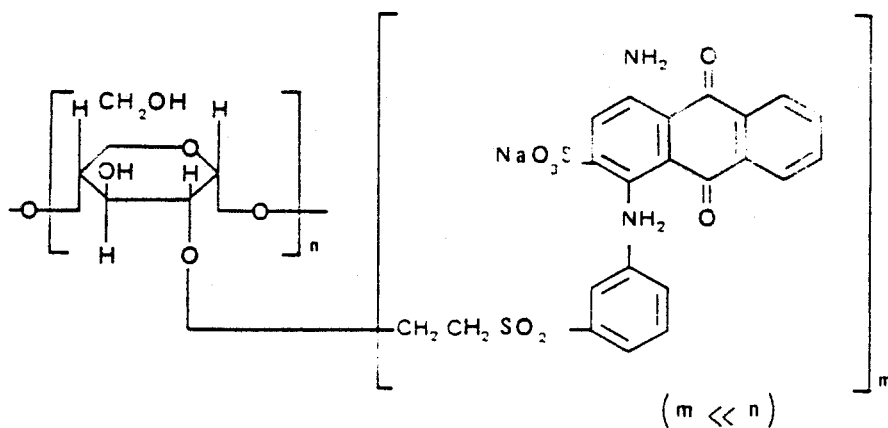
Les deux autres techniques font appel soit à un amylose oxydé à l'aide de métaperiodate de sodium (Marshall, 1978), soit à l'amylose azure dans lequel le Rémazol brillant blue R se greffe sur chaque résidu glucose (figure 6, Rinderknecht et al., 1967). Depuis la publication de H. Rinderknecht et collaborateurs (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

FIGURE 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 collaborateurs (1980)



$\text{O} \text{---} \text{O}$ = résidus glucose reliés par des liaisons α -1,4
 --- = pont glycérique interchaîne
 --- = action de l' α -amylase
 - - - = action de l'amyloglucosidase

FIGURE 6: Représentation de l'amylose azure.



(Fogarty et Kelly, 1979).

2.- Dosage de l'amyloglucosidase et de l' α -glucosidase en présence 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 M. Fugi et Y. 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.

3.- Différenciation et dosage de l' α -glucosidase et de l'amyloglucosidase.

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 M. Kujawski et M. Wegrzyn (1980), en utilisant un substrat combiné amidon soluble-maltose (10 %, 0,5 %) et en déduisant de l'activité présentée 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 Y. Yamasaki et Y. Suzuki (1980) (tableau 6).

C. Kueck et D.K. 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, 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.

Tableau 6 : Hydrolyse de l'amidon soluble et produits de transfert du maltose par les α -glucosidases fongiques (Y. Yamasaki et Y. 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

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 (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 C.P. 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 J.H. Pazur et K. Kleppe (1962), 0,05 % pour celle décrite par W.M. Fogarty et C.P. Benson (1983), absence de dégradation pour celles décrites par S. Medda et collaborateurs (1982). Parmi les α -glucosidases seule celle d'*A. oryzae* est citée comme dégradant le méthyl α -D-glucoside (Kelly et Fogarty, 1983), bien que certains 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 (amyloglucosidase, α -glucosidase, transglucosidase) à catalyser des réactions de réversion (dans certaines conditions pour l'amyloglucosidase) ne facilite pas le problème. S. 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).

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 Y.

TABEAU 7: Différentiation 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 = 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



Yamasaki et Y. 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 FRERES et de composition suivante :

- polysaccharides 95-97 %
- maltose 2 - 3 %
- glucose 1 - 1,5%

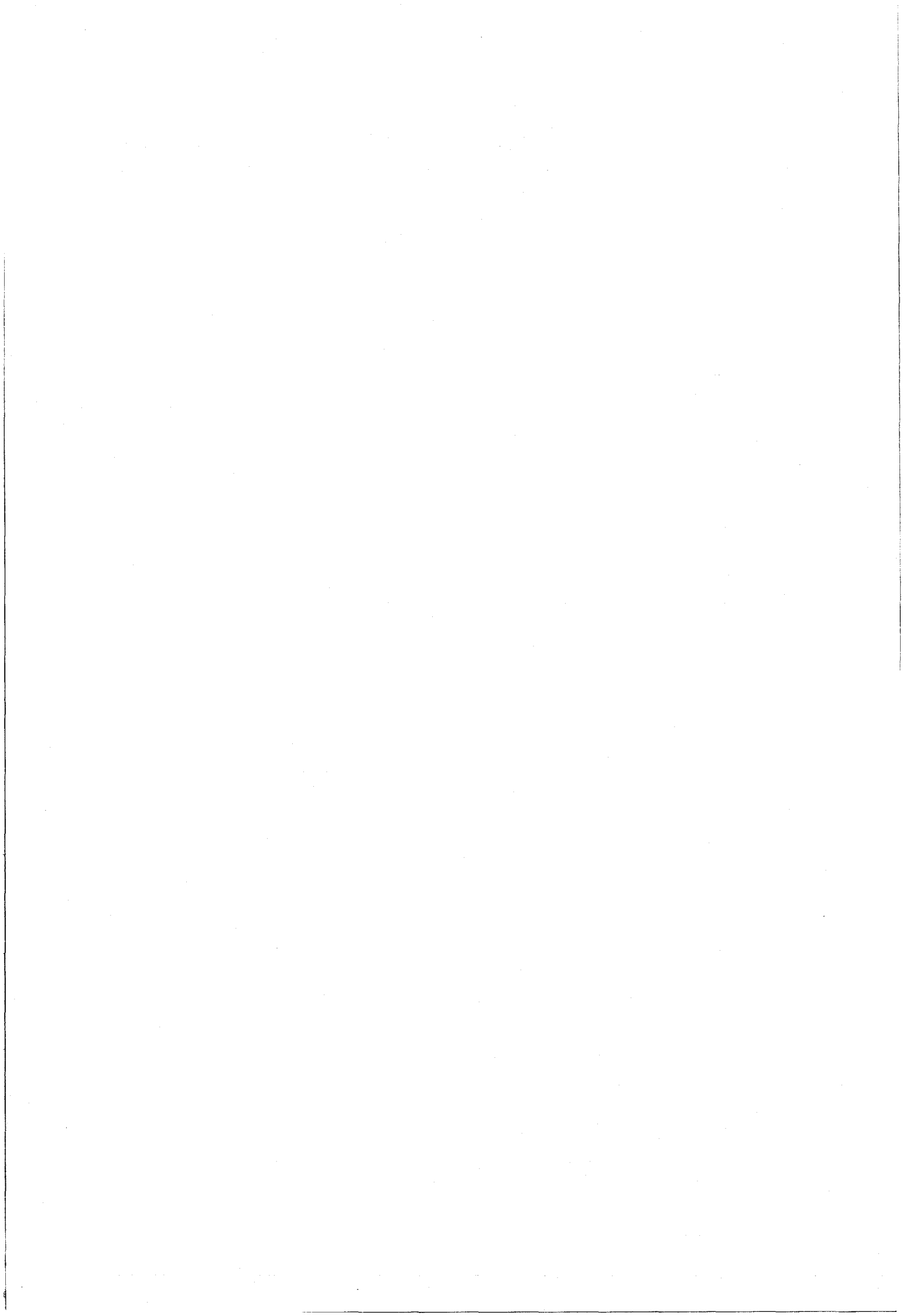
Masse moléculaire moyenne : 2700

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 que nous utiliseront comme substrat. Le produit de réaction de l'amyloglucosidase, le glucose, constituera le produit dosé.

CONCLUSION

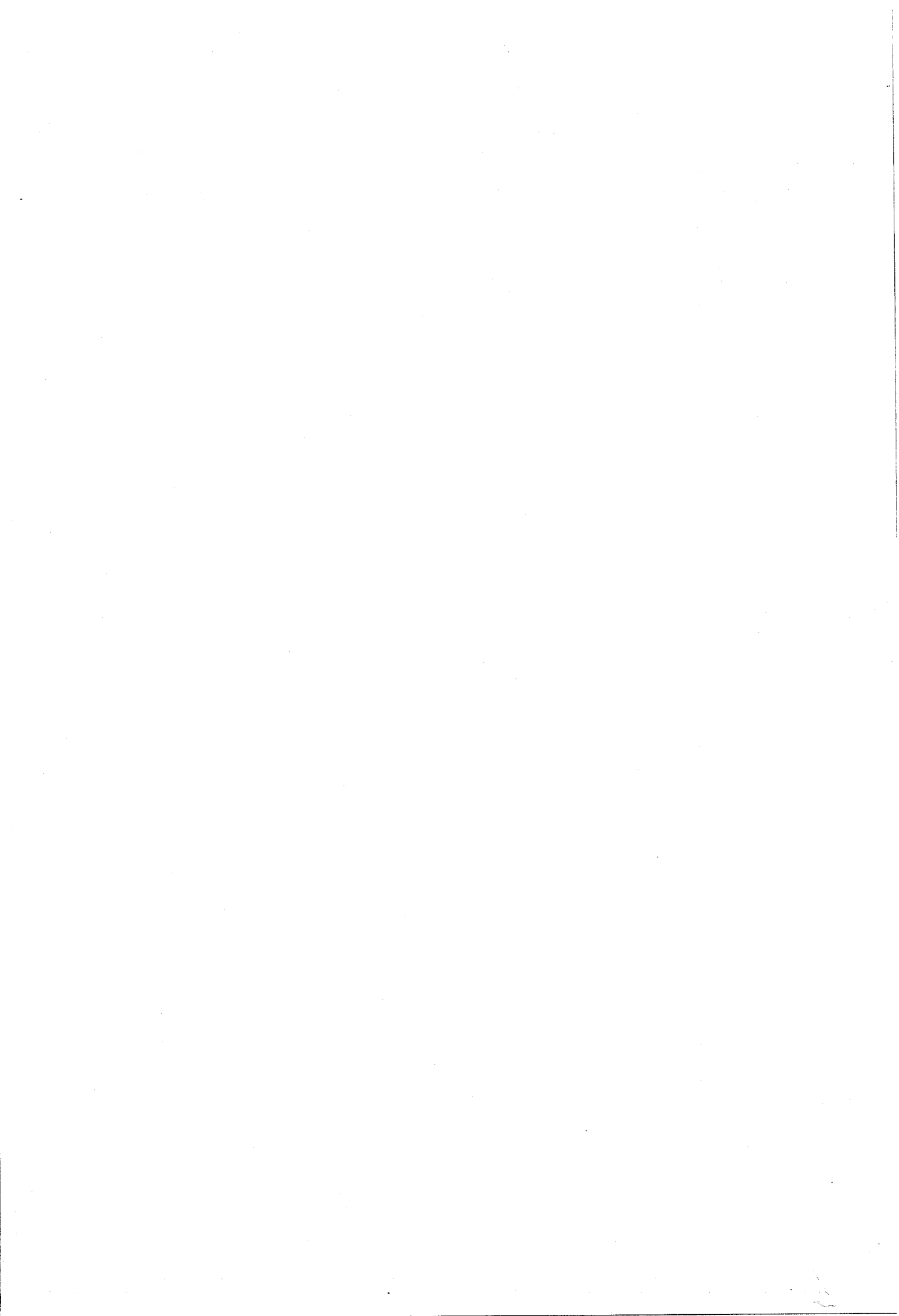
Le processus de saccharification demande à l'enzyme utilisé d'hydrolyser en glucose une maltodextrine issue de l'étape de liquéfaction. Les dosages courants pratiqués sur les amylases sont parfois imprécis, néanmoins certains artifices permettent dans certains cas de différencier les diverses activités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



1ère PARTIE

SELECTION DE MICROORGANISMES PRODUCTEURS
D'ACTIVITE AMYLOGUCOSIDASE A
THERMOSTABILITE AMELIOREE



CHAPITRE I

BIBLIOGRAPHIE

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 stearotherophilus	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	diastolicus	HOPKINS et KULKA (1957)*
	Fichia	burtoni	SILLS et STEWART (1982)
	Schwannomyces	alluvius	DE MOT et al (1986b)
	Schwannomyces	castelli	DE MOT et al (1986b)
	Schwannomyces	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	homilentoma	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 (1985a)
CHAMPIGNONS FILAMENTEUX			
ZYCOMYCOTINA			
Classe des Zygomycètes	Mucor	niehei	MANGALLAN et al (1977)
Ordre des Mucorales	Mucor	rouxianus	YAMASAKI et al (1977b)*
Famille des Mucoraceae	Rhizopus	amagasakiensis	TAKAYA et al (1982)*
	Rhizopus	delemar	HAMAIZU et al (1965)*
	Rhizopus	javanicus	WATANABE et FURIMBARA (1973)*
	Rhizopus	niveus	OHNISHI et HIRONI (1978)*
	Rhizopus	nodosus	MUTHUKUMARAN et DHAR (1983)
	Rhizopus	pygmaeus	GRIGOROV et al (1983)
ASCOMYCOTINA			
Classe des Pyrenomycètes	Hypocrea	peltata	OKADA (1983)
Ordre des Hypocreales	Neurospora	crassa	MURUYAMA et ISHIKAWA (1973)*
Famille des Hypocreaceae	Neurospora	sitohila	FOGARTY et DIXON (non publié)*
Classe des Plectomycètes	Talaromyces	thermophilus=dupontii	Brevet belge 878-466 (1979)
Ordre des Eurotiales	Monascus	rubiginosus (Sato)	SHOUJUN et al (1984)
Famille des Eurotiaceae	Aspergillus groupe niger		
	Aspergillus	awamori	WATANABE et FURIMBARA (1965)*
	Aspergillus	cinnamomeus	KURUSHINA (1974)*
	Aspergillus	foetidus	BODE (1968)*
	Aspergillus	proencticus	LINEBACH et BAUMANN (1970)*
	Aspergillus	saitoi	TAKAHASHI et al (1981)*
	Aspergillus	niger	FAZU et BOD (1960)*
	autres Aspergillus		
	Aspergillus	catatae	BENDETSKI et al (1974)*
	Aspergillus	candidus v. aureus	IYER (1973)*
	Aspergillus	cravatus	VOITKOVA-LEPESHKOVA et al (1974)*
	Aspergillus	crvace	MORITA et al (1960)*
Classe des Hyphomycètes	Aureobasidium	collulans	FEDERICI et BHELIA (1983)
Ordre des Hyphomycetales	Cephalosporium	craticola Lindau	KRZECHOWSKI et BREWER (1975)*
Famille des Moniliaceae	Cephalosporium	eichorniae	DAY (1978)*
	Chalara	paradoxa	MONNAH et al (1987)
	Dactylius	denroides	NEBRAG et al (1981)
	Humicola	lanuginosa	TAYLOR et al (1979)
	Faecilomyces	varioidis	TAKEDA (1985)
	Faecilomyces	subglobosus	KIM (1977)*
	Penicillium	expansum	SREEKANTIAH et al (1973)
	Penicillium	oxalicum	YAMASAKI et al (1977)*
	Pyricularia	oryzae	YUKI et al (1977)*
	Sporotrichum	thermophile	MANGALLAN et al (1977)
	Torula	thermophila	SUBRAMANIAM et al (1977)
	Trichosporon	viride	SCHILLART et al (1976)*
BASIDIOMYCOTINA			
Classe des Téléomycètes	Filobasidium	capsuligenum	DE MOT et VERARCHTERT (1985c)**
Ordre des Ustilaginales			
Famille des Filobasidiaceae	Schizophyllum	commune	SCHWALE et JANSONS (1973)
Classe des Hyménomycètes	Gondionophora	cerebella	KINE (1971)*
Ordre des Aphyllophorales			
Famille des Schizophyllaceae			
Famille des Gondionophoraceae			

* références citées par FOGARTY et KELLY (1980).

** champignon cité comme levure par les auteurs.



I. - 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 cité les différents producteurs d'amyloglucosidase ou d' α -glucosidase décrits par les auteurs sans tenir compte de l'anomérisation du glucose produit.

Il faut noter que ces deux enzymes sont produits par de nombreux microorganismes (tableaux 8 et 9) et en général en association avec d'autres amylases.

1. - Les bactéries

L'amyloglucosidase est principalement décrite chez les champignons filamenteux. Néanmoins, quelques bactéries la synthétisent également (tableau 8). Le *Clostridium thermoamyloticum* (Brevet Européen n°135-138, 1984) produit une amyloglucosidase à température optimale d'activité comprise entre 70°C et 75°C et de pH voisin de 5. Le *C. thermohydro-sulfuricum* (Hyun et Zeikus, 1985b) 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°C en présence de 1,4 M NaCl et à 75°C 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 est par contre produite par de nombreuses bactéries (tableau 9). Les principaux producteurs sont 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* (Kelly et Fogarty, 1983). La 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 Fogarty, 1983). Les températures optimales d'activité se situent entre 35°C (*B. brevis*; Mc Wethy et Hartman, 1979) et 75°C (*B. thermoglucosidius*; (Kelly et Fogarty,

TABEAU 9: Microorganismes cités comme produisant au moins une α -glucosidase. Tableau de Kelly et Fogarty (1983).

CLASSIFICATION	GENRE	ESPECE	REFERENCES
BACTERIES			
Classe des Schizomycètes	Bacillus	amylolyticus	URLAUB et WOBER (1978)*
Famille des Bacillaceae	Bacillus	brevis	KELLY et al (1980)*
	Bacillus	cereus	MC WETHY et HARTMAN (1979)*
	Bacillus	caldovelox	YAMASAKI et SUZUKI (1974)
	Bacillus	subtilis	GIBLIN et al (1987)
	Bacillus	thermooglucosidius	WANG et HARTMAN (1976)*
	Bacillus	licheniformis	SUZUKI et al (1976)*
	Clostridium	acetobutylicum	KELLY et al (1986)
Famille des Lactobacillaceae	Lactobacillus	acidophilus	LI et CHANG (1979)*
	Streptococcus	mitis	SUND et al (1978)*
	Streptococcus	pyogenes	DOOLIN et FANOS (1969)*
Famille des Pseudomonadaceae	Pseudomonas	amyloclavata	AMEMURA et al (1974)*
	Pseudomonas	fluorescens	GUFFANDI et CORPE (1976)*
Famille des Streptomycetaceae	Streptomyces	hygroscopicus	GRAF et al (1986)
	Streptomyces	venezuelae	CHAFERJRE et VINING (1981)*
	Myxobacter	sp	GUNTERMAN et al (1975)*
LEVURES			
ASCOMYCOTINA			
Classe des Hemiascomycètes Ordre des Endomycétales Famille des Endomycetaceae	Schizosaccharomyces	pombe	CHIBA et SHIMOMURA (1965)
	Saccharomyces	carlsbergensis	OUWEHAND et VAN WIJK (1972)*
	Saccharomyces	cerevisiae	KHAN et EATON (1967)*
	Saccharomyces	italicus	HALVORSON ET ELLIAB (1958)*
	Saccharomyces	logos	CHIBA et al (1973)
	Saccharomyces	oviformis	LAI et AXELROD (1974)*
	Lipomyces	starkei	KELLY et al (1985)
Classe des Blastomycètes Ordre des Cryptococcales Famille des Cryptococcaceae	Candida	tropicalis	HEHRE et al (1977)*
CHAMPIGNONS FILAMENTEUX			
ZYCOMYCOTINA			
Classe des Zygomycètes Ordre des Mucorales Famille des Mucoraceae	Mucor	javanicus	YAMASAKI et al (1973a,b)*
	Mucor	racemosus	YAMASAKI et al (1977)
	Mucor	rouxii	FLORES-CARREON et al (1972)*
ASCOMYCOTINA			
Classe des Plectomycètes Ordre des Eurotiales Famille des Thermoascaceae	Thermoascus	aurantiacus	OBERT (1980-1981)
Classe des Hyphomycètes Ordre des Hyphomycétales Famille des Monilaceae	Aspergillus	awamori	YAMASAKI et al (1977a)*
	Aspergillus	batatae	BENDETSKI (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)
	Paecilomyces	varicosus	REESE et al (1968)

* references citées par KELLY et FOGARTY (1983).

1983) les α -glucosidases bactériennes se révélant en général peu thermostables exceptions faites de *B.thermoglucozidius* (Kelly et Fogarty, 1983) 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). Habituellement, le *Saccharomyces diastaticus* est différencié de *S.cerevisiae* par son amyloglucosidase (Searle et Tubb, 1981; Tucker et al., 1985; Pretorius et al., 1986). 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). 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 8; De Mot et al., 1984, 1985a, 1985b, 1985c, 1986a, 1986b). Aucune des amyloglucosidases présentées dans le tableau ne possède une activité thermostable, la plage de température optimale se situant entre 45°C et 60°C 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 Ellias,, 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°C et à pH 3,5. Un *Humicola lanuginosa* (Taylor 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 est 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 possède, 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°C et 55°C (Fogarty et Kelly, 1983), l' α -glucosidase d'*Aspergillus flavus* possédant une température optimale d'activité exceptionnellement faible: 35°C, (Olutiola, 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*) et les *Aspergillus* du groupe *oryzae* (tableaux 8 et 9) 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* sont, quant à eux, utilisés dans les pays d'Extrême Orient.

Une bibliographie imposante a été écrite sur les 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 -amylases, hémicellulases, lipases, glucose-oxydases, pectinases, β -glucanases pour *A. niger*) et sont donc abondamment étudiés.

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 été sujets au remplacement, actuellement.

En résumé, deux points peuvent être soulignés :

- tout d'abord, la disproportion entre le nombre imposant de souches de champignons filamenteux faiblement productrices d'amyloglucosidase et d' α -glucosidase et les quelques espèces des groupes *niger* et *oryzae* et les *Rhizopus* connues comme hyperproductrices.
- ensuite, 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. L' α glucosidase intracellulaire du *Thermoascus aurantiacus* (Obert, 1980-1981) possède un optimum d'activité à 75°C.

II.- THERMOSTABILITE DES ENZYMES

1.- Définition et méthodes d'analyse

H.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 $\Delta pH / \Delta T$
- le suivi de la cinétique de dénaturation de la protéine par dichroïsme circulaire,
- la méthode de mesure de la taille de la molécule par la dispersion de la lumière,
- le suivi des changements du microenvironnement des résidus tryptophane en fluorescence.

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 retenu notre attention.

Certains auteurs préfèrent utiliser l'optimum de température d'activité enzymatique comme critère de thermostabilité bien qu'il s'agisse d'un paramètre de cinétique enzymatique déterminé à partir de vitesses de réaction. Pour R.Singleton et R.E. Amlunxen (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 amylo-



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

	Température optimale d'activité	Thermostabilité	Durée et pH	Références
AMYLOGLUCOSIDASE (EC.3.2.1.3.)				
<i>Clostridium thermohydrosulfuricum</i>	75°	65°	60mn pH 5	Hyun et Zeikus (1985a)
<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 Benson (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 Ueda (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 Suzuki (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.

glucosidases 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 ici correspond à la température autorisant la conservation de 100 % d'activité de l'enzyme après incubation pendant une certaine durée (variable selon les auteurs) en l'absence de substrat.

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 Fiechter, 1986), l' α -amylase de *Clostridium thermosulfurogenes* (Hyun et Zeikus, 1985b), l' 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 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 cite des techniques en vue de l'amélioration de la thermostabilité uniquement pour l'amyloglucosidase. Peu d'informations ont été obtenues pour l' α -glucosidase.

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 des conditions de culture (température, milieu) n'apparaît pas non plus comme généralisable.

* modification chimique de l'enzyme

L'amélioration chimique de la thermostabilité d'un enzyme peut être expliqué par:

-l'effet protecteur du substrat sur l'enzyme, qui est généralement expliqué par la formation d'un complexe enzyme-ligand. Le ligand se place au niveau du centre actif de l'enzyme en abaissant de manière significative le taux d'inactivation.

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

Ces modifications sont peu utilisées en vue d'une amélioration de la thermostabilité d'un enzyme. Seul un brevet (EP 189 838, 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 aromatiques et les chaînes de substitution 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., 1986; 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 d'un enzyme 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 destabilisation ou n'avoir aucun effet (Lenders et al., 1985).

Divers auteurs présentent l'immobilisation de l'amyloglucosidase comme un moyen d'améliorer la thermostabilité (Morijawa et al., 1980). Néanmoins les températures d'utilisation ($50^\circ C$) restent très inférieures à celles réclamées par l'industrie ($70^\circ C-75^\circ C$). 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,b) sans pour cela être suivies d'une quelconque utilisation industrielle.

** Modification de l'enzyme par les 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), et la protéase neutre (Sidler et Zuber, 1972) de *Bacillus stearothermophilus*, se sont avérés être plus thermostables lorsque l'organisme était cultivé à plus haute température. H.V. Haberstich et H. Zuber (1974) ont de même mis en évidence une meilleure thermostabilité de plusieurs enzymes dans les extraits

de *B.stearothermophilus* et *B.caldotenus* lorsque ceux-ci sont cultivés à 50°C plutôt qu'à 37°C.

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

Par contre, A.R.S.Prasad et R.Maheswari (1978) ainsi que d'autres auteurs (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 effectuée à température plus élevée. Ainsi S.Hayashida (1975) peut sélectionner l'un des 3 isoenzymes d'amyloglucosidase en fonction des conditions culturales. D. 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 à celle de l'enzyme obtenu après culture en milieu liquide. 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'un isoenzyme plus thermostable.

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

b) Modification de l'organisme producteur

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'expérimentation établie en vue d'améliorer la thermostabilité d'enzymes par mutagenèse. Les bactéries ont fait l'objet de quelques réussites en ce domaine. 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. Les enzymes sélectionnés sont fonctionnels 3°C à 6°C au dessus de la température de l'enzyme natif.

Chez les champignons, J.Mitra et P.V.Sane (1981) relatent l'existence d'une souche d'*Aspergillus niger* obtenue par mutagenèse et présentant une amyloglucosidase à meilleure

Tableau 11: Microorganismes acceptés pour la production d'enzymes

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 Lindt	
	Mucor miehei	

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 aléatoire.

* 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 une 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 (Dalbadie-McFarland et al., 1982), le génie génétique, la cristallographie aux rayons X et le design moléculaire (Ulmer, 1983; 1985).

Dans un premier temps, la comparaison de protéines mésostables et thermostables a permis d'appréhender les subtiles différences pouvant intervenir dans la thermostabilité. Diverses "règles" de modifications ont ainsi été édictées (Querol et Parrilla, 1987). Quelques résultats obtenus récemment ont montré 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 et Powers, 1986), le lysozyme T4 (Perry et Wetzell, 1984) ou la thermolysine (Imanaka et al., 1986).

Le symposium UCLA (Ulmer, 1985) "Structures, repliement et design des protéines" a montré l'intérêt que prête 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, des modifications chimiques et du concept futuriste 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 reposent sur l'obligation d'utiliser des organismes ayant fait preuve d'une innocuité

toxicologique, appartenant aux espèces mentionnées dans le tableau 11. Néanmoins, une procédure d'agrément (article P, arrêté 7, avril 1983; Desmazeaud, 1985) existe, 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 est faite.

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 voie, finalement la plus simple et la plus sûre, qu'il a été décidé de suivre.

Le premier problème posé dans la recherche de souches productrices d'enzyme à thermostabilité améliorée réside dans le choix des espèces 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).

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 rapportées 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* appartenant au groupe *niger* (Alazard et Raimbault, 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.

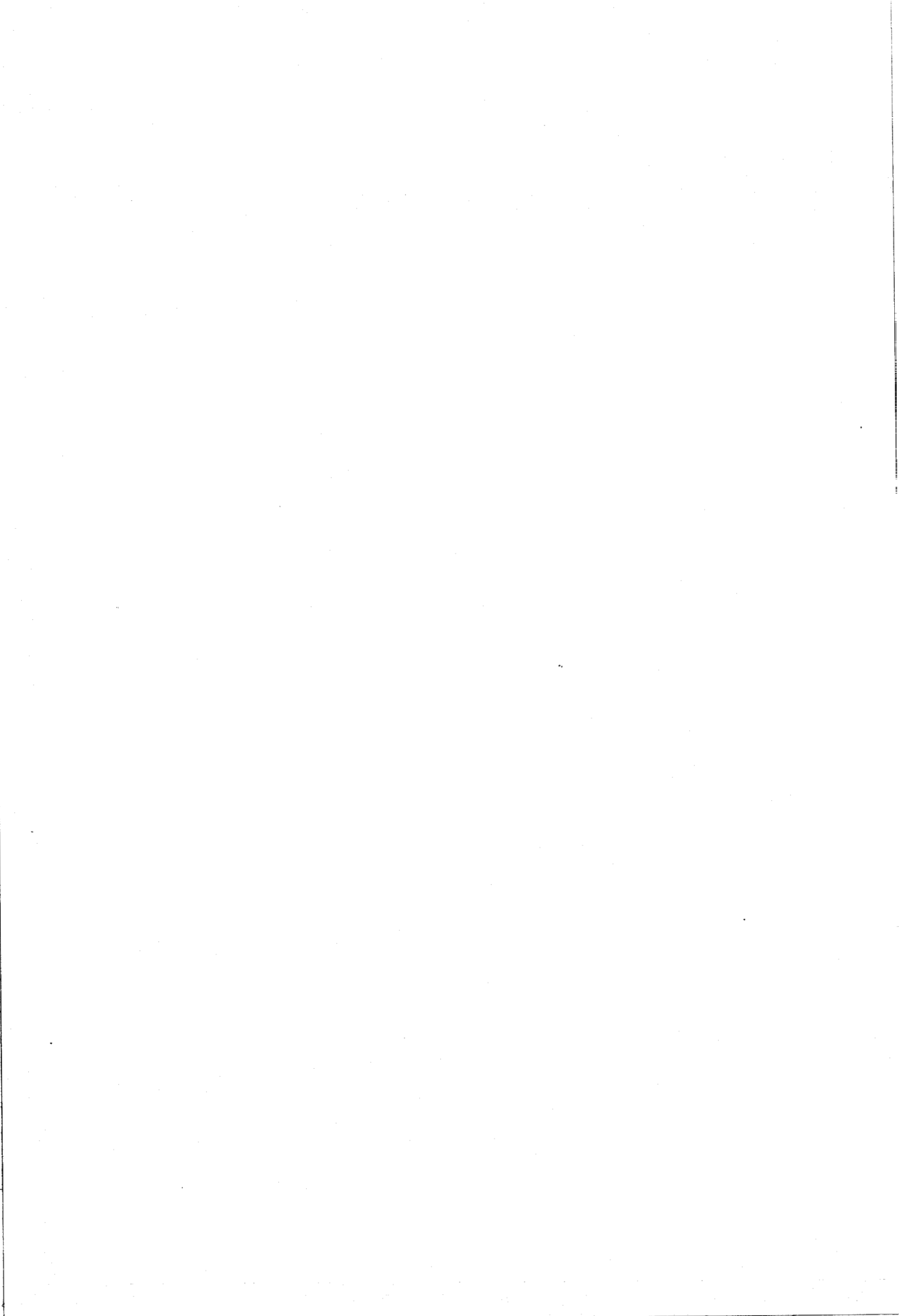
Les α glucosidases décrites dans la littérature (tableau 9) possèdent toutes un optimum de température voisin de 50°C-55°C sauf l' α -glucosidase intracellulaire de *Thermoascus aurantiacus* (Obert, 1980-1981) dont l'optimum d'activité atteint 75°C.

Une cinquantaine de champignons filamenteux sont considérés comme thermophiles ou thermotolérants d'après la définition de Crisan (1973). En effet pour celui-ci, un champignon thermophile ou thermotolérant possède un optimum de température proche de 40°C ou plus pour une croissance normale. Par contre pour D.G.Cooney et R. Emerson (1964), un champignon thermophile est un organisme fongique ayant une température maximale de croissance d'au moins 50°C et une température minimale de croissance supérieure à 20°C. 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

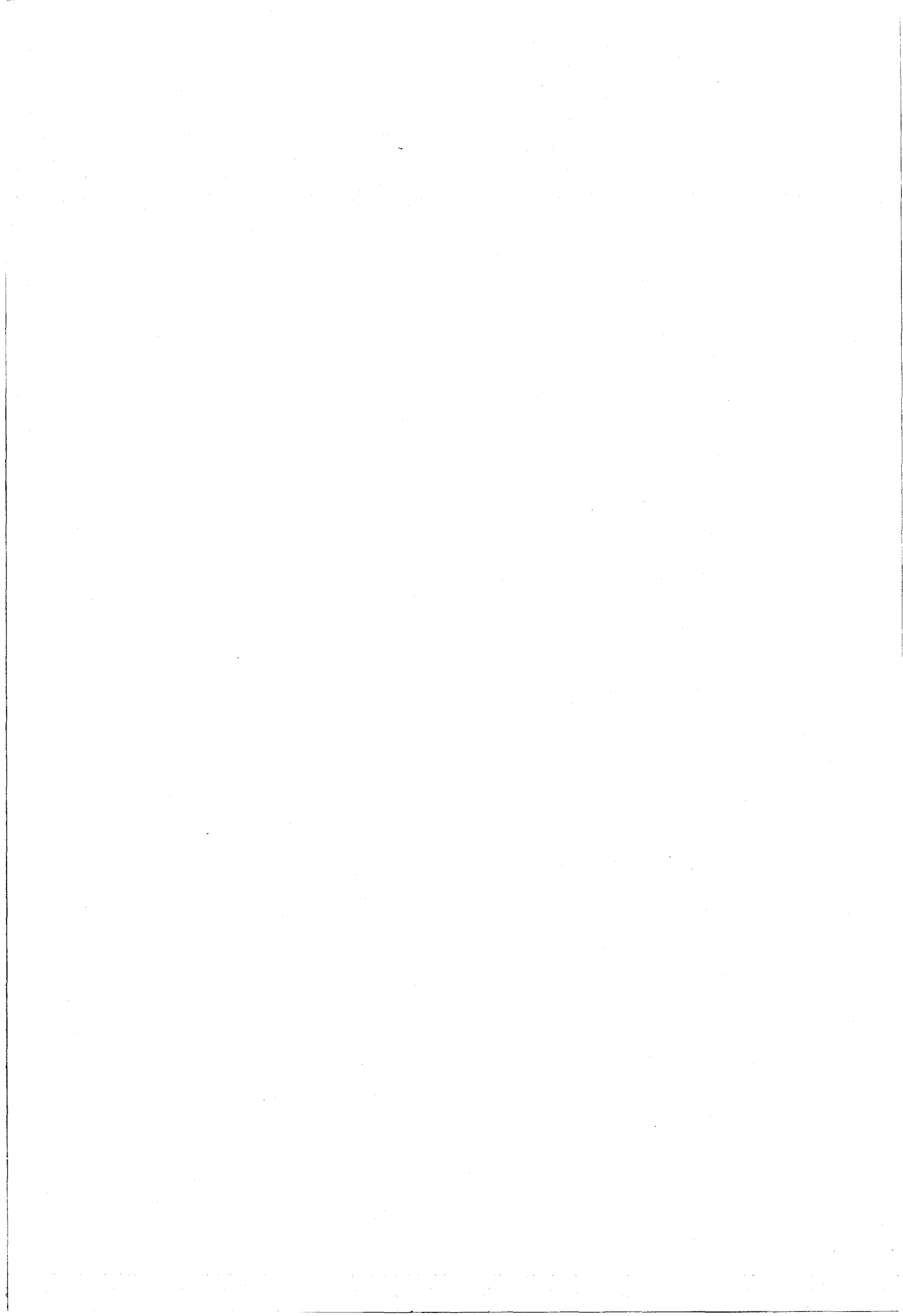
L'obtention d'une amélioration de la thermostabilité d'un enzyme peut être obtenue par les diverses voies discutées dans ce chapitre: modification chimique de l'enzyme, modification des conditions de culture, mutagénèse des souches productrices, ingénierie des protéines ou recherche de nouveaux organismes producteurs. Cette dernière méthode reste la plus facile d'accès et la moins hasardeuse, certains organismes synthétisant des enzymes thermostables 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 éliminer de suite.



CHAPITRE II

MATERIEL ET METHODES



I. - ISOLEMENT DES SOUCHES

Les souches fongiques de la sélection 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.

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 sera présentée dans le chapitre résultats de cette première partie.

Les microorganismes amylolytiques ont été également recherchés dans des échantillons de farine, de graines de céréales ou de légumineuses provenant de silos de stockage ou encore dans des colles industrielles.

Diverses autres sources ont également été utilisées.

2. Isolement des souches.

Dans un erlenmeyer contenant 100 ml d'eau physiologique (NaCl 0,75%) stérile, 5 grammes d'échantillon (terre, fumier, etc...) sont placés. 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 rajoute 20 ml du milieu gélosé suivant (milieu d'isolement) encore liquide (température inférieure à 50°C).

Milieu d'isolement: KH₂PO₄.....1,6g
 Ca(H₂PO₄)₂, 2H₂O..... 1,2g
 MgSO₄, 7H₂O.....0,5g
 ZnSO₄, 7H₂O.....0,02g
 MnSO₄, H₂O.....0,02g
 CuSO₄, 5H₂O.....0,01g
 NH₄NO₃.....0,94g
 MDO₂.....25,00g
 H₂O 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 et des prélèvements sont effectués; on repique les colonies apparues sur les boîtes dans des tubes 16/160 contenant 6 ml de milieu Malt-Agar (Malt DIFAL 1,5% et gélose Biokar type E 1,5%). 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 sur milieu Malt-Agar et milieu CZAPEK (CZAPECK, 1902-1903; DOX, 1910). La détermination est réalisée grâce aux manuels couramment utilisés à cet effet, cités dans la bibliographie, en fin de ce mémoire.

4. Conservation des souches

Elle est pratiquée dans des tubes 16/160 contenant 6 ml du milieu Malt-Agar. 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.

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 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).

On ajoute $4 \cdot 10^6$ spores 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 (Morquer, 1931, modifié) 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 *Leptosphaeria typhae* (Lacoste, 1965; Vidal et al., 1974-1975) et pour la production d' α -amylase par *Aspergillus oryzae* (Deprez, 1977; Malard, 1979; Remi, 1984).

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* (Ramachandran, 1978).

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.

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'activité de l'amyloglucosidase, EC 3.2.1.3, soit celle de l' α -glucosidase, EC 3.2.1.20, soit celle d'un mélange de ces deux enzymes.

- L'activité transglucosidasique correspondant à l'activité de la glucosyltransférase, (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 par le tampon 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 (UI/ml).

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.

IV. -ANOMERIE DU GLUCOSE LIBERE

Ce procédé fait appel à la mise en évidence des anomères α ou β du glucose par chromatographie en phase gazeuse, selon la technique décrite par Chiba et collaborateurs (1983).

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 ensuite 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 SILA (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 de 1/8" de 1,5 m de long SE 30 à 10% de silicne sur chromosab PAW (60-80 mesh).

L'azote est employé comme gaz vecteur sous une pression de 1 Kbar et un débit de 30ml/min., 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.

CHAPITRE III

RESULTATS DE LA SELECTION

Tableau 12: Origine des souches testées lors de la sélection

ORIGINE DES SOUCHES	NOMBRE DE SOUCHES TESTÉES DE CETTE ORIGINE	NOMBRE DE SOUCHES SELECTIONNÉES 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	
Farine non traitée	10	
Grains (Maïs, pois, seigle)	12	
Colle d'étiquette	16	1 <u>Th. aurantiacus</u>
Moquettes	10	
Murs	2	
Fumier de canard	22	
Fumier de porc	9	
Fumier d'oies et d'oisons	7	
Compost pasteurisé de champignonnières (la Gonthière)	54	1 <u>Th. aurantiacus</u>
Fumier de jardin	29	
Fumier de poule	16	
Litière de vache et cheval	26	
Ensilage de maïs	3	
Terre de terrils (P.de.Calais, Nord)	54	5 <u>A. fumigatus type I</u>
Terre d'Afrique du Sud	1	
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>
Terres de Baléares	9	
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>F. série restricta</u>
Terre de Tunisie	26	2 <u>A. carbonarius</u>
Terre de Zwiabawe	87	1 <u>A. fumigatus type I</u> 3 <u>Th. aurantiacus</u>

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

La sélection a été orientée, en partie, par l'hypothèse exposée dans la bibliographie de ce chapitre: la production d'un enzyme à thermostabilité élevée par un organisme thermophile est plus probable que par un organisme mésophile.

I.-ISOLEMENT DES SOUCHES ET PREMIER CRIBLE

1.-Isolement et détermination des souches étudiées

Nous avons testé 846 souches fongiques au laboratoire. Ces souches proviennent de diverses origines: isolement à partir de biotopes variés au laboratoire et différentes collections (tableau 12).

Ces souches, obtenues sur un milieu amylicé sont d'éventuels producteurs d'enzymes amylolytiques (α -amylase, amyloglucosidase et α -glucosidase, principalement).

Quelques souches fongiques témoins, producteurs connus d'amyloglucosidase, ont été suivies lors de cette étude. Les plus intéressantes ont été celles fournies par la collection de Roquette frères' (Lestrem): un *Aspergillus niger* v. *awamori* NRRL 3112 et 3 de ces mutants hyperproducteurs (25-17, 25-23 et O_1).

Parmi les 700 souches dont la détermination était connue (souches de collection et détermination au laboratoire), 30 genres et 61 espèces ou sous genres ont été identifiés (tableau 12). 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.

Ainsi 92 souches *Aspergillus* du groupe *niger* selon (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 D.G. Cooney et R. Emerson (1964) ont été recueillies: *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 D.G.Cooney et R.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, peut ne pas déboucher sur des résultats intéressants. Aussi afin de pouvoir examiner un grand nombre de souches différentes, il fallait utiliser un test rapide, reproductible et suffisamment sensible pour mettre en évidence les caractéristiques recherchées des enzymes étudiés.

Dans la bibliographie de ce chapitre, nous avons insisté sur 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 qui est en corrélation positive avec la thermostabilité.

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.

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 A.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:

- Isolement sur milieu solide amylicé de souches fongiques de biotopes divers.
- Production de l'éventuel enzyme sur milieu d'isolement amylicé liquide.
- 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 13 et les figures 7 et 8.

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 de ces deux activités % 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 7 et 8 constituent les représentations graphiques du tableau 12, soit le pourcentage d'activité AM dosée à 75°C par rapport à l'activité AM dosée à 60°C, et la production totale d'enzyme dosée à 60°C, 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 par un numéro correspondant au bas du graphique au nom du groupe (espèce ou genre).

Au regard de ces 2 représentations (figures 7 et 8) et du tableau 12, nous pouvons préciser certains points.

- La plupart des enzymes étudiés possède 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*, certains *Aspergillus* du groupe *fumigatus* et des *Penicillium* de la série *restricta*. A 45°C de température de croissance, on retrouve les 2 *Thermoascus*, aucun essai n'ayant été fait à cette température pour les *A.carbonarius*, les *Aspergillus* du groupe *fumigatus* et pour les *Penicillium* de la série *restricta*.

TABLEAU 13: Rapport des activités amyloglucosidasiques dosées à 75°C et à 60°C des différentes souches fongiques déterminées. (Traitement des données sur commodore C64, logiciel M. Hoël).

CLASSIFICATION	TEMP. °C	POURCENTAGE 75°C/60°C	A.AM DOSEE A 60°C UI/ml	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	3
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%±15%	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 Pyrenomycètes				
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%±5%	29± 16	9
Th.crustaceus	28	70%±32%	6± 7	6
	45	114%±33%	4± 3	6
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
	28	50%±11%	356±136	35
A.niger v.niger	45	45%±11%	348± 59	2
	28	21%	197	1
A.niger v.niger f.hennebergii	28	34%±12%	333±144	12
A.niger v.awadori	45	44%± 3%	320± 50	6
	28	51%± 6%	617± 77	6
A.niger v.awadori muté	28	68%± 6%	321± 100	4
A.carbonarius	28	14%± 4%	117± 109	14
A.japonicus	28	27%±13%	98± 15	2
A.aculeatus	28	16%± 5%	9± 16	3
A.foeticus	28			
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%	6± 3	11
A.gr.fumigatus type 1	28	127%± 6%	325± 6	6
A.gr.fumigatus type 2	28	19%±22%	28± 16	16
	45	26%±20%	25± 10	2
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 13: Suite.

CLASSIFICATION	TEMP. °C	POURCENTAGE 75°C/60°C	A. AM DOSEE A 60°C UI/ml	NOMBRE DE SOUCHES
CHAMPIGNONS FILAMENTEUX				
classe des Hyphomycètes				
Ordre des Hyphomycetales				
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. variotii	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 urticae	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%	16± 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 isiancica	28	16%±16%	42± 54	5
	45	37%	326	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	6%	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%	76	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 Ulicladium				
Ulicladium 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

FIGURE 7: Rapport des activités amyloglucosidasiqes 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.

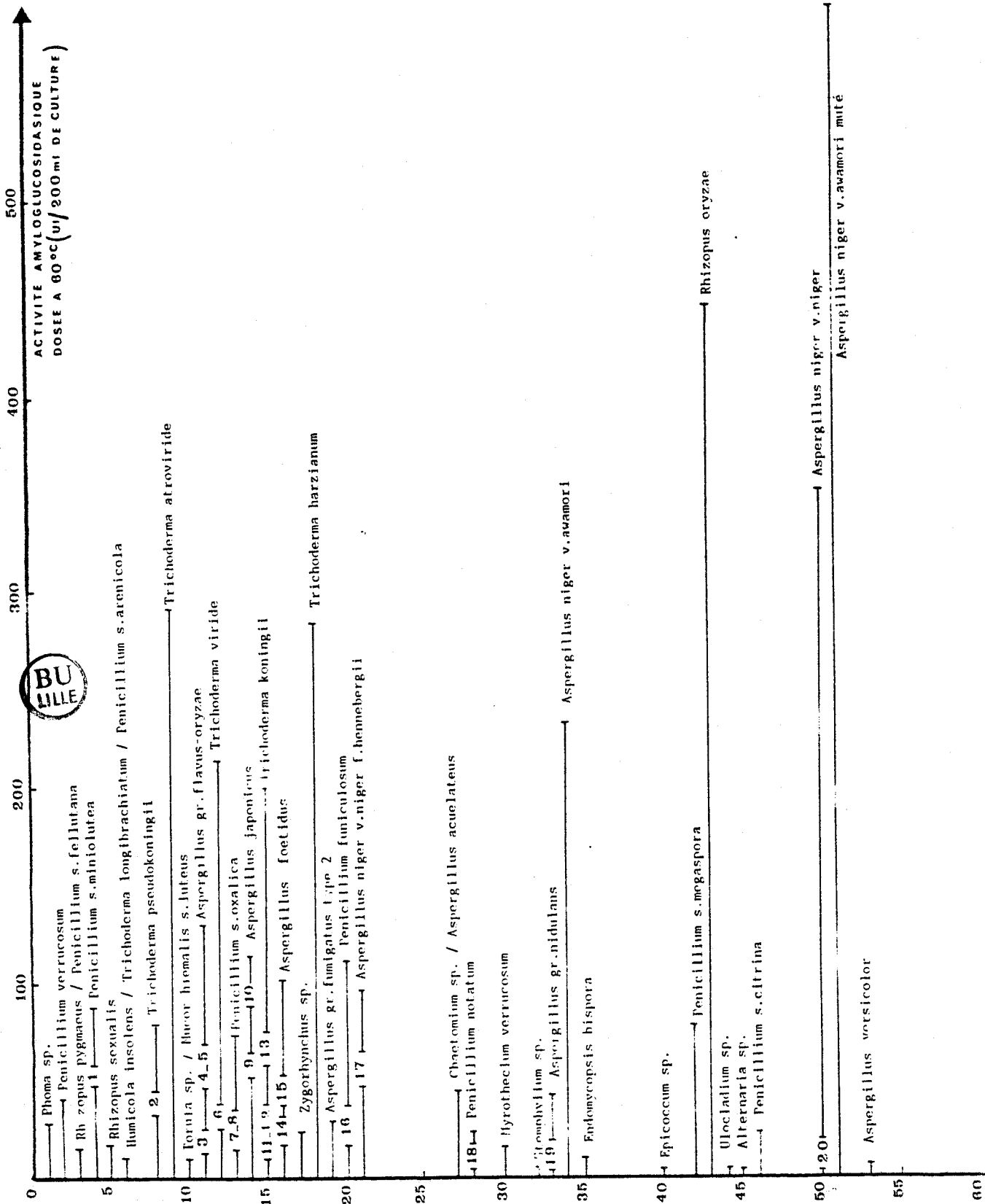


FIGURE 7: (Suite).

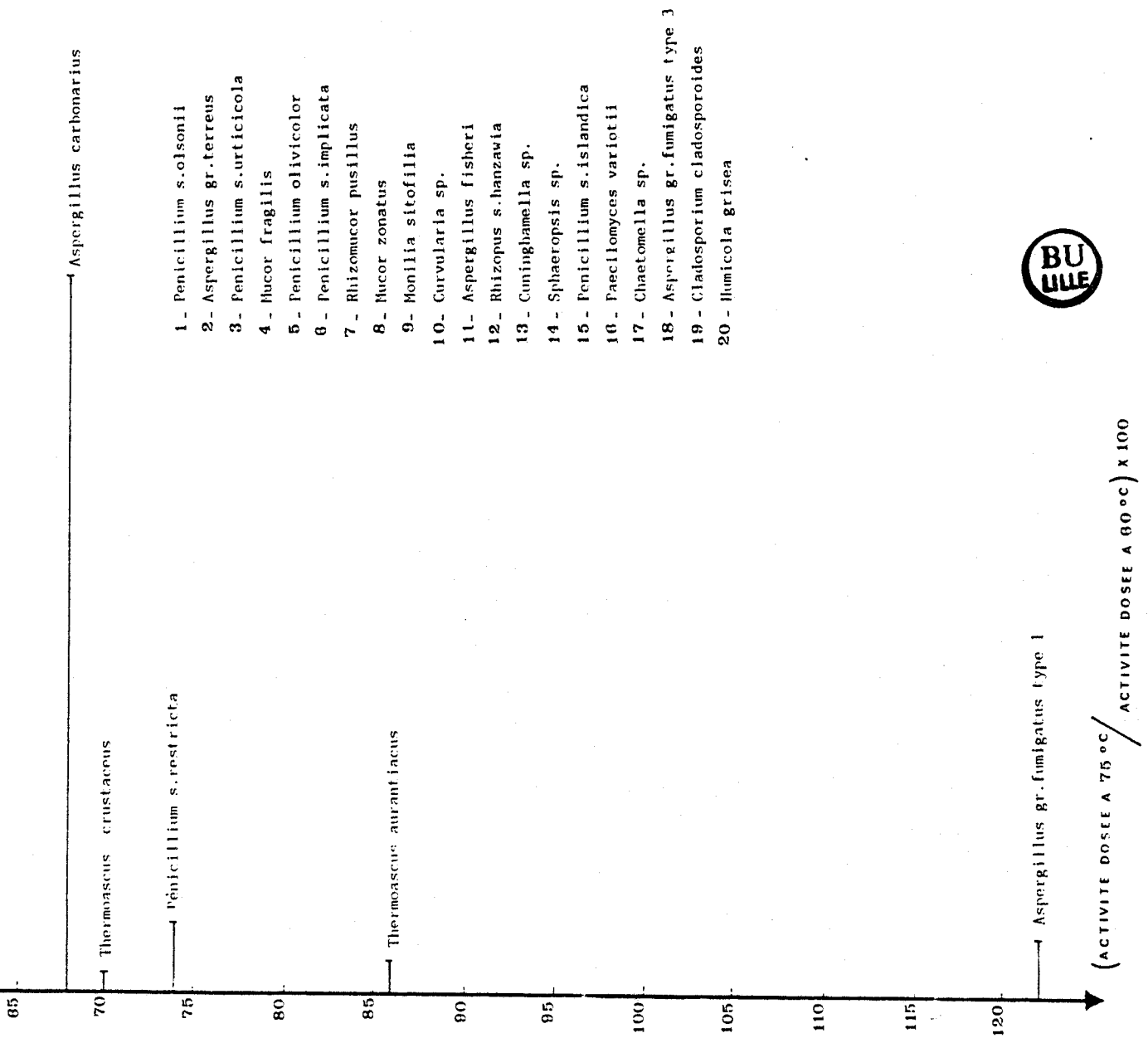


FIGURE 8: Rapport des activités amyloglucosidasiques dosées à 75°C et à 60°C (exprimé en pourcentage) et production de cette activité à 45°C (dosée à 60°C, en UI/ 200ml) par les souches fongiques déterminées.

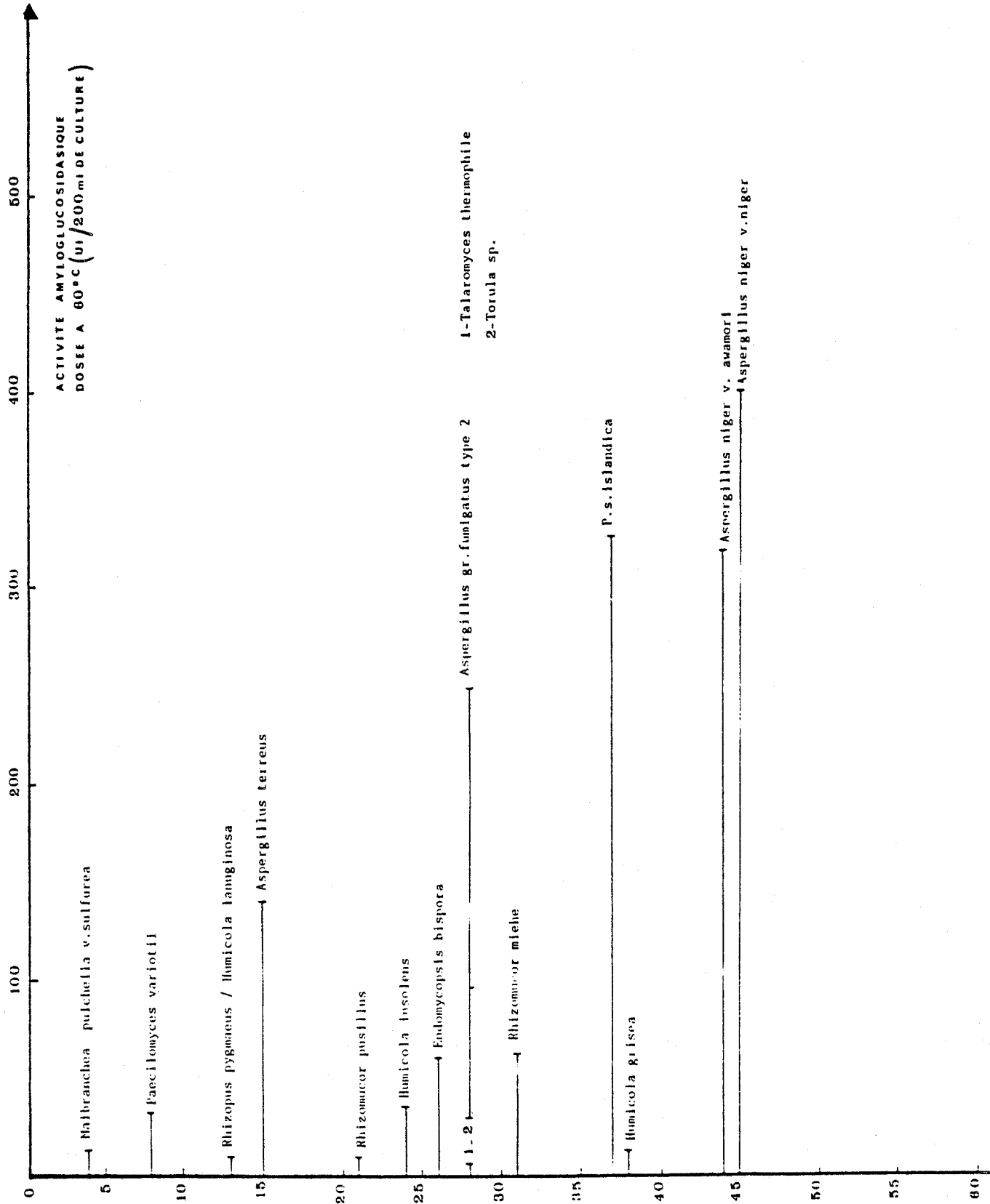
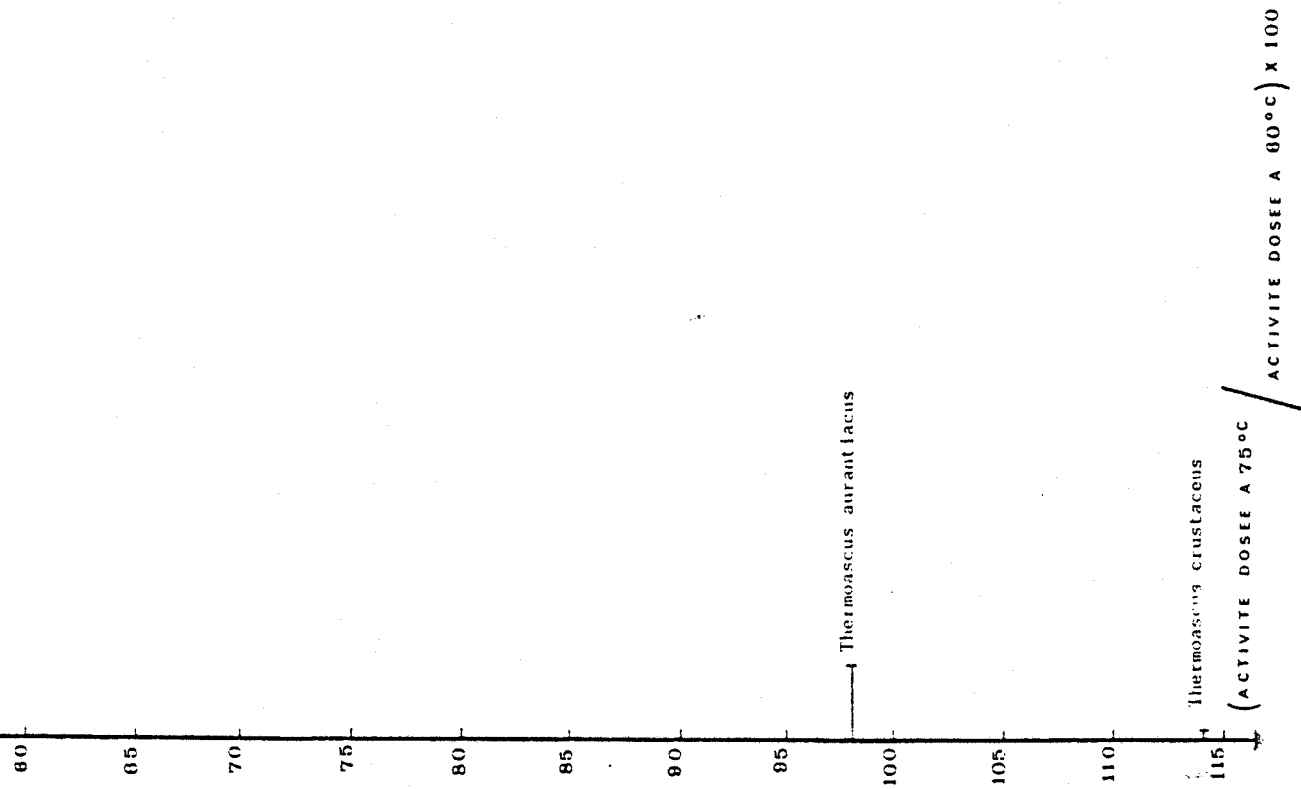


FIGURE 8: (Suite).



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

- Les écart-types sont souvent larges parce qu'il s'agit de groupes systématiques assez étendus et que dans une même espèce, il existe des variations de production importantes selon les différents isolats. Cependant on peut tout de même évaluer la zone de présence de ces champignons autant pour le %75/60 que pour leur production d'enzyme.

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

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

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

- Les échantillons des différents biotopes ont rarement été traités immédiatement, d'où une sélection des champignons ayant émis un grand nombre de spores, au détriment des espèces à faible sporulation.

Par ces différentes observations, nous ne pouvons pas affirmer avoir sélectionné les seules souches intéressantes lors de notre étude.

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* (Alazard et Raimbault, 1980; Ramasesh et al., 1982; Fogarty et Benson, 1983), *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, 1980-1981).

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 près des 50%, ceci se rapprochant des résultats des auteurs (Ramasesh et al., 1982).

Aucun des *Humicola lanuginosa* et des *Talaromyces thermophile* n'a présenté un %75/60 intéressant, ceci ne concordant pas avec les 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 telles les *A.carbonarius*, *A.fumigatus* type 1, *Penicillium* de la série *restricta* et *Th.crustaceus*.

Un certain nombre de genres, non décrits à ce jour comme possédant une activité amyloglucosidase, 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 présentent malheureusement pas une thermostabilité meilleure que celle des enzymes industriels.

A cette étape de la sélection on retrouve différents groupes de champignons intéressants dont la plupart sont thermotolérants ou thermophiles (*A.fumigatus* type 1, *Th.crustaceus* et *Th.aurantiacus*). Les *A.carbonarius* et les *Penicillium* de la série *restricta* sélectionnés ne présentent aucun caractère de thermotolérance, même s'ils croissent encore 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 de même 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 1 qui possèdent un enzyme amyloglucosidasique ayant un excellent %75/60 mais une faible production. Ces *A.* du groupe *fumigatus* type 1 ont un aspect morphologique très différent des *A.fumigatus* classiques (ou *A.* groupe *fumigatus* type 2) ce qui nous a permis de les différencier. Une détermination plus précise de ce type d'*A.fumigatus* a permis de classer ces souches dans l'espèce *A.viridi-nutans* appartenant au groupe *fumigatus* et à la série *fumigatus*.

Tableau 14: 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
Sy 13	P.serie restricta	5 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 *Thermoascus crustaceus* et *Th.aurantiacus* qui sont des 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 avec un bon %75/60.

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

II.-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 leur optimum de pH et de température. Toutes ces études ont été menées sur les filtrats bruts de culture, 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 ces filtrats bruts de culture placés à 70°C. Ce critère de demi-vie pouvait désormais être utilisé en raison du 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 l'amyloglucosidase thermostable produit par *Clostridium thermoamylolyticum*.

Les différents résultats de la mesure des demi-vies sont consignés dans le tableau 14.

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* type 1, *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 Roquette (*A.niger* v.*awamori* muté) 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 14.

La lecture du tableau 14 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 ne présente aucun intérêt, aussi toutes études sur celles-ci ont été abandonnées. Une première amélioration est obtenue avec les *Aspergillus* du groupe *fumigatus* type 1 (demi-vie sans substrat entre 9 et 36 min, et avec substrat 5 heures 40 min à 16 heures). 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.

- Action du pH: la durée de la demi-vie des enzymes, en présence ou absence du substrat, est plus longue à 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 de 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 stabilité des enzymes amyloglucosidasiques, produits par les 2 *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, on ne pourra que les situer entre 2 points consécutifs.

La figure 9 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. Les optimums d'activité sont décalés selon les souches. La souche témoin Roquette (25-17) et le Ve 10 (*A.niger* v. *niger*) possèdent un optimum compris entre 60°C et 65°C. Le Co 27 (*A.carbonarius*), le F3-2 (*A.gr.fumigatus* type 1), le Ful-1 et le P6 (les deux *Thermoascus*) ont leur optimum entre 65°C et 70°C. Ces températures optimales d'activité sont comparables aux températures optimales les plus élevées d'activité 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 Rimbault, 1981) ou d'*A.niger* (Fogarty et Benson, 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 pH 6.0 (figure 10), bien que certains enzymes semblent avoir un optimum d'activité à la limite inférieure de cet intervalle. Mais, 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 (Fogarty et Kelly, 1980). Seuls les enzymes de *Th.crustaceus* et de *A.gr.fumigatus* type 1 sortent de ces limites (entre pH 4.0 et 4.5, ou moins). De plus, ces pH optimums 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* type 1) 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.

FIGURE 9: Variation des activités des filtrats de culture des souches sélectionnées en fonction de la température d'incubation, exprimée en pourcentage de l'activité maximale.

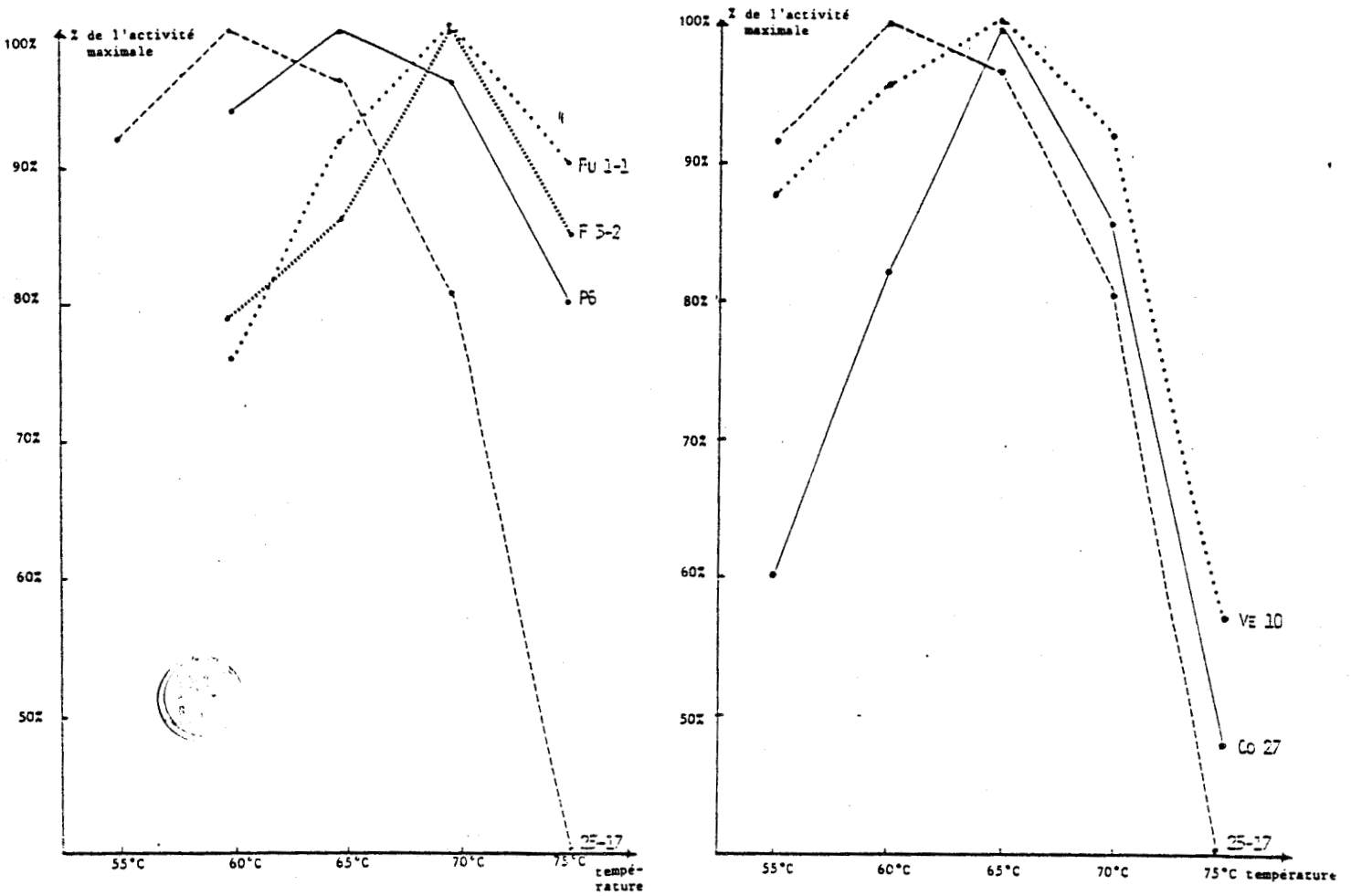


FIGURE 10: Variation des activités des filtrats de culture des souches sélectionnées en fonction du pH d'incubation, exprimée en pourcentage de l'activité maximale.

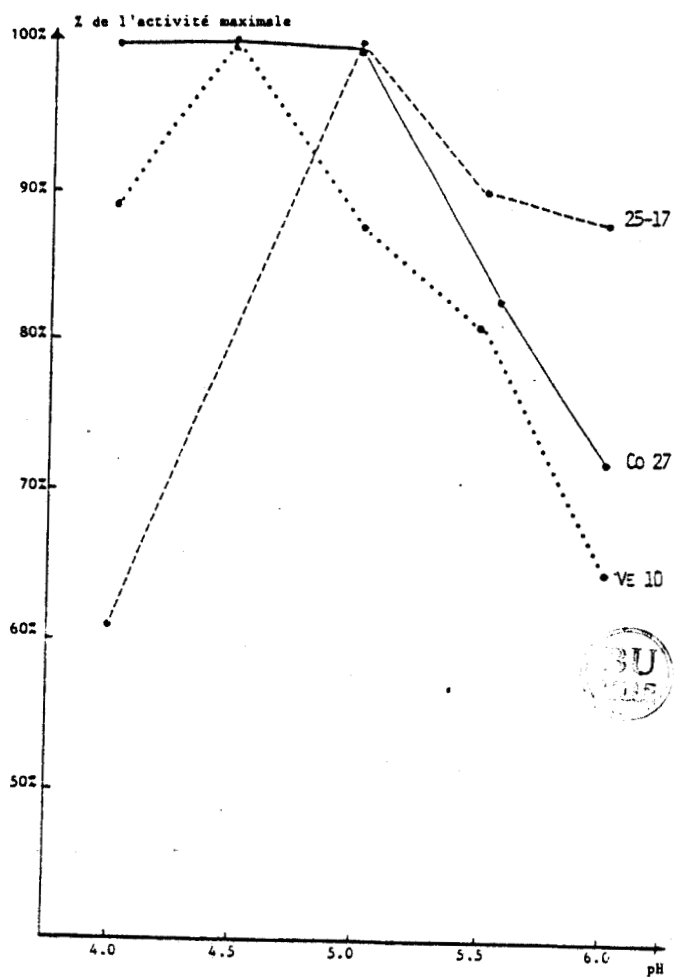
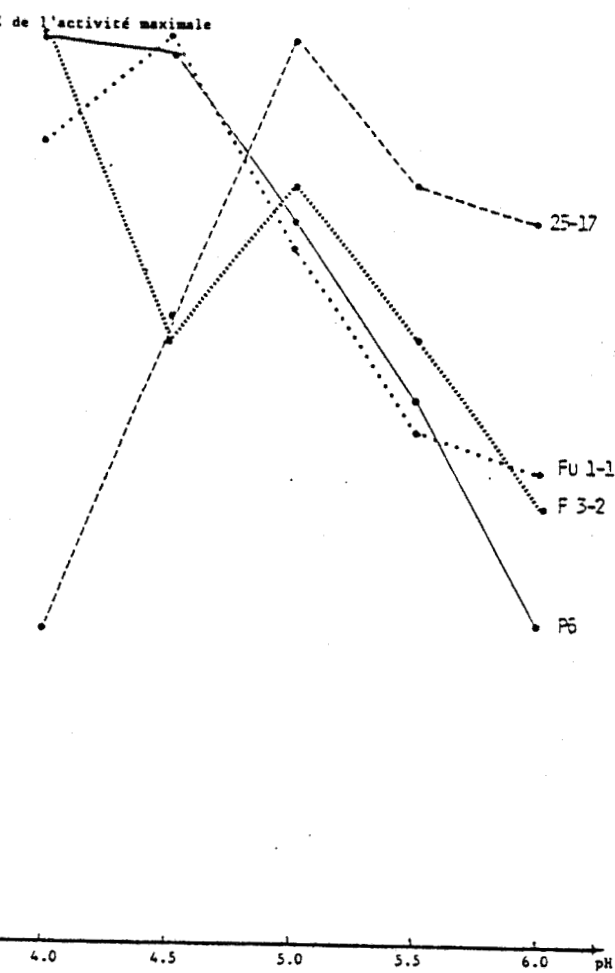


Tableau 15: Autres caractéristiques des souches sélectionnées

	25-17 A.niger V.awamori muté	Ve 10 A.niger V.niger	Cc 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	±	±	±	+	±	±

Conclusion

Il existe 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. Mais, on ne retrouve pas au niveau des optimums de température, l'importance du décalage constaté lors des mesures de demi-vie, entre les enzymes des souches thermophiles (*Th. crustaceus* et *Th. auran-tiacus*) et ceux des souches du groupe *A. niger*.

Ceci confirme le fait qu'il s'agit de 2 phénomènes différents mais qu'il existe une corrélation positive entre ceux-ci.

2.-Autres données biologiques concernant les souches sélectionnées

Diverses autres caractéristiques ont été définies et sont présentées dans le tableau 15, dans lequel nous avons rappelé les résultats de la thermostabilité. Ces paramètres ont été étudiés pour les raisons suivantes.

- L'interêt d'une faible production de transglucosidase qui catalyse des réactions de reversion (déjà discuté dans le chapitre préliminaire).

- La présence de polysaccharides est considérée comme gênante lors des étapes de filtration en production industrielle.

- Certaines espèces fongiques n'acceptent pas les conditions de culture en fermenteur (agitation, aération violentes).

- La pathogénicité des espèces représente un facteur important, vu les contraintes législatives en vigueur et doit être déterminée avant tout choix de souche.

La lecture de ce tableau appelle quelques commentaires:

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

- Les souches du groupe *A. niger* sélectionnées (Ve10 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. fumigatus* type 1 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 s'agisse d'une pathogénicité opportuniste.

Tableau 16: Comparaison de quelques caractéristiques physiologiques, biologiques et enzymologiques de Thermoascus crustaceus et de 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 < 55°C 35-37°C	28°C < 60°C 45°C
Production d'A.AM à 37°C Production d'A.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	+++	+
Pathogénicité reconnue	+	+

- 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 amyloglucosidasique 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.fumigatus* type 1 et son enzyme amyloglucosidasique possède une bonne thermostabilité (supérieure à 10 heures à 70°C et à pH 4.5, sans substrat).

Conclusion

La suite de l'expérimentation exigeant des cultures nombreuses, 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 moyenne en thermostabilité obtenue.

Aussi avons nous, pour la dernière étape, décidé de travailler sur les 2 espèces de *Thermoascus*, souches les plus intéressantes, pour pouvoir choisir celle qui subira des études plus approfondies.

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

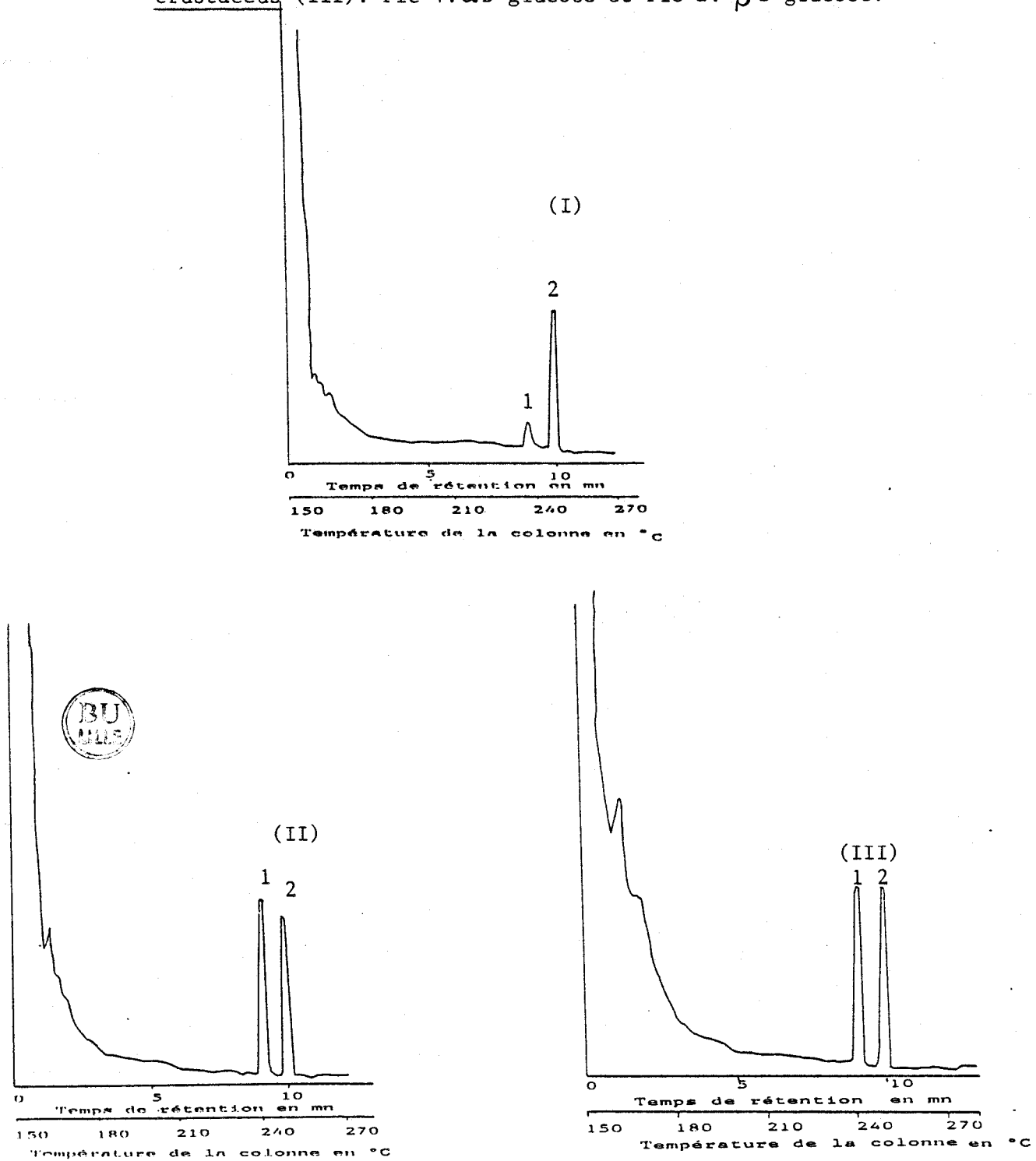
Une dernière comparaison des avantages et inconvénients des deux *Thermoascus* a été faite et une première analyse des différents enzymes amyloglucosidasiques présents dans les filtrats de culture a permis de compléter les connaissances de ces 2 souches.

1.- Choix final d'une souche

Ce choix se fonde sur toutes les données obtenues au cours des 2 premières étapes de la sélection et sur des caractéristiques biologiques et physiologiques particulières à ces 2 espèces de *Thermoascus* (tableau 16).

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", sont nettement supérieurs chez ce dernier. Par contre les autres données tendent à favoriser le

FIGURE 11: Chromatographie en phase gazeuse des dérivés triméthylsilylés des produits de digestion du maltose par l'AMG (I), le complexe enzymatique du *Th. aurantiacus* (II) et du *Th. crustaceus* (III). Pic 1: α D-glucose et Pic 2: β D-glucose.



Th. crustaceus. La production absolue, pour une culture pratiquée à 45°C, est identique chez les 2 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 est 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 2 souches présentent un cycle sexuel 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 conidiogénèse facile à obtenir représente donc un avantage certain.

Les 2 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 toutes ces 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 2 thermoascus

Les filtrats de culture des 2 *Thermoascus* comprenant au moins un enzyme susceptible de libérer du glucose à partir de malto-dextrine, il paraissait intéressant de savoir s'il s'agissait d'une amyloglucosidase, d'une α -glucosidase ou d'un complexe enzymatique comprenant les 2 types d'enzymes.

Deux techniques, décrites dans le chapitre préliminaire, ont été utilisées; celle de Chiba et collaborateurs (1983) et celle de Kujawski et collaborateurs (1980).

Tableau 17: Mise en évidence des activités α -glucosidasique et amyloglucosidasique dans les filtrats de culture des deux Thermoascus étudiés.

		I	II	
Fu 1.1 (<u>T.aurantiacus</u>)	Amidon soluble	200	7,4	(3,7%)
	Amidon soluble + Maltose	304	176	(77,9%)
P6 (<u>T.crustaceus</u>)	Amidon soluble	431	22	(5,1%)
	Amidon soluble + Maltose	526	137	(26,0%)
A M G 200 L (<u>A.niger</u> -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.

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.

La figure 11 présente les enregistrements obtenus à partir des produits de la digestion du maltose par les différents filtrats de culture des 2 *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 2 *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 Wegrzyn (1980)

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 essentiellement aux enzymes produits par les groupes des *A.niger* et *A.oryzae* (Yamasaki et al., 1980), les α -glucosidases 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 17).

L'étape de chauffage de l'enzyme (14 heures à 70°C et à pH 4.5, pour les 2 *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 2 *Thermoascus*; par contre cette diminution est plus limitée dans le cas du substrat composé. Ces 2 faits semblent indiquer que la thermostabilité du complexe enzymatique repose essentiellement sur l' α -glucosidase.

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 différents enzymes présents serait désormais nécessaire pour confirmer et préciser

les rôles respectifs de ceux-ci dans le complexe amyloglucosidasi-
dasique.

Conclusion

Cette dernière étape nous a permis d'effectuer un choix entre les 2 *Thermoascus* retenus à la suite des différentes phases de la sélection.

Le *Th. crustaceus*, bien que synthétisant un complexe amyloglucosidasi-
que 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 amyloglucosidasi-
que du *Th. crustaceus* ont mis en évidence 2 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 SÉLECTION

A partir de biotopes variés, 846 souches fongiques ont été testées en vue d'isoler des souches aptes à produire une activité amyloglucosidasi-
que à thermostabilité améliorée.

Les différentes phases de la sélection, basée 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 conidiogénèse bien développée, tout aussi aisée à obtenir que la phase sexuée.

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

Dans le chapitre suivant nous allons présenter ce champignon et résumer les données bibliographique le concernant.

CHAPITRE IV

THERMOASCUS CRUSTACEUS



Avant d'entreprendre l'étude physiologique de ce champignon, il nous est apparu nécessaire de le présenter et de résumer la bibliographie concernant le genre *Thermoascus*.

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

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

Quelques années plus tard, en 1912, O.P.J. Sopp (Sopp, 1912) isole un champignon proche du *Thermoascus aurantiacus* Miehle et crée le genre *Dactylomyces* représenté par le *Dactylomyces thermophile* Sopp (champignon thermophile à cléistothécies et à phase conidienne de type *Polypaecilium*).

En 1964, A.E. Apinis et C.G.C. 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*).

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

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

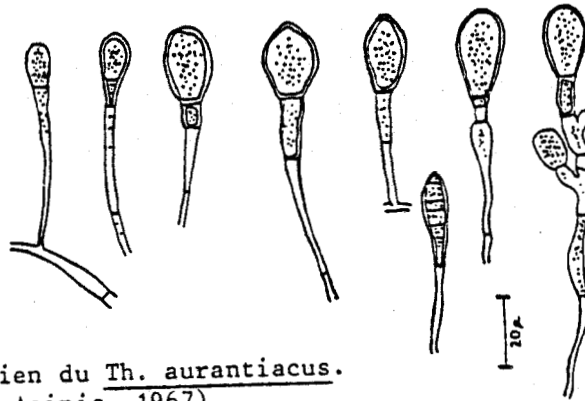
A.E. Apinis, en 1967, dénonce la réunion des 2 genres en un seul et préconise de garder les 2 genres sur la base des formes conidiennes différentes.

J.A.Von Arx (1970) et R.A.Samson (1974), en accord avec la classification de A.C.Stolk (1965) contestent le maintien des 2 genres et les réunissent en un seul, les stades sexués des trois espèces étant identiques.

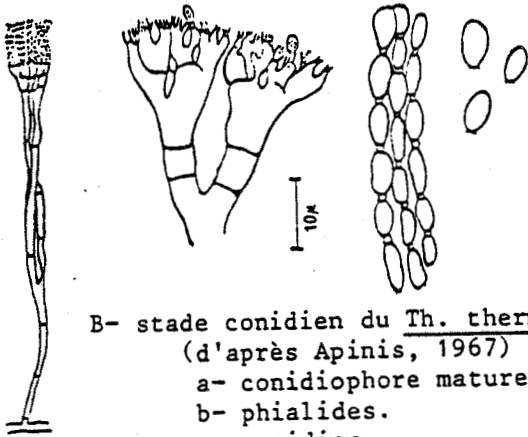
Actuellement, l'appellation *Thermoascus* pour les 3 espèces est unanimement acceptée. On utilise les caractéristiques du stade asexué pour la détermination spécifique.

Dernièrement, S. Ueda et S.I. Udagawa (1983) créent 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

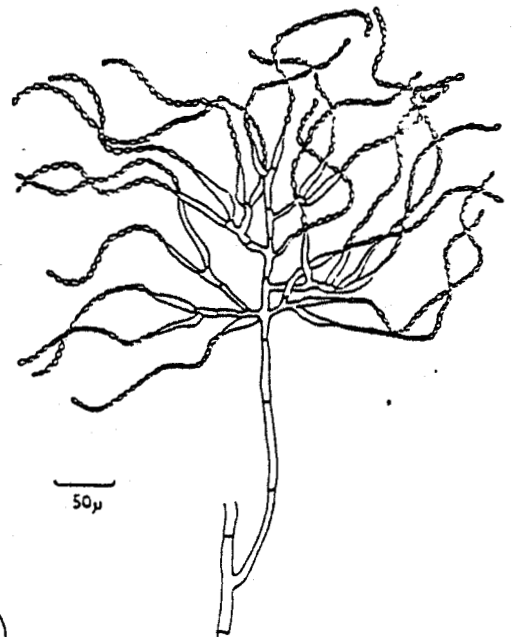
PLANCHE I: Les différents stades conidiens du genre Thermoascus.



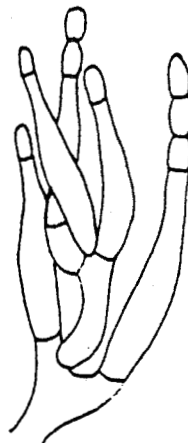
A- Stade conidien du Th. aurantiacus.
(d'après Apinis, 1967)



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.



verruqueuse, différentes des ascospores de *Th. crustaceus*. K.J. Kwon chung et collaborateurs (1984) contestent cette création, estimant qu'il s'agit d'un *Th. crustaceus* identique à leurs isolats. En effet, 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: A.C. Stolk (1965), A.E. Apinis (1967) et C.V. Subramanian et R. Rajendran (1980).

Le genre *Thermoascus* 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 8 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 larges (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 3 espèces, est la suivante: (d'après Stolk, 1965; Apinis, 1967; Samson, 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 2 ou 3, 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 J.M. Upadhyah et collaborateurs (1984) basé sur des caractéristiques différentes des ascospores et du peridium.

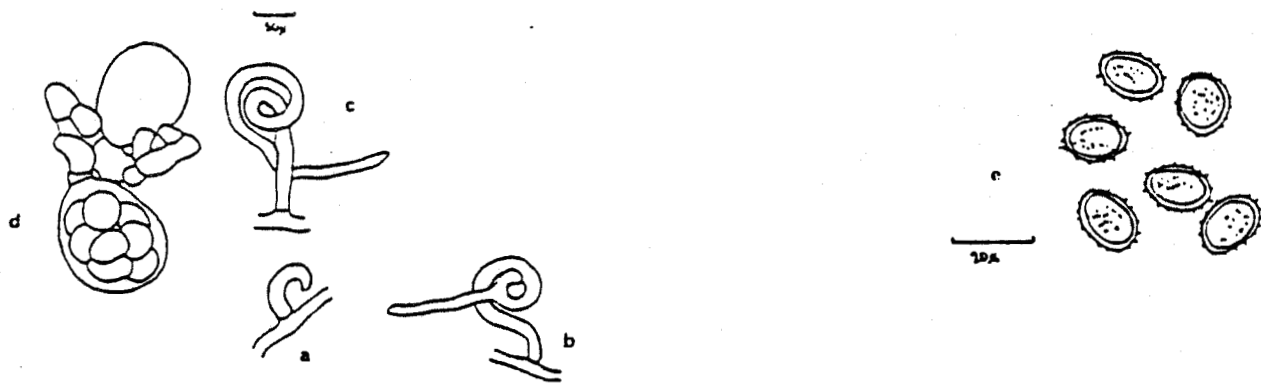
Th. thermophilus (planche I-B): possède un stade asexué de type *Polypaecilium* (conidies annellidiques) constitué par des conidiophores branchés de façon dichotonique, terminé par plusieurs paires de phialides produisant de nombreuses conidies en chaînes qui adhèrent en colonnes.

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.



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. aurantiacus est l'espèce la plus étudiée du genre *Thermoascus*. Ses besoins nutritionnels de croissance ont été abordés par F.Obert (1978-1979) et par A.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 décrit (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.

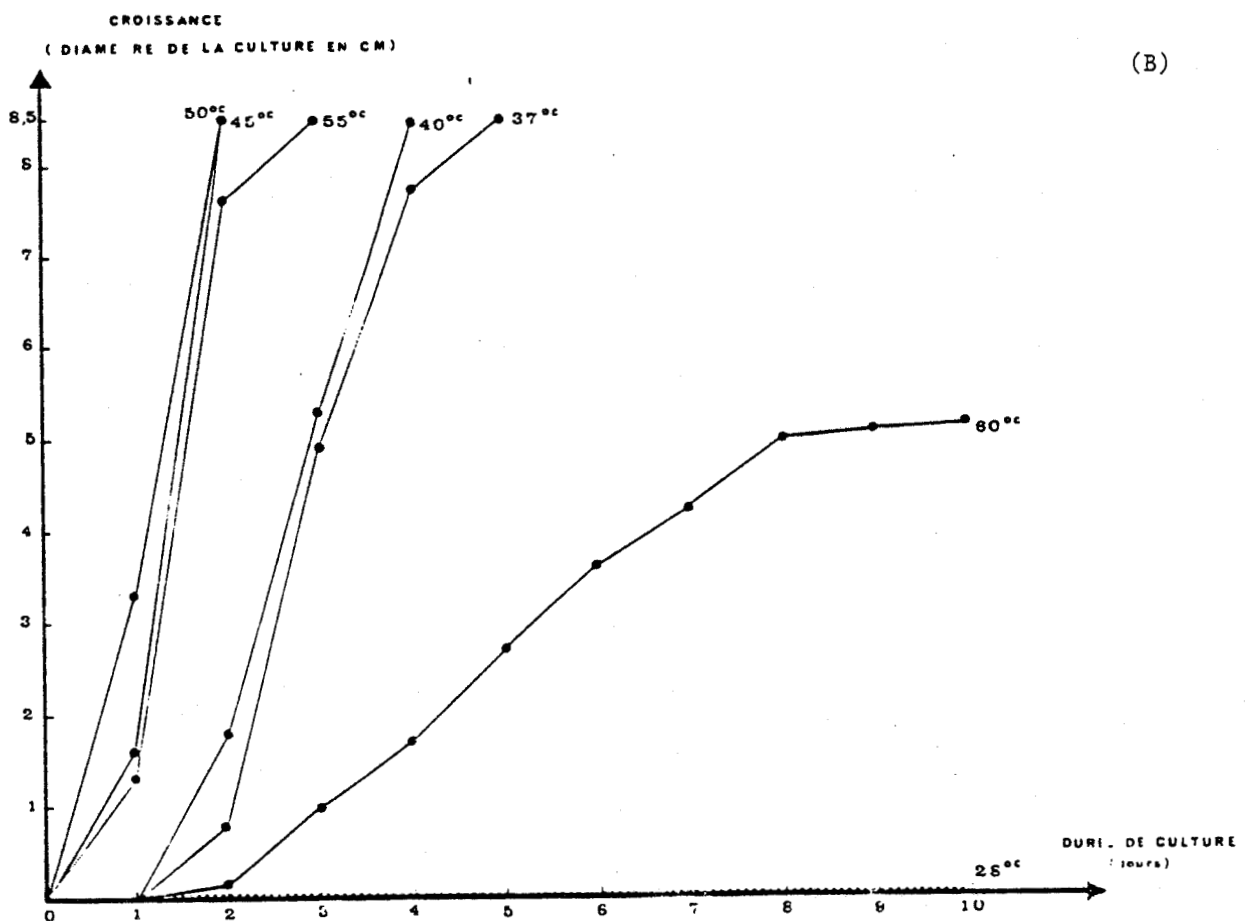
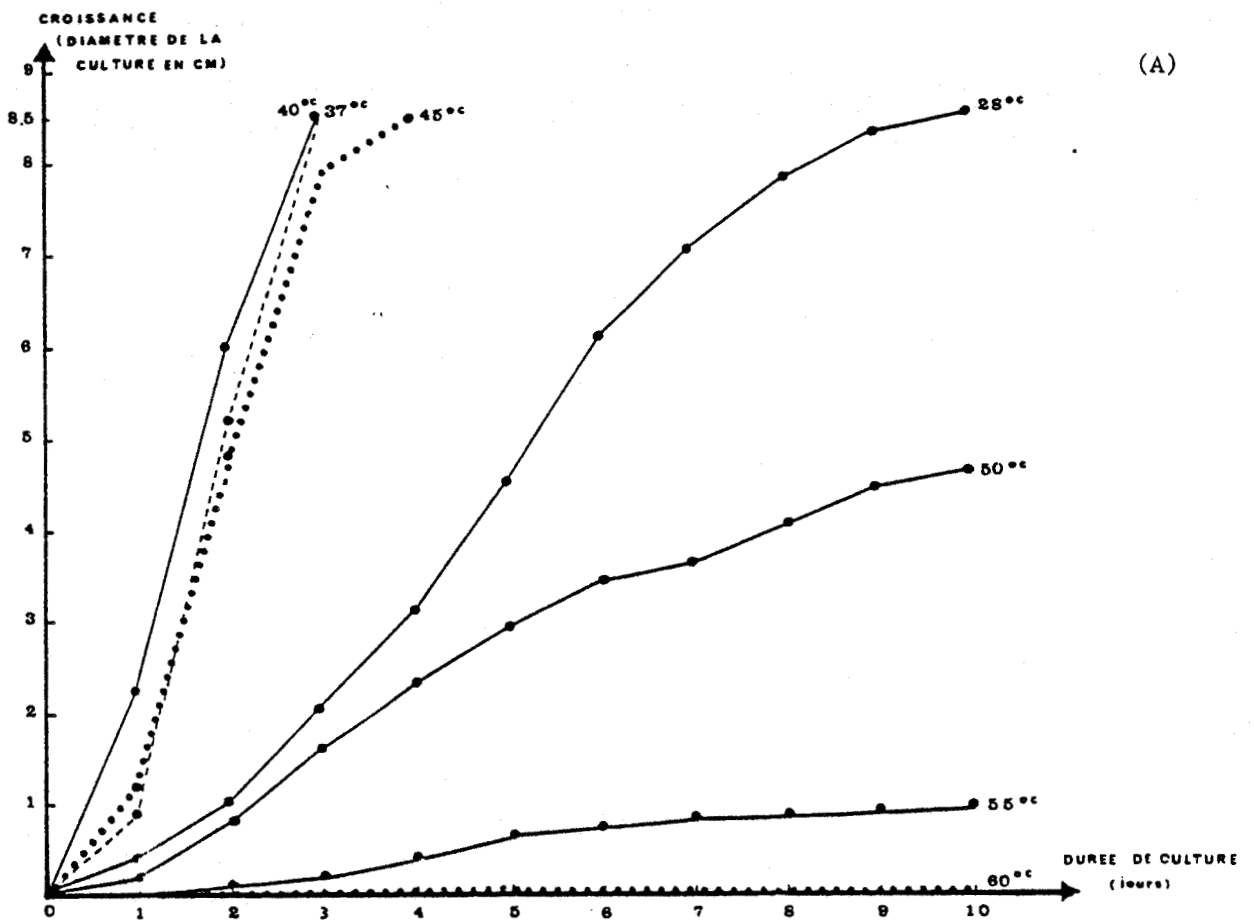
II.- THERMOASCUS CRUSTACEUS (SOUCHE P6): DESCRIPTION ET CONTRIBUTION AU DETERMINISME DES PHASES SEXUEE ET ASEXUEE.

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).

FIGURE 12: Courbes de croissance, en fonction de la température d'incubation, du Thermoascus crustaceus (A) et du Thermoascus aurantiacus (B).



S.Ueda et S.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* croit 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 K.J.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 8,5cm 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-e).

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 champignnière de La Gonthière (Wervicq-sud, Nord) (figure 12).

La température permettant la croissance maximale 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 45°C et 55°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 2 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, en fonction ou non des conditions culturelles, ou ne présenter que l'une ou l'autre des formes. Il est de plus

envisageable que deux champignons, l'un ne présentant que sa forme sexuée et l'autre sa forme asexuée, soient en réalité une seule et même espèce, le passage de l'une à l'autre forme de reproduction n'ayant jamais été observé.

Le *Th. crustaceus* possède les 2 phases de reproduction, comme décrit précédemment. 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 les différentes études à mener ultérieurement, il est nécessaire de pouvoir travailler dans des conditions les plus standardisées et donc d'éliminer le maximum de variation du matériel de base: le champignon. Dans la cas présent, le travail sur conidies semble le moins inducteur de variations, car il s'agit de spores provenant de mitoses et non de méiose.

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 2 phases, le stade conidien de façon fugace puis le stade sexué. La conidio-genèse semble donc difficile à isoler de la phase ascogoniale.

Les travaux de S.Ueda et S.Udagawa (1983) pour 3 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) Etude préliminaire de l'effet de la température et du milieu de culture

Une étude, variant les températures de croissance et les milieux de culture, a été menée sur le *Th. crustaceus*, souche P6, en boîtes gélosées.

Trois températures ont été étudiées 28°C, 37°C, 45°C, et trois milieux différents ont été essayés:

- milieu Malt-Agar 15 g de Malt
15 g de gélose Biokar type E
q.s.p. 1000 ml d'eau distillée

- milieu d'isolement, décrit p39, gélosé (15 g gélose Biokar type E/ litre), (C/N= 35).

- Milieu Sp.Th (sporulation *Thermoascus*)

KH ₂ PO ₄	1,6	g
MgSO ₄ ,7H ₂ O.....	0,5	g
Ca(H ₂ PO ₄) ₂ ,2H ₂ O.....	0,2	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 BOKAR typeE.....	15,00	g
pH.....	5,8	
(C/N= 4)		

Ce milieu a été principalement 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*.

Les cultures sont 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 2 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 décrites par S. Ueda et S. Udagawa (1983). Néanmoins quelques rares appareils conidiens ont été observés pour une température de culture de 25°C chez *Th.crustaceus*, sur milieu Czapeck, par K.J. Kwong-Chung et collaborateurs (1984).

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

b) Variation des sources de carbone et d'azote, et du taux d'azote sur le déterminisme des phases de la 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, (milieu minérale de Morquer modifié) 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 18 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=



Tableau 18: 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.

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

a: date de dernière observation

b: présence d'un exudat abondant

c: tissu superficiel d'aspect proche des ascocarpes

*: stérile

2,8g/l), il permet une conidiogénèse aussi abondant que le fait l'urée et de façon plus précoce (après 3 jours au lieu de 4 jours pour l'urée).

L'obtention du stade sexué, quant à lui, dépend de façon importante du 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).

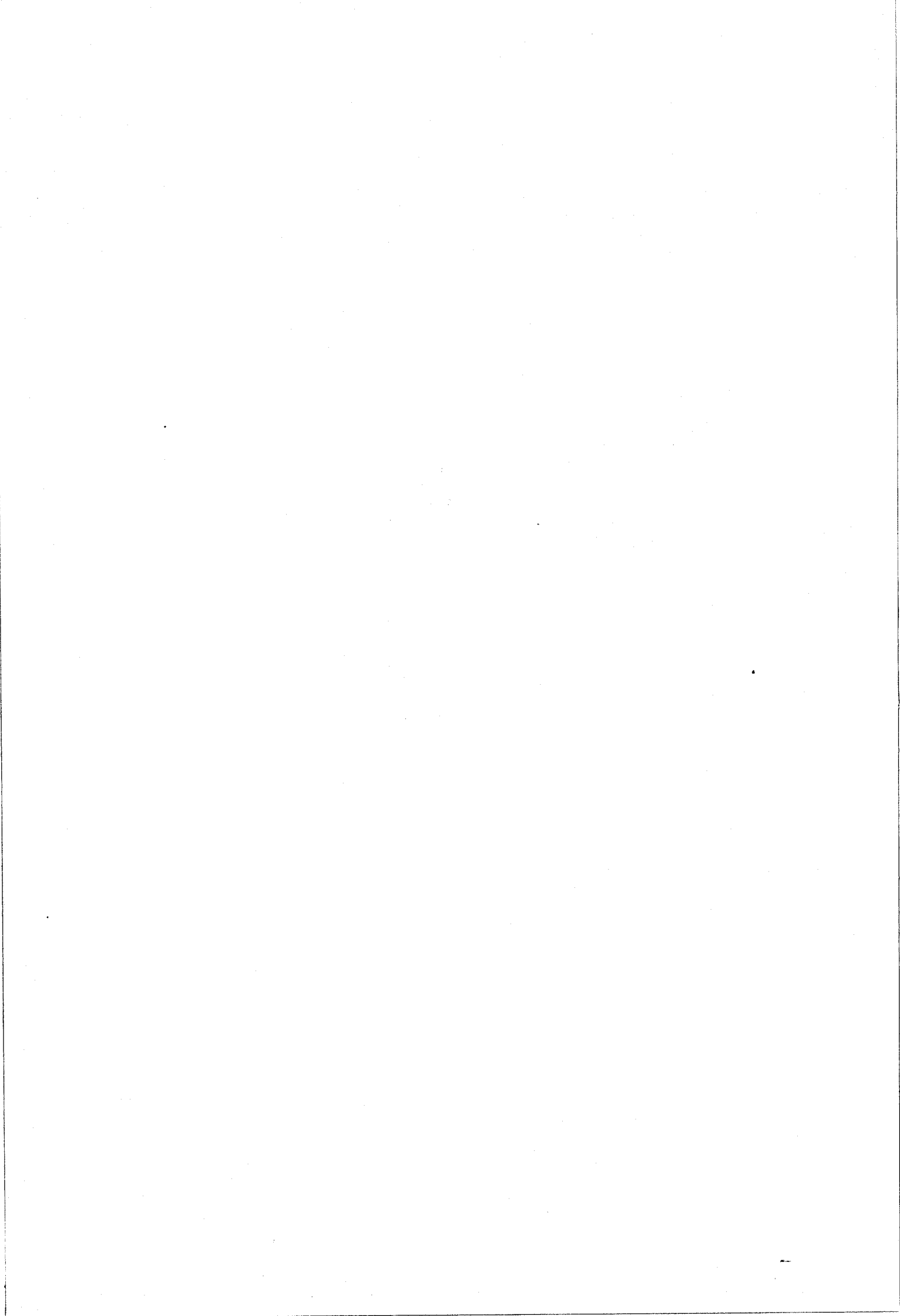
Un taux de 2,8g/l d'azote ne permet l'obtention d'ascospores que pour l'association urée-maltodextrine. Les autres associations n'autorisent que des ascocarpes stériles ou un tissu similaire (stroma stérile) aux ascocarpes, en superficie de la culture.

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 B. Dehorter (1985) sur le *Nectria galligena* Bres., par G. Vidal et collaborateurs (1974-1975) sur le *Leptoshaeria typhae* et par de nombreux autres auteurs.

Conclusion

Le but de ces études était de pouvoir obtenir l'une ou l'autre des phases du cycle biologique du champignon pour travailler dans des conditions standards lors de la suite de nos manipulations.

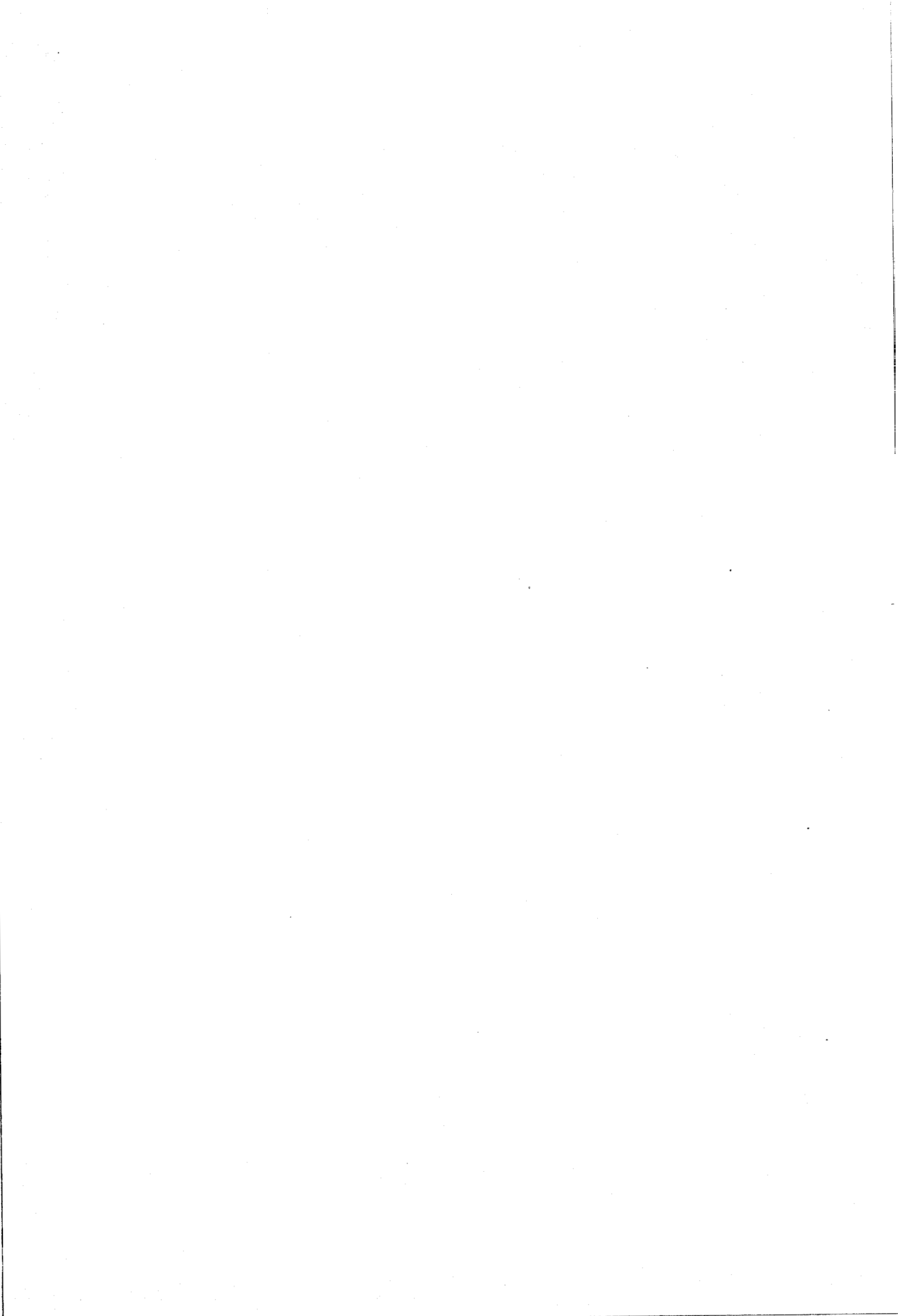
Aussi nous n'avons pas poussé nos investigations plus loin, mais il serait intéressant de pouvoir contrôler et comprendre réellement les mécanismes régissant ces phénomènes chez notre champignon.



CONCLUSION DE LA PREMIERE PARTIE

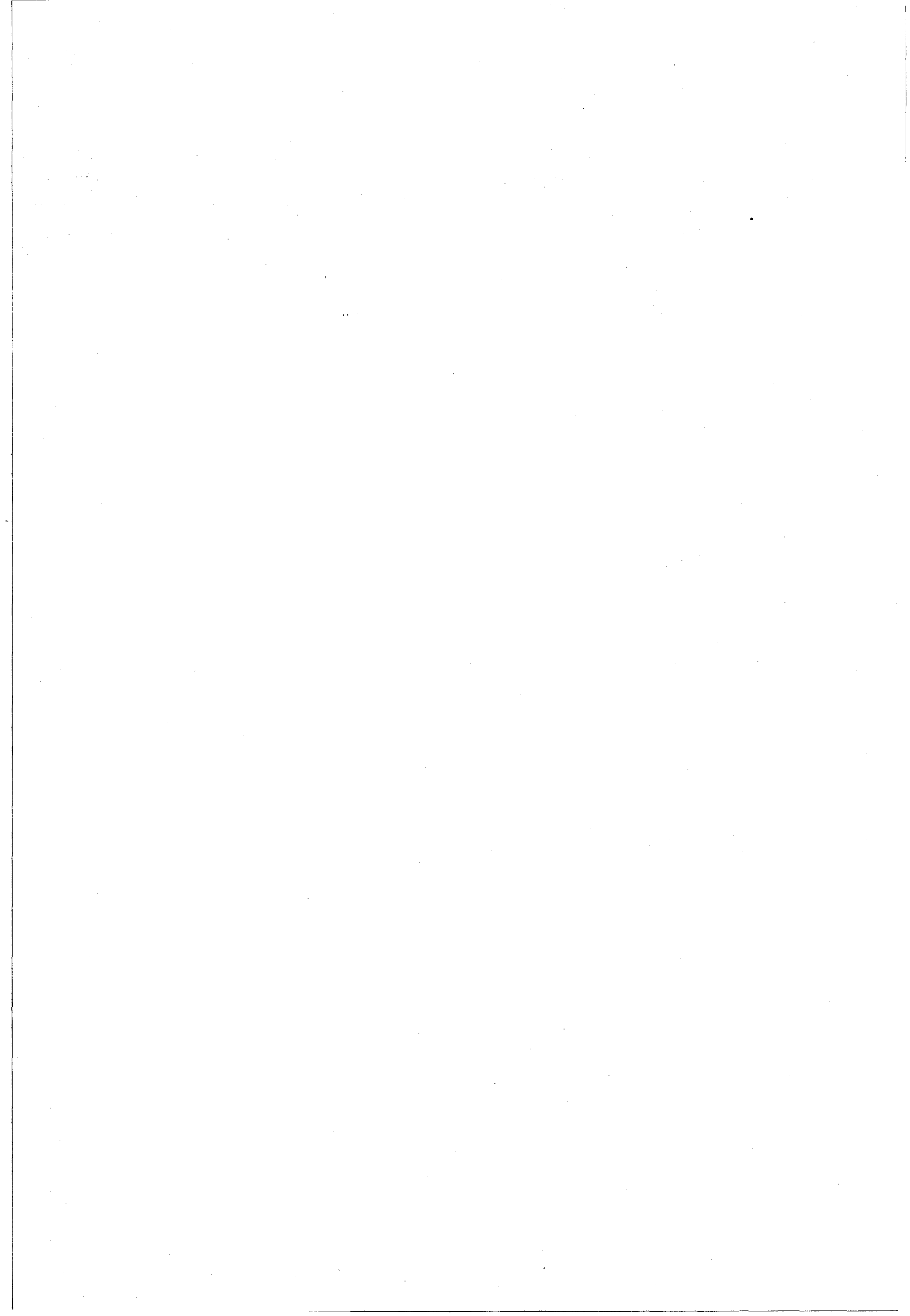
Après avoir déterminé la voie à étudier par la recherche d'une activité enzymatique dégradant les liaisons α -1-4 des maltodextrines et à thermostabilité supérieure à celle de enzymes industriels, nous avons procédé à une sélection de souches fongiques provenant de biotopes "chauds" (terres de terrils, de pays chauds, fumier...).

A la suite d'une première sélection basée sur l'optimum thermique de l'activité enzymatique recherchée, cinq groupes de champignons ont été retenus pour des études plus approfondies concernant l'activité enzymatique produite et le microorganisme producteur. De cette deuxième sélection, l'avantage indiscutable de la thermostabilité a permis la sélection de deux *Thermoascus* (*crustaceus* et *aurantiacus*). Mais par une dernière comparaison, le choix définitif s'est fait en faveur de *Thermoascus crustaceus*, champignon de culture rapide, simple et à reproductions sexuée et conidienne d'obtention aisée.



2ème PARTIE

ETUDE DES CONDITIONS CULTURALES DE LA
CROISSANCE ET DE LA PRODUCTION DU
COMPLEXE AMYLOGLUCOSIDASIQUE PAR
THERMOASCUS CRUSTACEUS (souche P6)

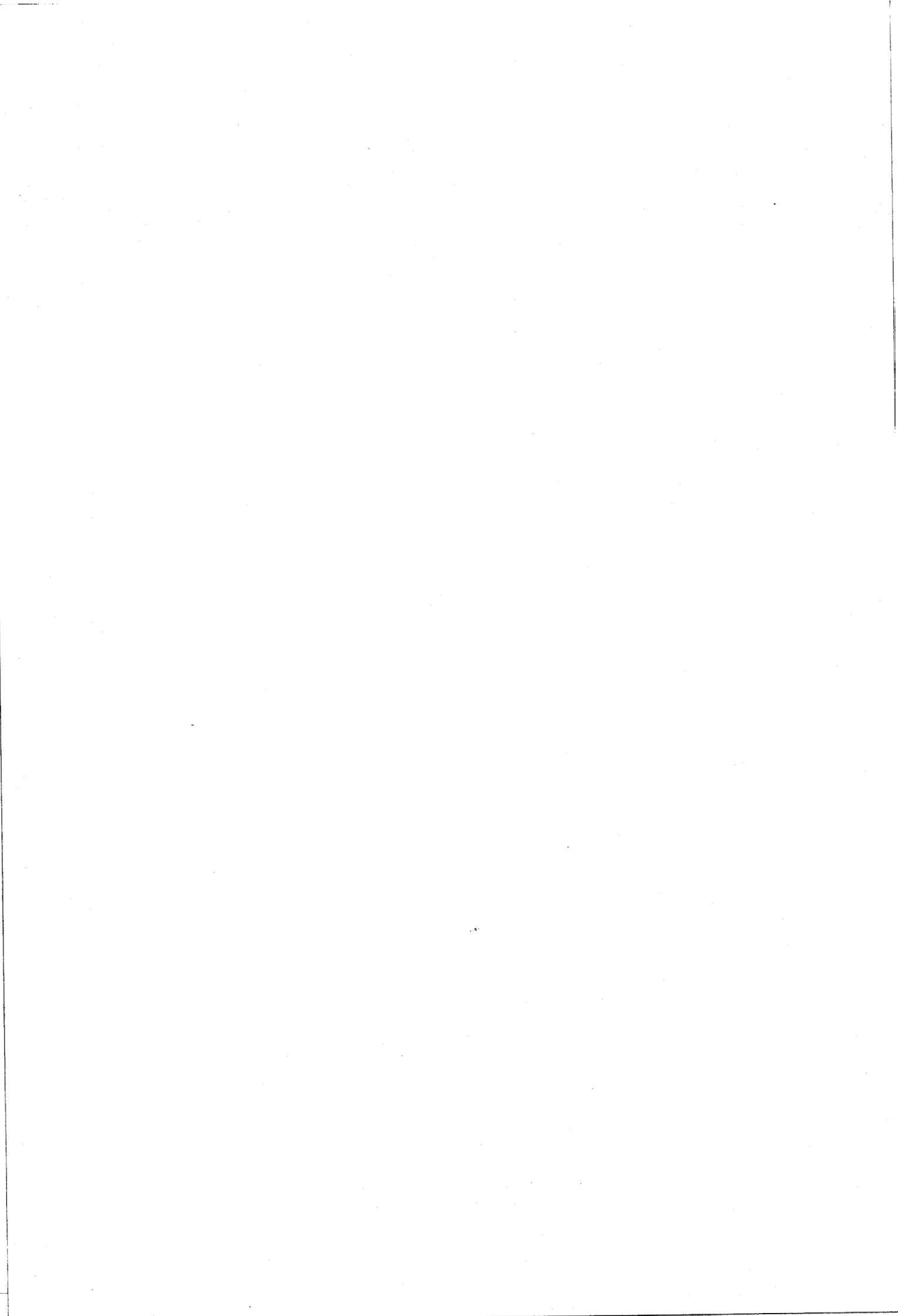


Le *Thermoascus crustaceus* (souche P6) a été sélectionné en vue de son étude pour la production du complexe amyloglucosidasiqne. Comme il a été vu en fin de la première partie, ce complexe est constitué de au moins deux enzymes différents dégradant les liaisons alpha 1-4 des maltodextrines. Il s'agit d'une amyloglucosidase (EC 3.2.1.3) à thermostabilité comparable à celle des enzymes industriels actuels et d'une α -glucosidase (EC 3.2.1.20) possédant une thermostabilité exceptionnelle. Un des paramètres étudiés: le rapport des activités enzymatiques dosées à 75°C et à 60°C (%75/60) constitue une estimation de l'équilibre entre ces deux enzymes dans le complexe. Une amélioration de ce pourcentage correspond à une augmentation relative du taux d'alpha-glucosidase dans le complexe.

Dans cette partie, les conditions culturales de la croissance et de la production du complexe enzymatique seront étudiées selon une méthode unifactorielle: première approche permettant de cerner la physiologie de ce champignon.

CHAPITRE I

PRESENTATION DES DONNEES ET BIBLIOGRAPHIE DES CONDITIONS
CULTURALES DU GENRE THERMOASCUS

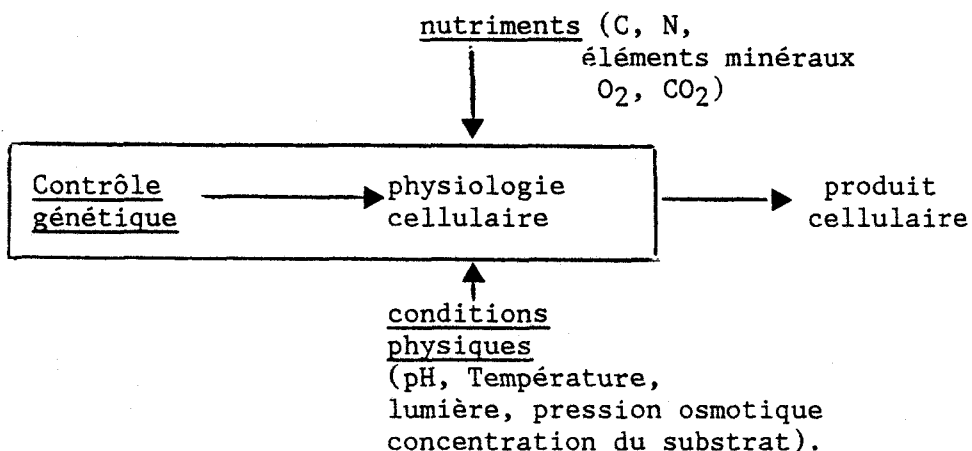


Le but de ce premier chapitre est de préciser le domaine à étudier pour optimiser la production du complexe enzymatique et sa thermostabilité.

I.- PRESENTATION DU PROBLEME A ETUDIER

La constitution génétique d'un champignon détermine ce qu'il est capable de faire, mais l'expression de cette potentialité dépend du milieu sur lequel il croît et de l'environnement dont il dépend (Lilly, 1965b; Rose, 1980).

Le schéma de D.R. Berry (1975), qui suit, résume les différents paramètres influents sur la physiologie fongique.



Pour chaque fonction biologique (croissance, sporulation, reproduction sexuée, productions de métabolites...) un tel schéma peut être établi réunissant les facteurs influents et leurs niveaux d'influence. Ce schéma visualise l'existence d'un milieu équilibré lié à chaque fonction. Ainsi, les conditions optimales déterminées pour une fonction (ex: la croissance) ne sont pas forcément celles d'une autre (ex: production de métabolites) (Davies, 1963; Deprez, 1977; Malard, 1981).

De nombreux auteurs insistent sur le fait que tous les facteurs jouant sur l'environnement d'un champignon agissent de façon interdépendante les uns des autres: loi des interactions, et que l'effet bénéfique d'un facteur n'est vrai que dans certaines conditions des autres facteurs: loi des facteurs limitants (Cochrane, 1958; Lilly, 1965a; Perlman, 1965; Deverall, 1965; Berry, 1975).

Il est nécessaire de préciser également qu'il est impossible d'étudier les différentes fonctions d'un champignon (croissance, sporulation, production de métabolite...) séparément. En effet, il existe toujours un lien étroit entre la croissance et les autres fonctions. Ainsi, avant toute sporulation ou production de métabolite par exemple, un certain seuil de croissance est nécessaire. Mais l'existence d'une relation entre deux fonctions autres que la croissance est également possible.

Quelques ouvrages traitent des besoins physiologiques des champignons. V.W.Cochrane (1958) dans son ouvrage sur la physiologie des champignons, la collection "the fungi" (Ainsworth et Sussman, 1965-1968) et la collection "the filamentous fungi" (Smith, Berry et Kristiansen, 1975-1983) résument la plupart des connaissances à ce sujet. Ces différents ouvrages ainsi que de nombreux travaux effectués au laboratoire de Cryptogamie de l'Université de Lille I (Deprez, 1977; Malard, 1981; Vidal, 1983; Dehorter, 1985), reprenant les travaux de Morquer (1931), Lacoste (1965) et Fayret (1975) permettent de classer les conditions culturelles influant sur la physiologie fongique. Ces conditions sont:

- d'ordre biologique: concernant l'origine de la souche, l'inoculum, sa constitution et son mode d'ensemencement...
- d'ordre physique: la température, le pH, la lumière et la pression osmotique,
- d'ordre nutritive: les sources de carbone, d'azote, d'éléments minéraux et de facteurs de croissance.

Rappelons que ces différentes exigences que présente un organisme fongique ne sont effectives qu'en conditions équilibrées en qualité et en quantité.

Les conditions particulières nécessaires à la production d'enzymes en général et des enzymes amylolytiques en particulier ont été traitées par différents auteurs (Davies, 1963; Fogarty et Kelly, 1980). Ainsi R.Davies, en 1963, résume ces données: exigence en un inducteur efficace pour les enzymes inductibles, un apport équilibré en éléments minéraux et en vitamines, une aération suffisante pour les organismes aérobies et des concentrations adéquates en carbone et azote qui peuvent stimuler ou inhiber d'autres types d'enzymes. L'amyloglucosidase étant un enzyme industriel, les besoins nutritionnels des souches fongiques la produisant ont été traités assez longuement. Ces souches appartiennent essentiellement au groupe des *Aspergillus niger* et des *Aspergillus oryzae*. Il est difficile de faire la part des besoins spécifiques à l'organisme de ceux consécutifs à la production enzymatique, ceux-ci étant liés. Les travaux sur la production d' α -glucosidase sont rares, aussi, peu d'information a été recueilli sur ce sujet. Les exigences spécifiques de la croissance et de la production d'amyloglucosidase et d' α -glucosidase par les souches fongiques seront présentées conjointement aux résultats concernant les besoins du *Thermoascus crustaceus* (souche P6).

Pour les champignons, les méthodes de culture ont une grande influence sur la productivité et le spectre des enzymes produits (Meyrath et Volavsek, 1975). La nécessité de connaître les effets de chaque condition culturelle sur la croissance et la production du complexe enzymatique étudié est donc nécessaire pour comprendre la physiologie de la production enzymatique de ce *Th.crustaceus* (souche P6).

II.- LES BESOINS NUTRITIONNELS DE LA CROISSANCE ET DE LA PRODUCTION D'ENZYME PAR LE GENRE THERMOASCUS

Le genre *Thermoascus* a été peu étudié et principalement en tant que genre thermophile: isolement de divers biotopes (Ogundero, 1979; Abdel-Hafez et al., 1983) et études cytologiques et morphologiques (Subramanian et Rajendran, 1980; Ellis, 1981b).

B.Flannigan et P.N.Sellars (1977) ont étudié la production d'amylase, β -glucosidase et β -xylosidase par des champignons thermophiles et thermotolérants. Ils citent la dégradation d'une solution amyliacée par les filtrats de culture de plusieurs *Th.crustaceus*.

Tous les autres travaux ont été effectués sur le *Th.aurantiacus*. Comme il a été vu dans le chapitre IV de la première partie, plusieurs enzymes intra et extracellulaires de *Th.aurantiacus* ont été étudiés: cellulases, xylanases, amylases, α -glucosidase, β -glucosidase, protéase.

La production de ces enzymes a été réalisée sur différents milieux pour des températures assez constantes de 45 à 50°C (Marcy et al., 1984; Kawamori et al., 1987). Mais la température de croissance optimale du *Th.aurantiacus* est donnée généralement entre 40 et 45°C pour ces mêmes milieux.

Le pH des milieux de production utilisés sont de pH 4.0 et de pH 5.0 pour la production de cellulases (Kawamori et al., 1987; Grajek, 1987), pour toutes les autres études les pH n'ont pas été mentionnés.

Un effet d'induction par le substrat sur la synthèse des différents enzymes renforce une production enzymatique de base (Feldman et al., 1982; Marcy et al., 1984). Ainsi pour M.D. Tendler et col. (1967) plusieurs souches de *Thermoascus* sp. (non déterminées) produisent des amylases uniquement en présence d'amidon. M.Kawamori et col. (1987) signalent que les cellulases de *Th.aurantiacus* sont produites de façon constitutionnelle mais que l'apport de polysaccharides en liaisons β -1-4 stimule cette production.

F.Obert (1978-1979) a suivi l'utilisation des substrats carbonés par le *Th.aurantiacus*, et A.Subrahmanyam (1980) la croissance et la sporulation de cette même espèce en fonction des sources de carbone et d'azote fournies. De plus, A.Subrahmanyam (1980) a étudié corrélativement les pH et les températures de croissance du *Th.aurantiacus*. La zone de pH optimale est située entre pH 4.2 et 6.3 en fonction de la température de croissance.

De ces deux études (Obert, 1978-1979; Subrahmanyam, 1980), il résulte que la croissance et la sporulation de *Th.aurantiacus* sont maximales avec le glucose. De plus, ce champignon utilise mieux les hexoses que les pentoses. Une croissance et une sporulation moyennes sont obtenues avec le dextran, l'amidon et le

maltose comme sources de carbone. Cette espèce ne croît que faiblement, sans sporuler, sur des substrats carbonés tels que: l'acide oxalique, l'acide citrique, l'acide tartrique, le saccharose, le lactose, le raffinose, l'inuline, le galactose et sur différents alcools, mannitol, sorbitol, dulcitol. De plus, le méthyl cellulose n'est utilisé par le *Th. aurantiacus* qu'après une période d'induction.

Des différentes sources d'azote testées pour cette espèce (Subrahmanyam, 1980), les meilleures, pour une bonne croissance, ont été l'urée, les nitrates de sodium, de potassium et de calcium, le tartrate d'ammonium et l'acide glutamique. Par contre, l'utilisation de nitrate de magnésium, de sulfate d'ammonium, d'acétate d'ammonium et de différents acides aminés (L-glycine, L-sérine, DL-sérine, DL-phénylalanine, DL-leucine, DL-alanine) n'induit qu'une faible croissance de ce champignon. Aucun développement fongique n'a été signalé par cet auteur avec le nitrate d'ammonium comme substrat azoté.

CONCLUSION

Comme le montrent les travaux cités dans ce chapitre, il est extrêmement difficile de séparer les nécessités de la production d'enzyme des besoins propres du développement de la souche productrice. D'autre part, il est pratiquement impossible d'appliquer directement à ce champignon les observations faites pour la même production par une souche d'une autre espèce. Enfin, la physiologie de l'espèce *Th. crustaceus*, et à fortiori de la souche P6, n'a été l'objet d'aucune publication, seule l'espèce voisine, *Th. aurantiacus* a été étudiée mais de façon assez superficielle. Il est donc indispensable de procéder à une étude systématique approfondie de l'effet que chaque facteur de l'environnement peut exercer sur la croissance et la production d'enzyme de notre champignon. C'est à ce prix seulement que nous pourrions envisager une amélioration des caractéristiques de notre souche en vue d'une éventuelle utilisation industrielle.

CHAPITRE II

MATERIEL ET METHODES



I.- LA SOUCHE, L'INOCULUM

La souche utilisée dans ces différentes études est la souche P6 du *Thermoascus crustaceus* présentée en fin de première partie.

La souche est entretenue dans des tubes 25/200 contenant du milieu Malt-Agar (p.40).

La culture est menée à 37°C pendant 10 jours puis conservée à température ambiante (20°C).

L'inoculum des cultures liquides provient d'une culture de 3 jours de la souche à 45°C sur milieu Malt-Agar ou sur milieu Sp.Th (p.80). La constitution de l'inoculum est réalisée de la façon décrite dans la première partie (p.40).

Les cultures liquides sont ensemencées par $20 \cdot 10^5$ conidies pour 100ml de milieu de culture.

II.- LES MILIEUX DE PRODUCTION DE LA SOUCHE ET LES CONDITIONS DE CULTURE

La production du complexe amyloglucosidasique est obtenue par la culture de la souche P6 sur 2 milieux principaux. Le milieu d'isolement, utilisé lors de la sélection des souches et le milieu P6, dérivé du milieu d'isolement:

- en diminuant sa teneur en $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2, 2\text{H}_2\text{O}$, pour éliminer le précipité qui apparaît à pH 5.8,

- en augmentant le taux d'azote, ce qui a souvent permis une amélioration de la production.

La composition de ce milieu est la suivante:

KH_2PO_4	1,6 g/l
$\text{MgSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$	0,5 g/l
$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2, 2\text{H}_2\text{O}$	0,2 g/l
$\text{MnSO}_4, \text{H}_2\text{O}$	0,02 g/l
$2\text{nSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$	0,02 g/l
$\text{CuSO}_4, 5\text{H}_2\text{O}$	0,01 g/l
MDO ₂	25,0 g/l
NH_4NO_3	2,8 g/l
pH 5.8	

A partir de ces 2 milieux de base, différentes modifications ont été faites portant sur l'un ou l'autre de leurs constituants ou par adjonction d'autres composés. Les conditions de cultures (température, pH...) seront précisées pour chaque expérience.

Les cultures ont été menées, dans ce chapitre, en fioles de Roux de 1 litre contenant 100 ml de milieu de culture. Ces fioles sont bouchées par du coton hydrophile.



La stérilisation des milieux a lieu à 110 °C pendant 20 minutes, l'eau distillée et le matériel (erlenmeyer vide, entonnoir, laine de verre) sont stérilisés à 120°C pendant 20 minutes.

Les cultures sont incubées dans des enceintes thermostatées à plus ou moins 0, 5°C. Les filtrats de culture sont récupérés par filtration sous vide. Les dosages et mesures sont faits généralement en cours (3 ou 4 jours) et en fin de culture (7 jours).

En fin de croissance, l'utilisation totale des polysaccharides en alpha 1-4 et alpha 1-6 est vérifiée par une auto-digestion, présentée par la suite, du filtrat de culture.

III.- LES MESURES

Chaque condition de culture a été réalisée trois fois et souvent vérifiée par une deuxième série. La signification des moyennes présentées des différentes mesures (croissance, activité enzymatique) est vérifiée par la comparaison du coefficient de variation des mesures ($C.V. = \text{écart-type} \times 100 / \text{moyenne}$) à celui d'un lot témoin.

1. mesure de la croissance

Elle a été suivie par la mesure du poids de matière sèche (PS) après filtration sous vide sur papier filtre sans cendre à filtration rapide (Prolabo, Derieux, n°111, bande rouge). Le PS est établi après perte de l'humidité du mycélium maintenu à 105°C jusqu'à poids constant. La croissance est exprimée ici en milligrammes pour 100 ml de culture (pour une fiole de Roux).

2. Mesure de l'activité amyloglucosidasique et de sa thermostabilité

L'activité du complexe amyloglucosidasique a été mesurée de la façon décrite dans la partie Matériels et Méthodes de la première partie (p.41). Cette activité a été dosée également à 75°C. Le rapport des activités (activité à 75°C/activité à 60°C) nous a permis d'appréhender la thermostabilité du complexe enzymatique et donc l'équilibre entre les 2 enzymes. La mesure de la survie enzymatique après incubation pendant 15 heures à 70°C, pH 4.5, sans substrat, a été parfois suivie.

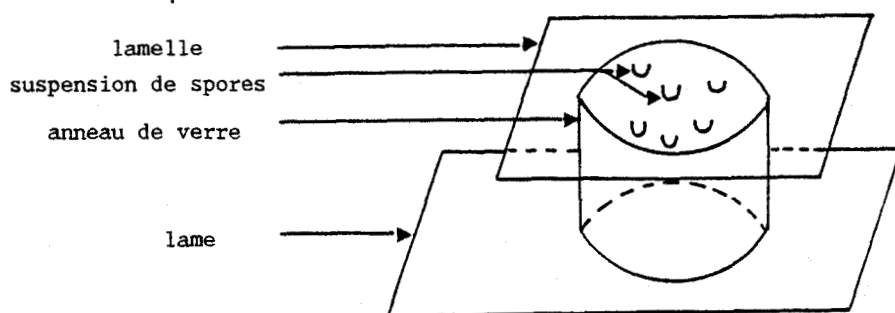
3. Vérification de l'utilisation totale du glucose et de ses polymères en alpha 1-4 et alpha 1-6 par la souche P6

Cette vérification est réalisée en fin de culture (7 jours) par le dosage, d'une part du taux de glucose dans le filtrat de culture, et d'autre part par celui résultant de l'incubation d'un aliquot du filtrat de culture à 60°C pendant une heure. Cette

incubation permet la dégradation des polymères de glucose restants. La comparaison de ces 2 teneurs en glucose permet de conclure sur l'utilisation de la source de carbone.

4. Mesure du taux de germination des conidies en cellule de Van Tieghem.

Le taux de germination (pourcentage de spores germées en fonction du nombre total de spores) des conidies du *Thermoascus crustaceus* (souche P6) a été mesuré par le comptage des conidies ayant émis un tube mycélien dans une suspension de spores incubée dans une cellule de Van Tieghem. La suspension de spores est réalisée dans un petit volume d'un milieu de culture.



5. Mesure de l'activité amyloglucosidase intracellulaire

Les cultures fongiques sont filtrées sous vide sur papier filtre (filtration rapide). Le mycélium est lavé abondamment par du tampon acétate 0.2 M pH 4.5, puis filtré à nouveau sous vide.

Le mycélium ainsi récupéré, additionné de 10 ml de tampon acétate (0.2 M, pH 4.5) à 4°C par gramme de poids frais de mycélium, est broyé à l'ultraturax pendant 30 secondes à 4°C.

Le mélange est centrifugé 30 minutes à 15.000 g et à 4°C. Le dosage de l'activité enzymatique est réalisé dans le surnageant selon la technique décrite précédemment.



CHAPITRE III

FACTEURS BIOLOGIQUES



Les caractéristiques de l'inoculum jouent un grand rôle dans la production enzymatique finale. Une cinétique de croissance et de production enzymatique d'une part et le dosage de l'activité amyloglucosidasiqne intracellulaire d'autre part ont permis un début de compréhension de la production des activités amyloglucosidasiques.

Une chute importante de la production enzymatique a été observée. Cette chute était due, en partie, à un repiquage inadéquat de la souche. Une réduction de cette chute a été obtenue par la constitution d'un stock de souches mères conservé à 20°C (absence de croissance). A partir de ce stock sont ensemencés les milieux utilisés pour la constitution des inoculums, cette méthode: conservation de la souche à un stade de dormance, est préconisée par V.W.Cochrane (1985). Toutefois, des variations subsistant une comparaison systématique à des conditions témoins a été réalisée pour chaque expérience. L'interprétation de cette variabilité dans le temps n'a pas été faite. Mais un retour à l'utilisation de la souche de départ (n'ayant subi que peu de repiquage) a permis une récupération presque totale de l'activité initiale. Dans tous les cas, le rapport des activités 75/60% est resté constant. La souche P6 utilisée dans les expériences suivantes provient d'une colonie unique isolée à partir d'une dilution de terre dans de l'eau physiologique et peut être assimilée à une souche monospore.

I.- CARACTERISTIQUES DE L'INOCULUM

Ces caractéristiques sont de différents ordres: âge de la culture, nature de l'inoculation (spores sexuées, asexuées ou mycélium), milieu de culture de la souche, taux d'ensemencement... Ces caractéristiques font partie intégrante des conditions agissant sur le métabolisme et la physiologie d'une culture fongique (Cochrane, 1958).

Quelques auteurs soulignent la nécessité de travailler avec une population homogène pour initialiser une culture (Cochrane, 1958; Meyrath et Suchanek, 1972; Dvadtsova et al., 1977; Hunt et Stieber, 1986). V.W.Cochrane (1958) insiste sur l'intérêt de standardiser les conditions d'obtention de l'inoculum (température, âge, milieu). Pour J.Meyrath et G.Suchanek (1972), la meilleure population standardisée, pour les organismes fongiques, est une suspension de spores asexuées (ex:conidies). Quelques essais, comparant les deux milieux de sporulation de *Th.crustaceus* P6 (milieu Malt-Agar et milieu SpTh), ont montré qu'aucune différence de croissance et de production enzymatique ne peut être imputée à l'utilisation de l'un ou l'autre de ces milieux pour la constitution des inoculums. Dans la suite de notre étude, nous utiliserons ces milieux indifféremment.

1. Age de l'inoculum

Comme il a été précisé dans la description de la souche P6, ce champignon a une croissance rapide, pour des températures élevées (37°C et 45°C). Aussi l'action de l'âge de l'inoculum a

FIGURE 13: Croissance (PS) et activité amyloglucosidasiq (A.AM dosée à 60°C) produite en fonction de l'âge de l'inoculum du *Th. crustaceus*. (milieu d'isolement. 45°C).

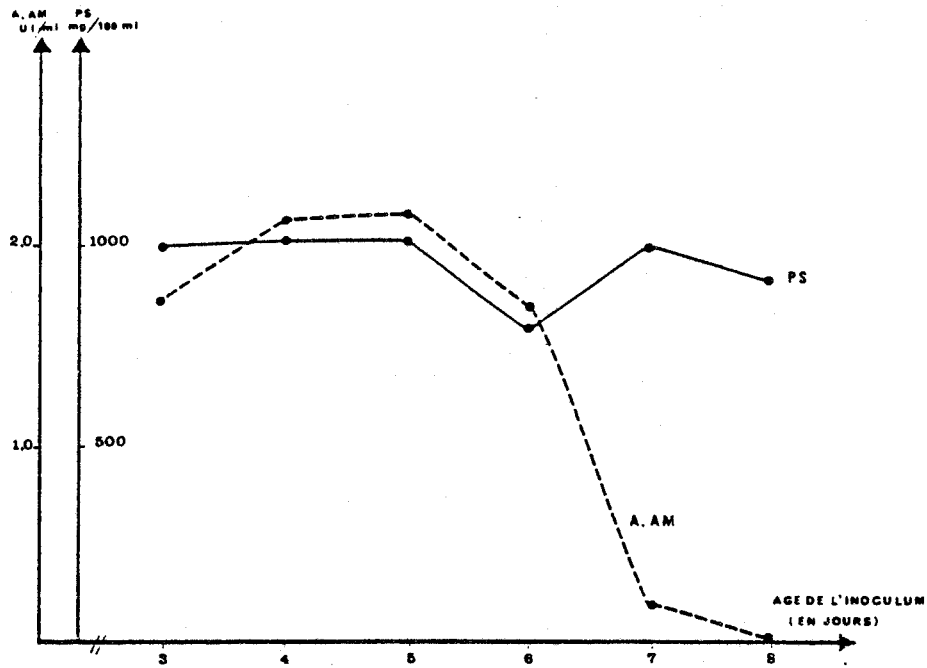
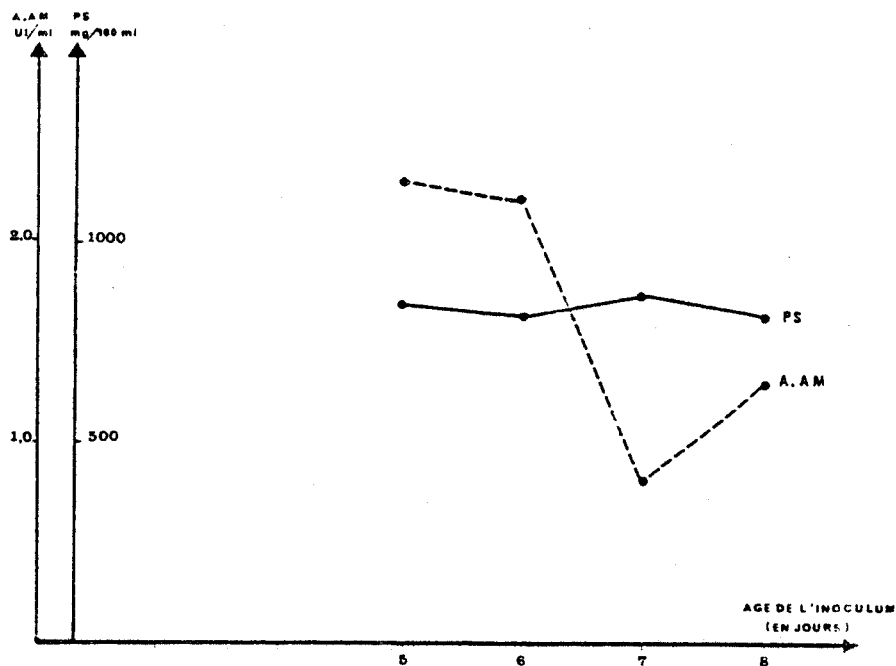


FIGURE 14: Croissance (PS) et activité amyloglucosidasiq (A.AM dosée à 60°C) produite en fonction de l'âge de l'inoculum du *Th. crustaceus*. (milieu P6. 37°C).



été étudiée dans une période assez courte (de 3 à 8 jours). Deux expériences similaires et non simultanées nous ont permis d'observer l'effet de l'âge de l'inoculum sur la croissance et la production du complexe amyloglucosidasique par le *Th. crustaceus*, souche P6.

a) conditions d'étude

L'inoculum provient d'une culture d'âge variable (3 à 8 jours) sur milieu Malt-Agar incubée à 45°C. Les cultures liquides sont incubées à 45°C pour le milieu d'isolement (fig.13) et à 37°C pour le milieu P6 (fig.14), le taux d'ensemencement étant de $20 \cdot 10^5$ conidies pour 100ml de milieu. Les mesures de croissance et d'activité enzymatique ont été réalisées après 7 jours de culture.

b) résultats

Le rapport des activités (%75/60) du complexe produit, est constant (80 à 90%) quel que soit l'âge de l'inoculum. L'observation des deux figures de résultats (13 et 14) nous montre que la croissance est peu touchée par l'âge des conidies constituant l'inoculum, tandis que la production enzymatique chute pour des conidies âgées de 7 et 8 jours.

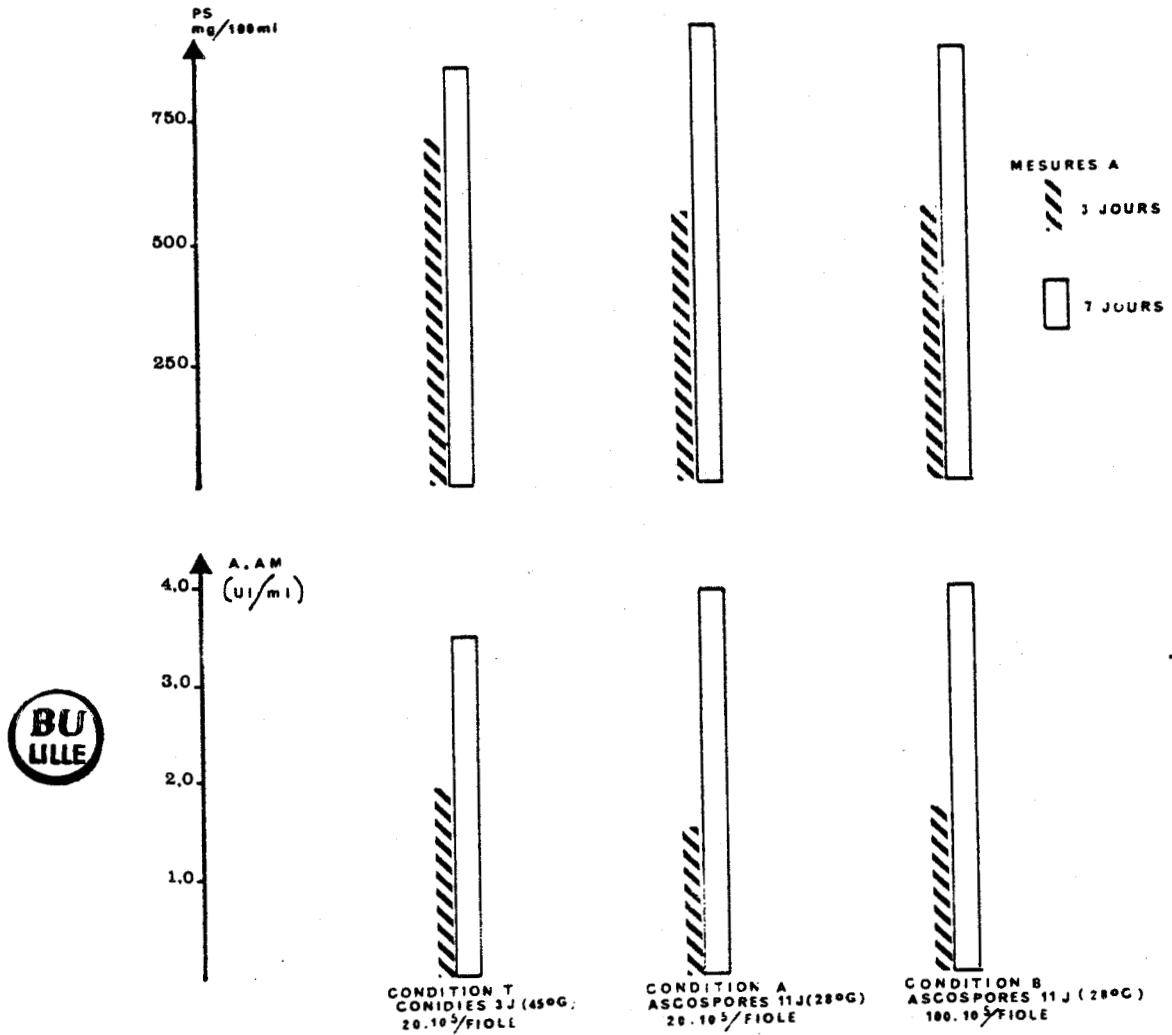
La chute de production enzymatique observée n'est donc pas due à une diminution de la masse mycélienne mais à une modification du métabolisme. J.Meyrath et G.Scuhanek (1972) précisent que le facteur inoculum peut influencer le métabolisme fongique plus profondément que celui des bactéries et des levures. Ils ont obtenu un phénomène semblable au nôtre pour la production d' α -amylase par un *Aspergillus oryzae*. E.A. Dvadtsova (1977) insiste, également, sur l'utilisation d'un inoculum jeune pour la production d'amyloglucosidase par un mutant d'*Aspergillus awamorii*.

2. Nature de l'inoculum

Nous n'avons réalisé aucun essai d'inoculum mycélien. La quantification d'un inoculum mycélien est très difficile à réaliser, et les filaments qui constituent le mycélium sont extrêmement hétérogènes: la zone apicale des hyphes est très jeune et active, alors que leurs parties les plus anciennes sont mortes. A.E.Kassim (1983) a montré que la production d'amyloglucosidase et d' α -glucosidase par *Aspergillus oryzae* était meilleure pour une culture ensemencée par un inoculum conidien que par une culture inoculée par du mycélium. Aussi nous n'avons réalisé aucun essai d'inoculum mycélium et nous nous sommes limités à comparer des inoculums conidiens et des inoculums d'ascospores.

Dans la première partie, nous avons vu qu'il était possible de sélectionner l'une ou l'autre des formes de dissémination en fonction de la température d'incubation utilisée. A 45°C, on obtient uniquement la phase conidienne, tandis qu'à 28°C seule la phase sexuée se développe, lentement.

FIGURE 15: Croissance (PS) et production de l'activité amyloglucosidasiq^{ue} (A.AM dosée à 60°C) en fonction de la nature de l'inoculum du *Th. crustaceus*. (mesures à 3 et à 7 jours. milieu P6. 37°C).



a) conditions d'étude

La croissance et la production du complexe enzymatique ont été comparées pour différentes cultures à 37°C, sur milieu P6 en fonction de la nature de l'inoculum (fig.15). Les conditions d'inoculation des fioles de Roux ont été les suivantes:

- condition témoin: $20 \cdot 10^5$ conidies provenant d'une culture de 3 jours sur milieu Malt-Agar, à 45°C
- condition A: $20 \cdot 10^5$ ascospores (culture de 11 jours à 28°C sur milieu Malt-Agar)
- condition B: $100 \cdot 10^5$ ascospores (culture de 11 jours à 28°C sur milieu Malt-Agar).

Les ascospores utilisées sont très jeunes, beaucoup d'asques n'étaient pas encore mûrs.

b) résultats (fig.15)

Tant pour la croissance (PS) que pour la production enzymatique (A.AM), on note un départ plus rapide (mesures à 3 jours) pour les cultures ensemencées par des conidies (condition T) que pour les cultures inoculées par des ascospores (conditions A et B). En fin de culture on observe, au contraire, un léger avantage pour la croissance et la production enzymatique dans les conditions A et B (ascospores). L'utilisation des ascospores en tant qu'inoculum semble donc induire un léger retard de la croissance et de la production enzymatique. Une cinétique de croissance dans ces conditions permettrait de préciser s'il s'agit d'un retard réel de croissance ou si la production maximale de biomasse est améliorée. Aucune différence significative n'est observée entre les conditions A et B, les taux d'ensemencement testés n'induisent pas de différence de croissance ni de production enzymatique, en culture statique.

En fin de compte, le faible avantage en fin de croissance de l'utilisation d'un inoculum constitué d'ascospores n'est pas suffisant pour justifier le remplacement de l'inoculum conidien. En effet, la période très longue d'obtention des ascospores reste un handicap. De plus, les conidies (provenant de mitose) offrent l'avantage d'être une population plus homogène que celle des ascospores (cellules ayant subies la méiose). Aussi les conidies seront gardées comme inoculum, pour la suite des expériences.

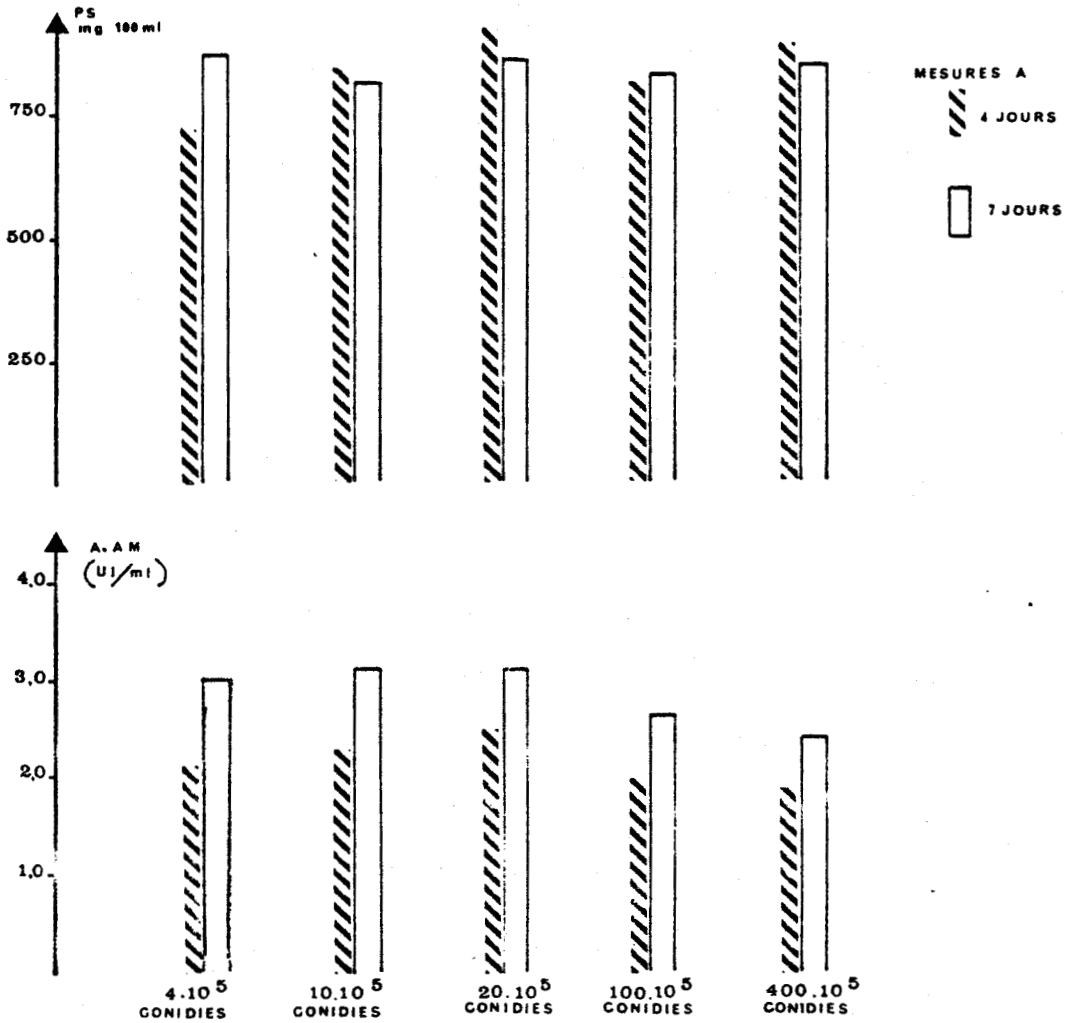
3.- Taux d'ensemencement

L'effet du taux d'ensemencement sur la croissance et sur la production du complexe enzymatique a été suivi, en système statique.

a) conditions d'étude

Différents taux d'incubation ont été essayés: $4 \cdot 10^5$; $10 \cdot 10^5$; $20 \cdot 10^5$; $100 \cdot 10^5$ et $400 \cdot 10^5$ conidies pour 100ml de culture. Les conidies utilisées provenant de culture âgée de 4 jours sur

FIGURE 16: Croissance (PS) et production de l'activité amyloglucosidasique (A.A.M dosée à 60°C) du *Th. crustaceus* (P6) en fonction du taux d'inoculation de 100 ml de milieu de culture. (mesures à 4 et à 7 jours. milieu P6. 37°C).



milieu Malt-Agar à 45°C. La croissance et la production du complexe enzymatique ont été mesurées pour des cultures de *Thermoascus crustaceus* (P6) sur milieu P6 à 37°C.

b) résultats (fig.16)

Assez peu de variations de production enzymatique et de croissance sont observées pour des taux d'ensemencement allant de 4.10^5 conidies à 400.10^5 conidies, en système statique.

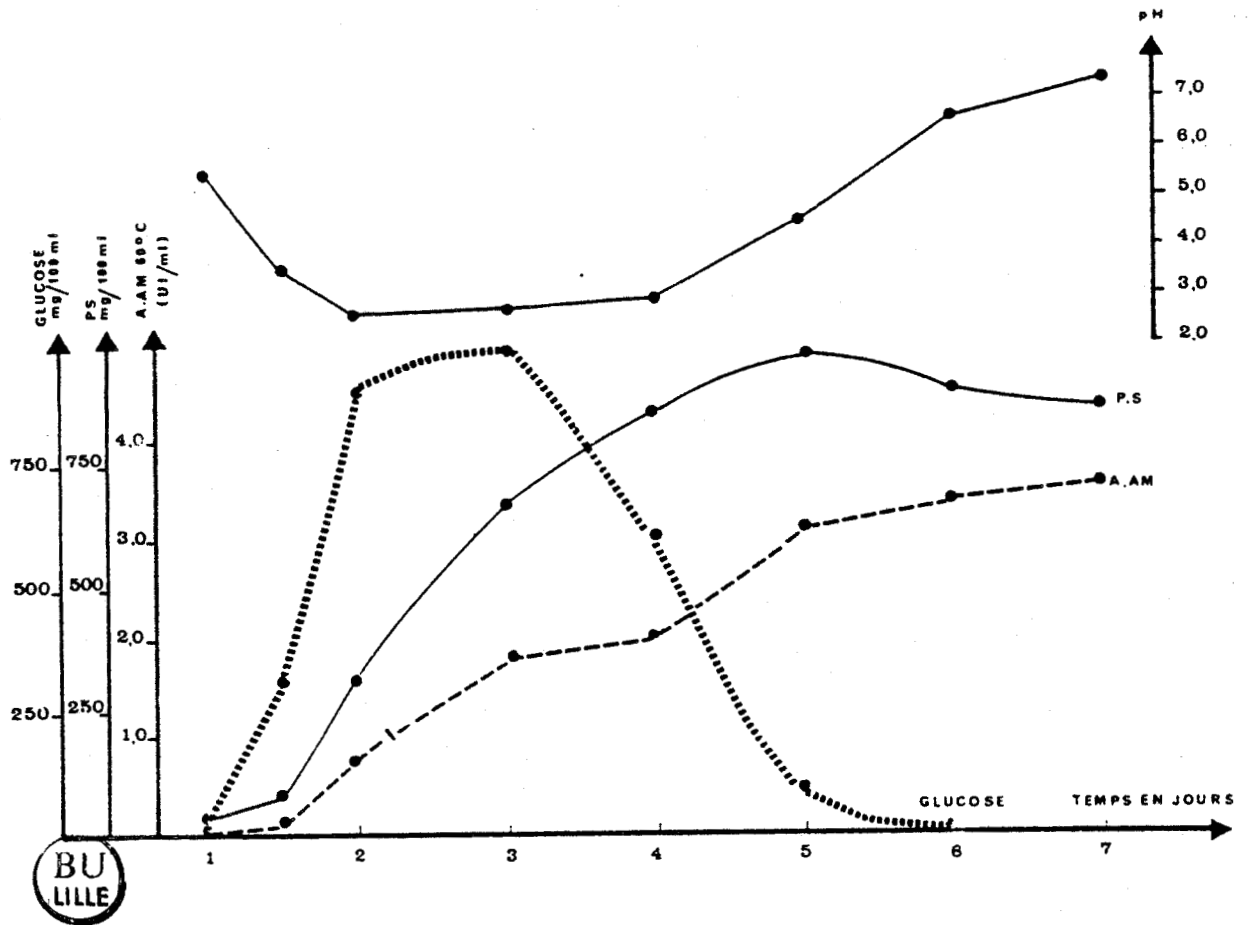
On note que pour des taux faibles (4.10^5) le démarrage de la croissance et de la production enzymatique est plus lent que celui obtenu avec des taux plus élevés d'incubation, mais que la production finale (à 7 jours) ne présente aucune différence notable. Pour des taux importants d'inoculum (100.10^5 et 400.10^5) malgré une croissance identique, une baisse de production enzymatique est effective aux différents moments observés (4 et 7 jours), par rapport aux résultats obtenus avec le taux habituel d'ensemencement (20.10^5 conidies par fiole). Ainsi le taux d'ensemencement optimale essayé pour la production enzymatique, en système statique, est de 20.10^5 conidies par fiole, la croissance n'étant pas touchée par la gamme d'ensemencement testée.

La légère baisse de production enzymatique observée pour des quantités élevées d'inoculum peut être expliquée par une limitation plus rapide du substrat disponible (évolution suivie par la mesure du taux de glucose dans le milieu). J.Meyrath et G.Volasvek (1975) constatent qu'en milieu liquide, la production d'amylase par *Aspergillus oryzae* est nettement meilleure avec des petits inoculums et que la taille de l'inoculum agit en interdépendance profonde avec les facteurs de l'environnement. Cet effet des taux importants d'inoculum a été, également, observé par V.V.Michelena et F.J.Castillo (1984) pour la production d' α -amylase par *Aspergillus foetidus*.

Conclusion

La croissance et la production du complexe enzymatique du *Thermoascus crustaceus* (souche P6) sont faiblement influencées par la nature et le taux de l'inoculum, dans les conditions testées. Par contre, l'âge des conidies utilisées pour constituer l'inoculum a une grande influence sur la production enzymatique. Aussi, pour limiter les variations non contrôlées dans les différentes expériences à venir, la réalisation de l'inoculum sera standardisée. En système statique, cet inoculum proviendra d'une culture de 3 à 4 jours à 45°C sur milieu Malt-Agar ou sur milieu Sp-Th, utilisé à un taux de 20.10^5 conidies pour 100ml de milieu de culture.

FIGURE 17: Cinétiques de croissance (PS), de production amyloglucosidasiq (A.A.M, à 60°C), du pH et du taux de glucose dans le milieu de culture P6, à 37°C du *Thermoascus crustaceus* souche P6.



II.- COMPORTEMENT DU THERMOASCUS CRUSTACEUS SUR LE MILIEU DE PRODUCTION P6

Ce comportement a été suivi par une double cinétique de croissance et de production enzymatique sur le milieu P6, à 37°C (fig.17) et par le dosage de l'activité amyloglucosidasique intracellulaire (tableaux 19 et 20).

1.- Cinétiques de croissance et de production enzymatique

Cette étude du développement du *Thermoascus crustaceus* (souche P6) a été faite pour comprendre les modifications du champignon et du milieu conjointement. La figure 17 résume les différentes étapes de ces cinétiques.

a) la croissance

L'observation de cette cinétique nous montre l'existence de 4 phases de croissance de notre champignon.

Une phase de latence au cours de laquelle aucune croissance n'est mesurée (de 0 à 36h) mais où la division cellulaire est très active. La phase exponentielle de croissance suit cette première phase et a lieu, dans les conditions étudiées, entre 36h et 4 jours. La phase stationnaire est peu marquée ici, et se situe entre 4 jours et 5 à 6 jours. La dernière phase, ou phase d'autolyse, est visualisée par la chute du poids sec. L'importance de cette phase est fonction des conditions nutritives et physico-chimiques (Cochrane, 1958). De plus, d'après V.W.Cochrane (1958) dans un milieu bien équilibré, la phase d'autolyse s'installe dès l'utilisation totale en carbohydrates. Ce qui semble être le cas dans cette étude, tout le maltodextrine (MDO₂) est dégradé en glucose qui est lui-même totalement utilisé, la teneur en glucose du filtrat après 5 jours de culture étant proche de zéro.

b) Le substrat carboné: taux de glucose dans le filtrat

Le taux de glucose, provenant de l'hydrolyse des maltodextrines, augmente d'abord fortement, par l'action de l'activité amyloglucosidasique, pour atteindre son taux maximal entre 2 et 3 jours de culture. Ce taux diminue ensuite rapidement en raison de l'absorption de ce glucide par les cellules fongiques, en phase exponentielle de croissance.

c) La production du complexe amyloglucosidasique

La production enzymatique a lieu en 2 temps plus ou moins marqués sur ce milieu. Une première phase se situe entre 2 et 3 jours de croissance (taux de glucose maximum dans le milieu), suivie par un léger ralentissement de la production entre 3 et 4 jours. On constate une accélération de la production en fin de phase exponentielle de croissance soit entre les 4^e et 5^e jours. Cette deuxième vague de production est suivie par une période de synthèse ralentie, durant les phases de croissance nulle et de lyse mycélienne.

TABLEAU 19: Activités amyloglucosidasiques extracellulaire et intracellulaire produites et rapport de ces activités, en fonction de l'âge de la culture. (milieu P6. 37°C).

	Activité extracellulaire totale (UI/100ml)			Activité intracellulaire totale (UI)			Pourcentage intra/extra	
	dosée à 60°C	dosée à 75°C	% 75/60	dosée à 60°C	dosée à 75°C	% 75/60	dosée à 60°C	dosée à 75°C
2 Jours	55,2	40,0	72%	5,3	5,4	102%	9,6	13,5
3 Jours	182,1	148,7	82%	9,4	9,6	103%	5,1	6,5
4 Jours	220,9	209,6	95%	29,3	32,0	110%	13,3	15,3
7 Jours	381,5	309,8	81%	49,3	45,0	94%	12,9	14,5

TABLEAU 20: Activités amyloglucosidasiques extracellulaire et intracellulaire produites et rapport de ces activités en fonction de la nature de la source de carbone.



	Activité extracellulaire totale (UI/100ml)			Activité intracellulaire totale (UI)			Pourcentage intra/extra		PS (mg/100ml)	Activité intracellulaire PS (UI/mg PS)	
	dosée à 60°C	dosée à 75°C	% 75/60	dosée à 60°C	dosée à 75°C	% 75/60	dosée à 60°C	dosée à 75°C		dosée à 60°C	dosée à 75°C
Source de Carbone: MDC_2	472,2	370,4	78%	61,5	52,4	85%	13,0	14,1	1051	0,059	0,050
Source de Carbone: Acétate de Sodium	4,1	2,6	63%	0,0	0,0	-	0,0	0,0	280	0,000	0,000
Source de Carbone: Acide Succinique	15,4	8,9	58%	4,1	2,9	70%	26,6	32,6	291	0,014	0,010

NB: Le milieu de base est le milieu P6, où le taux de carbone est maintenu à 10g/l.
La culture a été réalisée en fioles de Roux, à 37°C pendant 7 jours.

d) Cinétique du pH de la culture

Le pH du milieu de culture subit une chute rapide jusqu'à pH 2.6 à 2 jours. Le pH reste acide jusqu'au 4^e jour de culture où il commence à remonter. Cette chute de pH est expliquée par de nombreux auteurs par une assimilation très rapide du NH_4 (avant 2 jours dans notre cas) permettant la formation d'acide nitrique l'absorption plus tardive du nitrate induisant la remontée de pH (Cochrane, 1958; Lilly, 1965a; Nicholas, 1965; Ross et Bremner, 1971). Une mesure des teneurs en ions nitrate et ammonium dans les filtrats de culture permettrait de confirmer ou non cette hypothèse.

Une recherche d'acides organiques a également été faite dans les filtrats de culture. Mais la présence, aux différents âges de cultures, de faibles traces d'acides organiques ne permet pas de leur imputer la responsabilité des variations de pH.

Conclusion

Cette expérience nous a permis de suivre les différents stades de développement fongique de la souche P6 et des modifications que celui-ci entraîne sur certaines composantes du milieu.

Pour la suite des expériences, les mesures seront souvent réalisées aux 4^e et 7^e jours de culture qui correspondent, sur ce milieu, aux deux phases de production enzymatique. Il est évident que la modification des conditions culturelles entraînera des changements dans ces différentes cinétiques. L'idéal serait, pour chaque condition, de suivre ces données journalièrement, mais de nombreuses informations peuvent être utilisées à partir de 2 mesures ponctuelles.

2.- Mesure de l'activité amyloglucosidasique intracellulaire

Il était intéressant également, de savoir si l'enzyme était excrétée régulièrement ou si le champignon stockait une partie de l'enzyme dans des cellules pour le libérer par la suite.

Nous avons donc dosé le complexe enzymatique intracellulaire au cours du développement mycélien. Cette étude a été réalisée d'une part sur milieu P6 et d'autre part sur des milieux où la source de carbone a été modifiée induisant une faible production enzymatique, la température de culture étant fixée à 37°C.

a) Activité enzymatique intracellulaire du *Thermoascus crustaceus* (souche P6) cultivé sur milieu P6

Le tableau 19 résume les résultats de cette expérience. Le pourcentage des activités intracellulaires par rapport aux activités extracellulaires varie peu au cours de la croissance. Ce taux est légèrement plus bas à 3 jours de culture (fin de la première phase de production), mais remonte dès 4 jours de

culture. L'activité intracellulaire représente de 10% à 15% de l'activité extracellulaire. Ce taux assez constant indique qu'il existe un équilibre entre les taux d'activités intracellulaires et extracellulaires. De plus, il faut noter que le $\frac{75}{60}$ est supérieur dans la cellule, ce qui signifie que le rapport α -glucosidase/amyloglucosidase y est plus élevé, et que le transfert de l' α -glucosidase est plus lent à travers la membrane que celui de l'amyloglucosidase. P.Malard (1981) a également mesuré le rapport des activités α -amylasiques intra et extracellulaire de l'*Aspergillus oryzae* et a obtenu une valeur beaucoup plus faible que la notre (1 à 2%), le transport de nos enzymes apparaît donc beaucoup moins efficace, le mode de transfert de ces protéines restant à envisager.

b) Activité enzymatique intracellulaire du
Thermoascus crustaceus (souche P6) cultivé
sur plusieurs sources de carbone

Des essais de mesure de l'activité intracellulaire ont été réalisés avec des sources de carbone défavorables à la production enzymatique, en comparaison avec le milieu P6 (source de carbone: MD02).

Le tableau 20 présente les conditions étudiées et les résultats obtenus pour cette expérience complémentaire. Les résultats de ce tableau vérifient que les baisses de production enzymatique, observées pour les sources de carbone testées (acétate de sodium et acide succinique) ne sont pas dues à un stockage de l'enzyme dans les cellules. De plus, ils vérifient que ce résultat n'est pas uniquement lié à une diminution de la production de biomasse.

Conclusion

De ces deux expériences, nous pourrions déduire que les différences de productions enzymatiques ne sont pas dues à un stockage de l'enzyme dans les cellules mycéliennes mais proviennent d'une baisse de la synthèse du complexe.

CONCLUSION

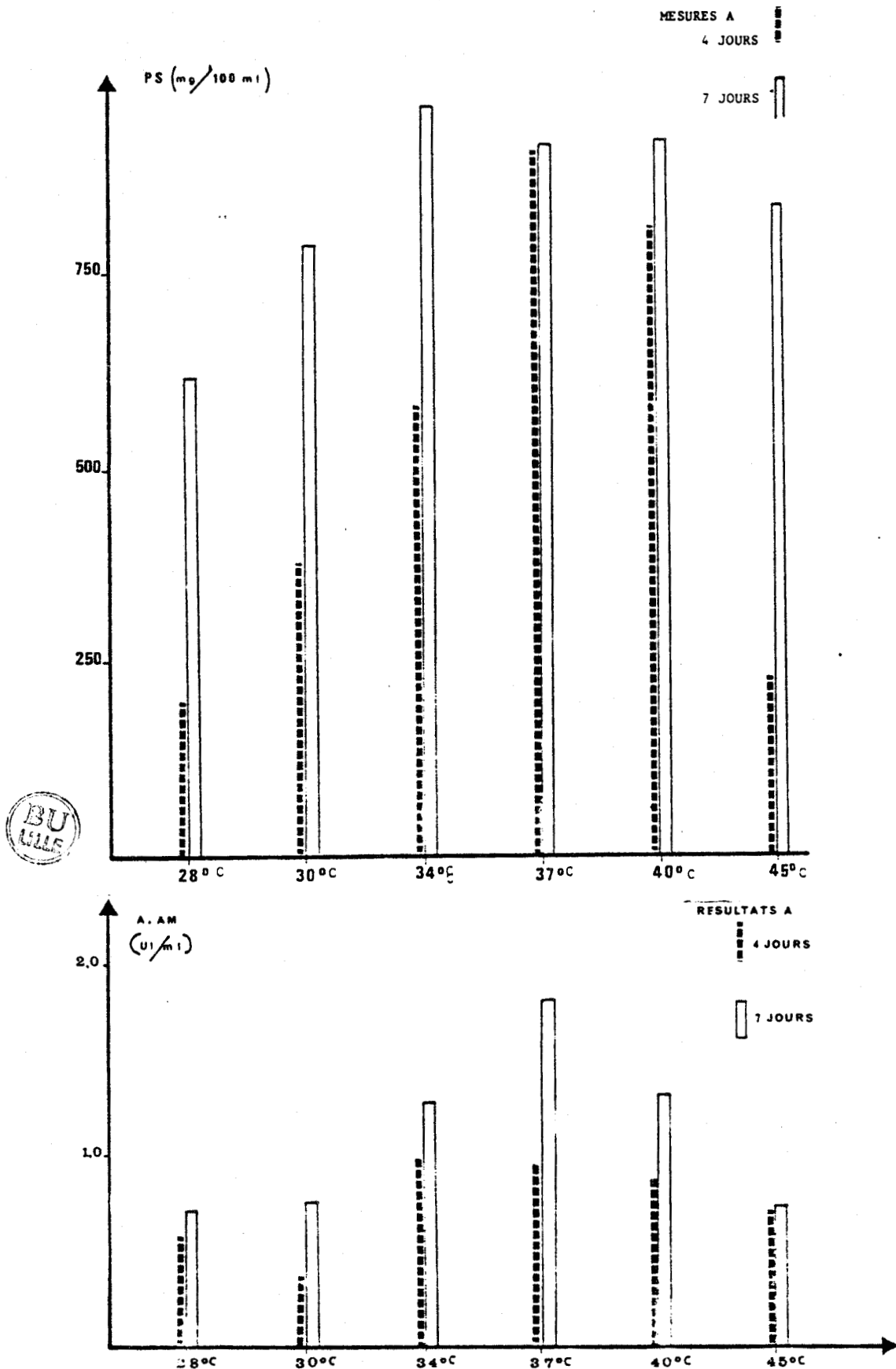
Ces premiers résultats nous ont permis de suivre l'effet de l'inoculum sur la croissance et la production enzymatique du *Thermoascus crustaceus* (souche P6). Ils ont confirmé le fait que le facteur "Inoculum" exerce une grande influence sur le métabolisme de notre champignon et principalement sur le métabolisme lié à la synthèse des enzymes étudiés. La compréhension de cet effet reste à déterminer et présente un grand intérêt pour comprendre les mécanismes liés à la synthèse de ces enzymes amyloglucosidase et α -glucosidase.

De plus, les cinétiques de croissance et de production enzymatique de ce champignon ainsi que les mesures d'activité intracellulaire nous ont confirmé qu'il s'agit bien d'un enzyme extracellulaire libéré régulièrement dans le milieu de culture.

CHAPITRE IV

CONDITIONS PHYSICO-CHIMIQUES DE LA CROISSANCE ET DE LA
PRODUCTION ENZYMATIQUE DU THERMOASCUS CRUSTACEUS (SOUCHE P6)

FIGURE 18: Croissance (PS) et production de l'activité amyloglucosidase (A.A.M, à 60°C) en fonction de la température d'incubation des cultures. (mesures à 4 et à 7 jours. Milieu de culture: milieu d'isolement modifié.)



Sous ce titre nous rassemblerons les effets que la lumière, la température et le pH du milieu de culture exercent sur l'activité de notre champignon.

La lumière est un facteur très influent sur le métabolisme fongique, entre autre sur le métabolisme oxydatif par photooxydation, mais actuellement son effet sur la production d'enzymes amylolytiques n'a jamais été étudié, aussi n'en parlerons nous pas dans ce travail.

Les rôles de la température et du pH de début de culture ont été suivis, en système statique.

I.- LA TEMPERATURE

Ce facteur joue un grand rôle dans la vie des micro-organismes. Il agit sur la croissance, la germination des spores, la reproduction et a un effet majeur sur toutes les activités métaboliques cellulaires (Cochrane, 1958; Deverall, 1965). Chaque microorganisme, ne bénéficiant pas d'une régulation thermique interne peut être caractérisé par des températures cardinales: minimale, optimale et maximale (Deverall, 1965).

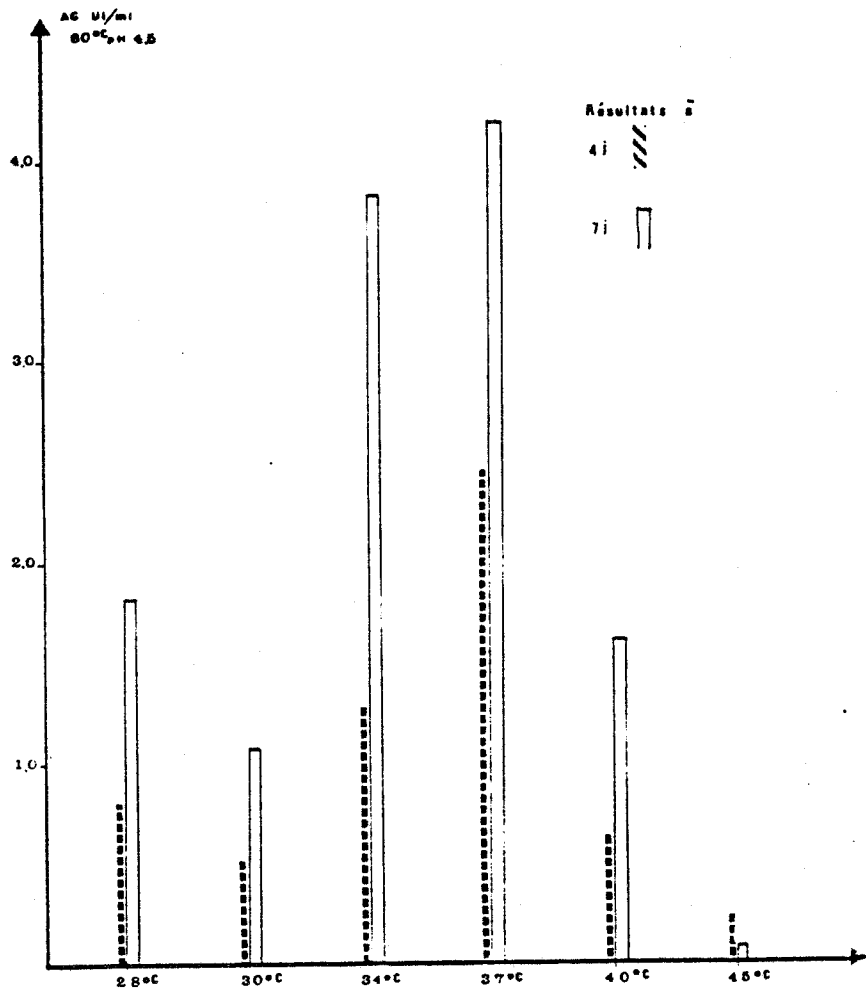
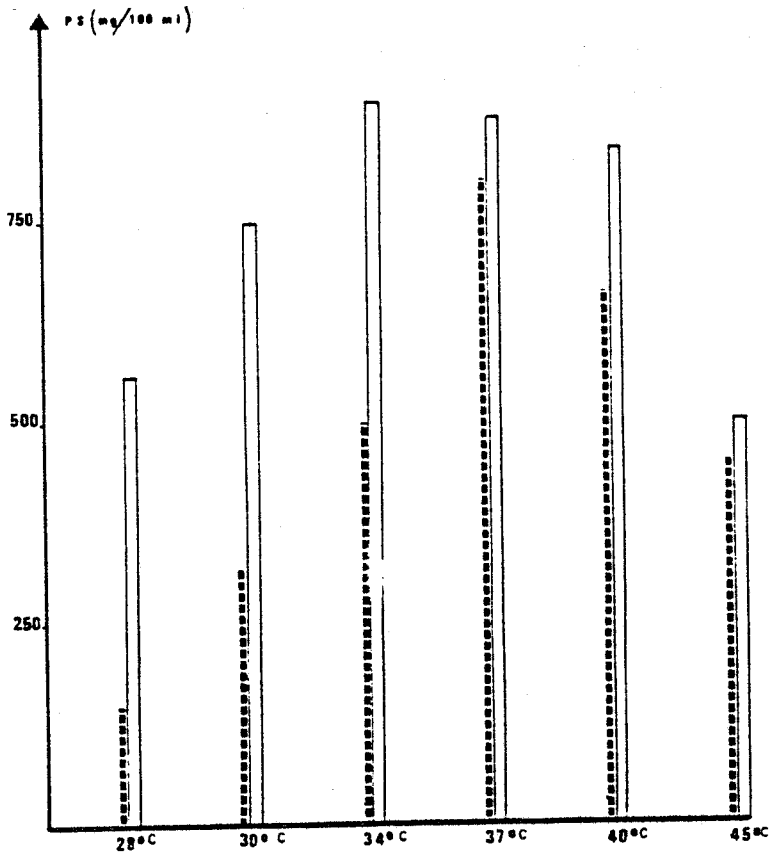
Ces températures peuvent varier en fonction de la réponse étudiée. Ainsi la température optimale de croissance (PS maximum) n'est pas obligatoirement celle de la sexualisation ou encore celle de la production enzymatique (Cochrane, 1958; Deverall, 1965; Estrela et al., 1982). Par exemple, le *Thermoascus aurantiacus* a une température optimale de croissance située entre 40°C et 45°C alors qu'il produit un maximum de protéase à 50°C (Marcy et al., 1984). De plus la notion de température optimale est peu claire, en effet elle dépend des conditions dans lesquelles elle a été étudiée, ainsi il n'existe pas de température optimale unique mais des températures optimales valables pour des conditions spécifiques de durée de culture, de milieu, de méthode de mesure et de réponse choisies (Cochrane, 1958). Ce facteur agit, entre autres, sur l'efficacité du métabolisme des substrats carboné et azoté (Perlman, 1965).

Dans la première partie, les courbes de croissance (suivie par le diamètre de croissance en boîte de Pétri, sur le milieu Malt-Agar) en fonction de la température d'incubation ont été définies pour la souche P6 du *Th. crustaceus*. La température optimale de vitesse de croissance (dans ces conditions) est comprise entre 37°C et 40°C.

1.- Méthodes d'étude

Nous avons examiné l'effet de la température sur la croissance et sur la production enzymatique par le champignon dans deux milieux de culture: le milieu d'isolement légèrement modifié (milieu d'isolement où la teneur en $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ est réduit de 1,2 g/l à 0,2 g/l) et le milieu P6. Ces deux milieux ne

FIGURE 19: Croissance (PS) et production de l'activité amyloglucosidase (A.A.M, à 60°C) en fonction de la température d'incubation des cultures. (mesures à 4 et à 7 jours. milieu de culture: milieu P6.)



diffèrent donc que par le taux de nitrate d'ammonium. Chaque fiole de Roux a été ensemencée avec 20.10^5 conidies provenant d'une culture âgée de 4 jours sur milieu Malt-Agar à 45°C.

Les cultures ont été incubées dans des étuves à l'obscurité thermostatées à + ou - 0,5°C. Certains auteurs préconisent l'utilisation de température élevée de culture pour la production d'enzyme plus thermostable (Isono, 1970; Sidler et Zuber, 1972; Crisan, 1973). Aussi, avons-nous vérifié la thermostabilité du complexe produit aux différentes températures par la mesure du pourcentage de survie enzymatique dosée à 60°C et à 75°C après incubation du filtrat de culture pendant 15 heures à 70°C pH 4.5, sans substrat.

2.- Résultats

Les résultats de croissance et de production enzymatique présentés ici correspondent à des mesures effectuées au 4^e et 7^e jours. Par contre, les résultats de survie enzymatique ont été présentés pour différents jours de culture, à différentes températures.

a) Croissance et production enzymatique

La figure 18 représente les résultats des cultures sur milieu d'isolement modifié, et la figure 19 ceux des cultures sur milieu P6.

L'observation de ces deux figures nous montrent que la croissance à 4 jours et la production enzymatique à 4 et 7 jours, sont nettement meilleures par des cultures à 37°C, tandis que l'avantage de cette température pour la croissance à 7 jours est moins marquée.

Pour une température de croissance de 30°C, la production enzymatique est inférieure à celle observée à 28°C, malgré une croissance meilleure à 30°C qu'à 28°C. Une hypothèse selon laquelle 2 mécanismes métaboliques agiraient sur cette production enzymatique demanderait à être vérifiée avant de permettre toute explication.

Le milieu P6 induit une meilleure production pour la plupart des températures étudiées sauf à 45°C, où le milieu d'isolement modifié permet une meilleure production. En effet, la température a une action sur l'efficacité d'assimilation et d'utilisation des sources carbonées (Perlman, 1965). Ceci souligne le fait que l'optimum d'un facteur est fonction des autres paramètres et montre les limites de l'étude unifactorielle. La comparaison des valeurs de biomasse et de production enzymatique montre que le meilleur rapport production d'enzyme/unité de biomasse est obtenue, une fois encore à 37°C.

TABLEAU 21: Survie enzymatique de l'activité amyloglucosidasique (à 60°C et à 75°C) après incubation du filtrat de culture à 70°C et pH 4.5 pendant 15 heures sans substrat, en fonction de la température de culture. (exprimée en pourcentage. milieu 1: milieu d'isolement modifié. milieu 2: milieu P6).

température n° milieu	2J		3J		4J		5J		6J		7J		zone de % de survie à 60°C	zone de % de survie à 75°C
	60°C	75°C	60°C	75°C	60°C	75°C	60°C	75°C	60°C	75°C	60°C	75°C		
25°C milieu 1			34										34% - 34%	
28°C milieu 1			48	66	36	64	41	60	44	72	57	99	36% - 57%	60% - 99%
30°C milieu 1			38	75	35	87	81	79	56	83	48	85	35% - 81%	75% - 87%
34°C milieu 1			49	63	48	81							48% - 49%	63% - 81%
37°C milieu 1	25	71			27	57					27	53	25% - 27%	53% - 71%
37°C milieu 2	37	56			33	66			34	60			33% - 37%	60% - 66%
45°C milieu 1			50	77	54	80	45	63	31	59	31	60	31% - 54%	59% - 80%
45°C milieu 2	45	75							52	71			48% - 52%	71% - 76%
50°C milieu 1			76		58								58% - 76%	

BU
LILLE

b) Etude de la thermostabilité du complexe en fonction de la température de croissance du *Thermoascus crustaceus* (souche P6)

Le tableau 21 résume les valeurs de thermostabilité obtenue aux différentes températures de culture. Dans les conditions étudiées, les pourcentages de survie enzymatique du complexe amyloglucosidasique (tableau 21) ne montrent aucune évolution significative en fonction de la température de culture. L'amélioration de la thermostabilité par une augmentation de la température de croissance ne semble pas vérifiée dans le cas de la souche P6 ce qui concorde avec l'opinion d'autres auteurs (Miller et Sheperd, 1972; Griffith et Sundaram, 1973; Yutani et al., 1973; Prasad et Maheswari, 1978). Il ne semble donc pas qu'il y ait stimulation de l'un ou l'autre des enzymes (α -glucosidase ou amyloglucosidase) constituant le complexe enzymatique (tableaux 21). La température de synthèse optimale des 2 enzymes est apparemment la même.

Conclusion

En résumé de cette étude, nous pouvons noter que:

- 37°C est la température optimale de croissance, de production enzymatique et de production spécifique,
- la thermostabilité du complexe ne varie pas en fonction de la température de croissance,
- la production enzymatique est plus faible à 30°C qu'à 28°C et 34°C. Une étude de cette observation serait intéressante à approfondir.

Le rôle de la température de culture est essentiel pour une bonne croissance et une bonne production enzymatique. Dans le cas du *Th. crustaceus* (P6), les optimums de température, de croissance et de production enzymatique sont proches (37°C).

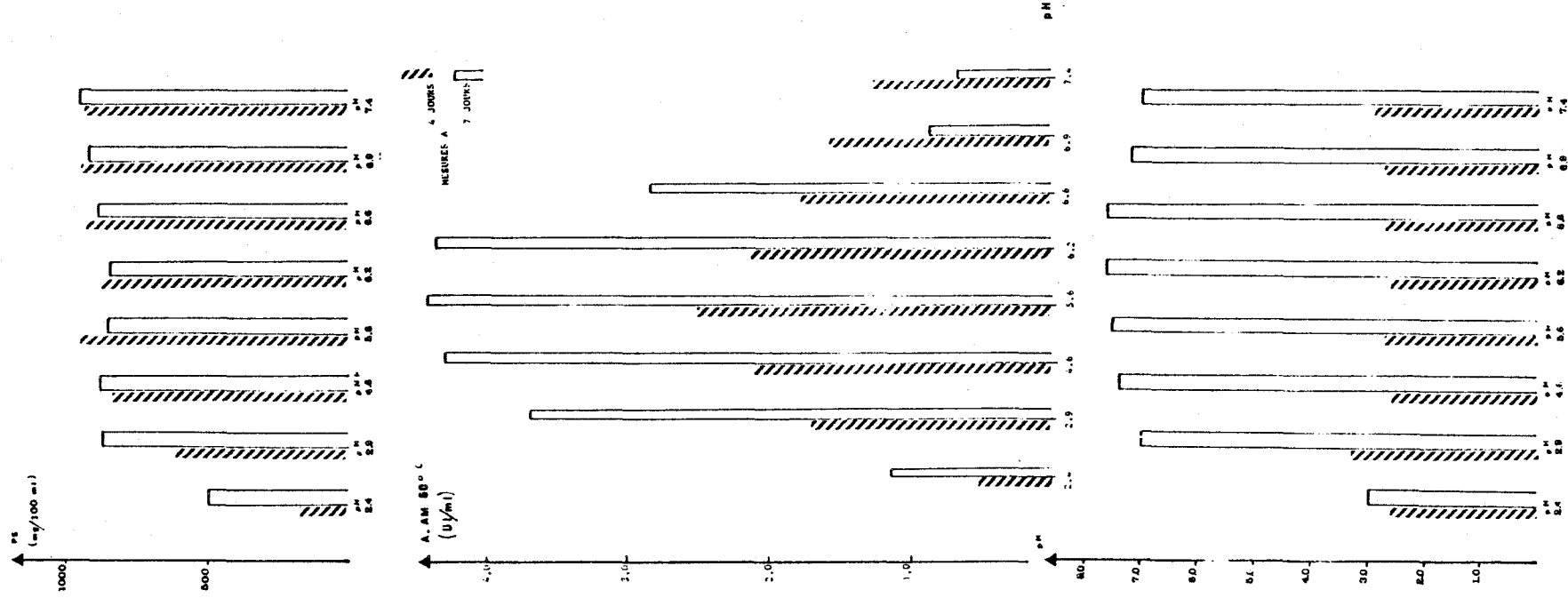
II.- ACTION DU PH INITIAL DE CULTURE

Le pH, facteur physico-chimique, agit par différents biais sur la croissance et sur la production de métabolites (Cochrane, 1958; Berry, 1975).

Il modifie la solubilité, et donc la disponibilité, des éléments minéraux par l'effet de la précipitation (Cochrane, 1958; Berry, 1975). Il modifie la perméabilité membranaire (prise de minéraux, d'acides organiques, de vitamines). Il joue sur les équilibres enzymatiques intra, extracellulaire et membranaire (Berry, 1975). Le pH optimal pour la croissance ne l'est pas obligatoirement pour la sexualisation ou la production de métabolites primaires et secondaires.

En règle générale, les pH extrêmes ne sont pas favorables à la croissance et à des productions enzymatiques (Cochrane, 1958). Le pH du milieu de culture, par l'effet du développement fongique, est très souvent sujet à variation par l'absorption

FIGURE 20: Croissance (PS) et production d'activité amyloglucosidase (A.A.M., à 60°C) et pH du filtrat de culture en fonction du pH initial de la culture. (mesures à 4 et à 7 jours. milieu P6. 37°C)



sélective ou la sécrétion de certains ions, acides organiques (Berry, 1975).

L.L. Barton et col., (1969) étudiant la production d'amyloglucosidase d'*A.niger* et d'*A.oryzae*, précisent qu'un pH initial situé entre 2.0 et 6.0 n'influence pas la production enzymatique, si la source d'azote est minérale (NH_4Cl), par contre, une influence est observée avec une source d'azote organique. Pour W.M. Fogarty et C.T. Kelly (1980) un pH neutre (7.0) est plus compatible avec la production de l' α -amylase chez les *Aspergillus* du groupe *Niger*. R. De Mot et col., (1984) font remarquer que le pH initial de culture affecte fortement la synthèse d'amylase par des levures dégradant l'amidon. Pour A.E.Kassim (1983) le pH initial optimal est de 5.0 pour la production d'amyloglucosidase et d' α -glucosidase par *A.oryzae*.

Les pH de production enzymatique du *Thermoascus aurantiacus* indiqués par les auteurs, sont assez bas pH 4.0 (Kawamori et al., 1987), pH 5.0 (Grajek, 1987).

1.- Méthodes d'étude

Notre étude de l'action du pH sur la production d'activités amyloglucosidasiques a été faite pour des cultures en fioles de Rouxensemencées par $20 \cdot 10^5$ conidies provenant de cultures âgées de 4 à 5 jours sur milieu Malt-Agar à 45°C. Le milieu de culture utilisé a été le milieu P6. L'incubation des cultures liquides a été pratiquée à 37°C. L'équilibrage du pH a été réalisé par l'addition de NaOH 1M ou de HCl 1M. A pH élevé (>6.0) il se forme un précipité d'autant plus intense que le pH est élevé.

2.- Résultats

La figure 20 résume les variations de croissance d'activité amyloglucosidasique produite et de pH mesurées à 4 et 7 jours) en fonction de celles du pH de début de culture. Grâce à l'observation de cette figure, on note l'existence d'une zone de production maximale comprise entre pH 2.9 et 6.2, le maximum se situant entre pH 4.6 et 6.2. La chute de production observée au pH bas (<2.9) est expliquée par un ralentissement de la croissance. A pH élevé, la croissance est comparable à celle obtenue pour des pH moyens et ne peut expliquer cette chute de production. Le pH reste bas dans le seul cas où la croissance et la production sont ralenties simultanément soit pH 2.4. Dans tous les autres cas, le pH est acide après 4 jours (pH 2.6 à 3.2) puis remonte entre pH 7.0 et 7.6. au 7^e jour de culture.

Comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent, la chute de pH observée entre 2 et 4 jours de culture est souvent expliquée par l'absorption préférentielle du NH_4 avant le NO_3 . Aussi une question se pose: pourquoi une culture ayant un pH bas en début de culture ne peut permettre de bonnes croissance et production enzymatique alors que toutes les autres cultures atteignent cette zone basse de pH pendant leur développement? J.J.Meyrath et G.Volavsek (1975) indiquent que les conditions initiales de

culture sont très importantes pour la manifestation de certaines propriétés dans des phases plus avancées de culture, ce qui semble le cas pour les pH bas et neutres dans cette expérience.

Pour expliquer la faible croissance observée à des pH bas, nous avons envisagé l'hypothèse qu'elle était due à une mauvaise germination des spores. Pour vérifier ce postulat nous avons mesuré le taux de germination des conidies en cellule de Van Thieghem en fonction du pH du milieu de culture. Des essais à pH 2.4, pH 5.6 et pH 7.4 ne montrent aucune différence significative du pourcentage de germination (de l'ordre de 20% à 37°C en 4 heures 30 d'incubation). Ce pH bas ne semble donc pas agir sur le taux de germination des conidies mais plus vraisemblablement, à posteriori, en déstabilisant les membranes. Les pH élevés agissent uniquement sur le métabolisme contrôlant la production du complexe enzymatique étudié.

Cette étude ne visant qu'à cerner le pH optimum pour la production d'enzyme, nous n'avons pas tenté d'expliquer l'effet de ces pH dans les différents cas.

CONCLUSION

En conclusion de cette étude des facteurs physiques, nous pouvons observer que les températures et pH optimums ont été cernés pour la croissance d'une part et la production du complexe enzymatique d'autre part.

Ces optimums sont situés entre 37°C et 40°C et pH 4,6 et 7,4 pour la croissance et entre 34°C et 40°C et pH 2,9 à 6,9 pour la production enzymatique. On peut remarquer que les plages de pH permettant une réponse maximale sont larges, à l'inverse de ce qui est observé pour les températures.

Différents problèmes ont été soulevés. Ainsi l'explication de la production enzymatique plus faible à 30°C qu'à 28°C et à 34°C, celle de l'effet des pH bas sur la croissance et la production enzymatique et celle de l'action des pH élevés sur la production du complexe restent en suspens. Il serait intéressant d'étudier ces problèmes plus précisément.

CHAPITRE V

LES CONDITIONS NUTRITIVES



Dans ce chapitre nous allons envisager les besoins du *Thermoascus crustaceus* en carbone et azote, tant du point de vue qualitatif que quantitatif et également l'équilibre entre les concentrations de ces deux éléments. Mais rappelons, une fois encore, que les autres conditions culturales comme l'aération, la température, la présence dans le milieu de culture de vitamines ou de traces minérales affectent l'utilisation des sources de carbone et d'azote (Perlman, 1965).

I.- NATURE DE LA SOURCE DE CARBONE

La connaissance de la nutrition carbonée est fondamentale pour la compréhension de la physiologie fongique du *Thermoascus crustaceus* (souche P6).

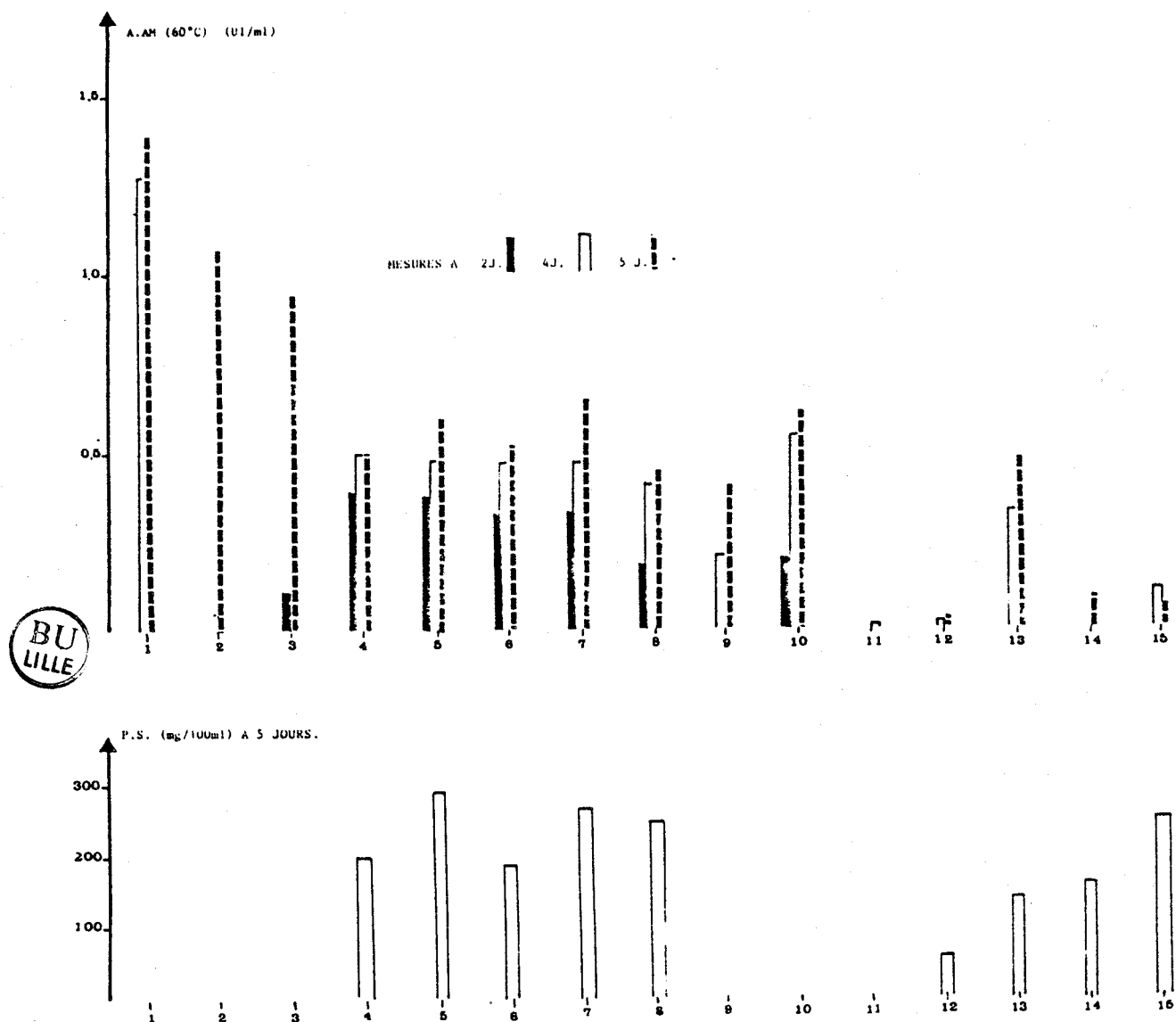
Les composés carbonés ont 2 rôles indispensables dans le métabolisme fongique, comme pour tout organisme hétérotrophe, un rôle plastique (chaînon carboné) et un rôle énergétique.

La source de carbone utilisée pour toutes études de croissance, de multiplication sexuée ou non, de production de métabolites par un microorganisme est essentielle. En effet, selon le type de métabolisme du champignon, de ses caractéristiques enzymatiques, certains substrats seront ou non utilisés, métabolisés, transformés.

L'étude de la nutrition carbonée permet d'envisager si l'enzyme étudié est adaptatif ou constitutif, problème important pour la production industrielle d'enzymes. Beaucoup d'amylases industrielles sont partiellement constitutives et partiellement inductibles (Meyrath et Volavsek, 1975; Fogarty et Kelly, 1980). L'inducteur de la production enzymatique est variable selon les organismes et les conditions étudiées. Ainsi pour certains auteurs, l'amidon est meilleur inducteur de la production d'amyloglucosidase par *Aspergillus oryzae* que le maltose ou le glucose (Kassim, 1983). N.E. Welker et L.L.Campbell (1963) montrent des effets d'induction de la production d'amylase de *Bacillus stearothermophilus* par différents composés en liaison alpha 1-4. Pour d'autres, le maltose est l'inducteur idéal de production de l'amyloglucosidase par *Aspergillus niger* (Okazaki et Terui, 1966). D'autres substances sont également citées comme inductrices de la synthèse des enzymes amylolytiques, comme le dextran en association avec d'autres sources de carbone pour l'*A. oryzae* (Nikolov et al., 1970). La β -cyclodextrine est utilisée comme seule source de carbone et comme inductrice de la synthèse d'amyloglucosidase par de nombreuses levures (De Mot et Verarchtert, 1986b).

Chez certains organismes, une inhibition plus ou moins totale de la production enzymatique: la répression catabolique est provoquée par le produit final de l'activité amyloglucosidasique: le glucose (Nicholov et al., 1970). Ainsi, la synthèse d' α -glucosidase par la levure *Lipomyces starkeyi* est totalement inhibée par le glucose, alors que de bonnes productions enzymatiques sont

FIGURE 21: Croissance (PS) et production de l'activité amyloglucosidasiqque (A.AM, dosée à 60°C) en fonction de la nature de la source de carbone. (mesures à 2, 4 et 5 jours. taux d'azote: 0,32 g/l. 45°C).



- Légende:**
- | | | |
|------------------------------|---------------------|----------------------------|
| 1. Amidon de blé non modifié | 6. MDO ₂ | 11. Cellulose |
| 2. Amidon naturel de maïs | 7. Maltose | 12. Carboxyméthylcellulose |
| 3. Amidon soluble | 8. Glucose | 13. Dextran |
| 4. MDO ₁ | 9. Amylose | 14. Sorbitol |
| 5. MDO ₂ | 10. Amylopectine | 15. Saccharose |

obtenues avec l'amidon, les dextrines, le maltose, le cellobiose et le pullulan (Kelly et al., 1985). Un effet identique est exercé par le glucose sur la production d' α -amylase de nombreuses levures (De Mot et al., 1984). Une étude au laboratoire de la production d' α -amylase par *A. oryzae* a montré également l'existence de cette répression catabolique par le glucose (Malard, 1981). Mais cette inhibition de la production par les produits d'hydrolyse des amylases n'est pas la règle générale: par exemple, le glucose est considéré comme un excellent substrat pour la production d'amyloglucosidase par *A. niger* (Ramachandran et al., 1979). Par contre, peu d'enzymes amylolytiques sont produits quand la source de carbone utilisée est uniquement du saccharose, du fructose ou du galactose (Fogarty et Kelly, 1980) malgré une bonne croissance fongique.

Dans le cas de notre champignon producteur d'activités amylolytiques, il était également intéressant de connaître son comportement vis à vis d'autres types de substrat (hexoses, pentoses, acides organiques, oligosaccharides et polysaccharides).

1.- Conditions d'étude

Ces conditions ont été étudiées selon le protocole habituel:

- culture en fioles de Roux (condition statique)
- ensemencement avec $20 \cdot 10^5$ conidies par fioles (100ml) provenant de culture sur milieu Malt-Agar ou sur milieu Sp.Th de 3 à 5 jours cultivée à 45°C
- milieu minéral de base: celui du milieu P6 associé à des sources de carbone variables
- température de culture: 37°C ou 45°C

Deux expériences ont été menées

- la première où le taux de carbone est fixé à 11,1 g/l et le taux d'azote à 0,32 g/l (sous forme de NH_4NO_3 , C/N=35 et à 45°C (figure 21). Lors de cette expérience la croissance a été mesurée lorsque cela était possible.
- une deuxième expérience où le taux de carbone est laissé à 11,1 g/l, mais le taux d'azote est amené à 0,95 g/l (NH_4NO_3 , C/N=11,7) et la température de culture à 37°C (fig.22). Durant cette deuxième expérience, la croissance n'a pas été suivie.

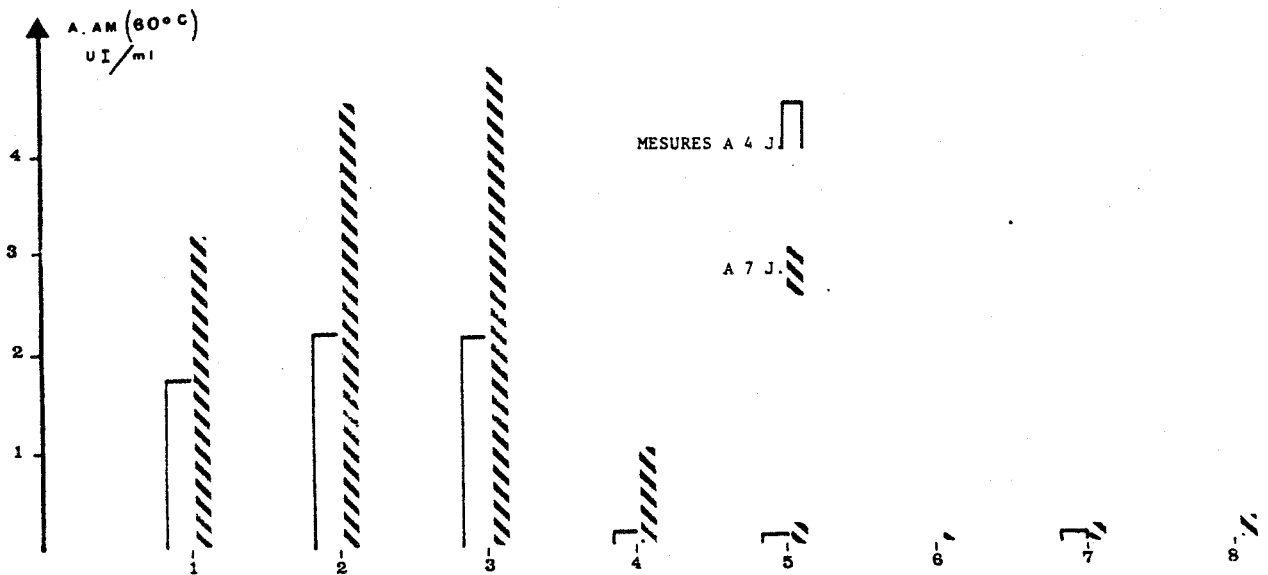
2.- Résultats

Une première observation doit être faite: aucune variation significative du rapport 75/60 n'a été observée lors de ces études, donc la composition du complexe enzymatique sécrété par *Th. crustaceus* n'est pas modifiée par la forme du carbone apporté.

a) Croissance et production du complexe amyloglucosidasique à 45°C et pour un taux d'azote de 0,32 g/l en fonction de la nature du substrat carboné.

Les meilleures sources de carbone pour la production du complexe amyloglucosidasique sont les chaînes longues d'amidon

FIGURE 22: Production de l'activité amyloglucosidasiqne (A.AM, à 60°C) en fonction de la nature de la source de carbone. (mesures à 4 et à 7 jours. taux d'azote: 0,95 g/l. 37°C)



Légende:

1. Amidon naturel de maïs
2. MDO₂
3. Glucose
4. Xylose

5. Pyruvate de sodium
6. Acétate de sodium
7. Acide succinique
8. Citrate de sodium



peu dégradées (substrats 1, 2, 3 de la figure 21). La croissance n'a pu être définie pour ces 3 substrats en raison de leur insolubilité (même à 5 jours). Une deuxième série de substrats permet des productions enzymatiques atteignant la moitié de celles obtenues avec les amidons peu transformés: celle-ci regroupe tous les dérivés de l'amidon testés (de la maltodextrine au glucose) ainsi que l'amylopectine et l'amylose. Avec le dextran (polymère en α -1-6 de glucose) comme source de carbone, on obtient des productions du même ordre que celles obtenues avec le glucose, mais le rapport activité/croissance mycélienne est supérieur à ceux que l'on observe sur les autres substrats de ce groupe. Les substrats celluloses n'induisent qu'une très faible croissance (non mesurée par suite de leur insolubilité) et une minime production enzymatique. Ce champignon n'est donc pas un organisme cellulolytique (la culture en 8 jours n'ayant toujours pas débuté). Au cours de cette première expérience, ni le sorbitol (alcool dérivé du glucose) qui n'est que peu utilisé par les champignons (Lilly, 1965b) ni le saccharose, considéré comme une bonne source de carbone pour les champignons mais moins courant que le maltose (Cochrane, 1958), n'induisent de bonne production malgré une croissance comparable à celle obtenue avec le glucose. Ce champignon est donc capable de métaboliser ces corps mais la production enzymatique n'est pas induite par ceux-ci.

b) Production du complexe amyloglucosidasique à 37°C pour un taux d'azote de 0,95 g/l en fonction de la nature du substrat carboné.

On retrouve une bonne production enzymatique avec l'amidon et ses dérivés (fig.22). Mais dans ces conditions, plus favorables à la croissance et à la production enzymatique que celles de la première expérience, l'amidon naturel (amidon de maïs non dégradé) est moins favorable que les maltodextrines testées (MDO2) et le glucose. Toutes les autres sources testées n'induisent qu'une très faible production enzymatique. Avec le xylose comme seule source de carbone, la production est de l'ordre de 25% de celle obtenue avec le MDO2 et le glucose, malgré une croissance similaire. Le xylose est le pentose le plus couramment utilisé par les champignons (Cochrane, 1958; Berry, 1975). La bonne croissance observée pour notre champignon indique que le xylose est bien métabolisé par la souche P6 mais qu'aucune induction de la production enzymatique n'est réalisée. Les acides organiques entrant en jeu dans le cycle de Krebs ne stimulent pas, seuls, la production enzymatique ni la croissance mycélienne.

3.- Discussion et conclusion sur la nature de la source de carbone

Il existe bien un effet d'induction de la synthèse de ce complexe enzymatique par notre champignon par toute la gamme des polymères du glucose en liaison α -1-4 et α -1-6. Ceci a été discuté en introduction de cette partie, la nature des inducteurs étant très variable selon les organismes producteurs. Une induction par une large gamme de substrats a déjà été signalée. Ceci a été

observé pour la production d'amylase par *Bacillus stearothermophilus* (Welker et Campbell, 1963). R.M. Attia et S.A. Ali (1974) obtiennent également de bonnes productions d'amyloglucosidase par *A. awamori* en présence des substrats carbonés suivants: amidon, dextrine, maltose et glucose et n'obtiennent que peu d'enzymes avec l'emploi de saccharose, lactose, fructose ou galactose dans le milieu.

L'absence de répression catabolique par le produit final de la digestion enzymatique: le glucose est à souligner. Mais rappelons que l'existence d'une telle répression n'est pas la règle observée dans la bibliographie (Ramachandran et al., 1979).

La comparaison de ces 2 expériences vérifie le fait que certains facteurs optimaux pour une température donnée ne sont pas obligatoirement ceux induisant la production maximale dans d'autres conditions de température et de taux d'azote. L'expérience unifactorielle réalisée ici ne suffit pas pour déterminer l'optimum réel de croissance et de production enzymatique, mais permet une première compréhension de la physiologie de ce champignon.

En conclusion, certains points ont été déterminés:

- la nécessité de fournir du glucose ou un polymère de celui-ci en α -1-4 ou α -1-6 pour induire une production correcte de l'activité amyloglucosidasique.
- l'absence de croissance et de production enzymatique sur les substrats cellulosiques (résultat différent de ceux observés chez beaucoup de champignons thermophiles).
- la croissance et l'absence d'induction de la production enzymatique sur différents substrats comme le sorbitol, le saccharose, le xylose...

II.- NATURE DE LA SOURCE D'AZOTE

La source d'azote, élément plastique indispensable pour la synthèse des protéines, conditionne de façon très précise la croissance et les productions enzymatiques.

Pour M.W. Fogarty et C.T. Kelly (1980), la production d'amyloglucosidase par *A. niger* est affectée par la source d'azote et par sa concentration. Ainsi, la source d'azote agit sur la quantité d'amyloglucosidase produite et sur la période de production (Barton et al., 1969), pour *A. niger*.

Le sulfate et le nitrate d'ammonium et le nitrate de potassium favorisent la production de nombreux enzymes (pectinase, polygalacturonase, amylase et amyloglucosidase) par différentes souches fongiques (*A. oryzae*, *A. aureus*, *A. niger*, *A. awamori* et *Penicillium expensum*) dans l'étude menée par K.R. Sreekantiah et col., (1973).

La sélection de différents isoenzymes est également possible en jouant sur la source d'azote apportée et sur d'autres conditions culturales. S. Hayashida (1975) sélectionne chacun des

3 types d'amyloglucosidase par *A. awamori* variété *Kawachi* en fonction de la source d'azote utilisée et d'autres conditions culturelles. La production d'amyloglucosidase par *A. awamori*, étudiée par R.M. Attia et S.A. Ali (1974) est fortement influencée par la source d'azote, qui est, pour eux, un des facteurs les plus importants à considérer pour la production d'amyloglucosidase. A.E. Kassim (1983) a étudié également l'action de la source d'azote sur la production d'amyloglucosidase par *A. oryzae*. Pour lui de nombreuses sources industrielles (corn step liquor, hydrolysats de caseine, peptone...) sont de meilleures sources d'azote que le sulfate d'ammonium pour la production enzymatique. La production d' α -glucosidase par la levure *Lipomyces starkeyi* (Kelly et al., 1985) est stimulée fortement par l'emploi d'azote organique, et aucune production enzymatique n'est obtenue avec le sulfate d'ammonium et le phosphate d'ammonium.

On peut classer les sources d'azote en 2 grands groupes: l'azote minéral (ammonium ou nitrate) et l'azote organique, le type d'azote utilisé permet de caractériser les espèces fongiques. Le problème de nombreuses sources d'azote organique utilisées en industrie est l'apport concomitant d'autres substances comme du carbone, des éléments minéraux, des vitamines (dans l'extrait de levure, l'hydrolysats de protéines, le corn step...).

En regard de la grande diversité des résultats présentés dans la bibliographie, l'étude du substrat azoté par le *Th. crustaceus* nous est apparue indispensable.

1.- Conditions d'étude

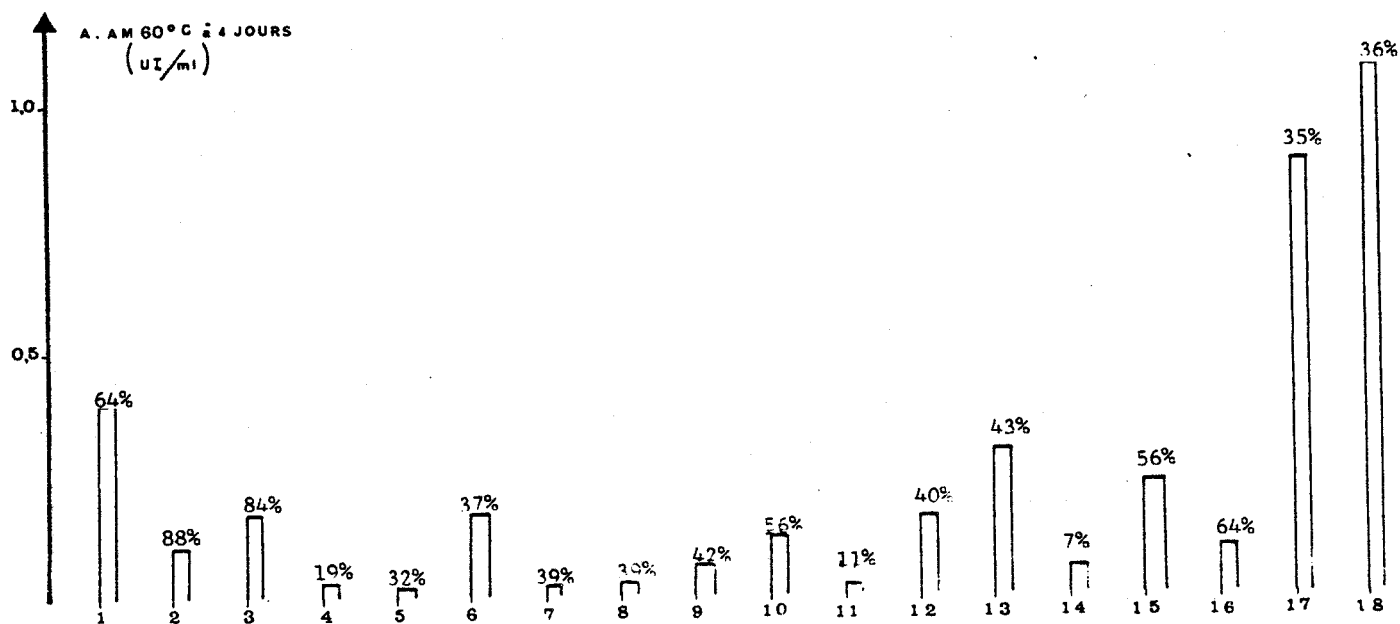
Le protocole d'étude est le même que celui présenté pour l'étude des sources de carbone. Nous avons voulu également étudier deux taux d'azote aux températures qui nous étaient apparues les meilleures pour ces taux d'azote dans le chapitre précédent. Les sources d'azote ont donc été étudiées en 2 expériences:

- une première expérience, où la source de carbone est de l'amidon de blé non modifié (une des meilleures sources de carbone à 45°C pour un taux d'azote de 0,32 g/l) à 11,1 g/l de carbone (soit 25 g/l d'amidon) et la source d'azote variable est fixée à un taux de 0,32 g/l (C/N = 35). La température de culture est de 45°C (fig.23). La source de carbone utilisé étant un amidon insoluble, la mesure du poids sec n'a pu être réalisée.
- la deuxième expérience a été réalisée en utilisant la malto-dextrine type MD02 (une des meilleures sources de carbone à 37°C pour un taux d'azote de 0,95 g/l) comme source de carbone à 11,1 g/l de carbone et un taux d'azote de 0,95 g/l (C/N = 11,7). L'étude a été suivie à 37°C (fig.24).

2.- Résultats

Dans les deux expériences, le NH_4NO_3 a été la meilleure source minérale d'azote pour la production enzymatique.

FIGURE 23: Production de l'activité amyloglucosidasiqne (A.A.M, à 60°C) et rapport des activités 75/60, exprimé en pourcentage, en fonction de la nature de la source d'azote. (mesures à 4 et à 7 jours. taux d'azote: 0,32 g/l. 45°C)



- Legende:**
- | | |
|---|--------------------------------------|
| 1. NH_4NO_3 | 10. Glycocolle |
| 2. NH_4Cl | 11. Cysteine |
| 3. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ | 12. Phenylalanine |
| 4. NaNO_3 | 13. 1/2 ac. glutamique + 1/2 alanine |
| 5. $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ | 14. Urée |
| 6. Ac. glutamique | 15. Hydrolysate de caseine |
| 7. Alanine | 16. Extrait de levure |
| 8. Ac. aspartique | 17. Corn step liquide |
| 9. Leucine | 18. Corn step atomisé |

Le rapport des activités à 75°C et à 60°C est fonction de la source d'azote utilisée à l'inverse de ce qui a été observé pour les sources de carbone. Aussi avons-nous précisé sur les figures ces rapports. La composition du complexe amyloglucosidasique varie, donc, en fonction de sources d'azote. Un phénomène semblable a été décrit par S.Hayashida et col. (1975).

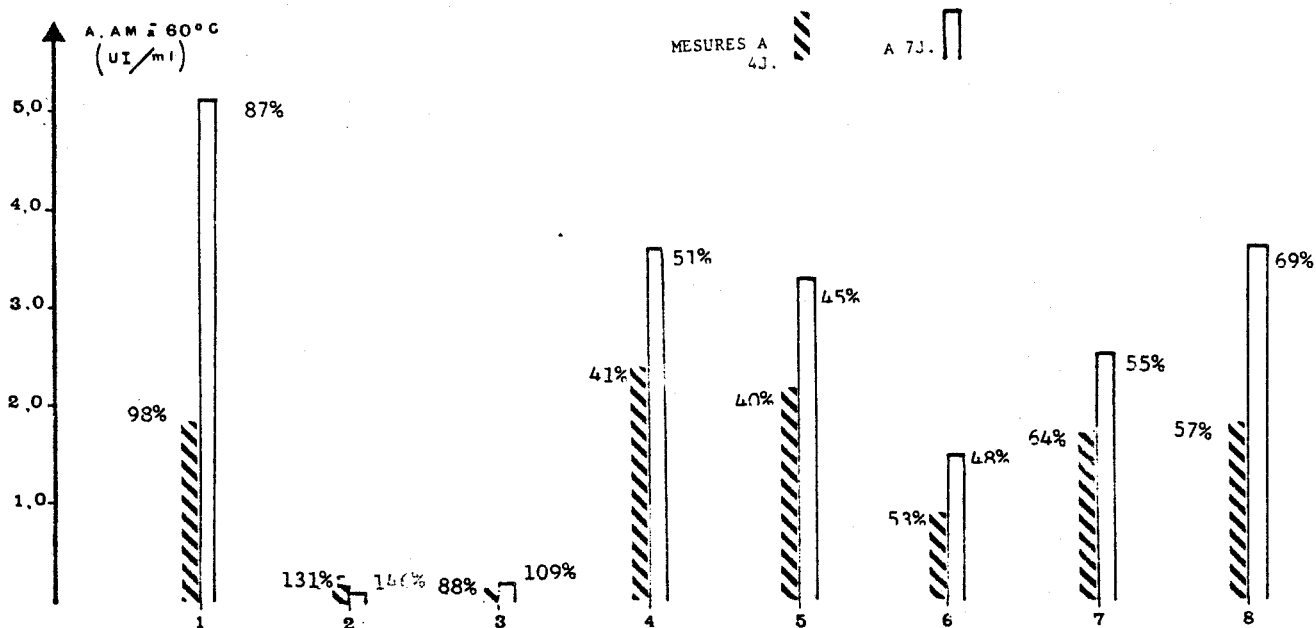
a) Production et thermostabilité du complexe amyloglucosidasique par le *Thermoascus crustaceus* à 45°C et avec de l'amidon de blé modifié comme source de carbone en fonction de la nature de la source d'azote.

A 45°C de température de culture et pour un taux d'azote de 0,32 g/l (amidon de blé non modifié, fig.23) l'utilisation des sources ammoniacuées présentent un net avantage sur la production et la thermostabilité du complexe enzymatique, par rapport aux formes nitrées. Les pourcentages 75/60 sont bons (84 et 88%) pour les formes ammoniacuées, et nettement plus faibles pour les formes nitrées (19 et 32%) dans cette expérience. Les sources ammoniacuées favorisent donc l' α -glucosidase par rapport à l'amyloglucosidase à l'inverse des sources nitrées.

Les acides aminés, testés seuls, induisent tous la formation d'un complexe à 75/60 moyen (40 à 50%). Le meilleur acide aminé est le glutamate, premier acide aminé synthétisé à partir de l'azote minéral et principal donneur de groupe aminé dans les réactions de transamination (Nicholas, 1965 ; Berry, 1975). De plus, un apport en azote constitué d'un mélange acide glutamique et alanine (la moitié de l'azote étant apportée par chacun d'eux) permet une augmentation de la production enzymatique par la souche P6 de 76%, par rapport à celle obtenue avec l'acide glutamique seul.

L'utilisation de l'urée comme seule source d'azote ne permet qu'une faible production enzymatique ayant un pourcentage 75/60 très faible (7%) dans cette expérience, bien que l'urée soit considérée comme une source d'azote utilisable. L'hydrolysate de caséine et l'extrait de levure sont des sources d'azote provenant de l'hydrolyse de protéine et apporte donc un grand nombre d'acides aminés. L'utilisation de ces 2 substrats n'a pas permis de bonnes productions enzymatiques lors de la première série d'expériences. Le problème de ce genre de substrat est l'impossibilité de contrôler l'effet réel de l'apport d'azote (action de quel acide aminé...). L'utilisation des corn step a permis une très forte amélioration de la production enzymatique par rapport à l'utilisation du nitrate d'ammonium (de 200 à 250%), mais un rapport des activités (75/60) plus faible. Ces corn steps sont des sources d'azote très répandues en industries par leur bon rapport qualité/prix et l'apport d'un grand nombre d'éléments (vitamines, minéraux...).

FIGURE 24: Production de l'activité amyloglucosidasiqne (A.A.M, à 60°C) et rapport des activités 75/60, exprimé en pourcentage, en fonction de la nature de la source d'azote. (mesures à 4 et à 7 jours. taux d'azote: 0,95 g/l. 37°C).



Légende:

1. NH₄NO₃
2. NH₄Cl
3. NaNO₃
4. 5/10 glutamate + 4/10 glycofolle + 1/10 aspartate
5. 4/10 glutamate + 3/10 glycofolle + 3/10 alanine
6. 5/10 glutamate + 4/10 glycofolle + 1/10 phénylalanine
7. 5/10 glutamate + 4/10 glycofolle + 1/10 cystéine
8. Corn Step Atomisé.

TABIEAU 22: Survie enzymatique de l'activité amyloglucosidasiqne (dosée à 60°C et à 75°C) après incubation du filtrat de culture à 70°C et pH 4.5 pendant 15 heures sans substrat, en fonction de la nature de la source d'azote. (exprimée en pourcentage. Age des cultures: 7 jours).

	NH ₄ NO ₃	5/10 glutamate 4/10 alanine 1/10 aspartate	4/10 glutamate 3/10 glycofolle 3/10 alanine	5/10 glutamate 4/10 glycofolle 1/10 phénylalanine	5/10 glutamate 4/10 glycofolle 1/10 cystéine
survie dosée à 60°C	39%	25%	23%	26%	30%
survie dosée à 75°C	68%	72%	69%	75%	76%
pourcentage 75/60 initial	87%	45%	48%	55%	69%
pourcentage 75/60 après incubation	140%	144%	152%	161%	156%

b) production et thermostabilité du complexe amyloglucosidasique par le *Thermoascus crustaceus* à 37°C et avec du MDO₂ comme source de carbone en fonction de la nature de la source d'azote (fig.24).

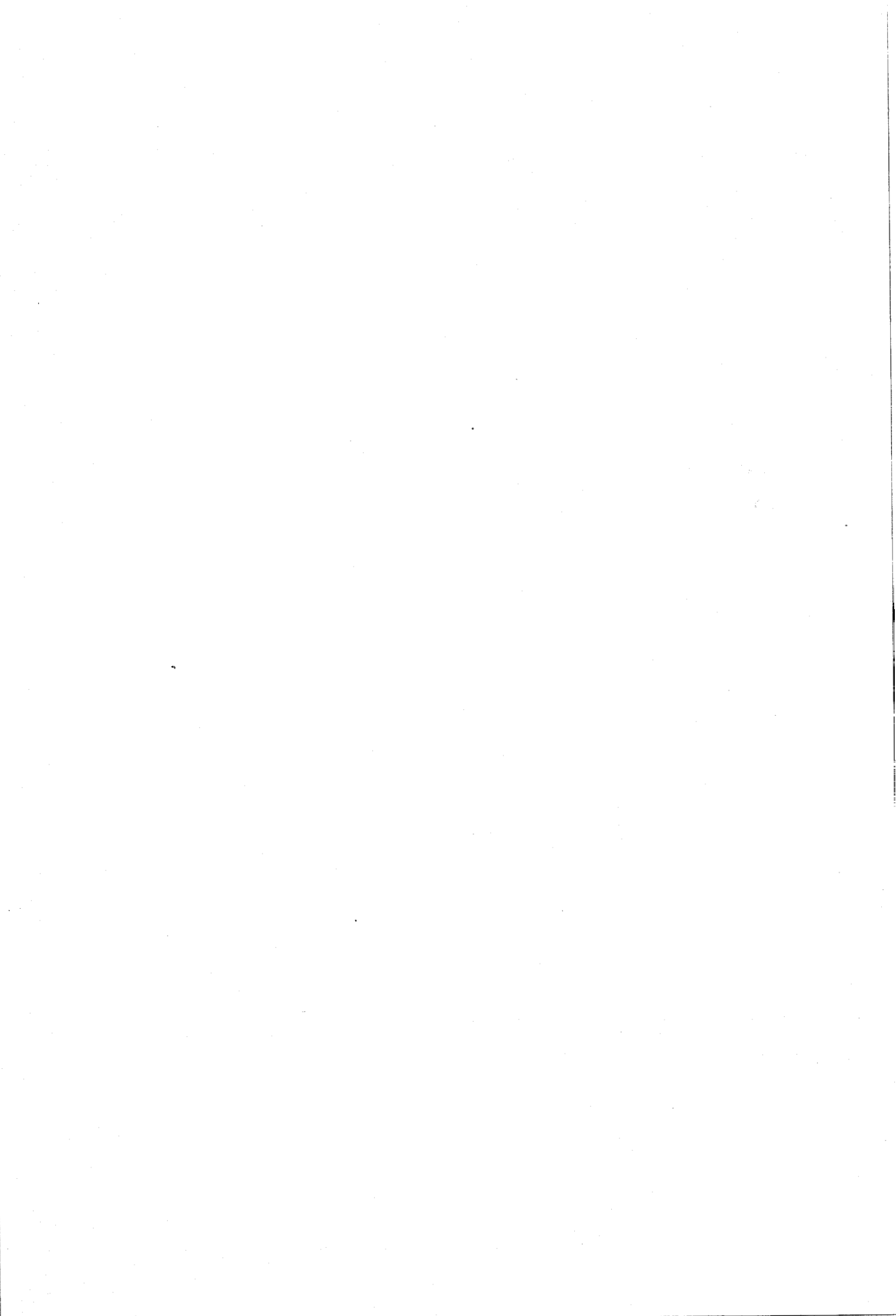
Dans ces conditions de production enzymatique, l'utilisation du chlorure d'ammonium et de nitrate de sodium permet des productions faibles mais des rapports d'activité (75/60) différents: 131% (à 4 jours) et 146% (à 7 jours) pour le NH₄Cl et 88% (à 4 jours) et 109% (à 7 jours) pour le NaNO₃ la forme ammoniacuée induit encore la formation d'un complexe légèrement plus thermostable (sélection de l'alpha glucosidase). L'assimilation des formes nitrées d'azote indique que ce champignon est capable de produire la nitrate réductase.

Dans cette expérience, différents mélanges d'acides aminés ont été testés associant le glutamate, l'alanine, l'acide aspartique, le glycolle, la phénylalanine et la cystéine 3 par 3. Ces différents acides aminés représentent les différentes classes d'acides aminés (aliphatique, aromatique, carboxylique et sulfurique). L'utilisation de ces 4 mélanges (fig.24) permet l'obtention de bonnes productions enzymatiques dosées à 60°C. Mais les pourcentages 75/60 (40 à 50%) sont nettement plus faibles que ceux obtenus avec le nitrate d'ammonium (98 et 87%). Des mesures de survie enzymatique du complexe ont été faites après incubation du filtrat de culture à 70°C pendant 15 heures à pH 4,5 sans substrat (tableau 22) pour vérifier que cette baisse du pourcentage 75/60 est bien dû à une baisse de la thermostabilité. L'observation de ce tableau montre bien une survie enzymatique plus faible du complexe dosé à 60°C pour les filtrats provenant de culture sur milieux à base d'acides aminés comme source d'azote. Par contre, le pourcentage de survie enzymatique dosé à 75°C reste similaire dans les différents cas. Cette survie correspondant à celle de l'α-glucosidase.

La production avec corn step atomisé comme source d'azote est proche de celle obtenue avec le nitrate d'ammonium dans ces conditions. L'assimilation de ce substrat indique que la souche P6 est capable de produire des protéases dégradant ces protéines combinées.

3.-. Discussion et conclusion

Le *Thermoascus crustaceus* (souche P6) est capable d'utiliser les différentes sources d'azote, minérale ou organique. Les meilleures productions enzymatiques ont été obtenues avec le nitrate d'ammonium comme source d'azote, productions supérieures à celles obtenues avec des sels d'ammonium seuls ou sels nitrés seuls comme source d'azote, en système statique. Cette amélioration de la production est-elle due à l'existence des 2 formes azotées dans le même substrat ? Une étude approfondie de cette hypothèse serait très intéressante à suivre. L'utilisation des sources organiques d'azote a permis des bonnes croissances et des productions enzymatiques variables, mais en général induisant un rapport (75/60) plus faible que ceux obtenus avec le nitrate



d'ammonium. Les sources organiques semblent donc favoriser la synthèse d'amyloglucosidase.

En résumé de cette étude, il faut rappeler:

- l'effet des sources d'azote dans la composition du complexe enzymatique étudié,
- la bonne utilisation du NH_4NO_3 , pour la production enzymatique,
- les productions enzymatiques meilleures avec les sels d'ammonium qu'avec les nitrates, mais très inférieures à celle du nitrate d'ammonium,
- un bon équilibre en acides aminés a permis l'obtention d'une bonne croissance et de la production d'un complexe enzymatique en quantité convenable mais ayant un %75/60 réduit, favorisant l'enzyme le moins thermostable (amyloglucosidase).

Les sources d'azote utilisées en industrie permettent une nette amélioration de la production à 45°C pour un taux d'azote de 0,317 g/l.

En conclusion, le nitrate d'ammonium semble être une excellente source d'azote pour l'étude des autres besoins nutritifs et du métabolisme du *Thermoascus crustaceus*.

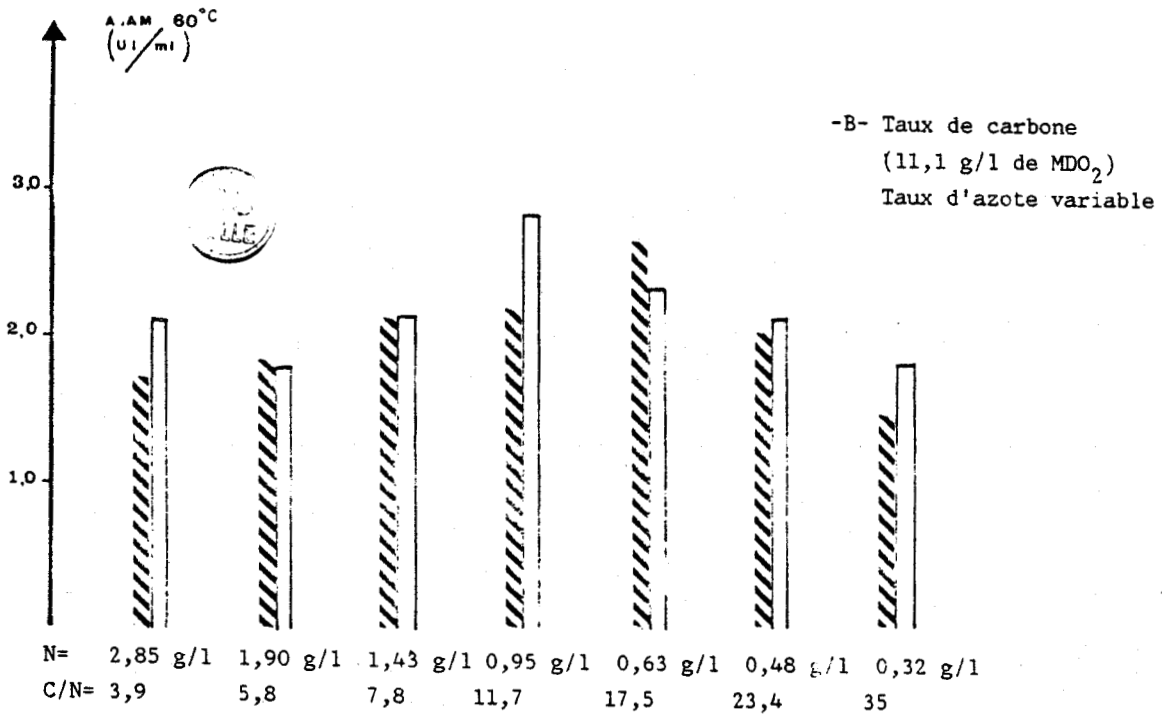
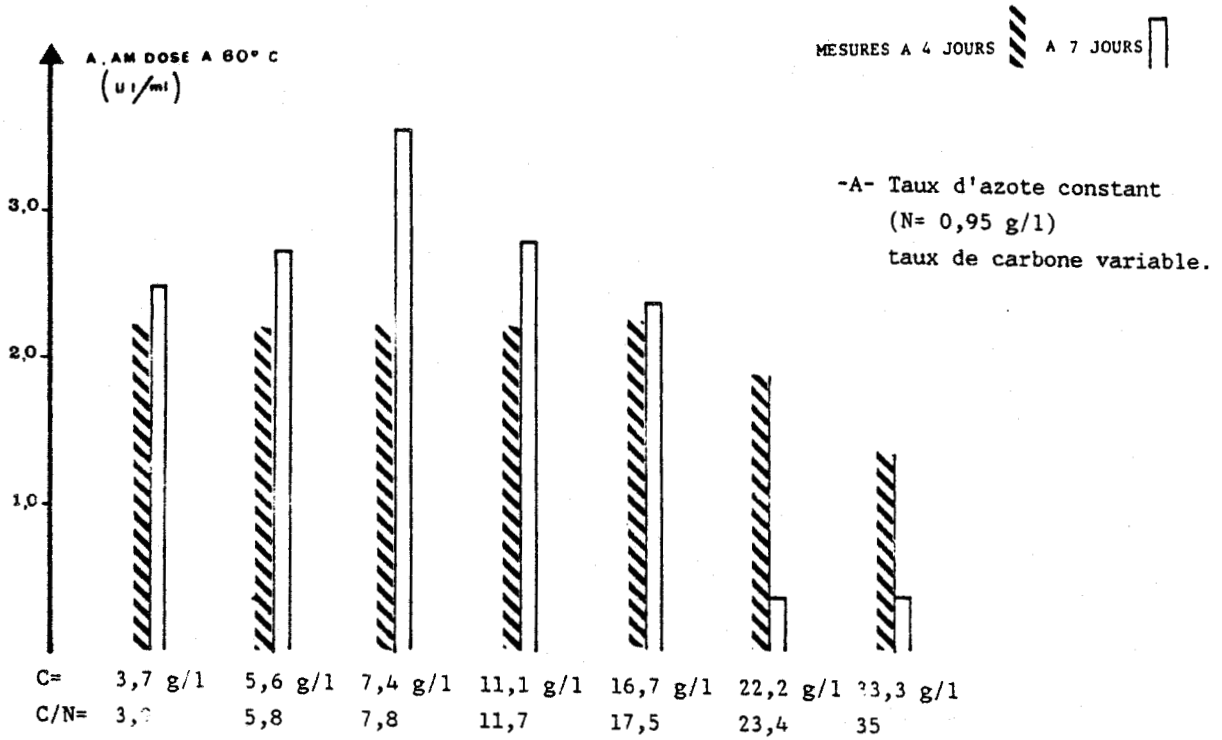
III.- EFFETS DES TENEURS EN CARBONE ET AZOTE ET DU RAPPORT C/N

Le choix des sources de carbone et d'azote a été réalisé dans des conditions constantes de concentration et du rapport C/N. Les effets de ces concentrations et de ce rapport sont très importants pour l'équilibre métabolique de tous microorganismes. Des apports déséquilibrés de ces éléments entraînent la limitation d'autres facteurs nutritifs (Cochrane, 1958). Peu d'informations concernent ce propos. Pour W.M.Fogarty et C.T.Kelly (1980), il n'est pas possible de généraliser des valeurs de C/N pour la production d'enzymes. En effet, ce facteur variera également en fonction des sources de carbone et d'azote utilisées. L.L.Barton et col. (1969) ont remarqué que la production d'amyloglucosidase augmente quand le rapport C/N diminue, mais également que la production chute quand la concentration en azote est fortement augmentée. V.V.Michelena et F.J.Castillo (1984) indiquent que la production d'amylase par *Aspergillus foetidus* augmente avec la concentration totale du milieu dont le rapport C/N est équilibré.

Les références bibliographiques sur ce sujet sont donc très fragmentaires et il est impossible d'en retirer une ligne générale, bien que l'importance de ces paramètres apparaisse indiscutable.

Dans cette partie, nous allons essayer de mettre en évidence d'éventuelles corrélations entre les concentrations en carbone et

FIGURE 25: Production de l'activité amyloglucosidasique (A.A.M, à 60°C) en fonction des variations de la teneur en carbone (-A-) et de la teneur en azote (-B-). (mesures à 4 et à 7 jours. source de carbone: MDO₂. source d'azote: NH₄NO₃. 37°C)



azote et le rapport C/N d'une part, et la croissance et la production du complexe enzymatique d'autre part.

1.- Méthodes d'étude

Plusieurs expériences ont été menées dans les conditions suivantes:

- culture en fioles de Roux (statique) à 37°C,
- milieu minéral utilisé : celui du milieu P6, les quantités d'azote et de carbone étant modifiées quantitativement (C=MDO2 et N=NH₄NO₃),
- ensemencement de chaque fiole par 20.10⁵ conidies âgées de 3 à 4 jours sur milieu Malt-Agar à 45°C.

Trois expériences ont été réalisées:

- variation de concentrations en carbone et en azote individuellement,
- variation de concentrations en carbone et azote, pour des rapports C/N constants,
- apport de glucose surnuméraire pour tenter de stimuler la production du complexe enzymatique.

2.- Résultats

a) production du complexe amyloglucosidasique en fonction des concentrations en carbone et en azote dans le milieu de culture

Dans la première expérience (fig.25) nous avons étudié, l'effet des variations de la teneur en carbone (pour un taux d'azote constant) d'une part (fig.25-A) et en azote (le taux de carbone étant constant) d'autre part (fig.25-B) chaque variation modifiant le rapport C/N et pour un même rapport C/N testé, nous avons essayé 2 concentrations en carbone et azote.

L'observation de la figure 25 rassemblant les résultats de cette expérience, permet de faire plusieurs remarques:

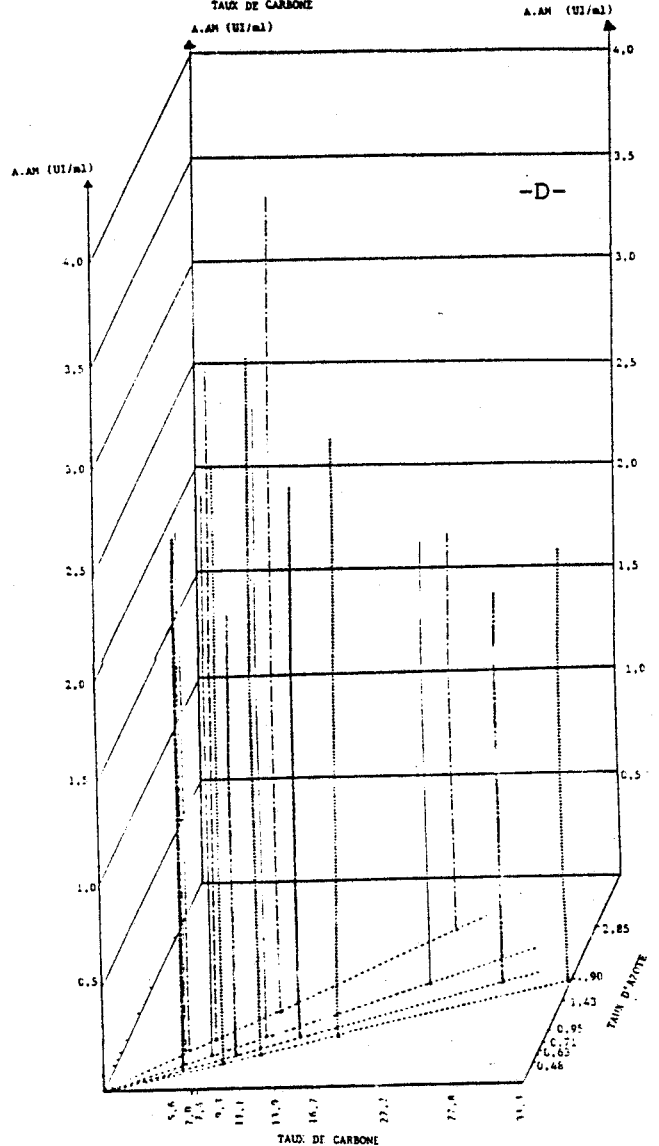
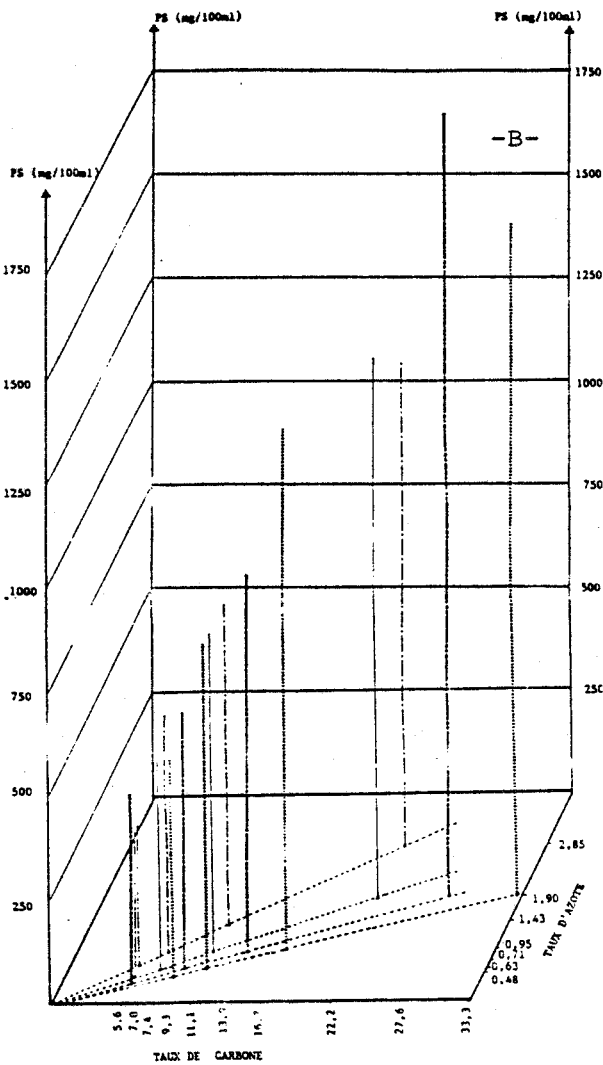
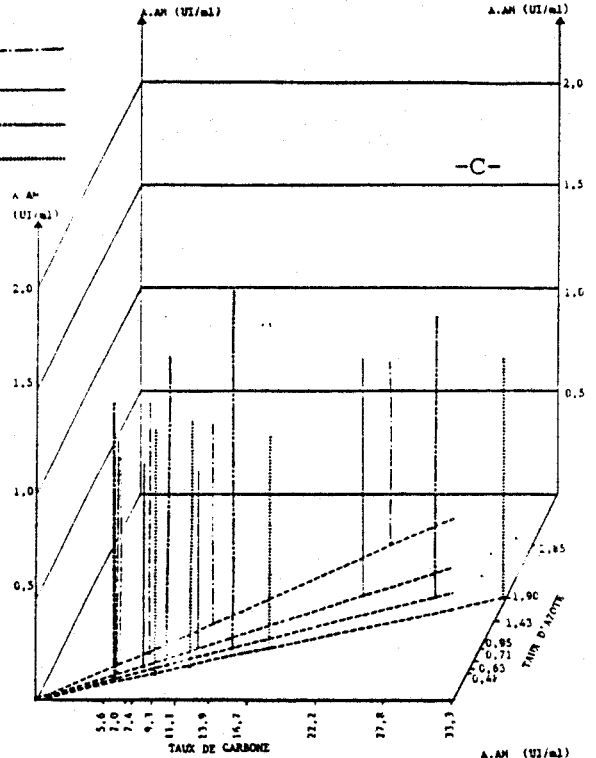
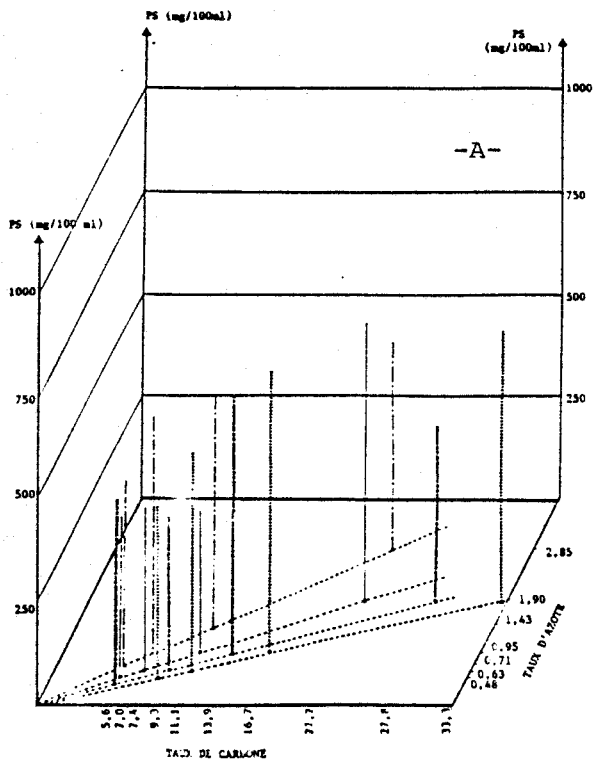
* Lorsque varie la teneur en carbone pour un taux d'azote constant, la production enzymatique mesurée après 4 jours de culture est constante pour des taux de carbone allant de 3,7 g/l à 16,7 g/l. Une baisse est observée pour des teneurs élevées (22,2 et 33,3 g/l). La production mesurée après 7 jours subit des variations dans toute la gamme de concentration testée. Un maximum de production enzymatique est obtenu pour une teneur en carbone de 7,4 g/l, et donc pour un C/N de 7,8. Pour les fortes concentrations en carbone, les autres facteurs nutritifs deviennent rapidement limitants (azote, éléments minéraux...), de plus la formation de produits toxiques est connue. La conséquence la plus importante est l'augmentation de la pression osmotique du milieu (Cochrane, 1958).

* Quand nous faisons varier la teneur en azote, pour un taux de carbone constant, on ne retrouve pas de palier de production

FIGURE 26: Croissance (PS) et production de l'activité amyloglucosidase (A.A.M, à 60°C) en fonction du rapport C/N et des concentrations en carbone et en azote dans le milieu de culture. (mesures à 4 jours (-A-, -C-) et à 7 jours (-B-, -D-). 37°C).

Legende:

- C/N= 7,4 -----
- C/N= 11,7 -----
- C/N= 14,6 -----
- C/N= 17,5 -----



enzymatique après 4 jours. Un maximum est obtenu pour un taux d'azote de 0,63 g/l (d'où un rapport C/N de 17,5). A 7 jours de culture, le maximum est décalé et est atteint pour un taux d'azote de 0,95 g/l (d'où un rapport C/N de 11,7).

* La variation du rapport C/N montre une zone optimale pour la production amyloglucosidasique comprise entre 7,4 et 17,5.

* L'emploi de fortes concentrations en carbone et azote (pour un même C/N) induit une chute globale de la production enzymatique, dans tous les cas essayés.

b) croissance et production du complexe amyloglucosidasique en fonction du rapport C/N et des concentrations en carbone et azote

Une deuxième expérience a donc été réalisée pour vérifier cette dernière observation (de fortes concentrations de carbone et d'azote amenant une chute de production enzymatique) dans la zone de rapport C/N qui semble la meilleure. 4 rapports C/N ont été testés: 7,4; 11,7; 14,6 et 17,5. Dans chaque cas, différentes concentrations en carbone et azote ont été envisagées (C,N), (C/2, N/2), (C/3, N/3), et (C/4, N/4). La figure 26 résume nos résultats:

- croissance mycélienne aux 4^e (fig.26-A) et 7^e jours (fig.26-B),
- production enzymatique aux mêmes moments (figs.26-C et 26-D).

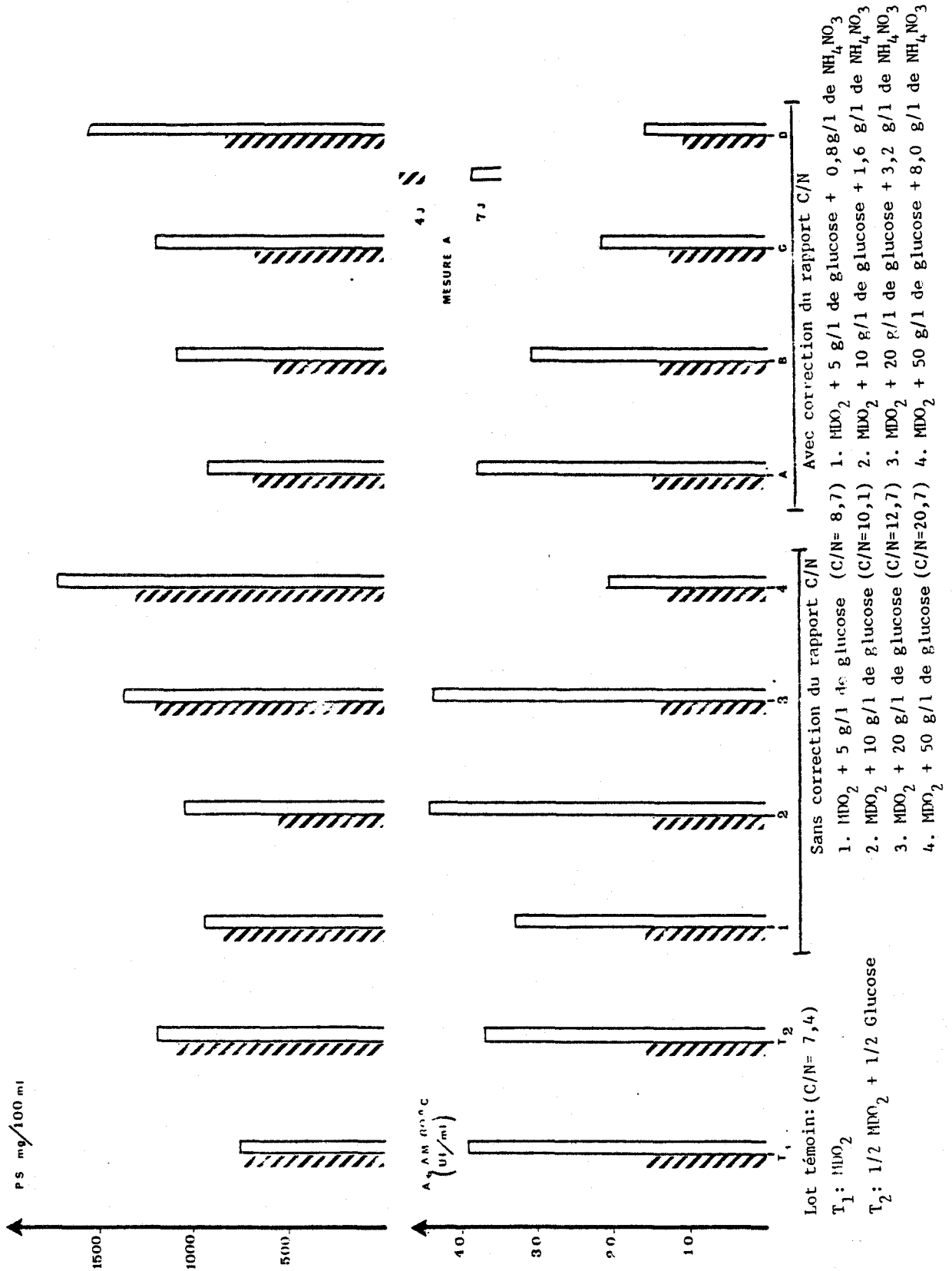
Les croissances au 4^e jour sont assez proches dans les différents cas étudiés, tandis qu'au 7^e jour l'augmentation des concentrations en carbone induit une forte hausse de la biomasse finale produite, tandis que celle des teneurs en azote n'améliore pas corrélativement cette biomasse. La croissance pondérale maximale n'a pas été atteinte dans la gamme présentée, de plus les fortes teneurs en glucose résiduel au 7^e jour nous indiquent que cette croissance n'est pas terminée.

On observe que la zone de production enzymatique maximale au 4^e jour est située autour de 9,3 g/l de carbone et de 0,63 g/l d'azote. Tandis que celle obtenue à 7 jours se localise aux environs de 11,1 g/l de carbone et de 0,95 g/l à 1,43 g/l d'azote. Les résultats obtenus ici confirment ceux de l'expérience précédente.

Grâce à ces 2 expériences, les optimums de ces teneurs en carbone, en azote et du rapport C/N pour la production enzymatique ont pu être précisés. Elles sont, pour une culture âgée de 4 jours, situées autour de 9,3 g/l de carbone et de 0,63 g/l d'azote (d'où un C/N de 14,8) et pour une culture de 7 jours de 7,4 à 11,1 g/l de carbone et de 0,95 à 1,43 g/l d'azote (d'où un C/N de 5,2 à 11,7).

Nous observons donc qu'il n'existe pas de corrélation entre la croissance pondérale et la production enzymatique dans la

FIGURE 27: Croissance (PS) et production de l'activité amyloglucosidasiq (A.A.M, à 60°C) en fonction d'un apport croissant en glucose sans et avec correction du rapport C/N. (mesures à 4 et à 7 jours. 37°C).



gamme des concentrations en carbone et en azote, pour les conditions étudiées.

c) croissance et production du complexe amyloglucosidasique en fonction de la quantité de glucose apportée en surplus de la source de carbone

L'effet de la teneur en carbone sur la production enzymatique semblant très important (fig.25), une troisième expérience a tenté de stimuler la production enzymatique par l'apport de glucose (fig.27).

Deux milieux témoins ont été testés: le milieu P6 bis (où la différence avec le milieu P6 réside dans le taux d'azote augmenté à 1,5 g/l de NH_4NO_3 , d'où un rapport C/N= 7,4) et un milieu P6 bis modifié où le carbone est apporté pour moitié par du glucose et pour moitié par du MDO2.

Une première série de milieux a été enrichie en glucose (de 5 g/l à 50 g/l de glucose, milieux 1 à 4).

Une deuxième série enrichie de la même manière (milieux A à D) mais où le rapport C/N a été corrigé par l'apport de NH_4NO_3 supplémentaire.

Les résultats de cette expérience sont présentés dans la figure 27 (production enzymatique et croissance, mesurées aux 4^e et 7 jours). Une première remarque peut être faite pour les témoins, les productions enzymatiques sont identiques pour les deux types de témoins aux 2 jours testés mais la croissance mycélienne est nettement stimulée dans le cas d'un substrat carboné combiné (MDO2 + glucose, témoin T2).

Dans la première série de milieux (de 1 à 4), il peut être observé que la production d'enzyme au 4^e jour n'est que peu modifiée par l'apport de glucose (même à 50 g/l); une baisse très faible est tout de même à remarquer. La production enzymatique au 7^e jour est par contre légèrement stimulée par des apports de glucose de 10 à 20 g/l, tandis qu'une addition de 50 g/l réduit de moitié la production finale.

Si on corrige le rapport C/N une baisse de production enzymatique très légère est constatée au 4^e jour de culture parallèlement à l'apport de glucose et de nitrate d'ammonium (C/N=7,4). Cette diminution devient très importante au 7^e jour de culture. Ceci confirme qu'une augmentation des taux de carbone et d'azote réduit la production enzymatique.

Dans ces 2 séries de milieux (milieux 1 à 4 et A à D), on note, par contre, une stimulation très nette de la croissance aux 4^e et 7^e jours lors d'un apport de glucose seul, et au 7^e jour uniquement dans le cas d'apport combiné de glucose et de nitrate d'ammonium.

Conclusion

De ces différentes expériences on peut remarquer:

- que les facteurs importants jouant un rôle primordial dans la production enzymatique sont avant tout les teneurs en carbone et en azote indépendamment ou en association. Le champignon est moins sensible au rapport C/N, sa production d'enzyme n'est affectée que par les valeurs extrêmes de cette relation,
- que l'apport de glucose stimule fortement la croissance mycélienne. La production enzymatique est également sensible à l'apport de glucose, mais elle est faiblement augmentée par des apports de glucose de 10 à 20 g/l (gain de 0,5 UI/ml, soit +13%) et fortement diminuée par des apports combinés de glucose et de NH_4NO_3 en vue de corriger le C/N.

CONCLUSION

Le rôle primordiale de la nature, de la quantité et de l'équilibre des substrats carbonés et azotés a été prouvé pour la croissance et la production du complexe enzymatique de *Thermoascus crustaceus* (souche P6).

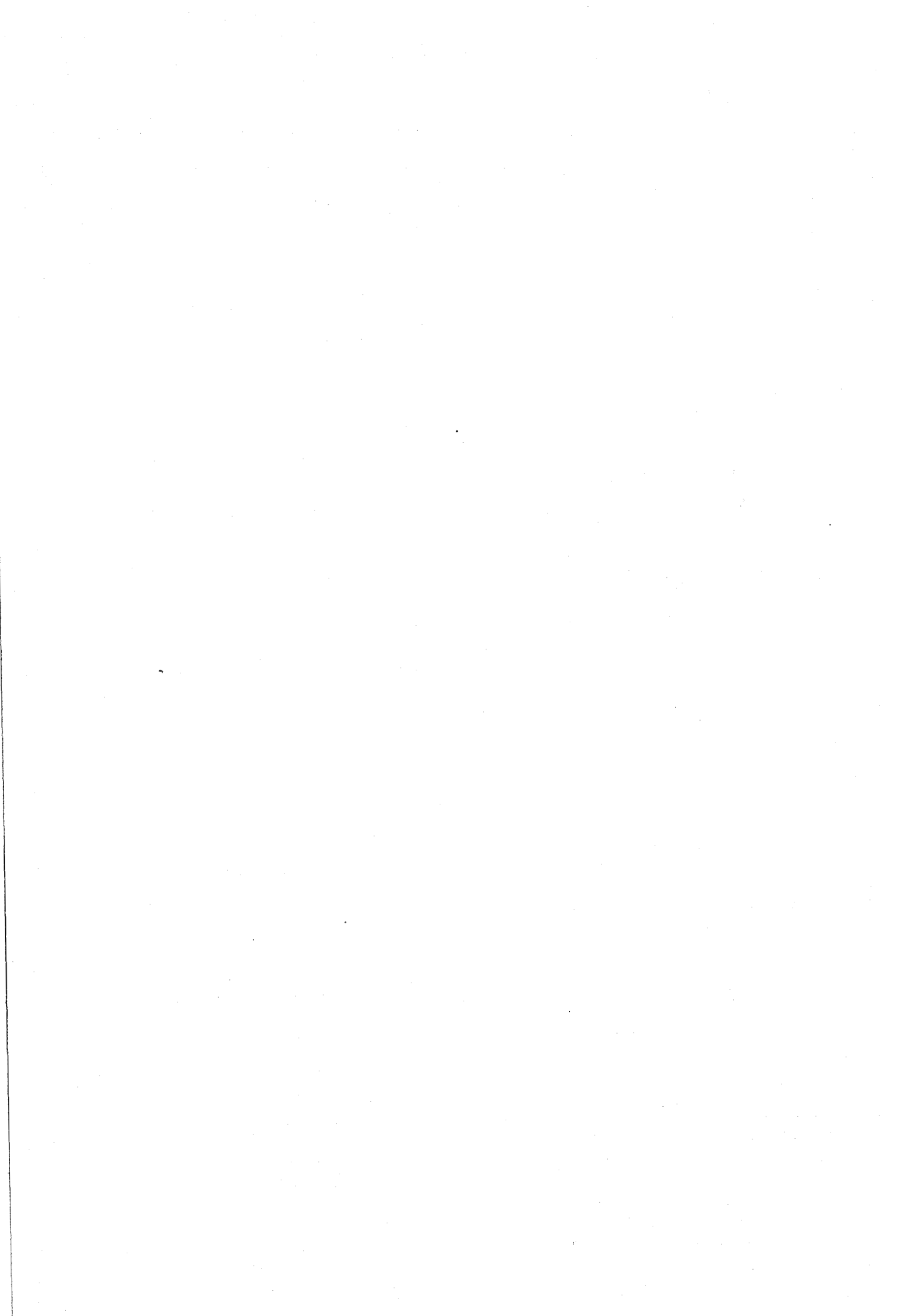
L'effet d'induction sur la production enzymatique du *Th. crustaceus* (souche P6) pour une très large gamme de substrats carbonés (glucose et polymère de glucose en α -1-4 et α -1-6) est à souligner ainsi que l'absence de répression catabolique par le produit final de la réaction: le glucose.

La nature de la source de carbone n'influence pas la composition du complexe, à l'inverse de ce qui est observé avec celle du substrat azoté. La nature de ces 2 sources agit également sur la croissance et la quantité d'enzymes produits.

Ce sont les concentrations de ces éléments qui affectent le plus la production enzymatique, les productions ne variant de façon importante que pour des rapports C/N extrêmes.

CHAPITRE VI

LES AUTRES EXIGENCES CULTURALES DE LA CROISSANCE ET DE LA
PRODUCTION ENZYMATIQUE DU THERMOASCUS CRUSTACEUS (SOUCHE P6)



Après avoir déterminé les conditions physiques et nutritives de la croissance et de la production enzymatique du *Thermoascus crustaceus* (souche P6), il était nécessaire de déterminer les besoins en éléments minéraux et en vitamines que pouvait présenter notre champignon.

I. - LES BESOINS EN ELEMENTS MINERAUX

Les champignons ont besoin en quantité relativement importante (macroéléments) de phosphore, potassium, soufre, magnésium et en quantité moindre (microéléments) en fer, zinc, cuivre, manganèse et molybdène. Des exigences en calcium, en chlorure de sodium peuvent exister dans certains cas (Lilly, 1965b; Berry, 1975). Les éléments minéraux agissent sur le métabolisme fongique de deux manières: par une fonction plastique et par une fonction catalytique.

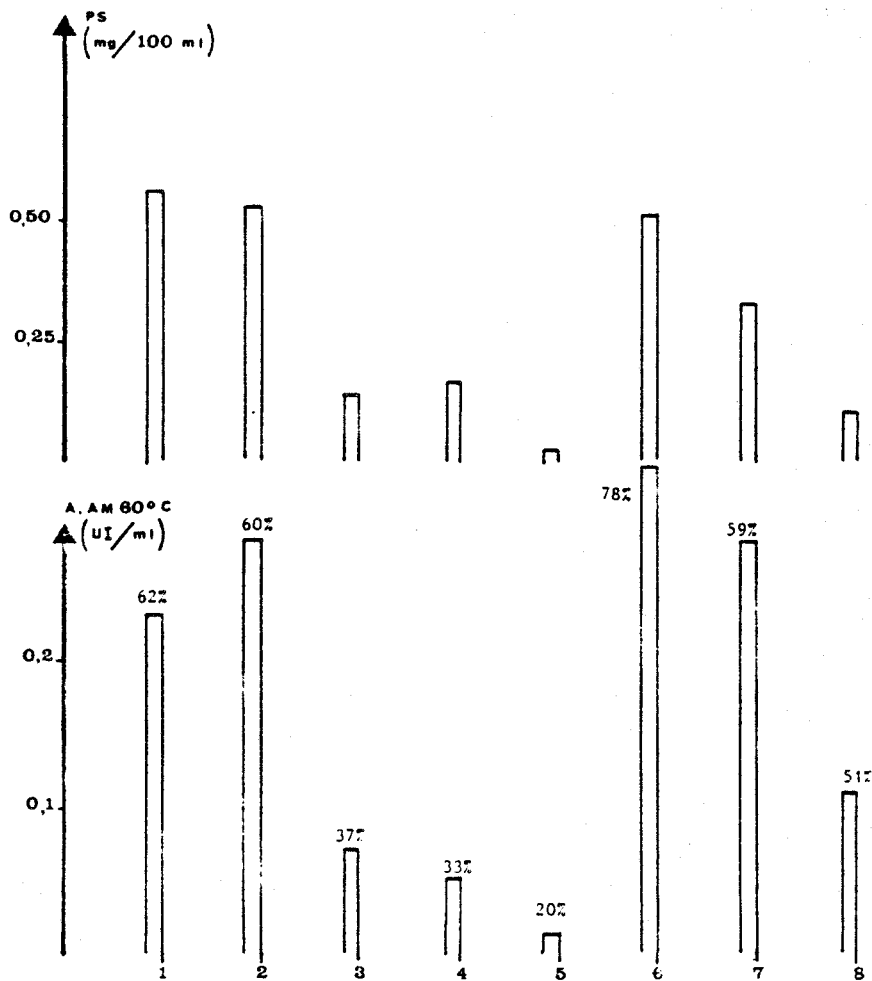
Dans un milieu défini, le rôle des éléments minéraux nécessaires en faible quantité peut être capital dans la production d'enzyme (Meyrath et Volavsek, 1975). En plus de leur utilité pour la croissance du microorganisme, ces composés minéraux peuvent agir en contrôlant le pH, en modifiant la pression osmotique du milieu, par leur rôle dans les réactions d'oxydo-réduction grâce à leur valence multiple, en apportant des cations ou des anions favorables au relargage d'enzymes extracellulaires ou sur la perméabilité membranaire (Meyrath et Volavsek, 1975). Les besoins en éléments minéraux sont également fonction des concentrations en source de carbone et d'azote et également des autres éléments minéraux fournis (Berry, 1975). Ainsi de nombreuses interactions existent entre les différents éléments minéraux. On retrouve la plupart des macroéléments dans les milieux de productions enzymatiques cités dans la bibliographie, par contre les microéléments sont rarement présents. Ainsi R.Pak (1969) signale une légère amélioration de la production d' α -amylase par l'introduction de microéléments à l'état de trace.

1. - Méthode d'étude

Avant toute manipulation sur l'effet des éléments minéraux sur le métabolisme fongique, la verrerie a été lavée à l'acide chlorhydrique 1M puis rincée abondamment à l'eau distillée.

Les exigences qualitatives en éléments minéraux ont été suivies par 3 expériences successives, en fioles de Roux,ensemencées par 20.10^5 conidies âgées de 3 à 4 jours sur milieu Malt-Agar à 45°C.

FIGURE 28: Croissance (PS) et production amyloglucosidase (A.AM, à 60°C) et rapport des activités 75/60, exprimé en pourcentage, en fonction de carence minérale. (mesure à 4 jours. 37°C).



- Légende:**
1. Milieu complet (MC)
 2. MC - $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2, 2\text{H}_2\text{O}$
 3. MC - KH_2PO_4
 4. MC - MgSO_4
 5. MC - $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2, 2\text{H}_2\text{O}$ - KH_2PO_4 - MgSO_4
 6. MC - $\text{MnSO}_4, \text{H}_2\text{O}$
 7. MC - $\text{FeSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$
 8. MC - $\text{MnSO}_4, \text{H}_2\text{O}$ - $\text{FeSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$ - $\text{CuSO}_4, 5\text{H}_2\text{O}$ - $\text{ZnSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$



2.- Résultats

a) croissance, production du complexe amyloglucosidasique et de sa thermostabilité par *Thermoascus crustaceus* en fonction de carence minérale

Lors de la première expérience (fig.28) nous avons comparé à un milieu de culture complet: milieu d'isolement modifié par un taux plus bas de Ca (H_2PO_4)₂, 2H₂O, (0,2 g/l au lieu de 1,2 g/l) et par l'ajout de 0,01 g/l de Fe SO₄, 7H₂O chélaté par de l'EDTA, l'effet de carence en différents composés minéraux Ca (H_2PO_4)₂; 2H₂O; KH₂PO₄; MgSO₄, 7H₂O; MnSO₄, H₂O; FeSO₄, 7H₂O; ZnSO₄, 7H₂O; CuSO₄, 5H₂O) sur la production du complexe enzymatique, sa thermostabilité et sur la croissance mycélienne à 37°C.

* effet du retrait de Ca (H_2PO_4)₂, 2H₂O

Ce retrait entraîne une augmentation non négligeable du taux moyen d'enzyme produit, en 3 jours (20%) pour une croissance similaire. Ce composé provoque, à pH 5,8, une légère précipitation. Cet élément peut donc agir de 2 manières, directement par un effet négatif du calcium sur la production ou indirectement par la précipitation obtenue qui peut entraîner d'autres ions (phosphate, sulfate...). Mais le rapport 75/60 et le taux de croissance restant identiques à ceux du milieu complet, ce composé semble donc limiter la production. Pour de nombreux champignons, le calcium permet une augmentation de la croissance, ce qui n'est pas confirmé pour la souche P6. De la même manière, A.K.Kundu et col. (1973) ont signalé une légère amélioration de la croissance et une diminution de la synthèse d' α -amylase par *A.oryzae* pour des cultures en milieux synthétiques comportant du calcium, par inhibition des hexokinases stimulés par les ions magnésiums.

* effet du retrait du KH₂PO₄

Le retrait de cet élément entraîne des carences en potassium et phosphate. Les déficiences en phosphate causent différents désordres métaboliques, entre autres un ralentissement de l'utilisation du glucose et les problèmes en résultant. L'absorption du phosphate se fait rapidement en début de culture et il est incorporé dans de nombreux composés organiques (ADP, ATP...), il possède donc un rôle dans le transfert d'énergie. L'absorption est ralentie si la concentration externe en phosphate est faible. Le potassium est également essentiel aux champignons (Lilly, 1965b), il agit sur le métabolisme des carbohydrates (Cochrane, 1958), sur la division cellulaire (croissance) et sur la perméabilité membranaire.

Ce retrait entraîne une chute concomitante de la croissance moyenne (de 74%), de la production enzymatique (de 68%) et du 75/60 (de 25%). Ce composé est donc indispensable à la croissance du champignon et à la production du complexe enzymatique.

Le retrait du phosphate de potassium induit donc de grands problèmes d'assimilation et de métabolisme des carbohydrates, limitant la croissance fongique et la production du complexe enzymatique. Une expérience ultérieure tentera de déterminer la part de chacun des composés. Mais des taux très élevés de potassium et de phosphate peuvent être assimilés par le champignon quand ces éléments sont fournis simultanément (Burnett, 1968) d'où l'existence d'une interaction entre ces 2 ions.

** effet du retrait de $MgSO_4, 7H_2O$*

Par le retrait de cet élément dans le milieu de culture, on supprime totalement le magnésium, tandis que le soufre est encore présent par l'apport d'autres composés en sulfate, dont le besoin quantitatif est restreint.

Le magnésium est essentiel pour tous les champignons (Lilly, 1965b). Son rôle est une activation enzymatique, en particulier pour les hexokinases (Kundu et al., 1973) pour un métabolisme et une croissance normale. Les taux en magnésium nécessaires sont de l'ordre de 0,001M. Cet élément contribue à l'absorption des ions phosphoriques, le rapport Mg/P est donc important. A.K.Kundu et coll. (1973) indiquent une baisse de 65% de la croissance et de 50% de la sécrétion d'amylase d'*A.oryzae* par la carence en magnésium. Il faut noter que, en général, le soufre est incorporé dans les milieux de culture de façon excessive sous la forme de sulfate de magnésium, les besoins en cet élément étant de l'ordre de 0,0001 à 0,0006 M (Berry, 1975). Beaucoup de champignons peuvent assurer leurs besoins en soufre par du sulfate inorganique, ce qui indique qu'ils réduisent le sulfate et l'incorpore dans des molécules organiques (Acides aminés soufrés, vitamines...). Il s'agit également d'un élément indispensable au métabolisme protéique et donc cellulaire car il est un constituant des acides aminés soufrés (cystéine...). L'apport de ces 2 éléments par le sulfate de magnésium fournit toujours un excès de sulfate, mais sans atteindre des taux toxiques.

Un effet semblable à celui obtenu précédemment est observé par le retrait du $MgSO_4, 7H_2O$:

- 90% pour la croissance moyenne
- 79% pour la production enzymatique
- 29 points pour le %75/60.

Cette expérience tend à vérifier que le magnésium est indispensable au métabolisme de notre champignon.

** le retrait combiné des 3 composés minéraux majeurs $Ca (H_2PO_4)_2, 2H_2O$; $MgSO_4, 7H_2O$ et KH_2PO_4*

Ce retrait combiné inhibe presque totalement les 3 réponses étudiées. A.E.Kassim (1983) a observé également une chute importante de la production d'amyloglucosidase par *A.oryzae* quand le magnésium, le potassium et le calcium sont supprimés du milieu de culture, le retrait un à un de ces 3 éléments n'induisant qu'une légère baisse de production.

** retrait du $MnSO_4, H_2O$*

Le rôle du manganèse, en faible concentration consiste en une réactivation des enzymes, spécialement ceux du cycle de Krebs. Il est également un constituant de la nitrate réductase, de l'hydroxylamine réductase, de la décarboxylase. Le besoin en manganèse n'est pas universel pour tous les champignons (Lilly, 1965b), ce qui semble le cas pour la souche P6, dans les conditions étudiées.

En effet, le retrait du $MnSO_4, H_2O$ permet, pour une croissance similaire, une augmentation de la production (de 44%) et du %75/60 (de 16 points). Ce composé semble inhiber en partie la production du complexe enzymatique, dans les conditions étudiées.

** retrait du $FeSO_4, 7H_2O$ chélaté par de l'EDTA*

Le rôle du fer agit par son incorporation dans des métabolites (catalase, cytochromes, ferrichromes, pigment...). Le fer est considéré comme un élément essentiel pour tous les champignons (Lilly, 1965b). Le fer a été cité comme stimulateur de la production d'amylase par *A. oryzae* (Steiner, 1960). Par contre, son effet n'a jamais été signalé, au laboratoire, sur ce même enzyme produit par un mutant d'*A. oryzae* (Deprez, 1977; Malard, 1981, Remy, 1984).

Une observation différente est faite pour le retrait du $FeSO_4$ chélaté par de l'EDTA. En effet, dans ce cas, on constate une chute de croissance de 42% après 3 jours parallèlement à une augmentation légère de la production enzymatique (de 20%) pour un rapport 75/60 similaire. La production enzymatique relative au poids sec est, alors augmentée fortement (de 110%). L'action du fer sur la croissance est donc vérifiée (Lilly, 1965b) mais, cet élément semble inhiber la production du complexe enzymatique étudié (amyloglucosidase et α -glucosidase).

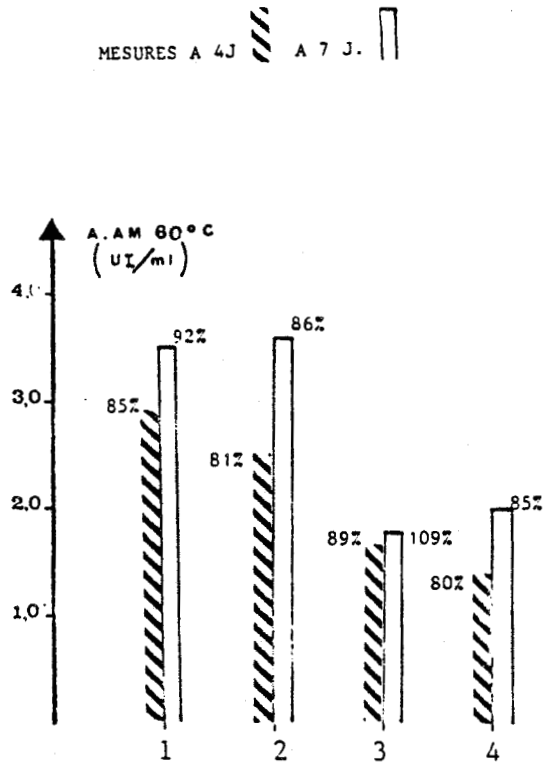
** effet du retrait des 4 éléments mineurs:
 $MnSO_4, H_2O$; $ZnSO_4, 7H_2O$; $CuSO_4, 5H_2O$ et
 $FeSO_4, 7H_2O$ chélaté par l'EDTA*

Le retrait de ces 4 éléments mineurs entraîne une chute de la croissance de 81%, de la production enzymatique de 53% et une légère baisse du %75/60 (de 10 points). L'effet du retrait du zinc et du cuivre est, dans ce cas, négatif sur la croissance et la production enzymatique est sera vérifié dans l'expérience suivante.

b) Production du complexe amyloglucosidasique et sa thermostabilité en fonction de quelques carences minérales

Une deuxième expérience (fig.29) a été réalisée dans des conditions identiques à la première à l'exception du taux d'azote (apport de 2,8 g/l au lieu de 0,94 g/l de NH_4NO_3). Cette modification a été apportée dans le but de travailler dans des conditions optimales à 37°C.

FIGURE 29: Production de l'activité amyloglucosidasiqne (A.A.M, 60°C) et rapport des activités 75/60, exprimé en pourcentage, en fonction du retrait ou de l'apport de sels minéraux. (mesures à 4 et à 7 jours. 37°C).



Légende:

1. Milieu complet (MC)
2. MC + NaCl
3. MC - $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
4. MC - $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

** effet de l'apport de NaCl à 1 g/l*

Ce composé agit, dans le métabolisme fongique, par l'apport d'ion chlorure et d'ion sodium mais, également par modification de la pression osmotique du milieu. L'apport de NaCl n'entraîne que peu de variation du comportement de la souche P6. Une légère chute de production est observée à 4 jours de culture (-14%) mais une production similaire est obtenue à 7 jours de culture. Ces éléments, sodium et chlore, ne sont pas nécessaires à la production du complexe enzymatique étudié, la variation de la pression osmotique, induite par ceux-ci, n'influence pas non plus la production du complexe. De plus, la composition du complexe ne semble pas changer, les rapports 75/60 ne variant pas.

** effet du retrait du cuivre*

Le cuivre est requis par les champignons pour une croissance normale à des taux de 0,01 à 0,1 ppm, un excès de cuivre pouvant être toxique (Lilly, 1965b). Cet élément exerce un effet sur la synthèse de la nitrite réductase et de l'hyponitrite réductase et dans différentes oxydases.

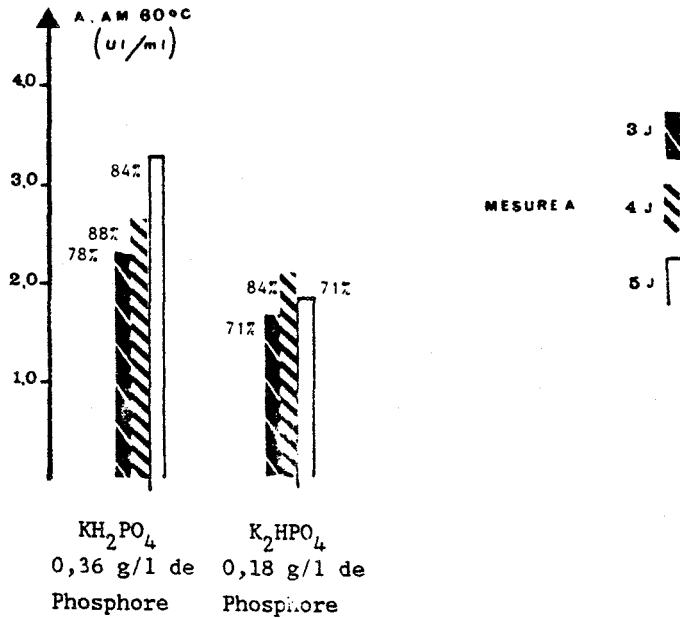
Le cuivre semble indispensable. En effet, son retrait provoque une chute de production (de 41% à 4 jours et de 54% à 7 jours de culture). L'effet du cuivre sur le 75/60 semble légèrement négatif pour la production final. Le retrait du cuivre entraîne une augmentation légère du 75/60 de 17% points à 7 jours. Le cuivre favorise donc plus la synthèse d'amyloglucosidase que celle d' α -glucosidase.

** effet du retrait du zinc*

L'importance essentielle du zinc dans la croissance et le métabolisme fongique a été confirmée de nombreuses fois (Cochrane, 1958; Lilly, 1965b; Gupta et al., 1977). Un effet de toxicité peut être exercé à hautes concentrations. Le zinc est un constituant de nombreux enzymes d'où la recherche de son effet sur la production de notre complexe enzymatique. Une limitation du taux de zinc peut induire une accumulation d'acides organiques pour une croissance insuffisante (Cochrane, 1958). De plus, S.Hayashida (1975) a montré que la sélection des différents isoenzymes d'amyloglucosidases pouvait être réalisée en jouant sur le taux de zinc en association avec des modifications de la source d'azote. Aucun effet significatif n'est observé sur le 75/60 par le retrait du zinc. Les 2 enzymes, constituant le complexe, présentent donc un comportement équivalent vis à vis du retrait de cet élément.

Le retrait du zinc est suivi également par une chute importante de la production enzymatique (de 52% à 4 jours et de 43% à 7 jours). L'effet du zinc est vérifié dans la production de notre complexe enzymatique.

FIGURE 30: Production de l'activité amyloglucosidase (A.A.M, à 60°C) et rapport des activités 75/60, exprimé en pourcentage, en fonction de la forme d'apport du potassium et du phosphore. (mesures à 3, 4 et 5 jours. 37°C).



c) Vérification de l'effet du phosphate sur la production du complexe enzymatique et sur sa thermostabilité

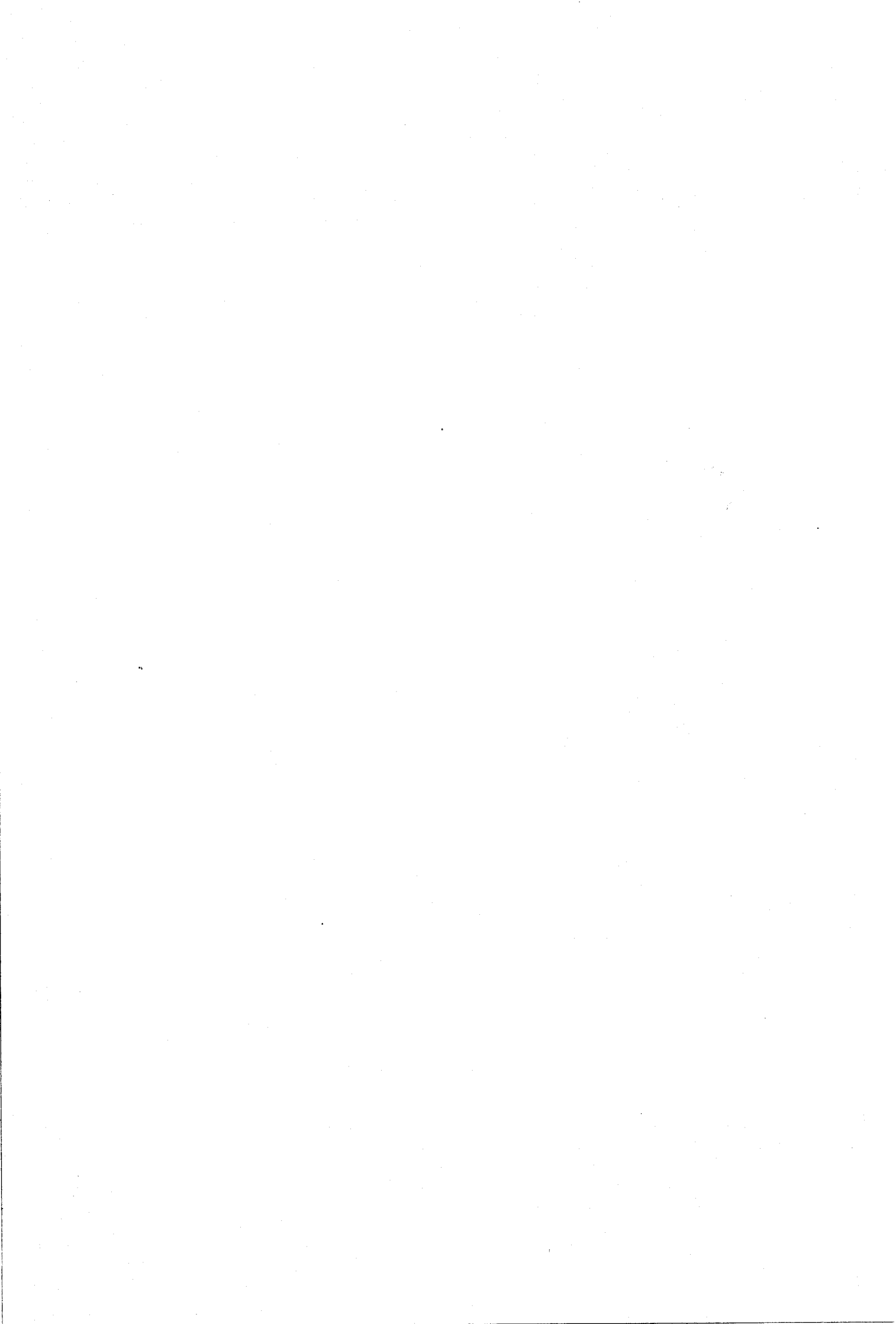
Dans la première expérience, nous avons observé que le retrait du KH_2PO_4 induisait une chute de production enzymatique. Malgré l'apport, en petite quantité, de phosphate par le $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2, 2\text{H}_2\text{O}$, nous ne pouvons attribuer, réellement, cet effet au potassium ou au phosphore, ou déterminer la part de chacun. Aussi une troisième expérience (fig.30) a comparé, pour une même concentration en potassium, l'effet du phosphate à 2 niveaux (0,18 et 0,36 g/l de phosphore), par l'apport de ces éléments soit par le KH_2PO_4 , soit par le K_2HPO_4 . Le milieu de culture a été le milieu P6 où le KH_2PO_4 à 1,6 g/l a été remplacé par 1,0 g/l de K_2HPO_4 . Les essais ont été incubés à 37°C pendant 3, 4 et 5 jours.

Quand le K_2HPO_4 (0,18 g/l de phosphore) est utilisé, une chute de production enzymatique est observée de 35% au 3ème, de 21% au 4ème et de 45% au 5ème jour. Les %75/60 sont très proches dans les 2 cas, donc la baisse du taux de phosphore de 50% influence la production des 2 enzymes formant le complexe de manière identique. Il semblerait que la baisse du %75/60 observée dans la première expérience soit due au potassium. Le phosphore testé à ces taux vérifie que la souche P6 est également exigeant en cet élément pour la synthèse des enzymes du complexe amyloglucosidasique.

Conclusion

En résumé de ces études, on peut noter, pour les conditions étudiées:

- l'effet favorable pour la production enzymatique et pour la croissance, du *Thermoascus crustaceus*, des éléments suivants: potassium, phosphore, magnésium, soufre, cuivre et zinc,
- l'effet défavorable du manganèse sur la production du complexe enzymatique, mais sans effet sur la croissance de celui-ci,
- l'effet de fer défavorable pour la production du complexe enzymatique mais bénéfique pour sa croissance,
- le chlorure de sodium ne semble pas nécessaire à la production enzymatique ou son apport en tant qu'impureté des autres sels suffit aux besoins du *Th. crustaceus* (souche P6).



II.- LES BESOINS EN VITAMINES DE THERMOASCUS CRUSTACEUS (souche P6)

Les champignons, comme tout autre organisme, nécessitent parfois des taux faibles de composés organiques spécifiques pour croître. La cellule peut synthétiser ses propres besoins en un ou plusieurs facteurs de croissance ou peut être dépendant, en partie ou totalement, d'un apport externe (Cochrane, 1958).

Les vitamines les plus couramment nécessaires aux champignons sont la biotine (apportée généralement en excès à 5 µg/l) et la thiamine (à 100 µg/l) (Fries, 1965). Les besoins en d'autres vitamines sont beaucoup plus rares (Cochrane, 1958), et peuvent être fonction des autres facteurs nutritifs et physiques (Fries, 1965). La thiamine (vitamine B1) entre en jeu comme coenzyme de nombreux enzymes (cocarboxylase, transketolase...) d'où un effet sur le métabolisme pyruvique et du cycle de Krebs. La biotine (vitamine H) est nécessaire à de nombreuses levures et champignons. Elle agit également sur la carboxylation de l'acide pyruvique et sur la synthèse d'acides gras essentiels. Les champignons déficients en biotine le sont souvent en thiamine, (Cochrane, 1958; Fries, 1965).

La bonne croissance de notre souche en milieu liquide ou solide, dépourvu de vitamines, ainsi que sa bonne production d'enzyme signifient que, si besoin en vitamines il y a, ceux-ci sont minimes.

1.- Méthodes d'étude

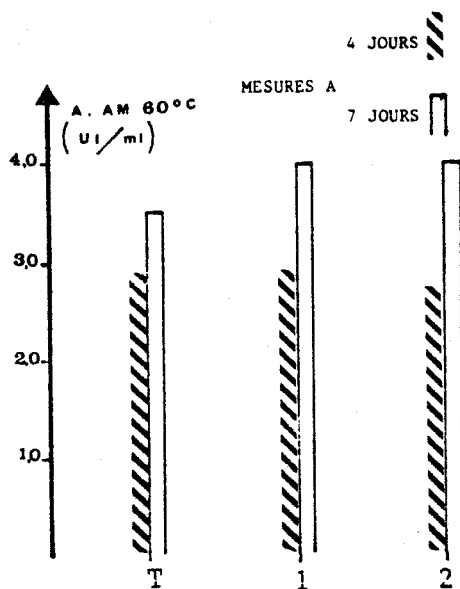
Nous avons seulement vérifié si l'apport des 2 vitamines les plus importantes (thiamine et biotine) favorisait ou non la production enzymatique (fig.31) et l'effet de chacune de ces vitamines sur la croissance du *Thermoascus crustaceus* (fig.32). Une solution vitaminée regroupant de nombreuses vitamines (biotine à 5 µg/l, thiamine, pyridoxine, choline, acide folique, panthoténate de sodium, acide nicotinique, cyanocobalamine et riboflavine à 100 µg/l) a également été essayée (fig.31).

Avant cette étude sur les besoins vitaminiques, la souche P6 a été transférée 3 fois sur le milieu gélosé Sp.Th pour éliminer toutes traces de vitamines avant constitution de l'inoculum.

Les expériences présentées dans les figures 31 et 32 ont été réalisées dans les conditions suivantes:

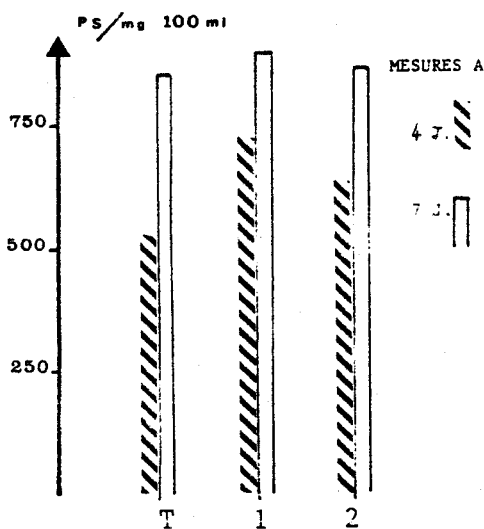
- culture en fioles de Rouxensemencée par $20 \cdot 10^5$ conidies âgées de 3 jours sur milieu Sp.Th. à 45°C,
- milieu de culture: P6,
- température de culture: 37°C.

FIGURE 31: Production de l'activité amyloglucosidasiq (A.AM, à 60°C) en fonction de l'apport de vitamines. (mesures à 4 et à 7 jours. milieu P6. 37°C).



Légende: T. Milieu témoin (MT)
 1. MT + 5 µg/l de biotine
 2. MT + 100 µg/l de thiamine

FIGURE 32: Croissance (PS) du *Thermoascus crustaceus* (P6) en fonction de l'apport en biotine et en thiamine. (mesures à 4 et à 7 jours. milieu P6. 37°C).



Légende: T. Milieu témoin (MT)
 1. MT + 5 µg/l de biotine
 + 100 µg/l de thiamine
 2. MT + Solution polyvitaminée



2.- Résultats

L'observation de la figure 31 nous montre que la production au 4ème jour n'est pas modifiée par l'apport de vitamines, tandis qu'au 7ème jour on constate une légère amélioration des productions moyennes (14%).

L'apport de la solution vitaminée complexe n'améliore pas la production enzymatique plus que l'apport des seules biotine et thiamine. Aucune des autres vitamines testées n'augmente donc la production du complexe aux concentrations utilisées.

La figure 32 représente la croissance obtenue sur le milieu P6 additionné des 2 vitamines. La croissance à 4 jours est supérieure dans le cas d'apport de la biotine et de la thiamine, les croissances à 7 jours restant similaires. Elles agissent donc en stimulant le départ de la croissance.

Il apparaît donc que les vitamines ne sont pas indispensables à la croissance de notre champignon et à sa production du complexe enzymatique, mais qu'un apport les stimule, nous sommes donc en présence d'un besoin partiel dans ces vitamines.

CONCLUSION

Les exigences en éléments minéraux sont variables selon les espèces fongiques mais réelles, en effet le besoin indispensable en de nombreux éléments minéraux est effective chez les végétaux quels qu'ils soient, car ces éléments minéraux possèdent de nombreux rôles métaboliques (constituant d'enzyme, rôle de transporteur d'électron, d'énergie...) et physiologiques (interactions ioniques, perméabilité membranaire...). Les exigences particulières à notre champignon étaient donc indispensables à déterminer. Par contre, certains organismes fongiques possèdent la capacité de produire leurs propres facteurs de croissance (ou vitamines), mais le besoin en certaines vitamines peuvent exister et la détermination de celui-ci était nécessaire pour connaître toutes les capacités du *Th. crustaceus* (souche P6). Seul un besoin partiel en biotine et en thiamine a été observé pour la production du complexe enzymatique.



CONCLUSION DE LA DEUXIEME PARTIE

Dans cette étude, suivie selon la méthode unifactorielle en culture statique, nous avons cerné les besoins culturaux de la croissance pondérale de *Thermoascus crustaceus* (P6), de sa production du complexe enzymatique (amyloglucosidase et α -glucosidase) et de la composition de ce complexe.

L'influence de l'inoculum sur la production enzymatique de *Thermoascus crustaceus* (P6) a été observée et demeure un point important à prendre en compte pour toute étude de production enzymatique.

L'influence des températures et pH de culture sur la croissance et la production enzymatique a également été étudiée et a permis d'observer un comportement particulier de ce champignon à 30°C pour la production enzymatique.

L'induction partielle de la production du complexe enzymatique étudiée, règle courante pour les enzymes amylolytiques, a été vérifiée chez notre souche. De plus l'absence de répression catabolique par le glucose nous indique que les mécanismes de synthèse de ces enzymes ne subit pas de retro-inhibition.

La composition du complexe enzymatique est fonction de la nature de la source d'azote et de la composition minérale du milieu de culture.

De fortes concentrations en carbone et en azote limitent la production enzymatique mais l'emploi de fortes teneurs en carbone stimule fortement la croissance.

La composition minérale du milieu de culture influence fortement le comportement de notre champignon, ainsi la croissance nécessite l'apport de potassium, phosphore, magnésium, soufre, fer, cuivre et zinc et la production enzymatique des mêmes éléments exception faite de fer.

Un besoin partiel en biotine et en thiamine a également été observé pour stimuler le départ de la croissance et de la production enzymatique.

L'interprétation de ces différentes observations demanderait à être vérifiée en système agité, système très différent du système statique par une aération, une immersion du mycélium et une agitation amenant un comportement fongique particulier.



IIIème PARTIE

RECHERCHE DES CONDITIONS OPTIMALES DE LA PRODUCTION
AMYLOGLUCOSIDASIQUE A THERMOSTABILITE AMELIOREE
PAR THERMOASCUS CRUSTACEUS (P6) EN SYSTEME AGITE,
PAR L'APPLICATION DE MODELES MULTIFACTORIELS



Les résultats, précédemment obtenus en fioles de Roux (système statique) par la méthode dite "un facteur à la fois", ont permis de soulever le problème de l'existence de variations des optimums en fonction des conditions d'étude (exemple : température, taux d'azote, ...), par le jeu des interactions entre les différents facteurs.

Ainsi, pour une deuxième étude des conditions de production en système agité, nécessitant également le contrôle de nombreux facteurs, il s'est avéré nécessaire d'utiliser des méthodes basées sur des données statistiques permettant d'étudier plusieurs facteurs en parallèle : les méthodes multifactorielles. En effet, l'étude des variations de ces nombreux facteurs demande le soutien de méthodes mathématiques pour pouvoir cerner l'optimum réel recherché. Il est à remarquer que le domaine d'application de ces méthodes est large et non limité à la Biologie.

Dans le premier chapitre de cette troisième partie, une bibliographie rapide présentera les différentes méthodes utilisables et certaines de leurs applications dans le domaine biologique.



CHAPITRE I

BIBLIOGRAPHIE DES DIFFERENTES METHODES MULTIFACTORIELLES ET PRESENTATION DU PROBLEME A ETUDIER



I. - BIBLIOGRAPHIE

G.W. Snedecor et W.G. Cochran (1957) montrent la difficulté, en Recherche fondamentale ou appliquée, de cerner par la méthode de "un facteur à la fois" l'étude de problème comportant de nombreuses variables.

R. Greasham et E. Inamine (1986) résument les conditions requises pour le développement industriel d'un milieu de production. La mise au point de ce milieu nécessite le choix de sources de carbone, d'azote, de phosphore, de soufre, de microéléments, la recherche d'une source d'énergie qui améliore la production du métabolite désiré et sa récupération, sans oublier l'étude des conditions physiques de culture. D'autres considérations sont également à prendre en compte comme le coût des nutriments (constitué par leur prix mais également leur transport et leur stockage), le coût des prétraitements, de la stérilisation, ... En considérant tous ces facteurs, il est nécessaire et indispensable de travailler avec des modèles multifactoriels pour trois raisons : le temps très long pour réaliser les différentes expériences, le risque majeur de ne pas atteindre l'optimum réel et l'impossibilité de saisir les interactions entre différents facteurs par l'étude "d'un facteur à la fois" (Deshayes, 1980 ; Greasham et Inamine, 1986).

P. Pilat et ses collaborateurs (1976) et C.M.P. Deshayes (1980) résument les différentes expériences factorielles utilisées à ce jour, en les classant en 2 groupes : les méthodes de recherche directe et celles permettant l'établissement, pour la réponse, d'un modèle mathématique.

1. - Les méthodes de recherche directe

Les carrés latins et gréco-latins, la méthode du simplex et la méthode de Rosenbrock constituent des méthodes de recherche directe couramment utilisées en Biologie.

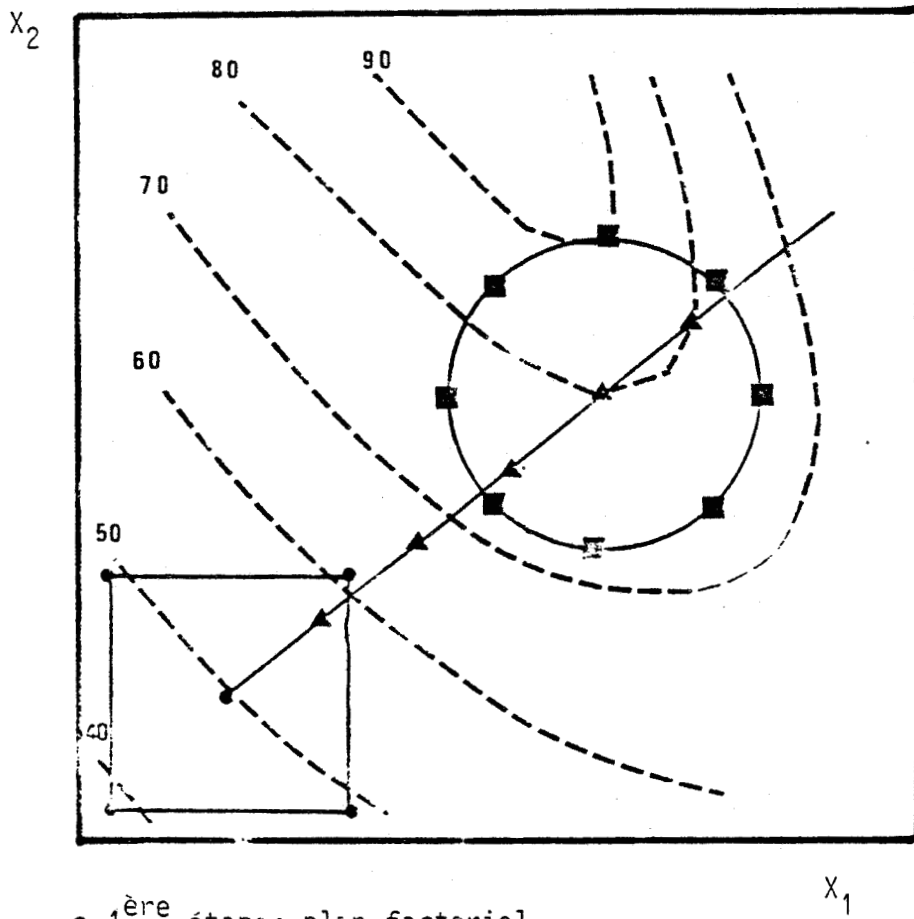
J. Auden et ses collaborateurs (1967) ont utilisé la méthode des carrés gréco-latins pour la sélection des constituants d'un milieu de production d'antibiotique. Cette méthode permet d'effectuer un premier choix, souvent qualitatif et peut constituer la première étape d'une étude.

La méthode du simplex est souvent utilisée en Chimie (Long, 1969 ; Deming et Morgan, 1973) mais moins souvent en Biologie (Dumenil et al., 1975b). G. Dumenil et ses collaborateurs (1975b) ont optimisé la bioconversion du DL homoserine en L threonine par *Enterobacter cloacae* par l'utilisation d'un modèle simplex.

La méthode de Rosenbrock, modifiée par Votruba et ses collaborateurs (1975) permet comme la méthode du simplex une optimisation progressive.

L'utilisation de ces 2 dernières méthodes (simplex et Rosenbrock) reste rare en Biologie, ce qui est dommage car il s'agit de méthodes facilement applicables, entre autres, aux cultures en fermenteur où le matériel est une condition limitante à de nombreuses expériences en parallèle.

FIGURE 33: Schéma d'optimisation par la méthode Surface-Reponse pour 2 paramètres. (D'après Deshayes, 1980).



- 1^{ère} étape: plan factoriel
- ▲ 2^{ème} étape: déplacement sur la ligne de la plus grande pente.
- 3^{ème} étape: plan centré composé

2. - Méthodes permettant l'établissement d'un modèle mathématique

Ces méthodes multifactorielles permettant l'établissement d'un modèle linéaire sont :

- les matrices d'Hadamard,
- la méthode de surface réponse.

Grâce aux matrices d'Hadamard (Plackett-Burman, 1943), étude de x facteurs à 2 niveaux en $x + 1$ expériences, il est possible de cerner les effets principaux de chaque facteur sur la ou les réponses étudiées mais non de saisir les interactions possibles entre ces différents paramètres. M. De Meo et ses collaborateurs (1985) ont optimisé un milieu de production d'un pigment bleu par *Streptomyces coelicolor* par cette méthode.

La méthode de surface réponse (Box et Wilson, 1951) est constituée de 3 étapes :

- un plan factoriel à 2 niveaux (- 1, + 1) qui permet d'établir un modèle linéaire, de saisir les interactions entre les différents facteurs et d'envisager la direction de l'optimum recherché ;
- la recherche de la zone optimale selon la direction de la plus grande pente : grâce aux résultats de l'étape précédente, les réponses étudiées seront mesurées pour différents points situés sur la direction des réponses optimales ;
- un plan centré composé qui, au voisinage de l'optimum décelé précédemment, va permettre d'étudier chaque facteur pour 5 niveaux ($-\alpha$, -1, 0, +1, $+\alpha$).

La figure 33 (selon Deshayes, 1980) résume les différentes étapes de la surface réponse pour l'étude de 2 facteurs simultanément.

Cette méthode est utilisée couramment dans les études biologiques dans son intégralité ou partiellement. Ainsi J. Auden et ses collaborateurs (1967), après avoir sélectionné les éléments constitutifs du milieu de production d'antibiotique par un carré gréco-latin, ont optimisé ce milieu par l'utilisation de plans factoriels.

L'optimisation d'un milieu de production de substances antifongiques par *Streptomyces viridoflavus* (Mc Daniel et al., 1976), la bioconversion de la DL homoserine en L threonine par *Enterobacter cloacae* (Dumenil et al., 1975a), l'optimisation d'un milieu de production d'acide gibbérelle par *Fusarium moniliforme* (Maddox et Richert, 1977), l'étude de la différenciation conidienne de *Claviceps purpurea* (Sanglier, 1977) et l'optimisation de la croissance et de la sporulation de *Conidiobolus obscurus* (Latgé et Sanglier, 1985) sont quelques applications de la méthode surface réponse entière ou partielle.

TABLEAU 23: Croissance mycélienne et production du complexe amyloglucosidasique (dosée à 60°C) par le *Th. crustaceus*, en système agité, en fonction de différentes sources de carbone et d'azote.

-croissance mycélienne -production d'enzyme -%75/60	Amidon naturel (Roquette)	Malto-dextrine MDC ₂ (Roquette)	Glucose anhydre (Prolabo)	1/2 Glucose 1/2 Acétate de Na (Prolabo)	Moyenne des effets
NH ₄ NO ₃ Prolabo	+++ 0,59 UI/ml 77 %	+++ 0,84 UI/ml 81 %	+++ 1,02 UI/ml 57 %	+ 0,09 UI/ml 30 %	0,64 UI/ml 56 %
(NH ₄) ₂ SO ₄ Prolabo	++ 0,84 UI/ml 72 %	++ 0,89 UI/ml 94 %	++ 0,58 UI/ml 102 %	+ 0,05 UI/ml 0 %	0,59 UI/ml 67 %
Extrait de levures Difco	+++ 0,96 UI/ml 65 %	+- 0,07 UI/ml 0 %	++ 0,04 UI/ml 50 %	++ 0,17 UI/ml 35 %	0,31 UI/ml 38 %
NaN ₃ Prolabo	± 0,00 UI/ml -	± 0,00 UI/ml -	± 0,17 UI/ml 50 %	± 0,00 UI/ml -	0,14 UI/ml 50 %
4/10 Glutamate 3/10 Lycocolle 3/10 Alanine	+++ 0,19 UI/ml 44 %	± 0,00 UI/ml -	++ 0,07 UI/ml 73 %	+ 0,04 UI/ml 100 %	0,08 UI/ml 72 %
Moyenne des effets	0,52 UI/ml 65 %	0,36 UI/ml 52 %	0,38 UI/ml 71 %	0,07 UI/ml 41 %	

Signification: +++ bonne croissance mycélienne
 ++ assez bonne croissance mycélienne
 + assez faible croissance mycélienne
 ± croissance faible.

Conditions culturales: Essais à 37°C, en 72h de culture, en agitation 90 rpm.
 Inoculum de 100.10⁸ spores par Erlenmeyer de un litre contenant 200 ml de milieu
 Pe associé à une source de Carbone et une source d'Azote, pour un rapport
 C/N= 7,4 et pH= 5,8.

II. - PRESENTATION DES DONNEES ET DU PROBLEME, EXPERIENCES PRELIMINAIRES

J.J. Sanglier (1977) et C.M.P. Deshayes (1980) ont tous deux longuement insisté sur la nécessité de planifier et de définir le domaine expérimental. Leurs propos se résument en :

- la détermination de l'étude à réaliser passant par le recensement des facteurs supposés influant sur le problème et leur classement. A ce niveau de planification, différentes contraintes (liées aux capacités matérielles, biologiques, industrielles) orientent le choix des facteurs et de leurs niveaux. Il faut souligner la très grande importance du choix des niveaux pour ne pas conclure trop vite à l'absence d'influence d'un facteur et pour atteindre plus vite un résultat satisfaisant ;
- la détermination des réponses à étudier et de leurs conditions ;
- le choix du ou des matrices multifactorielles à utiliser ;
- la vérification de la signification de l'expérience, par la multiplication des mesures au sein d'un essai, les répétitions de l'expérience et l'introduction de témoins dans l'essai.

Dans le cas de l'optimisation de la production du complexe enzymatique et de sa thermostabilité par la souche P6 de *Thermoascus crustaceus*, les études réalisées en système statique permettent de donner une base pour planifier notre expérimentation.

1. - Détermination du problème à étudier

L'ensemble des facteurs supposés influents sera présenté dans l'étude selon les matrices d'Hadamard (chapitre IV). Les niveaux de chaque facteur seront présentés pour chaque expérience multifactorielle.

L'influence de la température, dont l'effet sur la production est important, n'a pas été vérifiée en raison de l'impossibilité d'obtenir simultanément plusieurs niveaux pour ce facteur en système agité. Cette température a été fixée à son optimum établi en système statique : 37°C. Différentes observations en système agité, réalisées lors de la sélection des souches (Ière partie), ont montré qu'une température plus élevée (45°C) était défavorable à la production d'enzyme.

Le choix des sources d'azote et de carbone a été réalisé par une expérience préliminaire. Différentes combinaisons de sources de carbone, simple ou combinée, et d'azote, simple ou combinée également, ont été suivies pour leur effet sur la croissance, la production globale de l'enzyme et pour la thermostabilité du complexe produit (suivie par le rapport des activités dosées à 75°C et à 60°C) (tableau 23). Il aurait été possible ici de passer par l'utilisation d'une matrice expérimentale plus économique comme un carré latin ou gréco-latin, mais le nombre choisi des facteurs à suivre étant peu élevé, l'observation des différentes combinaisons était envisageable.

Le tableau 23 résume les résultats obtenus ; les conditions culturales sont présentées en annexe du tableau.

Au regard de ce tableau, il faut noter le rôle important joué par les sources d'azote ammoniacal, dans les conditions étudiées. L'emploi de la forme nitrée (nitrate de sodium) limite considérablement la croissance de la souche P6 ainsi que sa production enzymatique, tandis que l'emploi des deux formes ammoniacales (nitrate d'ammonium et sulfate d'ammonium) permet, en association avec les sources carbonées dérivées de l'amidon, une excellente croissance et de bonnes productions du complexe enzymatique. L'utilisation des sources d'azote organique, extrait de levure et mélanges d'acides aminés, limitent fortement les croissances et productions du complexe amyloglucosidase, en système agité, à l'inverse de ce qui est observé en culture statique.

Parmi les sources de carbone examinées, trois sont des dérivés de l'amidon (amidon naturel, MDO2, glucose) remarquables pour leur bonne incidence sur la production d'enzyme en système statique. Cette observation est confirmée ici.

La quatrième source testée est un mélange de glucose et d'acétate de sodium. Son utilisation ne permet pas une bonne production de biomasse et d'enzyme malgré la présence de 50 % de carbone sous forme de glucose. L'acétate, métabolite intermédiaire du cycle de Krebs, inhibe la croissance et la production du complexe, dans les conditions de l'essai.

En conclusion de cette expérience, différents choix ont été faits. La source de carbone choisie a été le MDO2, car il est plus facile d'utiliser que l'amidon naturel (non soluble) et permettra des comparaisons avec les essais en système statique. Le nitrate d'ammonium a été pris comme source d'azote dans la première matrice d'Hadamard, mais par la suite une comparaison entre le nitrate d'ammonium et le sulfate d'ammonium sera réalisée.

2. - Détermination des réponses à étudier

Dans cette étude, l'activité du complexe enzymatique est toujours dosée à deux températures : 60°C (réponse Y_1) et 75°C (réponse Y_2), ce qui permet d'appréhender la thermostabilité¹ du complexe enzymatique par le rapport des activités à 75°C et à 60°C exprimé en pourcentage (réponse Y_3). La croissance de la souche a également été suivie par la mesure du poids sec (réponse Y_4) pour observer l'effet des différents facteurs sur le métabolisme général du champignon. Enfin, pour vérifier si l'effet d'un facteur sur la production enzymatique est lié ou non à la croissance, nous avons rapporté les activités au poids de mycélium sec (réponse Y_5 = activité dosée à 60°C/poids sec ; Y_6 = activité dosée à 75°C/poids sec).

Pendant l'étude en système statique, les mesures (d'activité et de croissance) ont été réalisées, en général, après 4 jours et 7 jours de culture. En culture agitée, condition très différente, la détermination de la durée de culture est également très importante. Différentes manipulations préliminaires ont montré que le taux d'enzymes dans le milieu était maximal entre 2 et 3 jours, et que ce taux chutait rapidement par la suite. Aussi, les différentes mesures ont été pratiquées après 3 jours de culture.

3. - Choix du ou des modèles multifactoriels

La vérification de l'effet des différents facteurs en système statique était nécessaire et a été réalisée en utilisant 2 matrices d'Hadamard successives. Ces deux matrices ont été utilisées pour des niveaux légèrement décalés pour essayer de cerner la zone optimale.

Cette vérification faite, il était intéressant d'étudier les facteurs les plus influents et ceux dont l'optimum n'avait pas été déterminé. Ceci a été réalisé par l'utilisation d'un plan factoriel complet à 2 niveaux (-1, +1) pour l'étude de 4 facteurs apparemment influents.

Une dernière expérience a été menée par l'utilisation d'un plan centré composé pour vérifier que la zone optimale de ces réponses avait été effectivement atteinte.

4. - Détermination de la signification des résultats

Celle-ci est permise par les répétitions internes dans les plans expérimentaux et par la multiplication des essais. Au sein d'un plan multifactoriel chaque combinaison a été répétée 2 à 3 fois et un témoin, plusieurs fois. De plus, chaque plan a été réalisé 2 fois successivement. Grâce à ces nombreuses répétitions, une analyse de variance a été faite qui a permis à l'aide d'un test t de déterminer le degré de signification de chaque effet principal ou combiné, pour chaque facteur, sur chaque réponse.

De plus, pour vérifier la signification des réponses moyennes et évaluer la signification globale de la matrice, nous avons comparé les différents coefficients de variation à celui du témoin. Le coefficient de variation (C.V.) correspond au pourcentage de l'écart-type (ou déviation standard : D.S) et de la moyenne d'un échantillon, soit :

$$C.V. = \frac{D.S}{\bar{m}} \cdot 100$$

La signification globale de la matrice est effective si son coefficient de variation est au moins du double de celui des témoins.



CHAPITRE II

MATERIEL ET METHODES



Les conditions et le matériel d'étude sont très proches de ceux présentés dans la partie Matériel et Méthodes de la deuxième partie.

I. - MATERIEL

La culture a été réalisée en fioles d'Erlenmeyer de 1 000 ml contenant 200 ml de milieu. L'agitation des fioles est assurée par une table d'agitation Biolafitte (type AS 850) pouvant supporter 38 fioles de 1 000 ml. La culture a lieu dans une chambre thermostatée à 37°C +/- 0,5°C.

II. - METHODES

1. - L'inoculum

L'inoculum est préparé de la même manière que décrit p. 40. Le taux d'ensemencement a été augmenté à $100 \cdot 10^7$ conidies pour 200 ml de milieu de culture, pour permettre une bonne initialisation de la culture, après différents essais.

2. - Mesures

Les dosages enzymatiques et la mesure du poids de mycélium sec sont réalisés de la façon décrite p.100

3. - Calcul statistique

Les calculs statistiques des résultats et leur signification ont été réalisés sur UNIVAC (SANDOZ) programme PUMA (programme d'analyse de régression multilinéaire) par les bons soins de Monsieur J.J. Sanglier. Ces calculs rassemblent l'analyse des effets principaux et secondaires, leur signification, la signification des modèles établis et pour le plan centré composé les calculs nécessaires à la réalisation des courbes d'isoréponses.

La signification des résultats a été estimée par l'emploi d'un test t pour un seuil de $p = 0,1$.

4. - Les matrices d'Hadamard (Plackett-Burman, 1943)

La croissance et la production enzymatique ont, tout d'abord, été étudiées grâce à l'emploi de matrices d'Hadamard.

Ce sont des plans multifactoriels permettant d'étudier N-1 facteurs en N expériences (avec N multiple de 4). Chaque facteur est étudié à 2 niveaux codés représentés par les valeurs -1 et +1. Chaque ligne de la matrice correspond à une combinaison des N-1 facteurs pris soit à leur niveau -1, soit au niveau +1. Les niveaux étudiés peuvent être qualitatifs ou quantitatifs. Différents auteurs présentent la construction des matrices de ce plan (Deshayes, 1980 ; Greasham et Inamine, 1986).

Dans cette étude, 2 matrices à N = 12 expériences ont été réalisées ; ces matrices sont représentées dans les tableaux 25 et 28. Pour chaque combinaison établie avec l'aide des matrices d'Hadamard, la

croissance mycélienne et l'activité du complexe enzymatique seront déterminées (réponses $Y_1, Y_2, Y_3, Y_4, Y_5, Y_6$).

Pour chaque réponse (ex. : la croissance mycélienne), une valeur moyenne des réponses individuelles à chaque milieu sera calculée :

$$B_0 = \frac{Y_1 + Y_2 + \dots + Y_{12}}{12}$$

De plus, l'effet principal de chaque facteur sur la réponse étudiée (ex. : la croissance mycélienne) sera établi en calculant la différence moyenne des réponses individuelles au niveau (+1) de celles du niveau (-1).

Ainsi, l'effet du premier facteur (B_1) sera :

$$B_1 = \frac{\text{sigma (+)} - \text{sigma (-)}}{12}$$

où : sigma (+) est la somme des réponses individuelles où le premier facteur est pris à son niveau +1 ;
sigma (-) est la somme des réponses individuelles où le premier facteur est pris à son niveau -1 ;
12 est le nombre de combinaisons testées (ou milieux différents).

Dans les matrices d'Hadamard, seules N combinaisons de N-1 facteurs à 2 niveaux d'étude sont réalisées. Les interactions entre 2 facteurs ou plus ne peuvent donc pas être obtenues par ces matrices.

5. - Les plans factoriels complets à 2 niveaux selon Box et Wilson (1951)

Après détermination des concentrations optimales de nombreux facteurs pour la croissance et la production enzymatique du *Thermoascus crustaceus*, l'influence de certains facteurs sera étudiée, plus précisément, par l'application d'un plan factoriel complet à 2 niveaux.

Il s'agit également de plans multifactoriels où N facteurs sont étudiés en 2^N combinaisons, à 2 niveaux codés d'étude (-1, +1).

Dans ces plans factoriels, toutes les combinaisons peuvent être examinées ; dans ce cas, il s'agit d'un plan factoriel complet où les interactions sont appréhendées. Il est également possible d'étudier un plus grand nombre de facteurs en négligeant certaines interactions, mais ce n'est pas notre propos ici.

Le plan factoriel utilisé dans cette étude est un plan 2^4 qui étudie 4 facteurs X_1 à X_4 à 2 niveaux codés -1 et +1, les autres composants des milieux de culture étant constants. La matrice utilisée est présentée dans le tableau 31.

Comme dans le cas des matrices d'Hadamard, pour chaque réponse étudiée, une valeur moyenne des réponses individuelles de chaque combinaison de 4 facteurs est calculée :

$$B_0 = \frac{Y_1 + Y_2 + \dots + Y_{16}}{16}$$

L'effet moyen de chaque facteur (ou coefficient du modèle linéaire) sera établi en calculant la différence moyenne entre les réponses individuelles moyennes au niveau -1 de celles obtenues au niveau +1.

Effet du facteur X_1 :

$$B_1 = \frac{\text{sigma (+)} - \text{sigma (-)}}{16}$$

Dans ce cas, le modèle linéaire simple est représenté par l'équation suivante :

pour la réponse $Y_1 = B_{0(1)} + B_{1(1)} X_1 + \dots + B_{4(1)} X_4$

où $B_{1(1)}$ à $B_{4(1)}$: coefficient linéaire calculé comme précédemment pour la réponse Y_1 .

X_1 à X_4 : niveaux des 4 variables.

Cette équation ne présente pas les interactions possibles entre les différents facteurs. Avant de rechercher ces interactions hypothétiques, la signification du modèle linéaire simple est vérifiée par l'établissement du rapport entre la variance générale et la variance entre les points observés (réponses individuelles) et les points calculés (selon le modèle linéaire). La signification de ce rapport peut être comparée par l'emploi d'un test F, pour le nombre d'observations effectuées.

Si la signification du modèle linéaire est proche des 100 %, les interactions sont négligeables voire inexistantes.

Par contre, si ce modèle linéaire simple ne suffit pas pour obtenir une bonne correspondance entre les variances, l'existence d'interactions est à envisager. L'évaluation de ces interactions est réalisée par le développement de la matrice expérimentale en une matrice de détermination. Les signes pour chaque combinaison et pour chaque interaction sont obtenus par multiplication des signes correspondants. L'évaluation des interactions se fait alors selon le même principe que celui décrit pour les effets principaux.

6. - Plan centré composé

Il s'agit d'un plan multifactoriel pour lequel chaque facteur est étudié à 5 niveaux codés. En effet, ce plan centré composé est utilisé, en général, au voisinage de l'optimum où les modèles mathématiques du premier degré ne sont plus applicables et où il est nécessaire de

rechercher un modèle du second degré. Ce modèle est établi grâce à l'emploi de ce plan centré composé.

Les 5 niveaux codés étudiés sont $(-\alpha, -1, 0, +1, +\alpha)$.

La valeur du niveau α est déterminée en fonction de contraintes d'orthogonalité ou de rotabilité et est fonction du nombre de facteurs étudiés. Le plan centré composé orthogonal permet une estimation réelle des différents coefficients et le plan centré composé rotatif une uniformité de variance car chaque point est à égale distance du point central (Sanglier, 1977 ; Deshayes, 1980).

Dans notre cas, un plan centré composé orthogonal a été choisi et le nombre de facteurs étudié étant au nombre de 3, la valeur de α est de 1,216 (Sanglier, 1977).

La matrice d'expérience se compose d'un plan factoriel complet 2^3 complété par différentes combinaisons où chaque facteur est successivement pris à ses niveaux $-\alpha$ et $+\alpha$, les autres facteurs étant pris à leur niveau 0. Une répétition du point central complète ce plan et permet d'établir l'erreur expérimental.

Cette matrice de 3 facteurs étudiés à 5 niveaux codés est représentée dans le tableau 34.

La détermination des coefficients linéaires est réalisée de la même manière que ceux du plan factoriel. Les coefficients d'interaction et quadratiques sont calculés par ordinateur (UNIVAC, SANDOZ) ainsi que certaines représentations graphiques (courbes d'isoreponses).

Le modèle quadratique, dans ce cas, peut être résumé pour chaque réponse :

$$Y = B_0 + B_1 X_1 + B_2 X_2 + B_3 X_3 + B_{12} X_1 X_2 + B_{13} X_1 X_3 + B_{23} X_2 X_3 + B_{11} X_1^2 + B_{22} X_2^2 + B_{33} X_3^2$$

où B_0 est la moyenne des effets ;

B_1, B_2, B_3 les coefficients linéaires liés à chaque facteur ;

B_{12}, B_{13}, B_{23} les coefficients croisés ;

B_{11}, B_{22}, B_{33} les coefficients quadratiques ;

X_1, X_2, X_3 les niveaux des 3 variables.

L'adéquation du modèle quadratique est vérifiée de façon similaire à celle du plan factoriel complet.

CHAPITRE III

PREMIERE APPROCHE DU PROBLEME PAR L'ETUDE DE 11 FACTEURS
GRACE A L'UTILISATION DE MATRICES D'HADAMARD



Dans la deuxième partie, nous avons cerné le rôle, en système statique de nombreux facteurs nutritifs dans la production du complexe enzymatique et de sa thermostabilité par une méthode unifactorielle.

Cette première approche en culture agitée a comme but de vérifier avec l'aide de 2 matrices successives d'Hadamard, les facteurs jouant un rôle important dans la production du complexe amyloglucosidasique et de sa thermostabilité, pour une stratégie globale et de déterminer les concentrations optimales de certains éléments.

Les conditions constantes de ces expériences ont été les suivantes:

- flacon d'Erlenmeyer de 1 litre contenant 200 ml de milieu de culture
- ensemencement avec 100.10^5 spores par erlenmeyer
- source de carbone: maltodextrine (MDO2) à 25 g/l (sec)
- à 37°C et à l'obscurité
- chaque essai a été répété 2x2 à 2x3 fois

Chaque résultat présenté correspond à la moyenne de 4 à 6 essais réalisés en 2 expériences successives, sauf quand cela est précisé. La signification de ces moyennes a été vérifiée par la comparaison des coefficients de variations (C.V.) à celui des témoins (C.V. = écart-type/moyenne x 100).

I.- PREMIERE MATRICE D'HADAMARD

Dans cette matrice, 11 facteurs sont étudiés dans 12 combinaisons différentes, à 2 niveaux codés (-1, +1). Ces différents facteurs et leurs niveaux sont présentés dans le tableau 24.

Nous avons étudié certains des facteurs qui étaient apparus influant en système statique, ainsi que l'effet de l'agitation. Ces 11 paramètres étudiés sont le taux d'azote apporté dans le milieu (variation du C/N), la vitesse de rotation appliquée aux fioles (aération, agitation), la composition de la solution minérale (KH_2PO_4 ; $\text{MgSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$; $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2, 2\text{H}_2\text{O}$; $\text{CuSO}_4, 5\text{H}_2\text{O}$; $\text{ZnSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$; $\text{MnSO}_4, \text{H}_2\text{O}$; $\text{FeSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$ chélaté par de l'EDTA), les vitamines (biotine et thiamine) et le pH du milieu de culture. La source d'azote utilisée dans cette première expérience a été le nitrate d'ammonium.

Le tableau 25 présente la matrice d'expérience et les réponses obtenues et le tableau 26 l'effet moyen de chaque facteur, pour chaque réponse.

TABLEAU 24: Les différents facteurs étudiés et leurs niveaux dans les essais et le témoin de la première matrice d'Hadamard.

n° facteur	facteurs étudiés	niveau -1	niveau +1	niveau témoin
X ₁	taux d'azote (C/N=)	1,50 g/l (7,4)	0,23 g/l (23,4)	0,95 g/l (11,7) (t1)
X ₂	vitesse de rotation	80 rpm	120 rpm	80 rpm
X ₃	KH ₂ PO ₄	1,0 g/l	2,0 g/l	1,6g/l (t3)
X ₄	MgSO ₄ , 7H ₂ O	0,25 g/l	0,75 g/l	0,50 g/l
X ₅	Ca(H ₂ PO ₄) ₂ , 2H ₂ O	0 g/l	1,2 g/l	0,2g/l (t5)
X ₆	CuSO ₄ , 5H ₂ O	0,01 g/l	0,02 g/l	0,01 g/l
X ₇	ZnSO ₄ , 7H ₂ O	0,02 g/l	0,04 g/l	0,02 g/l
X ₈	FeSO ₄ , 7H ₂ O	0,00 g/l	0,01 g/l	0,01 g/l
X ₉	MnSO ₄ , H ₂ O	0,00 g/l	0,02 g/l	0,02 g/l
X ₁₀	biotine	0 µg/l	5 µg/l	0 µg/l
	thiamine	0 µg/l	100 µg/l	0 µg/l
X ₁₁	pH	5,8	6,5	5,8



rpm= rotation par minute

TABLEAU 25: Matrice d'expérience et réponses des essais de la première matrice d'Hadamard.

n° essai	MATRICE D'EXPERIENCE											REPONSES					
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆	X ₇	X ₈	X ₉	X ₁₀	X ₁₁	Production enzymatique			Croissance	Production relative au PS	
	taux d'azote	vitamine	rotation	K ₂ H ₂ PO ₄	MgSO ₄ · 7H ₂ O	Ca(H ₂ PO ₄) ₂ · 2H ₂ O	CUSO ₄ · 5H ₂ O	ZnSO ₄ · 7H ₂ O	FeSO ₄ · 7H ₂ O	MnSO ₄ · H ₂ O	vitamines	pH	Y ₁ (a) A.AM dosée à 60°C UI/ml	Y ₂ (a) A.AM dosée à 75°C UI/ml	Y ₃ (a) % 75/60	Y ₄ (b) Poids sec mg / 200ml	Y ₅ (b)(c) AM 60°C /PS UI/g
1	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	0,575	0,330	59,0%	860	93	47
2	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	0,100	0,010	25,0%	318	38	13
3	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	1,090	0,350	33,5%	897	190	62
4	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	0,120	0,020	22,0%	195	41	21
5	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+	-	0,740	0,280	38,0%	784	179	54
6	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	0,875	0,260	28,0%	701	205	46
7	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+	0,450	0,160	31,0%	694	72	17
8	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	0,460	0,160	19,0%	1369	121	47
9	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	1,720	0,795	47,0%	988	377	164
10	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	0,335	0,320	89,5%	1341	73	75
11	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	0,275	0,080	45,0%	547	59	44
12	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,860	0,520	37,5%	531	305	139
1	t1	-	t3	0	t5	-	-	+	+	-	-	0,820	0,410	50,0%	-	-	-
3	t1	-	t3	0	t5	-	-	+	+	-	-	0,710	0,240	34,0%	-	-	-
4	t1	-	t3	0	t5	-	-	+	+	-	-	1,020	0,300	30,0%	-	-	-
5	t1	-	t3	0	t5	-	-	+	+	-	-	1,060	0,310	29,0%	-	-	-
6	t1	-	t3	0	t5	-	-	+	+	-	-	0,720	0,310	43,0%	-	-	-
7	t1	-	t3	0	t5	-	-	+	+	-	-	0,440	0,130	29,0%	388	227	67
8	t1	-	t3	0	t5	-	-	+	+	-	-	0,600	0,230	39,0%	773	155	60
8	t1	-	t3	0	t5	-	-	+	+	-	-	0,690	0,150	21,0%	755	183	40

: moyenne de 4 à 6 mesures réparties en 2 expériences successives pour les essais 1 à 12.

: moyenne de 2 ou 3 mesures en une seule expérience pour les essais 1 à 12.

: rapport calculé avec les valeurs d'activités AM correspondantes aux valeurs de poids sec, pour les essais 1 à 12.

: Les essais T1 à T8 correspondent à des mesures simples.



TABLEAU 26: Effets moyens de chaque facteur ou coefficients du modèle obtenus.

	REPONSES					
	Production enzymatique			.Crois- sance	Production relative au PS	
	Y ₁	Y ₂	Y ₃	Y ₄	Y ₅	Y ₆
	A.AM dosée à 60°C UI/ml	A.AM dosée à 75°C UI/ml	% 75/60	Poids sec mg / 200ml	AM 60°C / PS UI/g	AM 75°C / PS UI/g
<u>Terme constant</u>						
b ₀ (moyenne des essais)	0,633	0,257	42,0	769	146,1	60,75
<u>Terme linéaire</u> (ou effet moyen)						
b ₁ (taux d'azote)	<u>+0,128</u>	<u>+0,055</u>	- 3,0	<u>+124</u>	+ 5,9	+ 2,8
b ₂ (rotation)	-0,082	+0,015	+ 1,5	+ 76	-22,3	+ 0,4
b ₃ (KH ₂ PO ₄)	+0,077	+0,049	+ 4,3	+ 44	+ 6,6	+ 7,9
b ₄ (MgSO ₄ , 7H ₂ O)	-0,088	-0,030	+ 4,1	- 12	-35,9	-11,6
b ₅ (Ca(H ₂ PO ₄) ₂ , 2H ₂ O)	<u>-0,257</u>	<u>-0,110</u>	- 5,4	<u>-202</u>	<u>-65,75</u>	<u>-28,1</u>
b ₆ (CuSO ₄ , 5H ₂ O)	+0,007	-0,025	- 8,3	+ 53	- 8,4	-15,9
b ₇ (ZnSO ₄ , 7H ₂ O)	<u>+0,093</u>	+0,009	<u>-11,0</u>	<u>-137</u>	+ 7,75	- 6,9
b ₈ (FeSO ₄ , 7H ₂ O)	<u>-0,101</u>	-0,042	- 3,2	<u>+111</u>	-33,4	-14,8
b ₉ (MnSO ₄ , H ₂ O)	+0,065	+0,009	<u>- 8,9</u>	- 5	+17,6	+ 1,9
b ₁₀ (biotine+thiamine)	<u>+0,149</u>	<u>+0,100</u>	+ 6,7	<u>+126</u>	+20,4	+ 6,4
b ₁₁ (pH)	<u>-0,218</u>	<u>-0,092</u>	- 2,5	+ 60	<u>-51,4</u>	<u>-20,4</u>

nb: -Les termes soulignés présentent une signification pour un seuil de p=0,1; test t.

Les termes non soulignés ne présentent pas, dans les conditions étudiées, de signification interprétable.

Le lot témoin correspond ici au milieu P6 supplémenté en FeSO_4 , $7\text{H}_2\text{O}$, milieu permettant une bonne croissance et une bonne production enzymatique en système statique de notre champignon.

Dans les domaines de concentration essayés et sous les conditions constantes choisies, les effets des 11 facteurs sur les 6 réponses étudiées ont été les suivants:

1.-Effet de la concentration en azote apporté sous forme de nitrate d'ammonium (variation inverse du rapport C/N.) (niveau-1: 1,50 g/l; niveau+1: 0,48 g/l)

L'effet du taux d'azote dans le milieu de culture est positif sur la production absolue du complexe enzymatique (réponses Y_1 et Y_2) et sur la croissance (réponse Y_4): ainsi un taux d'azote bas au niveau +1 ($N = 0,48$ g/l) permet une amélioration de la croissance (de +38%) et de la production du complexe enzymatique (de +50%) par rapport à une teneur élevée de 1,50 g/l.

Ce facteur agit de façon similaire, dans les conditions étudiées, sur la production des 2 enzymes (amyloglucosidase et α -glucosidase).

On a noté, aux concentrations en azote étudiées, une variation parallèle de la croissance mycélienne et de la production enzymatique, aussi aucune amélioration de la production enzymatique rapportée à la biomasse n'a été observée.

2.-Effet de la vitesse d'agitation (niveau -1: 80 rpm; niveau +1: 120 rpm)

Les variations de vitesse d'agitation n'ont pas exercé d'effet significatif sur la production du complexe enzymatique ni sur la croissance du champignon. Le peu de différence entre les 2 niveaux permet de supposer que cette absence de signification est due à un mauvais choix des niveaux.

3.-Effet du taux de KH_2PO_4 (niveau -1: 1,0 g/l; niveau +1: 2,0 g/l).

Ce facteur ne présente pas d'effet significatif au seuil de probabilité de 0,1, mais la tendance générale des effets est positive. Une concentration élevée (2,0 g/l) apparaît plus favorable pour les différentes réponses qu'une concentration faible (1,0 g/l). L'effet du KH_2PO_4 est à la limite de la signification pour la réponse Y_2 (production enzymatique mesurée à 75°C). Ainsi au niveau -1 la réponse moyenne pour Y_2 est de 0,208 UI/ml (dosée à 75°C) et au niveau +1 cette réponse moyenne passe à 0,306 UI/ml (amélioration de 46% de la production).

4.-Effet du taux de $MgSO_4, 7H_2O$ (niveau -1: 0,25 g/l; niveau +1: 0,75 g/l).

Une concentration élevée en sulfate de magnésium (0,75 g/l) a un effet défavorable sur la croissance et sur la production du complexe amyloglucosidasiq ue de *Thermoascus crustaceus*, mais ceci de façon non significative. Cependant une légère amélioration non significative du rapport des activités dosées à 75°C et à 60°C (réponse Y_3) peut être observée.

5.-Effet du taux de $Ca(H_2PO_4)_2, 2H_2O$ (niveau -1: 0,0 g/l; niveau +1: 1,2 g/l)

Le $Ca(H_2PO_4)_2, 2H_2O$ présente un effet très nettement significatif. L'absence d'apport de cet élément permet une forte amélioration des productions globales d'enzymes (Y_1 : +136%; Y_2 : +151%), relatives (Y_5 : +164%; Y_6 : 172%) et de la croissance (de +71%). Cet effet négatif peut être dû au calcium, au phosphore ou à la précipitation provoquée par ce sel dans le milieu de culture, n'autorisant pas une bonne disponibilité des minéraux pour le mycélium. L'effet négatif dû au phosphate n'est, toutefois, pas à envisager en raison des résultats positifs obtenus avec le KH_2PO_4 . Il apparaît donc que cet effet négatif incombe au calcium par la précipitation de nombreux autres ions qu'il entraîne.

En système statique cet élément avait également un effet négatif sur les productions du complexe enzymatique mais n'induisait pas de chute de croissance, comme observé ici.

6.-Effet du taux de $CuSO_4, 5H_2O$ (niveau -1: 0,01 g/l; niveau +1: 0,02 g/l).

Les différences d'action du sulfate de cuivre entre les concentrations 0,01 g/l et 0,02 g/l ne sont pas significatives. Un effet à la limite de la signification est seulement observé pour le rapport 75/60, dans ce cas le pourcentage moyen de ce rapport d'activités pour un apport de 10 mg/l est de 45% et de 33% pour un apport de 20 mg/l.

7.-Effet du taux de $ZnSO_4, 7H_2O$ (niveau -1: 0,02 g/l; niveau +1: 0,04 g/l).

L'utilisation d'un taux élevé de sulfate de zinc (40 mg/l) augmente la production enzymatique dosée à 60°C (réponse Y_1 ; de +35%). Aucun effet significatif n'est observable pour la production dosée à 75°C (réponse Y_2), il en résulte qu'une dose élevée de cet élément (40 mg/l) induit une chute du rapport 75/60 (réponse Y_3) de façon significative (-35% par rapport à un taux de 20 mg/l). Cet élément à forte teneur stimule la production de l'amyloglucosidase au détriment de l' α -glucosidase. On note en même temps une chute de la croissance mycélienne (-30% entre les niveaux -1 et +1). Aucun effet significatif n'a été obtenue, à ces niveaux, sur les productions spécifiques.

8.-Effet du $\text{FeSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$ chélaté par de l'EDTA (niveau -1: 0,00g/l; niveau +1: 0,01 g/l).

L'apport de $\text{FeSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$ à un taux de 10 mg/l augmente de 33% la biomasse mesurée après 3 jours de culture, par contre il exerce un effet négatif sur la production du complexe mesuré à 60°C (réponse Y_1) (baisse de 27% par rapport à la moyenne des milieux ne le comportant pas). On ne peut envisager la précipitation des minéraux comme explication de la chute de production; en effet le fer, étant chélaté, n'induit aucune précipitation dans le milieu.

9.-Effet de l'apport de $\text{MnSO}_4, \text{H}_2\text{O}$ (niveau -1: 0,00 g/l; niveau +1: 0,02 g/l).

Le sulfate de manganèse n'étant pas apparu nécessaire à la croissance et à la production enzymatique en système statique, nous n'avons testé que son apport par rapport à sa carence. Cet élément n'a pas d'effet significatif sur la croissance de champignon ni sur la production du complexe enzymatique, bien qu'une tendance semble montrer que son apport est bénéfique à la production enzymatique. Par contre un effet significatif sur le rapport 75/60 est à remarquer; en effet l'addition au milieu de 0,02 g/l de $\text{MnSO}_4, \text{H}_2\text{O}$ entraîne une baisse de 13 points de ce pourcentage et donc une meilleure production relative de l'enzyme le moins thermostable (amyloglucosidase).

10.-Effet de l'apport de vitamines (thiamine et biotine: niveau -1: 0µg/l et niveau +1: 5µg/l de biotine et 100 µg/l de thiamine).

Nous n'avons testé, dans cette étude, que les deux vitamines ayant stimulé la production enzymatique en système statique. L'apport de ces 2 vitamines au milieu de culture stimule la croissance (de +46%) et la production globale du complexe enzymatique (de 62% pour la réponse Y_1 , de 128% pour la réponse Y_2). Malgré l'absence d'effet significatif sur le rapport de activités dosées à 75°C et à 60°C il semble donc que ces vitamines stimulent plus la production de l' α -glucosidase que l'amyloglucosidase.

Ces corps induisent une légère augmentation de la production finale en système statique et accélèrent le développement mycélien en début de culture, sans que la croissance finale soit modifiée. L'effet de ces vitamines est plus net en système agité qu'en culture statique.

11.-Effet du pH (niveau -1: pH 5.8; niveau +1: pH 6.5).

Si un pH de 6.5 semble plus favorable à la croissance du champignon (de façon non significative), il est significativement moins favorable aux productions globales et spécifiques du complexe enzymatique que le pH 5.8. En effet, à pH 6.5 on constate une chute des différentes productions (réponses Y_1, Y_2, Y_5 et Y_6) d'environ 50% par rapport aux productions observées à pH 5.8.

Après cette première étude nous avons pu classer nos facteurs en différents groupes, dans les conditions étudiées:

- Facteurs à effets significatifs sur la croissance; taux d'azote (effet négatif du taux élevé d'azote), $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2, 2\text{H}_2\text{O}$ (effet - de niveau +1 par rapport au niveau -1), $\text{ZnSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$ (effet-), $\text{FeSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$ (effet + de niveau +1 par rapport au niveau -1), vitamines (effet +).
- Facteurs à effets significatifs pour les productions d'enzymes (réponses Y_1 et Y_2) mais sans effet sur les productions spécifiques: taux d'azote (effet négatif du taux élevé) $\text{ZnSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$ (effet +), $\text{FeSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$ (effet -), KH_2PO_4 (effet +) et vitamines (effet +)
- Facteurs à effets significatifs sur le rapport des activités dosées à 75°C et à 60°C (réponse Y_3): $\text{ZnSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$ (effet-), $\text{MnSO}_4, \text{H}_2\text{O}$ (effet -)
- Facteurs induisant des effets significatifs pour les productions d'enzymes (Y_1 et Y_2) et pour les productions spécifiques (Y_5 et Y_6): $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2, 2\text{H}_2\text{O}$ (effet -) et pH (effet -).
- Facteurs à effets non significatifs: vitesse de rotation des cultures, $\text{MgSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$

L'absence de signification d'un effet n'indique pas nécessairement que le facteur étudié est sans influence sur le phénomène considéré. Les variations intrinsèques de l'expérience peuvent être trop élevées, l'influence plus marquée d'autres facteurs, éloignés de leur optimum, peut masquer l'effet d'autres facteurs et enfin le choix des niveaux peut ne pas avoir été adéquat.

Aussi dans le souci de ne pas conclure trop vite à la signification ou non des différents facteurs nous les avons testés dans une deuxième matrice d'Hadamard.

II.-DEUXIEME MATRICE D'HADAMARD

La plupart des facteurs testés dans la première matrice sont étudiés, à nouveau, à d'autres niveaux dans cette deuxième matrice afin de vérifier ou de cerner les optimums de certains d'entre eux. Le fer (sous forme de $\text{FeSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$ chélaté par de l'EDTA) n'a plus été considéré et a été supprimé des milieux de culture. Le phosphate de calcium a été remplacé ici par du chlorure de calcium dans le but de pouvoir déterminer si l'effet observé pour cet élément était lié à l'ion phosphate, au calcium ou à la précipitation induite par celui ci. Dans les essais préliminaires, les 2 sources d'azote ammoniacé testées

TABEAU 27: Les différents facteurs étudiés et leurs niveaux dans les essais et le témoin de la deuxième matrice d'Hadamard.

n° facteur	facteurs étudiés	niveau -1	niveau +1	niveau témoin
X ₁	source d'azote	NH ₄ NO ₃	(NH ₄) ₂ SO ₄	NH ₄ NO ₃
X ₂	taux d'azote (C/N=)	0,62 g/l (17,5)	0,48 g/l (23,4)	0,95 g/l (11,7) (t2)
X ₃	vitesse de rotation	80 rpm	150 rpm	80 rpm
X ₄	KH ₂ PO ₄	1,5 g/l	2,5 g/l	1,6g/l (t4)
X ₅	MgSO ₄ , 7H ₂ O	0,0 g/l	0,5 g/l	0,5 g/l
X ₆	CaCl ₂	0,0 g/l	1,0 g/l	0,2g/l (t6) Ca(H ₂ PO ₄) ₂ , 2H ₂ O
X ₇	CuSO ₄ , 5H ₂ O	0,005 g/l	0,015 g/l	0,010 g/l
X ₈	ZnSO ₄ , 7H ₂ O	0,03 g/l	0,05 g/l	0,02 g/l (t8)
X ₉	MnSO ₄ , H ₂ O	0,01 g/l	0,03 g/l	0,02 g/l
X ₁₀	biotine	0 µg/l	100 µg/l	0 µg/l
	thiamine	0 µg/l	1000 µg/l	100 µg/l
X ₁₁	pH	5,0	5,8	5,8

rpm= rotation par minute



TABLEAU 28: Matrice d'expérience et réponses des essais de la deuxième matrice d'Hadarnard.

n° essai	MATRICE D'EXPERIENCE											REponses					
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆	X ₇	X ₈	X ₉	X ₁₀	X ₁₁	Production enzymatique			Croissance	Production relative au PS	
	soufre	taux	vitamines	K ₂	MgO	CaCl ₂	CUSO ₄ 5H ₂ O	ZnSO ₄ 7H ₂ O	MnSO ₄ H ₂ O	vitamines	pH	Y ₁	Y ₂	Y ₃	Y ₄	Y ₅	Y ₆
												A.AM dosée à 60°C UI/ml	A.AM dosée à 75°C UI/ml	% 75/60	Poids sec mg /200ml	AM 60°C /PS UI/g	AM 75°C /PS UI/g
1	+	+	-	+	+	-	-	-	+	-	0,550	0,530	97,5%	909,0	122,5	118,5	
2	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+	0,025	0,025	115,5%	97,5	51,5	51,5	
3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0,080	0,090	114,0%	265,5	61,5	69,0	
4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,515	0,325	63,5%	573,5	179,0	113,0	
5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,030	0,030	97,0%	90,5	64,5	64,5	
6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,295	0,250	88,0%	564,5	104,5	89,0	
7	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	0,800	0,520	64,5%	603,0	265,0	171,5	
8	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	0,115	0,110	90,5%	335,0	66,0	62,5	
9	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	0,040	0,050	97,5%	85,0	85,0	92,0	
10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,035	0,025	83,5%	92,0	78,0	55,0	
11	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	0,585	0,580	95,5%	704,0	167,0	161,0	
12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,025	0,015	65,0%	32,0	168,0	94,0	
T1	-	t2	-	t4	+	t6	0	t8	0	-	+	0,140	0,090	66,0%	945,0	30,0	19,0
T2	-	t2	-	t4	+	t6	0	t8	0	-	+	0,050	0,060	111,0%	1046,0	10,0	11,0
T3	-	t2	-	t4	+	t6	0	t8	0	-	+	0,100	0,080	80,0%	946,0	21,0	17,0
T4	-	t2	-	t4	+	t6	0	t8	0	-	+	0,050	0,040	80,0%	1056,0	9,0	8,0
T5	-	t2	-	t4	+	t6	0	t8	0	-	+	0,030	0,060	200,0%	1006,0	6,0	12,0
T6	-	t2	-	t4	+	t6	0	t8	0	-	+	0,210	0,150	71,0%	836,0	50,0	36,0
T7	-	t2	-	t4	+	t6	0	t8	0	-	+	0,250	0,240	96,0%	653,0	77,0	74,0
T8	-	t2	-	t4	+	t6	0	t8	0	-	+	0,270	0,220	82,0%	644,0	84,0	68,0
T9	-	t2	-	t4	+	t6	0	t8	0	-	+	0,270	0,230	86,0%	1018,0	53,0	45,0
T10	-	t2	-	t4	+	t6	0	t8	0	-	+	0,430	0,280	65,0%	-	-	-

nb: Les essais de 1 à 12 sont des moyennes de 4 à 6 mesures en 2 expériences successives pour chaque réponse. Les essais T1 à T2 correspondent à des mesures simples.



TABEAU 29: Effets moyens de chaque facteur ou coefficients du modèle linéaire établi.

	REPONSES					
	Production enzymatique			Croissance	Production relative au PS	
	Y ₁	Y ₂	Y ₃	Y ₄	Y ₅	Y ₆
	A. AM dosée à 60°C UI/ml	A. AM dosée à 75°C UI/ml	% 75/60	Poids sec mg / 200ml	AM 60°C / PS UI/g	AM 75°C / PS UI/g
<u>Terme constant</u>						
b0 (moyenne des essais)	0,258	0,212	89,3	362,6	117,7	95,1
<u>Terme linéaire</u> (ou effet moyen)						
b1 (source d'azote)	<u>+0,104</u>	<u>+0,101</u>	+ 3,9	<u>+121,0</u>	+10,1	<u>+17,3</u>
b2 (taux d'azote)	<u>-0,045</u>	<u>-0,035</u>	+ 2,0	- 14,0	<u>-20,7</u>	<u>-13,0</u>
b3 (rotation)	<u>-0,125</u>	<u>-0,079</u>	<u>+11,2</u>	<u>-140,2</u>	<u>-33,1</u>	<u>-13,0</u>
b4 (KH ₂ PO ₄)	<u>+0,085</u>	<u>+0,088</u>	+ 1,0	<u>+155,5</u>	+ 1,0	+ 5,8
b5 (MgSO ₄ , 7H ₂ O)	<u>+0,160</u>	<u>+0,123</u>	- 0,4	<u>+133,6</u>	<u>+23,9</u>	<u>+18,2</u>
b6 (CaCl ₂)	<u>-0,075</u>	<u>-0,040</u>	<u>+11,1</u>	+ 14,4	<u>-39,3</u>	<u>-19,3</u>
b7 (CuSO ₄ , 5H ₂ O)	<u>+0,035</u>	-0,002	+ 1,2	+ 2,2	+ 6,7	+ 2,5
b8 (ZnSO ₄ , 7H ₂ O)	+0,005	-0,029	- 3,8	<u>- 36,0</u>	+ 1,3	- 5,9
b9 (MnSO ₄ , H ₂ O)	+0,005	+0,012	- 0,7	+ 29,5	- 6,7	+ 1,9
b10 (biotine+thiamine)	<u>+0,034</u>	+0,022	- 1,3	+ 28,0	+ 2,2	+ 3,3
b11 (pH)	<u>+0,051</u>	<u>+0,039</u>	+ 0,3	<u>+ 36,7</u>	+ 4,3	+ 3,3



nb: Les termes soulignés présentent une signification pour un seuil de $p=0,1$ (test t).

Les termes non soulignés ne présentent pas, dans les conditions étudiées de signification interprétable.

procuraient, toutes 2, de bons résultats comparables. Aussi ici, nous allons tester ces 2 sources: NH_4NO_3 et $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ au même niveau d'apport d'azote.

Le tableau 27 présente les différents facteurs étudiés et leurs niveaux d'utilisation, le tableau 28 la matrice d'expérience et les différentes réponses obtenues et le tableau 29 les effets moyens de chaque facteur pour chaque réponse.

Voici les observations, pour chaque réponse, qui peuvent être faites de chaque facteur, dans le domaine étudié.

1.-Effet de la nature de la source d'azote (niveau -1: NH_4NO_3 ; niveau +1: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$).

L'expérience montre la supériorité générale du sulfate d'ammonium. L'amélioration de la croissance due à ce sel est de 100% par rapport au nitrate d'ammonium, celles des productions enzymatiques sont de 135% pour la réponse Y_1 et de 181% pour la réponse Y_2 . L'absence de signification pour le rapport des activités 75/60 indique que c'est la production du complexe entier qui est stimulé et non l'une ou l'autre des formes le composant. Dans la suite de nos essais nous utiliserons donc ce sel.

2.-Effet du taux d'azote fourni (niveau -1: 0,62g/l; niveau +1: 0,48 g/l).

Le taux d'azote le plus élevé testé (niveau -1, 0,62 g/l) est significativement plus favorable à la synthèse du complexe enzymatique (+30%) de façon similaire pour les 2 formes constituant le complexe que le taux le plus faible (niveau +1, 0,48g/l). L'absence de différence de la croissance à ces niveaux explique l'existence d'effet sur les productions spécifiques (pour Y_5 et Y_6 : -30% et -24% entre les niveaux -1 et +1).

3.-Effet de la vitesse d'agitation (niveau -1: 80 rpm; niveau +1: 150 rpm).

Comme nous l'avions envisagé, l'absence de signification de ce facteur dans la première matrice était due au mauvais choix des niveaux. Dans cette deuxième expérience, ce facteur induit un effet significatif sur les 6 réponses étudiées. Une agitation rapide est défavorable à la croissance (-56% entre les niveaux -1 et +1), aux productions d'enzymes (-65% et -54% pour Y_1 et Y_2) et aux productions spécifiques du complexe (-32% et -24% pour Y_5 et Y_6). Par contre un effet bénéfique de la rotation rapide est observé pour le rapport des activités 75/60 (niveau -1: moyenne des %: 78%; niveau +1: moyenne des %: 100%). Ceci s'explique par le fait que l'agitation rapide est moins défavorable pour le complexe dosé à 75°C que pour le complexe dosé à 60°C. Cet effet défavorable d'une agitation rapide abonde dans le sens d'un moins bon niveau de croissance et de production enzymatique obtenu en système agité qu'en système statique.

4.-effet du taux de KH_2PO_4 (niveau -1: 1,5 g/l; niveau +1: 2,5 g/l)

Les niveaux testés ici permettent d'observer que ce facteur influe sur la croissance (de +150% entre les niveaux -1, +1) et conjointement sur la production du complexe enzymatique (+99% pour Y_1 et +107% pour Y_2). L'amélioration de la production enzymatique est concomitante, pour ce facteur, à une amélioration de la biomasse. Corollairement aucun effet significatif n'est observé pour le rapport des activités ni pour les productions spécifiques.

5.-Effet de l'apport de $\text{MgSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$ (niveau -1: 0,0 g/l; niveau +1: 0,5 g/l)

L'apport de ce sel améliore très nettement la croissance (+117%), les productions enzymatiques (+325% et +270% pour Y_1 et Y_2) et les productions spécifiques (+51% et +47% pour les réponses Y_5 et Y_6) du complexe. Tout champignon nécessite du magnésium et le *Thermoascus crustaceus* (souche P6) ne déroge pas à la règle, le soufre étant apporté parallèlement par d'autres sels minéraux.

6.-Effet de l'apport de CaCl_2 (niveau -1: 0,0 g/l; niveau +1: 1,0 g/l)

L'apport de ce sel dans le milieu de culture réduit la production enzymatique et la production spécifique de ce complexe (de -45%; -31%; -50%; -34% entre les niveaux -1 et +1 pour les réponses Y_1 , Y_2 , Y_5 et Y_6), il agit réellement sur la production du complexe amylolytique car la croissance n'est pas affectée significativement par l'apport de ce sel. Un effet significatif est à observer sur le rapport des activités de +22 points de pourcentage entre les niveaux -1 et +1. Ceci s'explique par le fait que la production du complexe dosée à 60°C est plus inhibée par l'apport du chlorure de calcium que la production dosée à 75°C. L'augmentation dans le milieu de la concentration en KH_2PO_4 compense la perte en phosphate du $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2, 2\text{H}_2\text{O}$ par rapport à la première matrice et donc l'effet négatif observé ici peut être imputé à l'ion calcium. Celui-ci provoque également une précipitation minérale dans le milieu de culture et modifie la disponibilité des sels minéraux pour ce champignon.

7.-Effet du taux de $\text{CuSO}_4, 5\text{H}_2\text{O}$ (niveau -1: 0,005 g/l; niveau +1: 0,015 g/l)

On ne note un effet significatif du cuivre que sur la production absolue dosée à 60°C (Y_1 , +31% entre les niveaux -1 et +1), aucun seuil de signification n'est atteint pour les autres réponses.

8.-Effet du taux de $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ (niveau -1: 0,03 g/l; niveau +1: 0,05 g/l).

Seul un effet défavorable à la limite de la signification de la concentration élevée du sulfate de zinc (0,05 g/l) est observé sur la croissance (-18% entre les niveaux -1 et +1). Aucune signification n'est obtenue pour les cinq autres réponses.

9.-Effet du taux de $MnSO_4 \cdot H_2O$ (niveau -1: 0,01 g/l; niveau +1: 0,03 g/l).

Aucun effet interprétable n'est obtenu pour le sulfate de manganèse, la zone optimale semble être atteinte pour ce sel.

10.-Effet de l'apport en biotine et thiamine (niveau -1: 0µg/l; niveau +1: 100µg/l de biotine et 1000µg/l de thiamine).

Les vitamines utilisées à des taux très élevés pour les besoins "normaux" des champignons induisent des effets à tendance positive, et significatifs uniquement pour la production du complexe enzymatique dosée à 60°C (Y_1), dont l'amélioration est de +30%.

11.-Effet du pH (niveau -1: pH 5.0; niveau +1: pH 5.8).

L'effet du pH est significatif et positif pour les productions de biomasse (+23%) et du complexe enzymatique (dosée aux 2 températures, +50% et +45% pour les réponses Y_1 et Y_2). La tendance des autres réponses est également positive mais de façon non significative. Le pH 5.8 est plus favorable qu'un pH de 5.0 pour l'ensemble des réponses étudiées.

III.- DISCUSSION

Grâce à ces 2 matrices successives, pratiquement chaque facteur a été étudié pour différents niveaux. La confrontation des résultats est indispensable pour la suite de ce travail.

1.- Choix d'une source d'azote

Le sulfate d'ammonium s'est avéré être une meilleure source d'azote que le nitrate d'ammonium dans les conditions étudiées et pour les diverses variations des autres facteurs. Ce sel est utilisé par la majorité des champignons (Cochrane, 1958; Nicholas, 1965; Berry, 1975). Malgré que le sulfate d'ammonium n'induit aucune production d' α -glucosidase par la levure *Lipomyces starkeyi* (Kelly et al., 1985).

Dans l'étude réalisée par A. Subrahmanyam (1980) sur l'utilisation de sources de carbone et d'azote par *Thermoascus aurantiacus*, le sulfate d'ammonium induit une croissance moyenne du champignon alors qu'aucun développement n'est obtenu avec le nitrate d'ammonium comme source d'azote bien qu'une croissance correcte ait été obtenue avec notre isolat de cette espèce pour le NH_4NO_3 . Les 2 *Thermoascus* (*Th. crustaceus* et *Th. aurantiacus*) ne présentent donc pas le même métabolisme azoté. Comme le nitrate d'ammonium, ce corps est un sel d'acide fort et à donc le désavantage de provoquer une forte chute de pH en début de culture (correspondant à l'absorption du NH_4). Dans le cas du NH_4NO_3 l'absorption plus tardive du NO_3 par le champignon entraîne une remontée de pH. Pour le $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ le pH reste acide (excès de sulfate dans le milieu). Ces variations de pH ne semblent pas gêner, dans les conditions étudiées, la production d'enzyme dosée après 3 jours de culture en milieu agité.

En système statique, l'utilisation de ce sel ne permettait pas d'aussi bonnes productions enzymatiques que le nitrate d'ammonium. Le métabolisme de la souche P6 est donc différent selon les conditions de culture.

Dans la suite de nos essais, nous utiliserons le sulfate d'ammonium qui offre également l'avantage d'être une source unique d'azote, alors que le NH_4NO_3 est un mélange d'azote oxydé et d'azote réduit, ce qui peut être une hypothèse de l'amélioration de la production en système agité où la croissance est très rapide. Une deuxième hypothèse réside dans l'apport d'ion sulfate en excès qui stimulerait la production enzymatique et la croissance.

2.-Etude du taux d'azote

Les 2 expériences ont permis de cerner les taux d'azote dont l'utilisation permet une production maximale d'enzyme, soit $1,50 \text{ g/l} < 0,62 \text{ g/l} > 0,48 \text{ g/l}$.

La croissance ne change pas pour des variations du taux d'azote entre $0,48 \text{ g/l}$ et $0,62 \text{ g/l}$, mais en élevant le taux d'azote à $1,5 \text{ g/l}$ une baisse de la croissance est observée. La zone optimale de croissance semble donc être située pour des taux d'azote environnant $0,48 \text{ g/l}$ et $0,62 \text{ g/l}$. Ce facteur fera l'objet d'examen plus approfondis par la suite.

3.-Effet de la vitesse d'agitation.

Des résultats significatifs ont seulement été observés dans la deuxième matrice. L'écart entre les 2 niveaux étudiés (-1, +1) était vraisemblablement trop faible dans la première expérience. Une agitation rapide (150 rpm) inhibe, de façon concomitante, la croissance et la production du complexe enzymatique, mais également les productions spécifiques du complexe enzymatique. Par contre cette agitation élevée améliore le rapport 75/60 du complexe produit. Ce facteur agit par une augmentation du taux

d'oxygène dissout et par une agitation mécanique permettant une augmentation de taux d'oxygène dissout, une immersion du mycélium et une bonne homogénéisation du milieu nutritif et du mycélium. L'effet de la vitesse de rotation des cultures a été étudié de nouveau dans la partie suivante de cette recherche.

4.-Effet du taux de KH_2PO_4 .

En fonction des concentrations utilisées dans la première matrice (1,0 et 2,0 g/l) nous avons observé des effets positifs mais non significatifs de la concentration élevée en phosphate de potassium sur l'ensemble des réponses.

Dans la 2^{ème} matrice les niveaux de ce facteur ont été décalés dans le sens de l'optimum apparent. L'effet d'une concentration plus élevée (2,5 g/l) s'est avéré être encore très positif et cette fois significatif, à la fois pour les productions de mycélium et d'enzyme. Aucune concentration inhibitrice n'est atteinte pour le phosphore ni pour le potassium. La zone optimale ne semble pas encore atteinte, aussi ce facteur restera parmi nos préoccupations pour la suite de cette étude.

5.-Effet du taux de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$.

La première expérience n'a pas donné de résultats significatifs, mais la tendance générale semble indiquer que la concentration la plus faible de ce sel (0,25 g/l) soit plus favorable au champignon que 0,75 g/l. Dans la 2^{ème} expérience, la présence du sulfate de magnésium à 0,5 g/l s'est avérée nécessaire pour la croissance et les productions d'enzymes absolues et spécifiques. On peut supposer que cette concentration est proche de l'optimum, aussi dans la suite de nos expériences, nous l'avons adoptée. Ce taux est d'ailleurs utilisé couramment pour de nombreux champignons (Morquer, 1931; Lacoste, 1965; Deprez, 1977). La nécessité de la présence de ce sel avait été également remarquée en système statique tant pour la croissance que pour la production enzymatique.

6.-Effet du calcium (sous forme de $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ et de CaCl_2)

Le calcium est souvent cité comme nécessaire pour la croissance fongique et pour la stabilité thermique des protéines (Berry, 1975). Mais les 2 expériences ont montré que les formes sous lesquelles nous l'avons fourni au champignon ont eu un effet inhibiteur sur la croissance et les productions d'enzymes amyloglucosidasiqes. Ceci ne nous permet pas de conclure définitivement à l'effet négatif de cet ion en tant que nutriment. Car il est toujours possible que la chute de production soit liée à des problèmes de précipitation d'autres éléments sous l'action des sels de calcium. L'effet négatif du phosphate n'est pas envisageable vu l'effet très positif des concentrations élevées en KH_2PO_4 . Le chlore peut avoir un effet négatif, mais les essais en fiole de Roux ne l'ont pas démontré.

Par contre l'effet positif du CaCl_2 sur le rapport %75/60 est à remarquer. Ce facteur a été supprimé car en l'absence d'addition de calcium défini, la production enzymatique est meilleure. De plus étant donné les problèmes que nous pose le calcium par les précipités qu'il provoque dans le milieu de culture, nous avons jugé préférable de ne plus en apporter.

7.-Effet du $\text{CuSO}_4, 5\text{H}_2\text{O}$.

L'effet du cuivre sur la production du complexe enzymatique, aux niveaux étudiés dans les 2 matrices, a été à la limite de la signification pour le %75/60 de la première matrice (favorable au niveau bas: soit 0,01 g/l) et significatif pour la production absolue dosée à 60°C (favorable au niveau haut soit 0,015 g/l), pour la deuxième matrice. Les effets moyens des autres réponses étaient plutôt défavorables à la concentration la plus élevée (0,02 g/l) pour la première matrice et plutôt favorable à une concentration de 0,015 g/l pour la deuxième matrice. Il semble donc que nous ayons cerné la zone optimale de ce facteur. Nous avons choisi de garder ce facteur à son niveau initial de 0,01 g/l. L'utilité de ce facteur avait été observée également en système statique, pour la croissance, les productions d'enzymes et pour le rapport des activités dosées à 75°C et à 60°C.

8.-Effet du $\text{ZnSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$:

Le zinc, sous forme de sulfate de zinc, induit une baisse significative de la production absolue d'enzymes dosés à 60°C et du rapport %75/60 quand il est fourni au champignon à une concentration élevée (0,04 g/l, 1^{ère} matrice). Une légère stimulation, non significative est observée pour son utilisation à ce même niveau (0,04 g/l), sur les réponses Y_2 (production dosée à 75°C) et Y_5 (production spécifique dosée à 60°C). Un décalage a été réalisé vers la concentration la plus élevée, dans la deuxième matrice (0,03 et 0,05 g/l). Dans celle ci, seule une inhibition due à la concentration élevée sur la production de mycelium a été significative, les effets des autres réponses ont été soit positifs soit négatifs mais non significativement. Nous avons choisi d'arrêter les essais concernant ce facteur et de le garder constant à une concentration de 0,03 g/l.

9.-Effet du $\text{FeSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$ (chélaté par de l'EDTA)

Ce facteur a été traité uniquement dans la première matrice, il s'est avéré être défavorable à la production enzymatique et favorable à la production mycélienne. Des observations identiques avaient été faites en système statique. Le fer est nécessaire pour une bonne croissance mais inhibe la production enzymatique. Nous avons de ce fait décidé de supprimer toute addition de cet élément des milieux de culture à venir.

Il est probable que les apports sous forme d'impuretés des autres sels suffisent à assurer la production enzymatique du champignon, et qu'un apport supplémentaire de cet élément inhibe la production enzymatique en partie. Un effet antagoniste du fer envers un autre ion est également à envisager.

10.-Effet du $MnSO_4 \cdot H_2O$:

Le manganèse semble être sans effet sur la croissance et favorable, de façon non significative, à la production enzymatique globale et relative; défavorable au facteur %75/60, significativement, et sans effet sur la production de biomasse (1^{ère} matrice, niveau -1: 0,00 et niveau +1: 0,02 g/l).

La deuxième matrice (niveau -1:0,01 g/l; niveau +1:0,03 g/l) n'a pas donné plus de résultats significatifs. Mais la tendance négative pour le rapport %75/60 semble se confirmer. Il semblerait donc qu'il ne s'agisse pas d'un facteur très influent sur la croissance et sur la production d'enzyme, aussi l'avons nous laissé à la concentration utilisée précédemment soit 0,02 g/l.

11.-Effet de la biotine et de la thiamine

La biotine (5 µg/l) et la thiamine (100 µg/l) sont les 2 vitamines couramment utilisées par les champignons aux concentrations indiquées (Fries, 1965).

Leurs apports, dans le milieu de culture, améliore la croissance et la production du complexe enzymatique, ceci tend à prouver les besoins de ces 2 vitamines de notre champignon. Cet effet a été vérifié dans la deuxième matrice pour des concentrations très élevées (Biotine: 100 µg/l et thiamine: 1000 µg/l). Le besoin vitaminique n'est pas absolu, mais il permet une stimulation du champignon. Ce besoin n'avait pas paru aussi marqué lors de nos essais en système statique. Les besoins pourraient être accrus par une mise en agitation des cultures.

12.-Effet du pH:

Nous n'avons envisagé qu'une zone étroite de valeur de pH en nous appuyant sur les résultats obtenus en système statique. L'effet de ce facteur a été vérifié malgré le peu de distance séparant les niveaux d'étude. Grâce à la première matrice il a été vérifié que le pH 5.8 améliore les productions absolues et spécifiques du complexe par rapport à un pH de 6.5, la croissance étant par contre favorisée à pH 6.5.

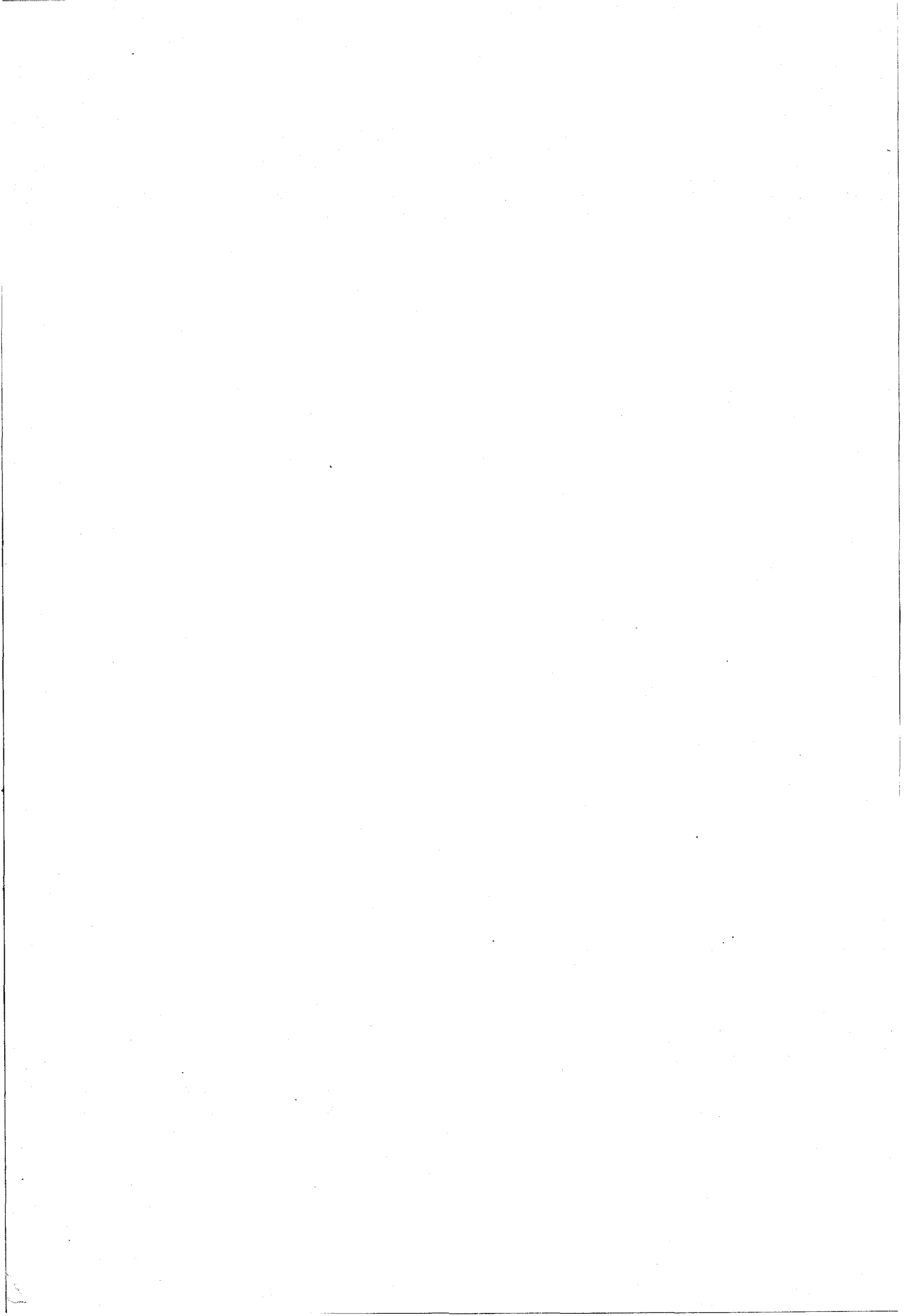
Dans la deuxième matrice les pH 5.0 et 5.8 ont été testées. Le pH 5.8 est dans ce cas plus favorable à la croissance et aux productions absolues du complexe que le pH 5.0; l'amélioration de la production enzymatique est concomitante à une augmentation de la production de biomasse. En conséquence, le pH 5.8 a été conservé pour la suite de nos essais.

CONCLUSION

En résumé de ces 2 expériences voici les paramètres qui resteront constants dans la suite des expériences.

Source d'azote:	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
MgSO_4	0,50 g/l
$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2, 2\text{H}_2\text{O}/\text{CaCl}_2$	0,00 g/l
$\text{CuSO}_4, 5\text{H}_2\text{O}$	0,01 g/l
$\text{ZnSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$	0,03 g/l
$\text{FeSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$	0,00 g/l
$\text{MnSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$	0,02 g/l
pH	5,8

Afin de compléter notre travail, il nous reste à étudier les facteurs suivants, pour lesquels l'optimum n'est toujours pas précisé: teneur en azote du milieu, teneur en KH_2PO_4 , vitesse d'agitation des fioles de culture et taux des deux vitamines.



CHAPITRE IV

PLAN FACTORIEL COMPLET 2^4

TABLEAU 30: Les différents facteurs étudiés et leurs niveaux dans les essais et le témoin du plan factoriel complet 2^4 .

n° facteur	facteurs étudiés	niveau -1	niveau +1	niveau témoin
X ₁	taux d'azote (C/N=)	0,95 g/l (11,7)	0,62 g/l (17,5)	0,76 g/l (14,6)
X ₂	KH ₂ PO ₄	1 g/l	3 g/l	2 g/l
X ₃	biotine	0 µg/l	100 µg/l	50 µg/l
	vitamines thiamine	0 µg/l	1000 µg/l	500 µg/l
X ₄	vitesse de rotation	80 rpm	150 rpm	80 rpm

rpm= rotation par minute



La méthode du plan factoriel complet (présentée p. 184) a été utilisée pour l'étude de 4 facteurs à 2 niveaux codés (-1, +1). Ces facteurs ont été :

- X_1 : taux d'azote sous forme de $(NH_4)_2SO_4$,
- X_2 : concentration en KH_2PO_4 ,
- X_3 : concentration en vitamines,
- X_4 : vitesse d'agitation des fioles de culture.

Les valeurs des autres facteurs restent constantes.

Pour chaque essai, les valeurs données correspondent à la moyenne de 6 mesures pour les réponses Y_1 à Y_3 et à 3 mesures pour les réponses Y_4 à Y_6 . La signification de ces moyennes a été vérifiée par la comparaison du coefficient de variation (C.V) avec le coefficient de variation des témoins.

Le tableau 30 présente les niveaux des 4 facteurs étudiés, le tableau 31 la matrice d'expérience et les résultats moyens obtenus pour chaque essai et le tableau 32 les effets principaux de chaque facteur et l'adéquation au modèle linéaire simple pour chaque réponse.

I. - EFFET DE LA CONCENTRATION EN AZOTE (NIVEAU -1 : 0,95 g/l ; niveau +1 : 0,62 g/l)

La meilleure production du complexe (absolue et spécifique) est obtenue par l'utilisation de la concentration la plus faible en azote (niveau +1 : 0,62 g/l). Cette amélioration est significative pour la première réponse (activité absolue dosée à 60°C) et proche de la signification pour la deuxième réponse (activité absolue dosée à 75°C). Ces améliorations sont de + 13 % pour Y_1 et de + 12 % pour Y_2 entre les niveaux -1 et +1. L'absence de signification de l'effet de ce facteur sur la croissance pondérale, ainsi que les résultats obtenus dans les expériences effectuées avec les matrices de Hadamard, indiquent que la zone optimale de concentration en azote est atteinte pour le développement mycélien du champignon. De plus, il apparaît que l'amélioration de la production du complexe enzymatique n'est pas corrélative à une augmentation de biomasse. En conséquence, on peut penser que ce facteur agit en améliorant le fonctionnement métabolique lié à la production des enzymes étudiées.

II. - EFFET DE LA CONCENTRATION EN KH_2PO_4 (NIVEAU -1 : 1 g/l ; NIVEAU +1 : 3 g/l)

Par l'emploi d'une concentration élevée de ce sel (3 g/l), on provoque une stimulation significative de la croissance (+ 47 %) et de la production du complexe enzymatique dosée à 75°C (+ 36 %) par rapport aux réponses obtenues avec la concentration la plus basse (1 g/l). Par contre, l'emploi de l'une ou l'autre des concentrations ne modifie pas la production du complexe dosée à 60°C (première réponse). Il en découle un changement significatif du rapport des activités dosées à 75°C et 60°C. Ce facteur, à son niveau +1, améliore donc le pourcentage 75/60. La baisse de l'activité spécifique (dosée à 60°C) est significative et logique. Par contre, aucune signification statistique n'est obtenue pour

TABLEAU 31: Matrice d'expérience et réponses des essais du plan factoriel complet 2^4 .

n° essai	MATRICE D'EXPERIENCE				REPONSES					
	X ₁ taux d'azote	X ₂ KH ₂ PO ₄	X ₃ vita- mines	X ₄ vitesse de rotation	Production enzymatique			Crois- sance	Production relative au PS	
					Y ₁ AM 60°C (a) UI/ml	Y ₂ AM 75°C (a) UI/ml	Y ₃ %75/60 (a)	Y ₄ PS (b) mg/200ml	Y ₅ AM 60/PS (b)(c) UI/g	Y ₆ AM 75/PS (b)(c) UI/g
1	-	-	-	-	0,575	0,360	61,5%	435	285	189
2	-	-	-	+	0,860	0,600	68,5%	609	309	243
3	-	-	+	-	0,700	0,455	64,0%	487	316	219
4	-	-	+	+	0,980	0,680	69,0%	619	328	246
5	-	+	-	-	0,810	0,625	77,0%	762	231	186
6	-	+	-	+	0,970	0,960	98,0%	920	220	224
7	-	+	+	-	0,865	0,720	83,5%	753	247	215
8	-	+	+	+	0,650	0,655	98,0%	883	195	208
9	+	-	-	-	0,905	0,615	68,0%	569	344	228
10	+	-	-	+	0,895	0,590	66,0%	496	310	214
11	+	-	+	-	0,960	0,580	60,5%	537	350	201
12	+	-	+	+	0,940	0,655	70,5%	600	310	230
13	+	+	-	-	0,835	0,690	82,5%	721	277	233
14	+	+	-	+	0,920	0,880	96,0%	856	215	194
15	+	+	+	-	0,860	0,715	82,0%	678	254	227
16	+	+	+	+	0,960	0,940	101,0%	829	203	234
T1	0	0	0	-	0,960	0,810	84,0%	692	277	234
T2	0	0	0	-	1,100	0,930	85,0%	735	299	253
T3	0	0	0	-	1,060	1,000	94,0%	689	308	290
T4	0	0	0	-	1,140	0,940	82,0%	698	327	269
T5	0	0	0	-	0,900	0,650	72,0%	-	-	-
T6	0	0	0	-	0,610	0,390	64,0%	-	-	-
T7	0	0	0	-	0,760	0,540	71,0%	-	-	-

(a) : Moyenne de 4 à 6 mesures réparties en 2 expériences successives pour les essais 1 à 16.

(b) : Moyenne de 2 à 3 mesures en une seule expérience pour les essais 1 à 16.

(c) : Rapport calculé avec les valeurs d'activités AM correspondantes aux valeurs de Poids Sec, pour les essais 1 à 16.

nb : Les essais T1 à T7 correspondent à des mesures simples.

TABLEAU 32: Effets principaux moyens des facteurs ou coefficients du modèle linéaire simple, et adéquation au modèle.

	REPONSES					
	Production enzymatique			Croissance	Production relative au PS	
	Y ₁	Y ₂	Y ₃	Y ₄	Y ₅	Y ₆
	A. AM dosée à 60°C UI/ml	A. AM dosée à 75°C UI/ml	% 75/60	Poids sec mg / 200ml	AM 60°C / PS UI/g	AM 75°C / PS UI/g
<u>Terme constant</u> b ₀ (moyenne des essais)	0,855	0,670	77,9	672	274,6	218,1
<u>Terme linéaire</u> (ou effet principal moyen)						
b ₁ (taux d'azote)	<u>+0,054</u>	+0,038	+ 0,4	- 11	+ 8,3	+ 2,0
b ₂ (KH ₂ PO ₄)	+0,003	<u>+0,103</u>	<u>+11,9</u>	<u>+128</u>	<u>-44,4</u>	- 3,0
b ₃ (vitamines)	+0,009	+0,005	+ 0,6	+ 1	+ 0,8	+ 4,3
b ₄ (rotation)	+0,042	<u>+0,075</u>	<u>+ 5,6</u>	<u>+ 54</u>	<u>-13,4</u>	+ 6,0
Adéquation au modèle	78,00%	99,93%	100%	100%	99,99%	28,85%



nb : Les effets significatifs au seuil p=0,1 (test t) sont soulignés.

l'effet de ce facteur sur l'activité spécifique dosée à 75°C. Il apparaît donc que la zone optimale de concentration en KH_2PO_4 pour la réponse Y_1 (liée à la production d'amyloglucosidase) est atteinte et non celle de la réponse Y_2 (liée à la production d' α -glucosidase).

De ces différentes observations, on peut conclure que l'amélioration de l'activité dosée à 75°C et donc celle du pourcentage 75/60 est liée à l'augmentation de la biomasse du champignon par l'utilisation de fortes concentrations en phosphate de potassium.

A ces concentrations élevées, ce sel agit non seulement en tant que source de potassium et de phosphate mais également en augmentant la pression osmotique du milieu de culture.

III. - EFFET DES TENEURS EN BIOTINE ET THIAMINE (NIVEAU -1 : 0 $\mu\text{g/l}$; NIVEAU +1 : 100 $\mu\text{g/l}$ DE BIOTINE ET 1 000 $\mu\text{g/l}$ DE THIAMINE)

L'emploi des 2 vitamines, aux niveaux testés (mêmes niveaux que pour la deuxième matrice d'Hadamard) ne montre aucun effet significatif sur l'ensemble des réponses, bien qu'une tendance positive apparaisse.

On ne retrouve que partiellement la confirmation des résultats obtenus dans la seconde matrice d'Hadamard. Une concentration très élevée en biotine et en thiamine ne semble pas indispensable. Les niveaux étudiés ne permettent pas de conclure sur ces effets.

IV. - EFFET DE LA VITESSE D'AGITATION DES FIOLES DE CULTURES (NIVEAU -1 : 80 rpm ; NIVEAU +1 : 150 rpm)

La vitesse d'agitation (facteur X_4) a été étudiée aux mêmes niveaux que dans la deuxième matrice d'Hadamard. Une forte agitation tend à augmenter la croissance (+ 18 %), les productions absolues (+ 25 % pour la production mesurée à 75°C) et le pourcentage 75/60. Un effet proche de la signification a été observé pour la production du complexe dosé à 60°C.

L'action de la vitesse de rotation sur la production relative au poids sec dosée à 60°C (Y_5) est significative et négative (logique, car il y a absence d'effet pour Y_1 et effet positif pour Y_4). L'effet pour la réponse Y_6 , lui, n'est pas significatif (logique, car effet positif pour Y_2 et pour Y_4).

Ce facteur agit, comme le facteur KH_2PO_4 , en améliorant la production de l'enzyme le plus thermostable (α -glucosidase) et la croissance fongique.

Seuls les effets pour Y_3 et Y_5 coïncident avec ceux de la deuxième matrice d'Hadamard. Les 4 autres réponses présentent, elles, des effets inverses. Ces différents effets de la vitesse d'agitation, obtenus dans ce plan factoriel, ont été vérifiés dans un autre plan factoriel complet, non présenté, par lequel les 4 mêmes facteurs ont été étudiés, pour des

niveaux différents des facteurs X_1 , X_2 et X_3 , mais aux mêmes niveaux pour l'agitation.

Ainsi, les productions absolues (Y_1 et Y_2), la croissance (Y_4) et la production dosée à 75°C relative au poids sec (Y_6) sont stimulées par une agitation rapide (150 rpm) dans cette expérience établie selon le plan factoriel et par l'agitation lente (80 rpm) dans celle étudiée grâce à la matrice d'Hadamard. Cette différence de résultats est difficile à expliquer, une hypothèse peut être envisagée, mais qui demanderait à être étudiée, par l'existence d'interaction non contrôlée avec d'autres facteurs dans l'expérience de la matrice d'Hadamard.

Un des objectifs principaux de cette optimisation est l'amélioration de la thermostabilité du complexe enzymatique (suivie par le pourcentage 75/60). L'emploi d'une agitation plus rapide améliore cette réponse.

V. - ADEQUATION AUX MODELES

Les pourcentages des valeurs d'adéquation aux modèles établis grâce aux coefficients des effets principaux de chaque facteur sont proches des 100 % pour les réponses Y_2 , Y_3 , Y_4 et Y_5 de ce plan factoriel complet (tableau 32).

Cette bonne adéquation aux modèles linéaires signifie que les éventuelles interactions entre facteurs ne peuvent qu'être minimales, et donc, que les effets de ces facteurs sont indépendants les uns des autres aux niveaux étudiés.

CONCLUSION

L'utilisation de ce plan, deuxième étape de l'optimisation des conditions culturales de la souche P6 de *Thermoascus crustaceus*, a permis d'approcher les optimums pour certaines réponses, amélioration de la production globale dosée à 75°C et amélioration de la thermostabilité du complexe (réponses Y_2 et Y_3).

Les concentrations optimales en azote, pour l'obtention d'une biomasse maximale, ont été observées entre 0,62 et 0,95 g/l, dans les conditions étudiées (de température, de teneur en carbone, de la composition minérale, ...). Par contre, il est possible d'augmenter encore cette biomasse en jouant sur la concentration en KH_2PO_4 et par l'agitation des cultures.

Pour les variations de certains facteurs (teneur en KH_2PO_4 et agitation), on a observé un parallèle dans l'évolution de la croissance pondérale, de la production du complexe le plus thermostable et donc du rapport pourcentage 75/60. Il serait intéressant d'étudier si ces améliorations sont réellement liées entre elles et au métabolisme fongique ou s'il ne s'agit que de modifications de leur comportement, sans lien précis.



CHAPITRE V

PLAN CENTRE COMPOSE

TABLEAU 33: Niveaux des trois facteurs étudiés dans le plan centré composé.

n° facteur	facteurs étudiés	niveau -1,2	niveau -1	niveau 0	niveau +1	niveau +1,2
X ₁	taux d'azote (C/N=)	1,36 g/l (8,2)	1,26 g/l (8,8)	0,95 g/l (11,7)	0,76 g/l (14,6)	0,73 g/l (15,2)
X ₂	KH ₂ PO ₄	1,8 g/l	2,0 g/l	3,0 g/l	4,0 g/l	4,2 g/l
X ₃	vitamines: biotine thiamine	2,0 μg/l 40 μg/l	2,5 μg/l 50 μg/l	5,0 μg/l 100 μg/l	7,5 μg/l 150 μg/l	8,0 μg/l 160 μg/l



Dans cette troisième étape, la marche à suivre classique aurait été d'étudier les réponses du champignon pour les milieux établis selon la méthode de la plus grande pente. La limitation matérielle du nombre de niveaux pouvant être étudiée pour l'agitation des cultures, et la proximité des optimums pour les autres facteurs nous ont orienté vers l'étude d'un plan centré composé à 3 facteurs (X_1 , X_2 , X_3) où la vitesse d'agitation sera maintenue constante.

L'organisation et l'utilisation de ce plan centré composé ont été présentées p.185.

Les 3 facteurs étudiés sont donc les taux d'azote, de phosphate de potassium et de vitamines. Ces facteurs et leurs niveaux d'étude sont présentés dans le tableau 33.

Ces niveaux ont été choisis en fonction des résultats du plan factoriel complet. Pour le facteur X_1 (taux d'azote), les concentrations choisies sont proches du domaine supposé optimal.

Le facteur X_2 (KH_2PO_4) a été examiné dans une gamme de concentration décalée vers l'optimum en fonction des résultats du plan factoriel complet.

Le facteur X_3 (biotine et thiamine), sujet à discussion quant à son effet réel sur la production du complexe amyloglucosidasique, a été analysé à des niveaux ayant permis la mise en évidence d'un effet significatif lors de la première matrice d'Hadamard.

Tous les autres composants du milieu ont été maintenus aux niveaux considérés comme optimaux selon les résultats précédents. La vitesse d'agitation a été choisie à un niveau proche de la moyenne des essais antérieurs (110 rpm).

Chaque essai a été répété trois fois et les moyennes calculées. La signification de ces moyennes a été vérifiée par l'analyse des coefficients de variation par rapport à celui des témoins.

Le tableau 34 présente la matrice d'expérience et les résultats obtenus pour chaque combinaison de trois facteurs, le tableau 35 les coefficients du modèle quadratique et la position de l'extremum (maximum ou minimum) pour chaque réponse du plan centré composé.

I. - LES MODELES QUADRATIQUES

Le tableau 35 présente les coefficients de ces modèles, ceux-ci ont été calculés d'après les résultats des matrices d'expérience.

A la différence des autres expérimentations modélisées effectuées dans cette étude, un seul effet est significatif : l'effet du taux d'azote (X_1) sur la production enzymatique dosée à 60°C (Y_1), favorisant l'utilisation d'une teneur faible (0,76 g/l) par rapport à une concentration plus élevée (1,26 g/l).

Cette absence générale de signification mathématique peut être expliquée par différentes hypothèses.

TABLEAU 34: Matrice d'expérience et réponses des essais du plan centré composé.

n° essai	MATRICE D'EXPERIENCE			REPONSES					
	X ₁ taux d'azote	X ₂ KH ₂ PO ₄	X ₃ vita- mines	Production enzymatique			Crois- sance Y ₄ PS mg/200ml	Production relative au PS	
				Y ₁ AM 60°C UI/ml	Y ₂ AM 75°C UI/ml	Y ₃ %75/60		Y ₅ AM 60/PS UI/g	Y ₆ AM 75/PS UI/g
1	-	-	-	0,57	0,61	108%	712	160	171
2	-	-	+	0,58	0,64	112%	718	162	178
3	-	+	-	0,67	0,84	127%	947	141	177
4	-	+	+	0,62	0,80	129%	937	132	171
5	+	-	-	0,56	0,63	112%	613	183	216
6	+	-	+	0,48	0,54	112%	583	165	185
7	+	+	-	0,60	0,85	144%	916	131	186
8	+	+	+	0,41	0,36	86%	159	516	453
9	-1,2	0	0	0,53	0,67	128%	751	141	178
10	+1,2	0	0	0,47	0,64	135%	663	109	148
11	0	-1,2	0	0,52	0,67	129%	687	151	195
12	0	+1,2	0	0,57	0,77	136%	895	127	172
13	0	0	-1,2	0,46	0,61	133%	809	114	151
14	0	0	+1,2	0,55	0,70	127%	790	139	177
T1	0	0	0	0,44	0,67	151%	900	98	149
T2	0	0	0	0,44	0,65	147%	847	104	153
T3	0	0	0	0,43	0,59	138%	860	100	137
T4	0	0	0	0,44	0,63	143%	840	105	150
T5	0	0	0	0,49	0,66	134%	863	114	153
T6	0	0	0	0,53	0,72	136%	865	123	166
T7	0	0	0	0,49	0,66	134%	863	114	153
T8	0	0	0	0,46	0,63	137%	861	107	146
T9	0	0	0	0,48	0,64	133%	851	113	150
T10	0	0	0	0,50	0,60	120%	858	117	140

nb : Chaque réponse correspond à la moyenne de 3 mesures pour les essais 1 à 14.
Les essais T1 à T10 correspondent à des mesures simples.

TABLEAU 35: Coefficients du modèle mathématique et position de l'extrémum pour chaque réponse du plan centré composé.

	REPONSES					
	Production enzymatique			Croissance	Production relative au PS	
	Y ₁	Y ₂	Y ₃	Y ₄	Y ₅	Y ₆
	A.AM dosée à 60°C UI/ml	A.AM dosée à 75°C UI/ml	% 75/60	Poids sec mg / 200ml	AM 60°C / PS UI/g	AM 75°C / PS UI/g
Terme constant						
b ₀ (moyenne des essais)	0,473	0,675	141,7	878,0	85,0	137,4
Terme linéaire (ou effet moyen)						
b ₁ (taux d'azote)	+0,042	-0,050	-1,1	-83,5	+33,2	+28,2
b ₂ (KH ₂ PO ₄)	+0,015	+0,051	+4,8	+53,6	+20,3	+19,2
b ₃ (vitamines)	-0,019	-0,044	-5,3	-74,8	+35,8	+24,7
Termes d'interactions						
b ₁₂	-0,021	-0,044	-3,5	-71,9	+43,5	+29,9
b ₁₃	-0,029	-0,071	-7,8	-97,9	+46,8	+29,4
b ₂₃	-0,021	-0,059	-7,3	-92,9	+49,0	+35,6
Termes quadratiques						
b ₁₁	+0,018	-0,020	-8,1	-53,7	+33,4	+21,0
b ₂₂	+0,049	+0,026	-7,4	-64,9	+43,1	+35,3
b ₃₃	+0,021	-0,020	-9,1	-59,0	+34,4	+21,7
	Y ₁	Y ₂	Y ₃	Y ₄	Y ₅	Y ₆
Position de l'extrémum (codé)						
X _e (1)	+25,4	+0,36	+0,07	-0,43	-0,30	-0,54
X _e (2)	+10,2	-1,00	+0,58	+1,90	+0,16	+0,10
X _e (3)	+22,6	-0,29	-0,55	-1,80	-0,43	-0,28
(non codé)						
X _e (1) Taux d'Azote (g/l) (C/N)	<0,73 >(15,2)	0,87 (12,7)	0,93 (11,9)	1,08 (10,5)	1,04 (10,8)	1,12 (10,1)
X _e (2) Taux de KH ₂ PO ₄ (g/l)	>4,2	2,0	3,6	4,9	3,2	3,1
X _e (3) Biotine (µg/l)	>8,0	4,3	3,6	0,5	3,9	4,3
X _e (3) Thiamine (µg/l)	>160	85,5	72,5	10,0	78,5	86,0



1) Elle peut être due à l'existence d'une zone optimale assez large. Les écarts des réponses aux niveaux $-\alpha$ et $+\alpha$ sont faibles, ce qui tenderait à confirmer cette hypothèse. Dans la suite de cette discussion, les représentations graphiques (courbes d'isoreponses et courbes individuelles centrées) étayeront cette hypothèse.

Cette absence de signification indique, en association avec les valeurs des extremums calculés, que la zone optimale pour les réponses étudiées a été atteinte.

2) L'étroitesse du domaine étudiés ($-\alpha$, $+\alpha$), pour chaque facteur, explique partiellement cette absence de signification.

3) L'absence de signification des coefficients calculés pourrait également être due à une grande variation expérimentale. Pour vérifier cette hypothèse, les coefficients de variation au point central (0, 0, 0) pour chaque réponse ont été calculés. Ils sont de :

Y_1 : 7,0 % ; Y_2 : 5,7 % ; Y_3 : 6,2 % ; Y_4 : 2,1 % ; Y_5 : 7,6 % et Y_6 : 5,6 %.

Ces coefficients sont faibles, ils indiquent un bon contrôle des conditions expérimentales et nous montrent que l'absence de signification des coefficients du modèle quadratique ne peut être expliquée par une trop grande variation expérimentale.

4) Cependant, la comparaison de ces coefficients à ceux des réponses du plan (14 combinaisons) : Y_1 : 13,0 % ; Y_2 : 19,0 % ; Y_3 : 11,6 % ; Y_4 : 27,5 % ; Y_5 : 60,1 % et Y_6 : 38,3 %, indique que les variations contrôlées sont peu importantes dans la zone de concentrations étudiées. Ce fait renforce l'hypothèse d'une zone optimale large.

5) Une dernière hypothèse pour expliquer l'absence de signification des coefficients du modèle peut être que d'autres facteurs ayant un rôle prépondérant sur le sujet et éloignés de leur optimum masqueraient les effets des paramètres étudiés ici. Il pourrait s'agir, par exemple, de l'agitation (aération), ce facteur devrait faire l'objet d'une étude approfondie en bioréacteur.

De plus, il faut noter que les équations ne permettent que l'établissement de courbes pratiquement symétriques et non de courbes à plateaux. Il y a donc limitation de ces modèles. La raison de l'absence de signification sera discutée dans la suite de ce chapitre à l'aide des représentations graphiques.

II. - LA POSITION DES EXTREMUMS (OU NIVEAUX OPTIMAUX DES FACTEURS POUR CHAQUE REPONSE)

Le choix des niveaux pour les trois facteurs a permis, pour la majorité des réponses, un bon centrage autour du point central (0, 0, 0), dans le domaine étudié ($-\alpha$, $+\alpha$). Seuls les niveaux optimaux de chaque facteur pour les réponses Y_1 (minimum) et Y_4 (maximum) sont en dehors de cette zone ($-\alpha$, $+\alpha$). Mais ces niveaux pour la croissance (réponse Y_4)

rentrent dans le cadre élargi étudié (-2, +2). De plus, la position du minimum de la première réponse (production du complexe dosé à 60°C) est très éloignée du domaine étudié.

Les grandes différences observées pour les productions enzymatiques dosées à 60°C et à 75°C démontrent que les optimums sont différents et que ces 2 réponses ne peuvent être améliorées simultanément.

Au regard du tableau 35, on peut noter les concentrations optimales des 3 paramètres étudiés (teneur en azote, en KH_2PO_4 et en vitamines) pour chaque réponse. Pour les cinq dernières réponses (Y_2 à Y_6), les taux en azote restent tous dans le domaine étudié (-1,2, +1,2) ; ces taux sont différents selon les réponses. La concentration en KH_2PO_4 optimale, pour les réponses Y_2 à Y_6 , est toujours élevée de 2,0 g/l, pour la production enzymatique dosée à 75°C, à 4,9 g/l pour la croissance pondérale, ce qui indique l'effet de la pression osmotique. Les concentrations en vitamines utilisées au point central sont toutes, pour les réponses Y_2 à Y_6 , trop élevées pour obtenir une réponse optimale du champignon, ainsi la croissance du *Thermoascus crustaceus* (P6) sera maximale pour 0,5 µg/l de biotine et 10 µg/l de thiamine.

L'amélioration de la production dosée à 75°C est parallèle à l'augmentation de la biomasse fongique. Ces trois réponses (Y_2 , Y_3 , Y_4) ont souvent montré des zones optimales de façon proche.

III. - REPRESENTATIONS GRAPHIQUES

Différentes représentations graphiques vont permettre d'illustrer les résultats obtenus dans le domaine élargi (-2, +2).

Ces représentations graphiques sont de deux types : les courbes d'isoreponses et les courbes individuelles centrées. Ces différentes représentations graphiques ont été effectuées en fonction des modèles quadratiques calculés.

1. - Les courbes d'isoreponses

Ces courbes d'isoreponses sont les représentations des courbes de réponses égales correspondantes aux variations simultanées de deux facteurs, le troisième étant considéré à son niveau central (0).

Les variations des facteurs ont été suivies dans un espace plus large (-2, +2) que celui étudié ($-\alpha$, $+\alpha$) pour permettre une meilleure visualisation.

Les figures 34 à 39 représentent ces courbes d'isoreponses pour les six réponses suivies. Les valeurs indiquées sur les courbes correspondent aux valeurs des réponses en UI/ml pour les productions enzymatiques (Y_1 et Y_2), en % pour le rapport 75/60 (Y_3), en mg/100 ml de culture pour la croissance pondérale (Y_4) et en UI/g pour les productions enzymatiques rapportées à la biomasse (Y_5 et Y_6).

FIGURE 34: Courbes d'isorréponses de la réponse Y_1 (production du complexe dosé à 60°C) de 2 facteurs simultanément ($3^{eme}=0$).

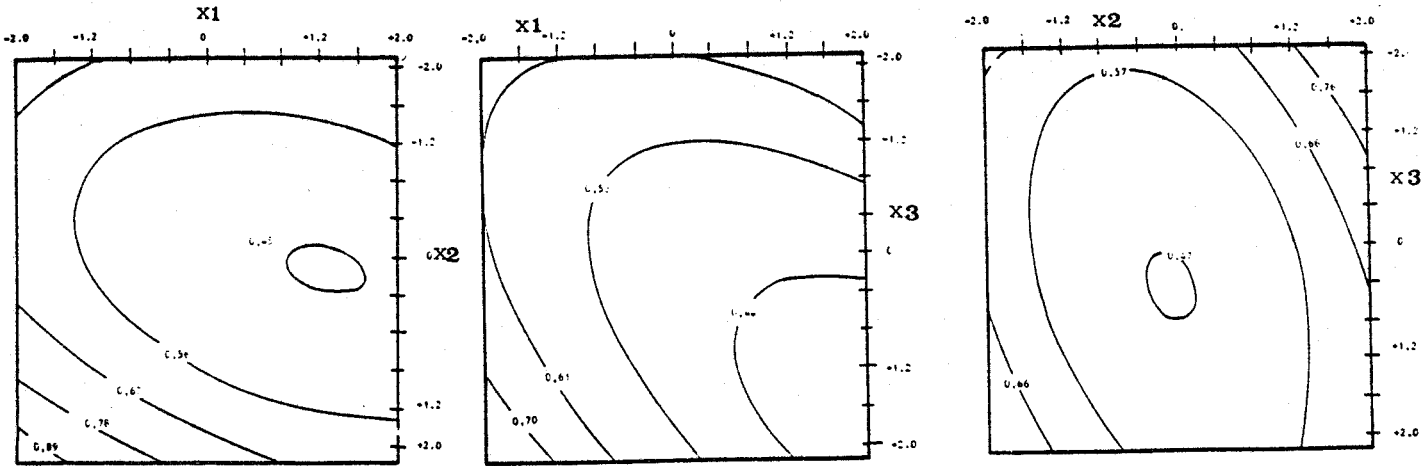


FIGURE 35: Courbes d'isorréponses de la réponse Y_2 (production du complexe enzymatique dosé à 75°C) de 2 facteurs simultanément ($3^{eme}=0$).

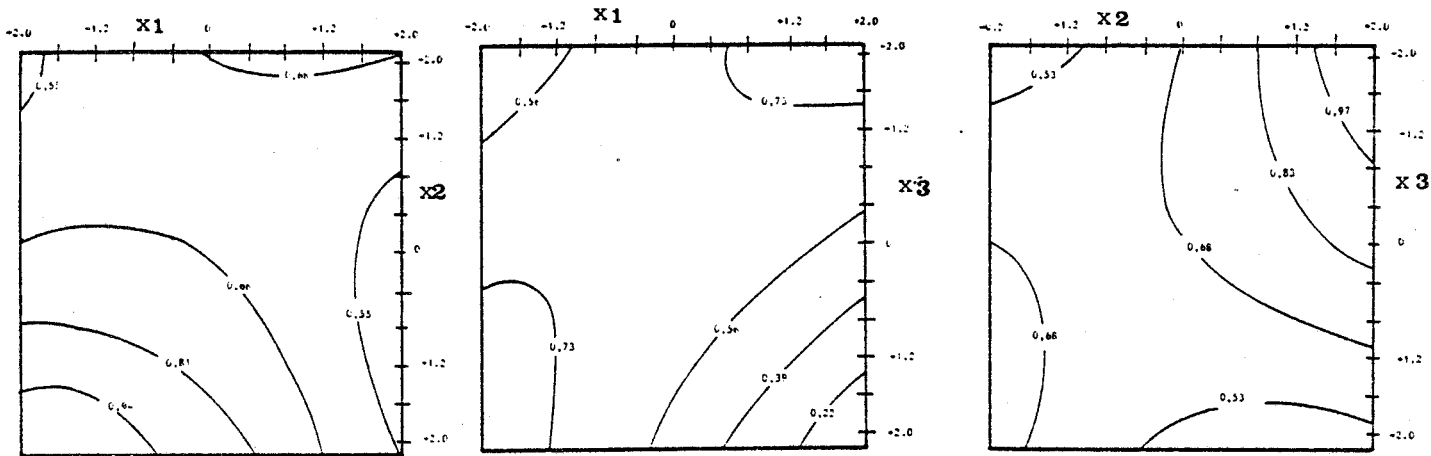


FIGURE 36: Courbes d'isorréponses de la réponse Y_3 (rapport des activités dosées à 75°C et à 60°C) de 2 facteurs simultanément ($3^{eme}=0$).

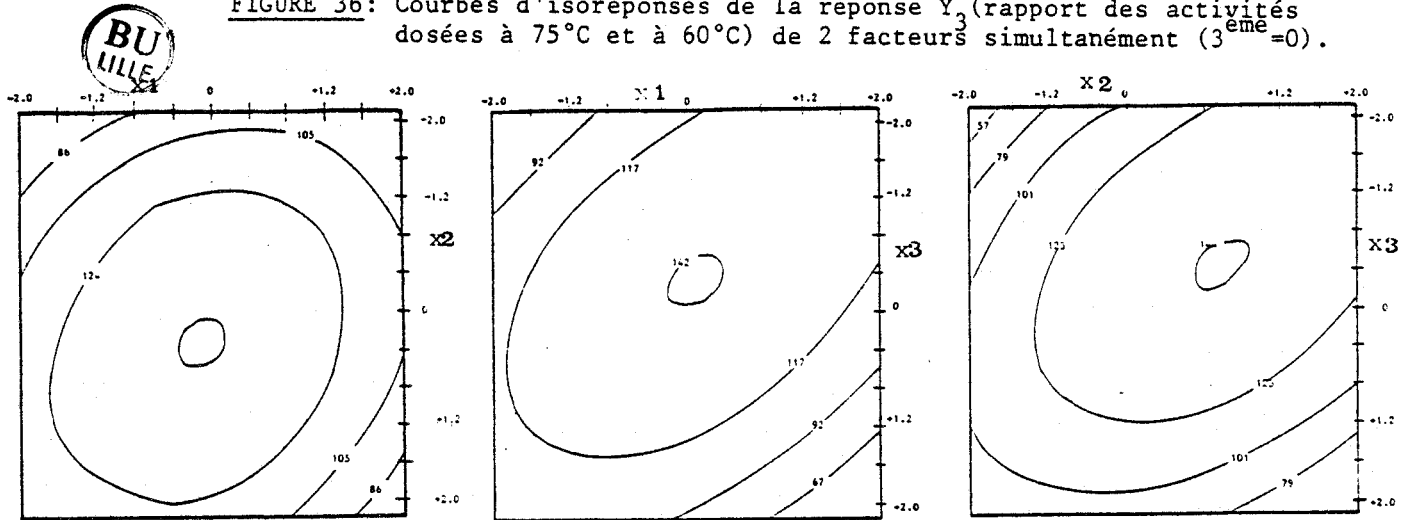


FIGURE 37: Courbes d'isorréponses de la réponse Y_4 (croissance mesurée par le poids sec) de 2 facteurs simultanément ($3^{eme}=0$).

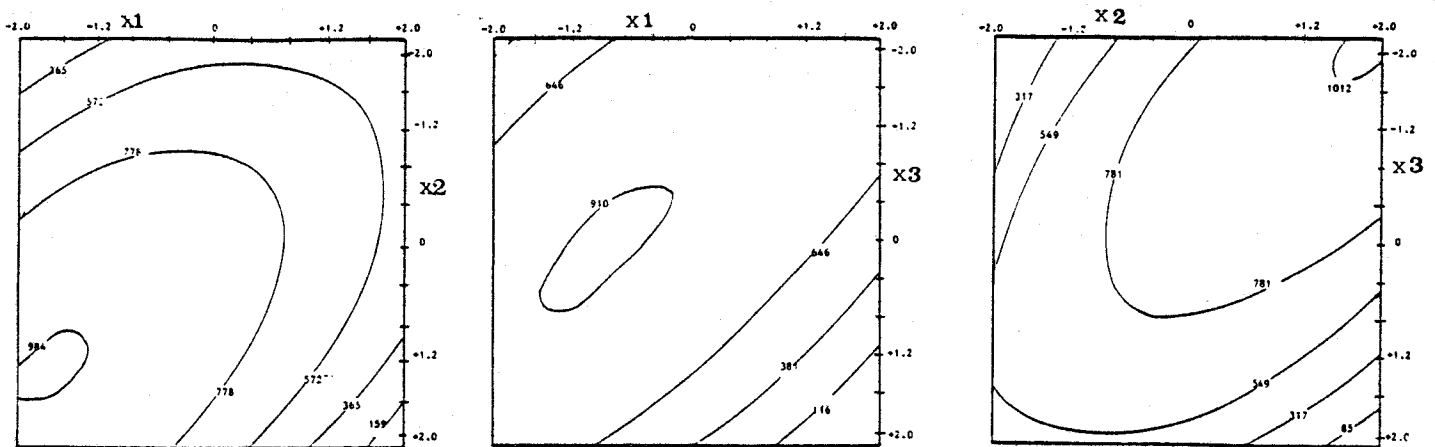


FIGURE 38: Courbes d'isorréponses de la réponse Y_5 (production enzymatique dosée à 60°C rapportée au PS) de 2 facteurs simultanément ($3^{eme}=0$).

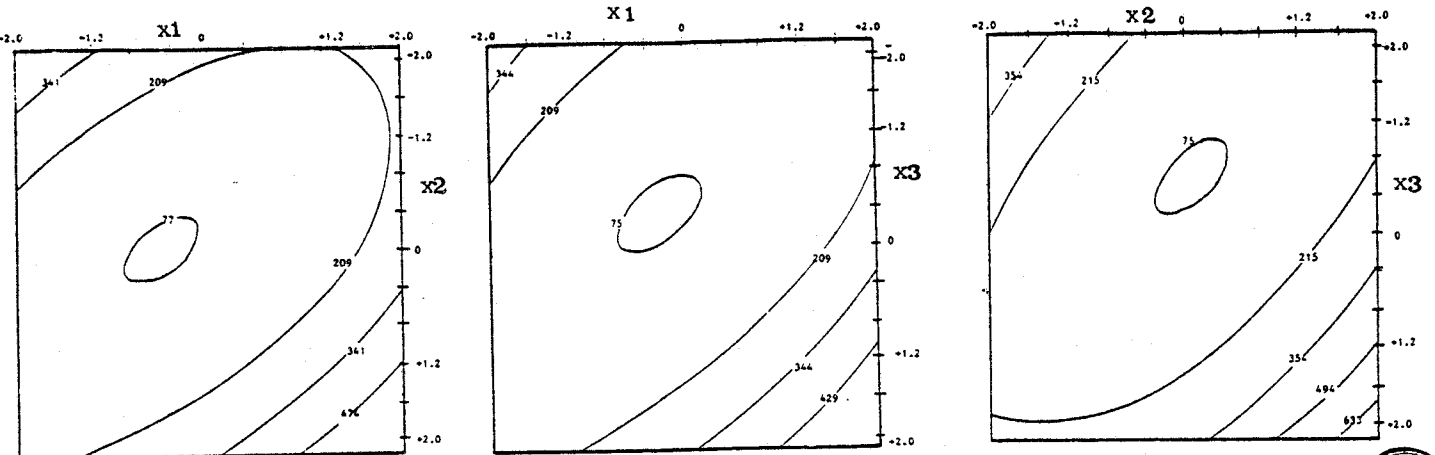


FIGURE 39: Courbes d'isorréponses de la réponse Y_6 (production enzymatique dosé à 75°C rapportée au PS) de 2 facteurs simultanément ($3^{eme}=0$).

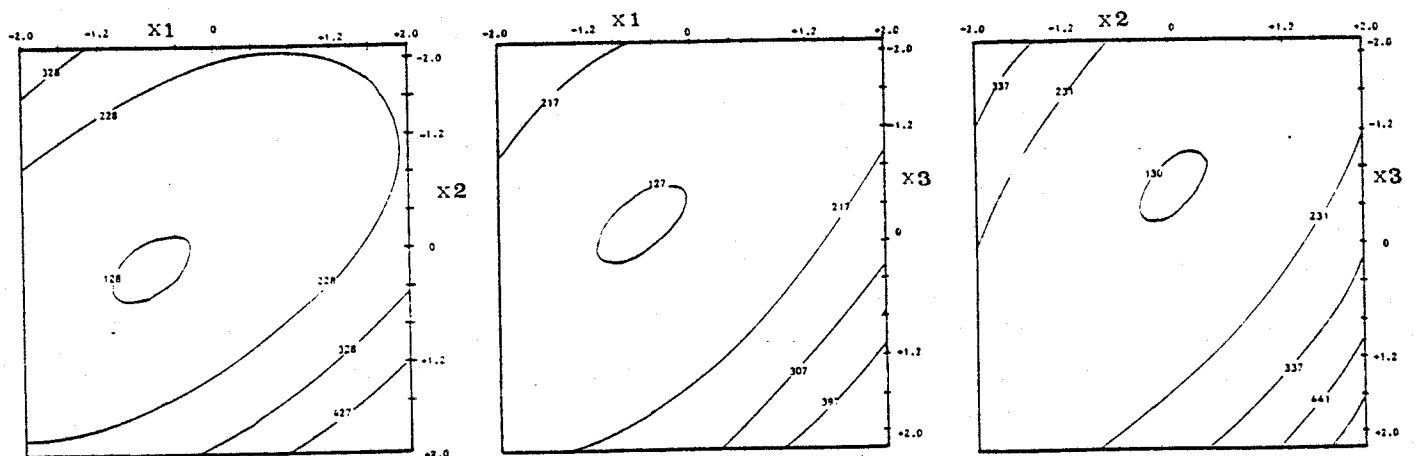


FIGURE 40: Courbes individuelles centrées pour les facteurs X_1 , X_2 et X_3 dans le domaine élargi (-2, +2) de la réponse Y_1 .

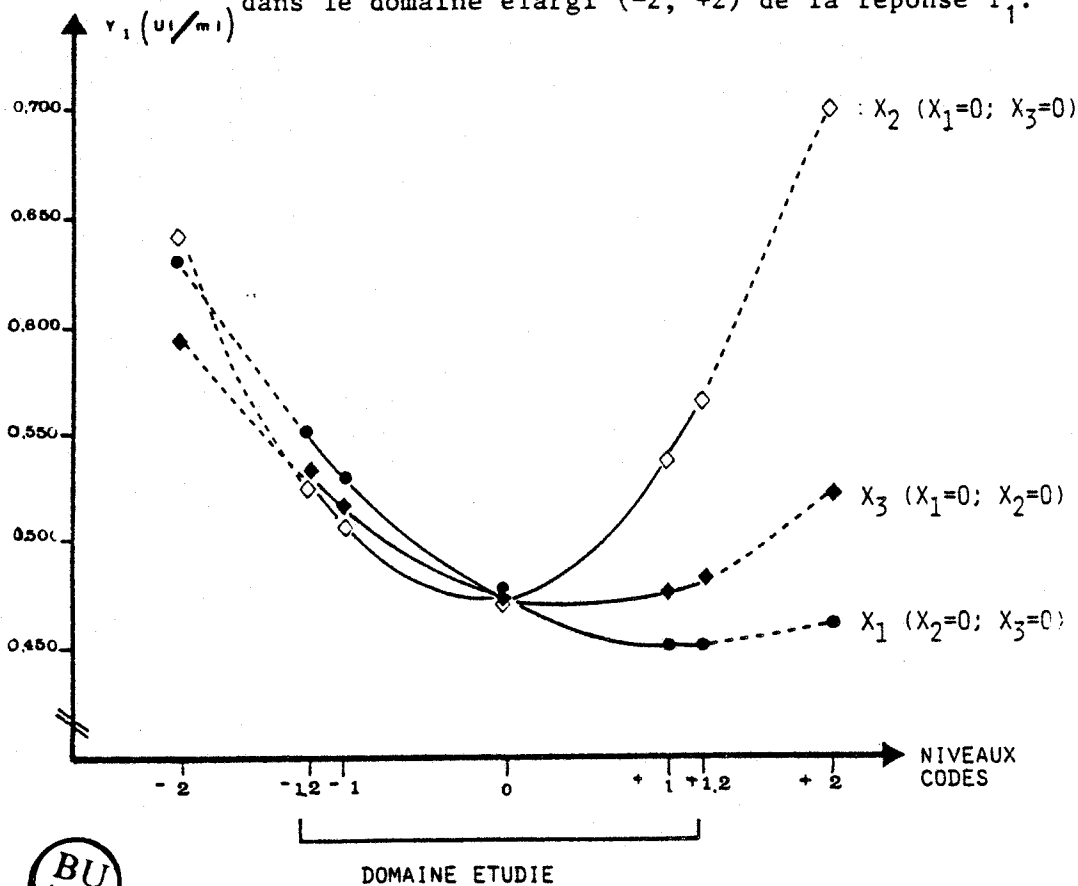
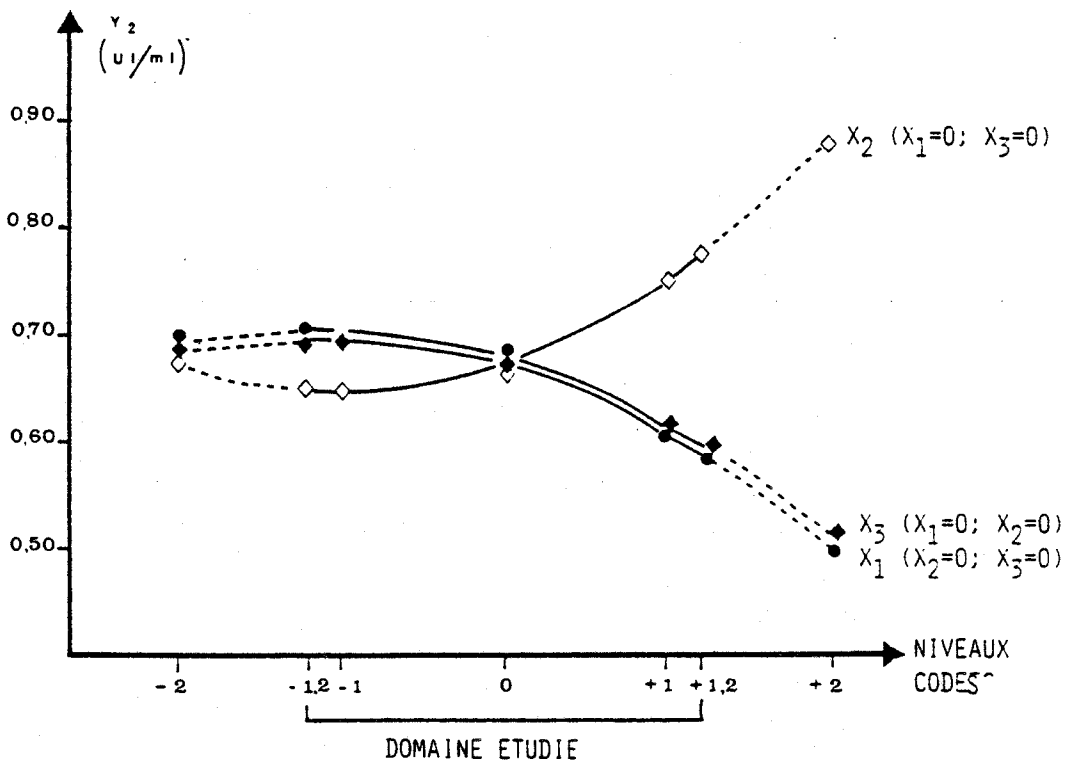


FIGURE 41: Courbes individuelles centrées pour les facteurs X_1 , X_2 et X_3 dans le domaine élargi (-2, +2) de la réponse Y_2 .



L'aspect général de ces figures est soit bien centré sur l'extremum (minimum ou maximum) (ex. : figure 36), soit présente au moins 2 extremums (ex. : figure 35).

Pour la première réponse (production du complexe enzymatique dosé à 60°C, figure 34), l'extremum est un minimum. Ce minimum est centré pour les variations conjointes des concentrations en KH_2PO_4 et en vitamines (le taux d'azote étant conservé au niveau moyen 0, soit 0,95 g/l). Dans les deux autres cas, ce minimum est décalé aux limites du domaine élargi (-2, +2). Toutefois, pour la production du complexe mesurée à 60°C, l'extremum pour la variation simultanée des trois facteurs est situé hors de ces limites.

La production du complexe AM dosé à 75°C présente, quant à elle, pour toutes les variations, des extremums non situés dans le domaine étudié. Par contre, l'optimum est situé dans le domaine exploré (- α , + α) pour les variations des trois facteurs simultanément.

Pour le rapport des activités (% 75/60) et la croissance du champignon (Y_4), de bons centrages des optimums sont observés, pour toutes les variations. Ces centrages sont également obtenus lors de la variation simultanée de trois facteurs pour ces deux réponses.

Les courbes d'isoréponses pour les deux dernières réponses (activités spécifiques produites, dosées aux deux températures) démontrent que les extremums sont des minimums et sont atteints dans tous les cas de variations deux à deux des trois facteurs.

2. - Les courbes individuelles centrées

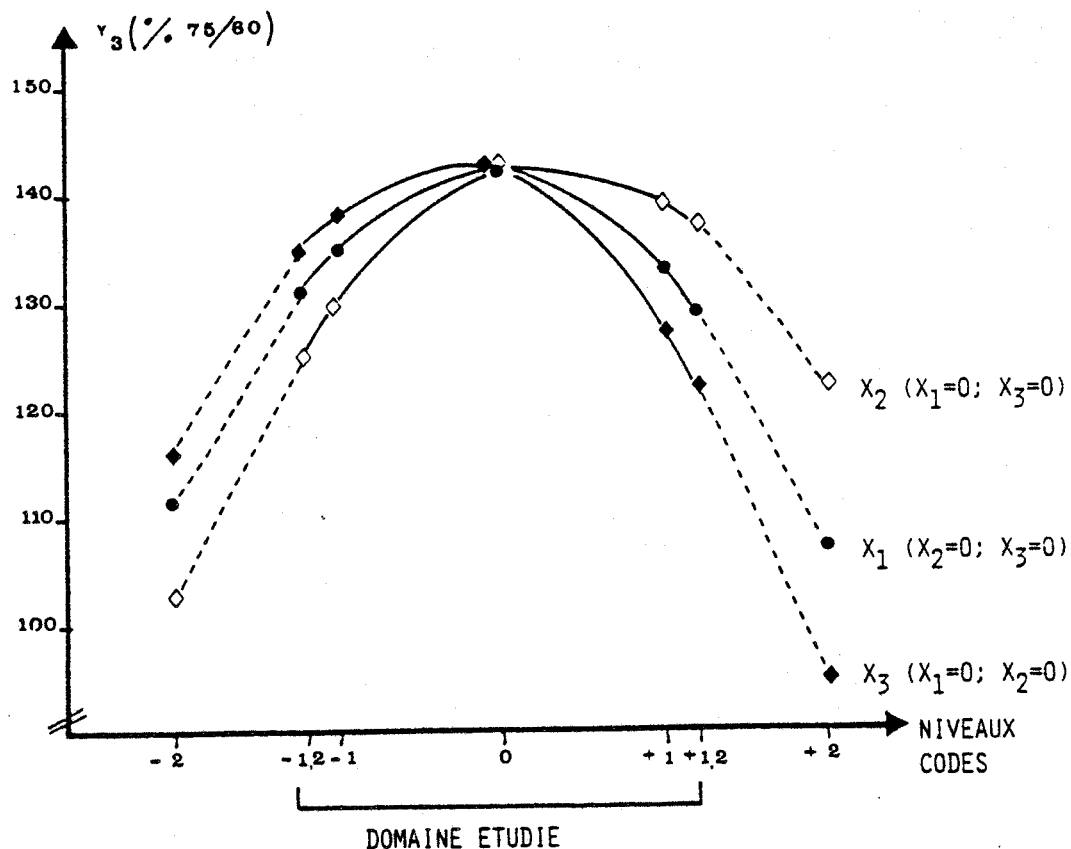
Les courbes individuelles centrées suivent la variation d'un seul facteur aux différents niveaux étudiés, les deux autres étant fixées à leur niveau central codé (0).

Les figures 40 à 43 représentent les courbes individuelles centrées pour les trois facteurs des quatre premières réponses, les deux dernières réponses étant des combinaisons des quatre premières. Ces courbes ont été représentées dans le domaine étudié (- α , + α) et par extrapolation dans le domaine élargi (-2, +2).

Une remarque générale s'impose pour ces quatre représentations graphiques : les différents extremums sont tous inclus dans le domaine étudié (- α , + α). Le centrage des niveaux a été bon si on ne considère que les variations individuelles. Les variations des réponses dans le domaine (- α , + α) sont assez faibles, ce qui confirmerait l'existence d'une zone optimale large.

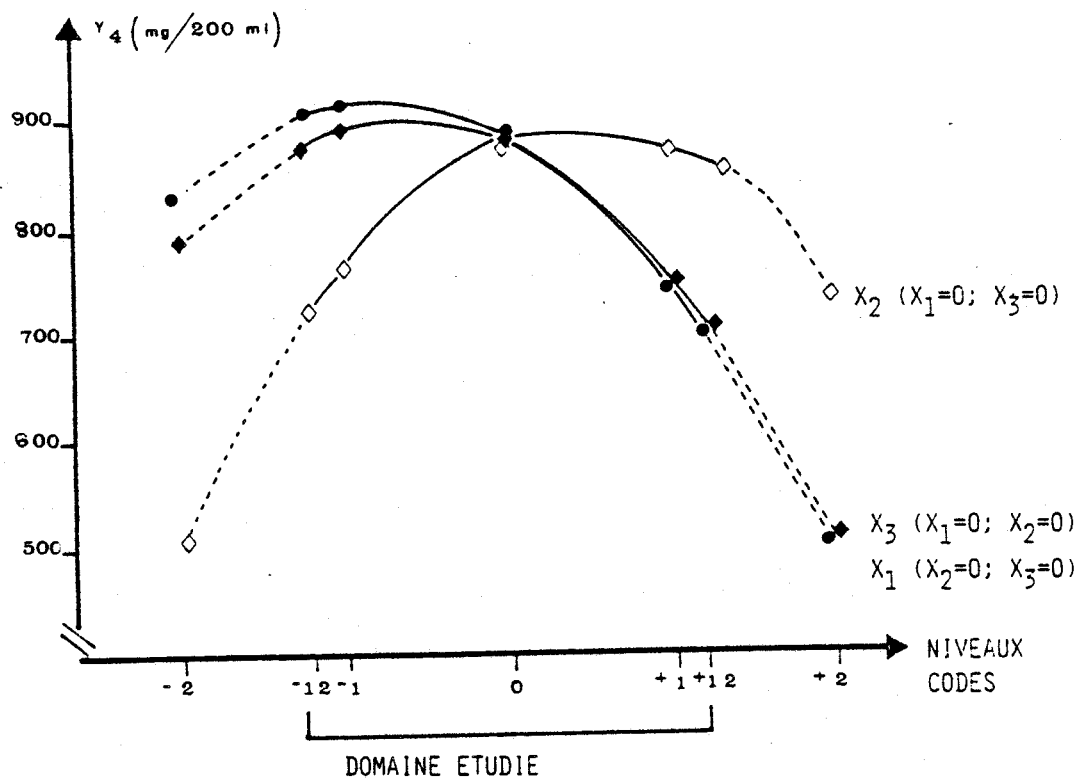
1) La figure 40 représente les courbes individuelles pour la production du complexe enzymatique dosée à 60°C (Y_1). Pour les teneurs en KH_2PO_4 et en vitamines (X_2 et X_3), le minimum atteint est bien centré sur le niveau codé (0) (soit 3 g/l de KH_2PO_4 , 5 $\mu\text{g/l}$ de biotine et 100 $\mu\text{g/l}$ de thiamine), tandis que pour le taux d'azote (X_1) le minimum atteint l'est pour les niveaux codés +1 et +1,2 (0,76 et 0,73 g/l). Cette représentation graphique souligne bien que ces facteurs n'ont pas été optimisés.

FIGURE 42: Courbes individuelles centrées pour les facteurs X_1 , X_2 et X_3 dans le domaine élargi $(-2, +2)$ de la réponse Y_3 .



BU
LILLE

FIGURE 43: Courbes individuelles centrées pour les facteurs X_1 , X_2 et X_3 dans le domaine élargi $(-2, +2)$ de la réponse Y_4 .



2) Dans la figure 41, les courbes individuelles centrées pour la production enzymatique mesurée à 75°C montrent une même allure pour les teneurs en azote et en vitamines (X_1 et X_3) où l'optimum de production enzymatique dosée à 75°C est situé pour les niveaux codés -1,2 et -1 : soit entre 1,36 et 1,26 g/l d'azote, 2 et 2,5 µg/l de biotine et 40 et 50 µg/l de thiamine. Par contre, la courbe du facteur X_2 indique la position d'un minimum dans ce domaine. Pour cette réponse, le facteur X_2 n'est pas totalement optimisé. L'existence de ces deux types de courbes explique l'aspect des courbes d'isoreponses obtenues pour cette réponse (figure 35), où aucun extremum ne figure dans le domaine exploré, ni dans le domaine élargi.

3) Les variations des courbes individuelles centrées du rapport des activités dosées à 75°C et à 60°C (% 75/60, figure 42) pour chaque facteur montrent que, pour cette réponse, le centrage des facteurs a été excellent autour du point central. Il apparaît donc que le pourcentage maximal a été atteint pour les concentrations des trois facteurs essayées dans ce plan centré composé : 0,95 g/l d'azote, 3,0 g/l de KH_2PO_4 , 5 µg/l de biotine et 100 µg/l de thiamine.

L'optimisation de la thermostabilité du complexe produit a donc été atteinte pour ces 3 facteurs, en fonction de l'ensemble des facteurs maintenus constants.

4) Pour la croissance (quatrième facteur), un bon centrage est également à remarquer mais décalé vers les niveaux codés -1,2 et -1 pour le taux d'azote (1,36 et 1,26 g/l) et la concentration en vitamines (2,0 et 2,5 µg/l de biotine et 40 et 50 µg/l de thiamine).

IV. - DISCUSSION ET CONCLUSION DU PLAN CENTRE COMPOSE

Les concentrations optimales de ces 3 paramètres ne sont pas identiques pour les diverses réponses étudiées. Ainsi, les teneurs optimales en azote, KH_2PO_4 et vitamines n'ont pas été atteintes puisque l'objectif était un accroissement de la production dosée à 75°C et de la thermostabilité du complexe enzymatique. Une amélioration de la croissance s'observe en parallèle à l'amélioration de la thermostabilité du complexe.

Comme il a été précisé dans la fin de la première partie et dans le début de celui-ci, le complexe enzymatique dosé correspond à un mélange d'activité d'amyloglucosidase et d' α -glucosidase. La thermostabilité et l'optimum d'activité élevé sont dus à l' α -glucosidase du *Thermoascus crustaceus*, l'amyloglucosidase possédant les caractéristiques des amyloglucosidases des *Aspergillus niger*.

Il apparaît donc que les conditions d'amélioration de la production d' α -glucosidase ne sont pas celles de l'amyloglucosidase. Les mécanismes régissant ces synthèses enzymatiques ne sont pas identiques et n'obéissent pas aux mêmes conditions extérieures.

En fonction du nombre de facteurs considérés (1, 2 ou 3), les concentrations optimales de ces 3 facteurs varient, ce qui indique l'existence d'interactions entre les facteurs. Si aucun de ces termes n'est significatif, ils n'en sont pas moins importants.

L'absence de signification constatée précédemment peut être expliquée par une zone optimale large et par l'étroitesse du domaine étudié. Malgré cette absence de signification, on peut tout de même conclure que les concentrations optimales des trois facteurs ont été atteintes pour la croissance et la thermostabilité du complexe produit. Il aurait été possible et plus judicieux de choisir dans cette étape un domaine d'étude plus large que celui classiquement conseillé de (-1,2 ; +1,2) pour l'étude de trois facteurs. En effet, un élargissement de ce domaine (-2, +2) par exemple, pour cette expérience, aurait permis une résolution plus sûre du problème.

CHAPITRE VI

ETUDES COMPARATIVES DES MILIEUX OPTIMISES ET DISCUSSION

TABLEAU 36: Composition des trois milieux "clés" de l'amélioration de la production enzymatique en système statique et agité.

		Milieu d' isolement (+FeSO ₄ , 7H ₂ O)	Milieu P6 (+FeSO ₄ , 7H ₂ O)	Milieu (0,0,0)
<u>Source de Carbone</u> (MGO ₂)	(g/l) (g/l)	25 (C=11,1)	25 (C=11,1)	25 (C=11,1)
<u>Source d'Azote</u>	(g/l) (g/l)	NH ₄ NO ₃ 0,94 (N=0,32)	NH ₄ NO ₃ 2,80 (N=0,95)	(NH ₄) ₂ SO ₄ 4,50 (N=0,95)
C/N		35,0	11,7	11,7
<u>Composition minérale</u>				
KH ₂ PO ₄	(g/l)	1,6	1,6	3,0
MgSO ₄	(g/l)	0,5	0,5	0,5
Ca(H ₂ PO ₄) ₂ , 2H ₂ O	(g/l)	1,2	0,2	-
ZnSO ₄ , 7H ₂ O	(g/l)	0,02	0,02	0,03
MnSO ₄ , H ₂ O	(g/l)	0,02	0,02	0,02
CuSO ₄ , 5H ₂ O	(g/l)	0,01	0,01	0,01
FeSO ₄ , 7H ₂ O (Chélaté par de l'EDTA)	(g/l)	0,01	0,01	-
<u>Composition vitaminique</u>				
Biotine	(µg/l)	-	-	5
Thiamine	(µg/l)	-	-	100
pH		5.8	5.8	5.8

Comme nous l'avons déjà précisé dans la deuxième partie de ce mémoire, la souche étudiée a présenté des variations importantes des taux de productions enzymatiques tout au long des études dans des conditions équivalentes. Seul le rapport de l'activité dosée à 75°C et de l'activité dosée à 60°C a présenté une bonne constance. Il n'est donc pas concevable de comparer les taux de production des différentes étapes. Ces productions enzymatiques ont été vérifiées par des cinétiques de production du complexe enzymatique pour différents milieux de culture. De plus, les milieux déterminés comme optimaux à chaque étape pour la réponse Y_3 (% 75/60) ont été comparés dans la figure 47 résumant les différentes étapes de l'optimisation.

1. - CINETIQUES DE PRODUCTIONS ENZYMATIQUES PAR LA SOUCHE P6 DU *THERMOASCUS CRUSTACEUS*

Ces cinétiques ont été suivies à 37°C et à l'obscurité en culture statique (fioles de Roux, 100 ml de milieu de culture) et en culture agitée (fioles d'Erlenmeyer, 200 ml de milieu de culture, 110 rpm).

Le taux d'ensemencement a été de $20 \cdot 10^5$ conidies par fiole de Roux et de $100 \cdot 10^5$ conidies par fiole d'Erlenmeyer.

Trois milieux ont été essayés :

- le milieu d'isolement additionné de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$;
- le milieu P6 additionné de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$;
- le milieu (0, 0, 0) central du plan centré composé.

Le tableau 36 résume la composition de ces milieux.

Les cinétiques ont été suivies jusqu'à cinq jours de culture en système agité et sept jours en système statique, durées après lesquelles la phase de lyse mycélienne est nettement entamée.

La figure 44 résume les différentes cinétiques de croissance de *Th. crustaceus* dans ces différents cas. Les figures 45 et 46 représentent ces cinétiques de productions amyloglucosidasiques, pour les activités dosées à 60°C et 75°C.

1. - Aspect des cultures

- En culture agitée, l'utilisation des 3 milieux permettent l'obtention de culture uniquement mycélienne, sans formation d'agglomérats.
- En système statique, l'aspect cultural est différent selon les milieux :
 - sur le milieu d'isolement, additionné de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, le Champignon produit des périthèces, mûrs en 5 à 6 jours et un exudat doré qui colore fortement le milieu de culture ;
 - sur le milieu P6, complété par du $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, la culture reste mycélienne jusqu'à 7 ou 8 jours, puis différentes plages apparaissent, tantôt conidiennes, tantôt périthéciales ;

FIGURE 44: Croissance pondérale du *Thermoascus crustaceus* en système agité et en système statique sur 3 milieux de culture.

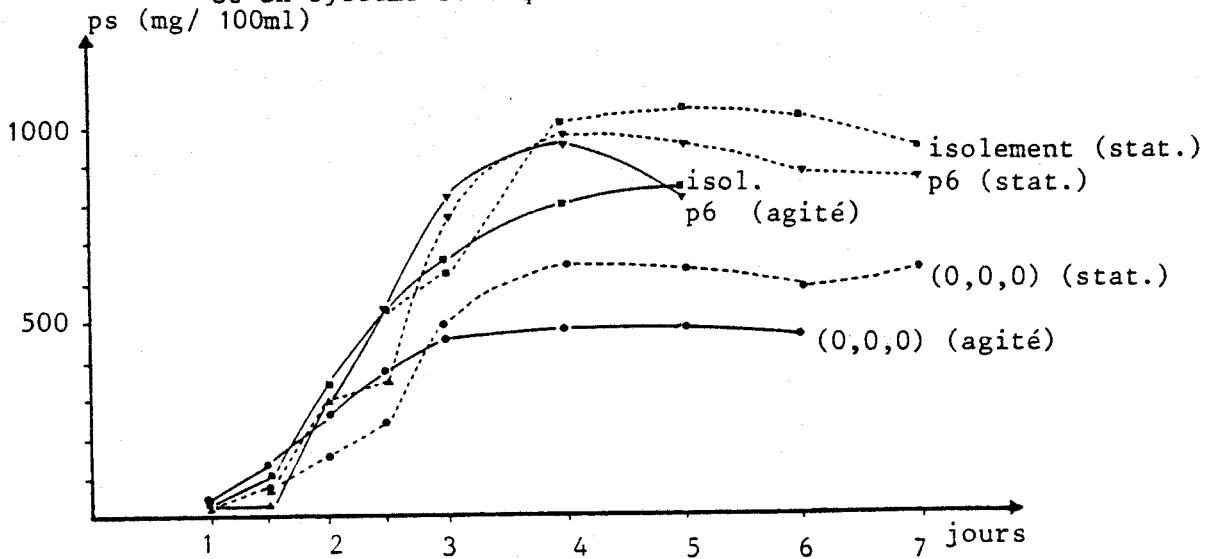


FIGURE 45: Activité amyloglucosidasiqne produite en système statique mesurée à 60°C (—) et à 75°C (----) sur 3 milieux de culture.

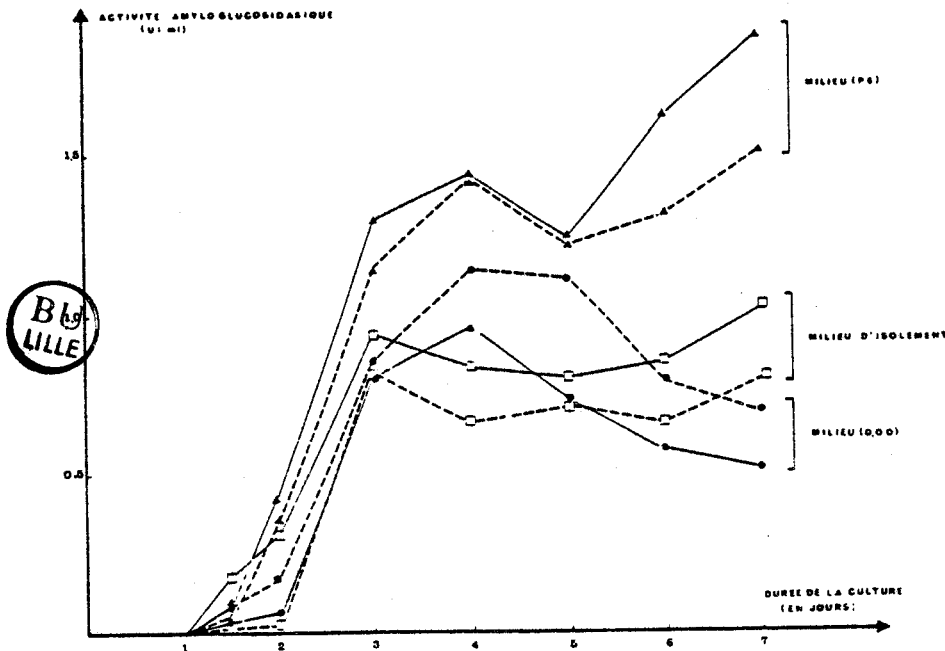
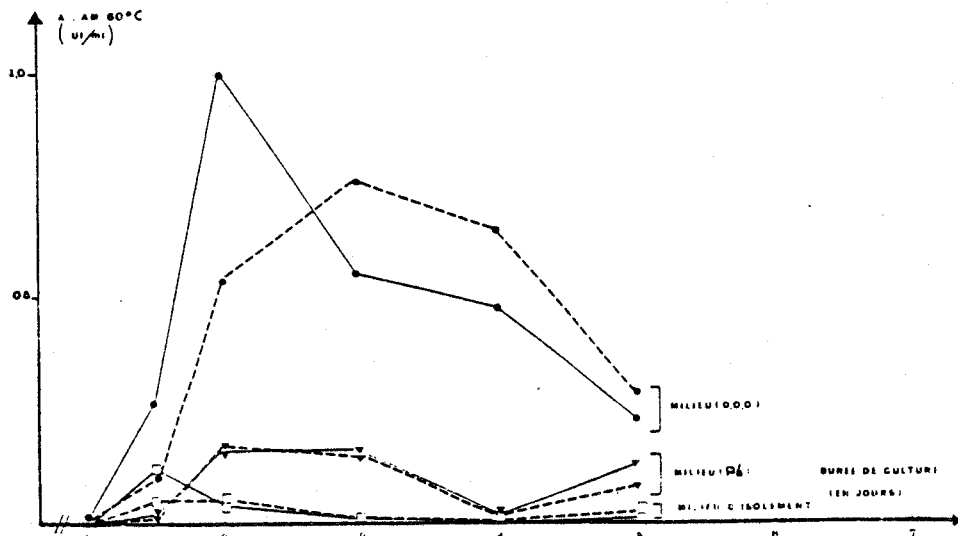


FIGURE 46: Activité amyloglucosidasiqne produite en système agité mesurée à 60°C (—) et à 75°C (----) sur 3 milieux de culture.



. sur le milieu (0, 0, 0), la culture est uniquement mycélienne.

2. - Croissance pondérale (figure 44), évolution du pH et de la teneur en glucose

Cette croissance débute plus rapidement sur les milieux agités que sur les milieux statiques, mais la biomasse maximale atteinte est globalement plus importante en culture statique.

- Sur le milieu d'isolement (+ $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), la phase stationnaire est atteinte au bout de 5 à 6 jours, en agitation et en statique. Par contre, le pH est au minimum vers 36 h et remonte immédiatement en système agité, tandis qu'en système statique le pH reste bas jusqu'à 3 jours où il commence à remonter. La teneur en glucose atteint un maximum après 2 jours de culture, puis chute rapidement.

- Sur le milieu P6 (+ $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), la phase stationnaire est atteinte à 4 jours, dans les 2 cas. Le comportement de la teneur en glucose est similaire à celui observé avec le milieu d'isolement. Par contre, la chute du pH en système statique est plus longue (4 jours).

- Sur le milieu (0, 0, 0), la phase stationnaire est atteinte entre 4 et 5 jours de culture. La biomasse maximale obtenue à ces jours est de l'ordre de 2/3 de celle obtenue avec les 2 autres milieux. Le pH chute rapidement et reste constant aux pH 2.0 et 2.5. Le comportement de la teneur en glucose est très différent avec ces milieux ; en effet, elle atteint un maximum à 2 jours et ne descend guère par la suite.

3. - Production du complexe enzymatique (figures 45 et 46)

L'analyse des différentes cinétiques de productions enzymatiques par le *Thermoascus crustaceus* (souche P6) en cultures statique et agitée démontre que ces productions sont nettement meilleures en système statique qu'en système agité. L'oxygénation et l'agitation mécanique du milieu limitent donc, également, la production enzymatique.

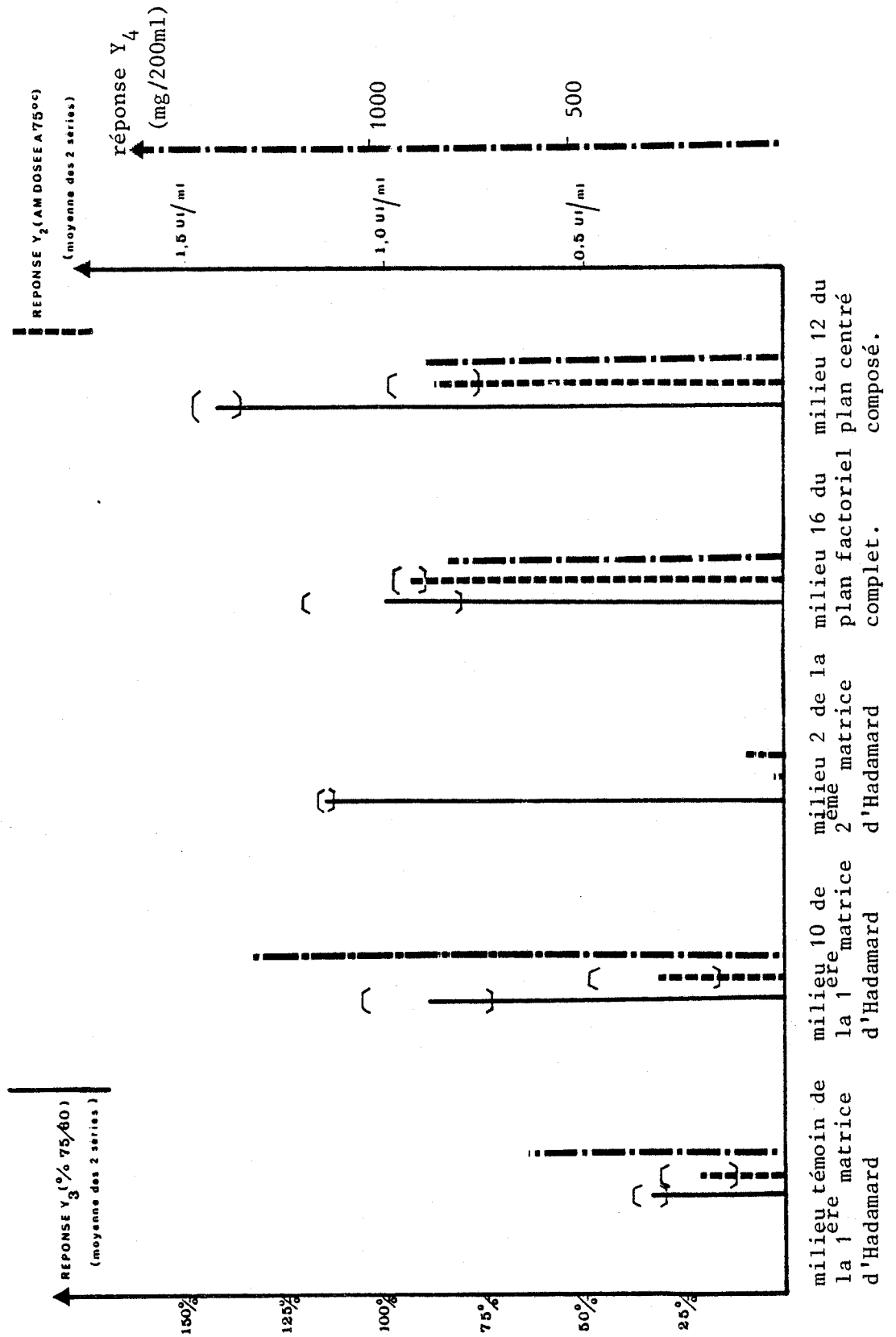
Conclusion

Le meilleur milieu en système agité est le milieu (0, 0, 0), milieu avec lequel l'amélioration de la production et de la thermostabilité du complexe enzymatique est effective. Aussi, les expériences multifactorielles ont permis de réaliser une amélioration importante de la production enzymatique de notre champignon : la production moyenne obtenue en 3 jours, en système agité, a été de 0,2 UI/ml (dosées à 75°C) avec le milieu P6 et de 0,75 UI/ml avec le milieu (0, 0, 0), soit une amélioration de 275 %.

II. - RECAPITULATION DE L'EVOLUTION DE LA REPOSE Y3 DANS CETTE ETUDE MULTIFACTORIELLE

La production enzymatique ayant été améliorée et les cinétiques de production du complexe ayant permis de vérifier ce résultat, la comparaison des différents milieux permet de contrôler la valeur des séquences de cette étude.

FIGURE 47: Evolution du rapport des activités (75/60) à chaque étape de l'étude en système agité, à laquelle sont associées les valeurs de croissance et de production enzymatique dosée à 75°C (réponses Y_4 et Y_2).



La figure 47 représente cette évolution de la réponse Y_3 , en fonction des milieux améliorés à laquelle sont associées les valeurs de productions enzymatiques dosées à 75°C (réponse Y_2). Le tableau 37 précise la composition des différents milieux. L'observation de la figure 47 met en évidence que les différentes étapes ont permis une amélioration importante du rapport des activités dosées à 75°C et à 60°C, ainsi que de la production du complexe (dosée à 75°C). Cette amélioration permet de passer d'un rapport des activités de 35 % à 140 % et de 0,2 UI/ml à 0,9 UI/ml en fin d'amélioration.

III. - COMPARAISON ET DISCUSSION DES CONSTITUANTS DU MILIEU P6 ET DU MILIEU OPTIMISE

Le tableau 38 récapitule les constituants du milieu en P6 et des milieux optimisés pour les réponses Y_2 et Y_3 . La comparaison de ces 2 milieux nous montre que l'amélioration de la thermostabilité et de la production enzymatique dosée à 75°C est due à la nature de la source d'azote, et à sa concentration dans le milieu, à la teneur en KH_2PO_4 et à la présence de vitamines.

1. - Nature de la source d'azote

Deux sources d'azote ont été utilisées, NH_4NO_3 pour le milieu P6 qui apporte l'azote sous ses 2 formes minérales et le $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. L'amélioration de la production, due à l'emploi de ce dernier sel, peut être due :

- à l'utilisation immédiate de toute la source d'azote durant la période de croissance rapide, en système agité ;
- à l'ion sulfate, fourni en quantité excessive ;
- à une conséquence de la concentration en ion sulfate : une acidification du milieu de culture.

L'étude de ces hypothèses est indispensable, pour une compréhension du phénomène. De plus, dans l'étude en système statique (IIème partie), il a été remarqué que la nature de la source d'azote influence la composition du complexe enzymatique, ce qui est confirmé ici.

2. - La teneur en azote dans le milieu de culture

Cette teneur ne varie que peu, dans ces 3 milieux, et on ne peut lui imputer la grande variation de production enzymatique observée.

3. - La teneur en KH_2PO_4

Cet élément double, source de potassium et de phosphore, peut agir sur la thermostabilité et la production du complexe mesurée à 75°C, également par différents biais :

- source de potassium, élément indispensable de la constitution du fuseau mitotique ;

TABEAU 38: Composition du milieu P6 et des milieux optimisés pour les réponses Y_2 et Y_3 .

		Milieu P6	Milieu optimisé pour la réponse Y_3	Milieu optimisé pour la réponse Y_2
<u>Source de Carbone</u> (MDO ₂)	(g/l) (g/l)	25 (C=11,1)	25 (C=11,1)	25 (C=11,1)
<u>Source d'Azote</u>	(g/l) (g/l)	NH ₄ NO ₃ 2,8 (N=0,95)	(NH ₄) ₂ SO ₄ 4,4 (N=0,93)	(NH ₄) ₂ SO ₄ 4,1 (N=0,87)
C/N		11,7	11,9	12,7
<u>Composition minérale</u>				
KH ₂ PO ₄	(g/l)	1,6	3,6	2,0
MgSO ₄	(g/l)	0,5	0,5	0,5
Ca(H ₂ PO ₄) ₂ , 2H ₂ O	(g/l)	0,2	-	-
ZnSO ₄ , 7H ₂ O	(g/l)	0,02	0,03	0,03
MnSO ₄ , H ₂ O	(g/l)	0,02	0,02	0,02
CuSO ₄ , 5H ₂ O	(g/l)	0,01	0,01	0,01
<u>Composition vitaminique</u>				
Biotine	(µg/l)	-	3,6	4,3
Thiamine	(µg/l)	-	72,5	85,5
pH		5.8	5.8	5.8



- source de phosphore, élément ayant une grande importance dans les réactions métaboliques énergétiques (constituant de l'ATP, ADP, ..) ;
- par la modification de la pression osmotique ;
- ou par l'action combinée de ces différents effets.

4. - Présence et teneur en biotine et thiamine

Les concentrations apportées en vitamines dans les milieux optimisés sont légèrement inférieures à celles couramment utilisées. Leurs effets, en culture statique, avaient été observés par une stimulation du départ de la culture et une légère augmentation de la production enzymatique du *Thermoascus crustaceus*.

En système agité, la production totale ayant lieu très tôt, dans la culture, la stimulation due aux vitamines explique l'amélioration de production. Par contre, l'effet sur la thermostabilité du complexe n'a pas été remarqué en système non agité.

IV. - EFFET DE LA NATURE DE LA SOURCE D'AZOTE

Nous avons voulu, par une simple expérience, déterminer quelle hypothèse émise était vraisemblable sur l'effet de la nature de la source d'azote sur la production enzymatique, en système agité.

1. - Conditions d'étude

Huit sources d'azote minérale ont été essayées dans les conditions constantes suivantes :

- ensemencement par $100 \cdot 10^5$ conidies pour 200 ml de milieu d'une culture de 4 jours sur milieu Malt-Agar à 45°C ;
- solution minérale du milieu P6 ;
- absence de vitamines ;
- source de carbone : MD 02 (C = 11,1 g/l) ;
- source d'azote : variable (N = 0,95 g/l) ;
- pH : 5,8 ;
- 37°C, à l'obscurité, agitation à 110 rpm ;
- mesure à 3 jours de culture.

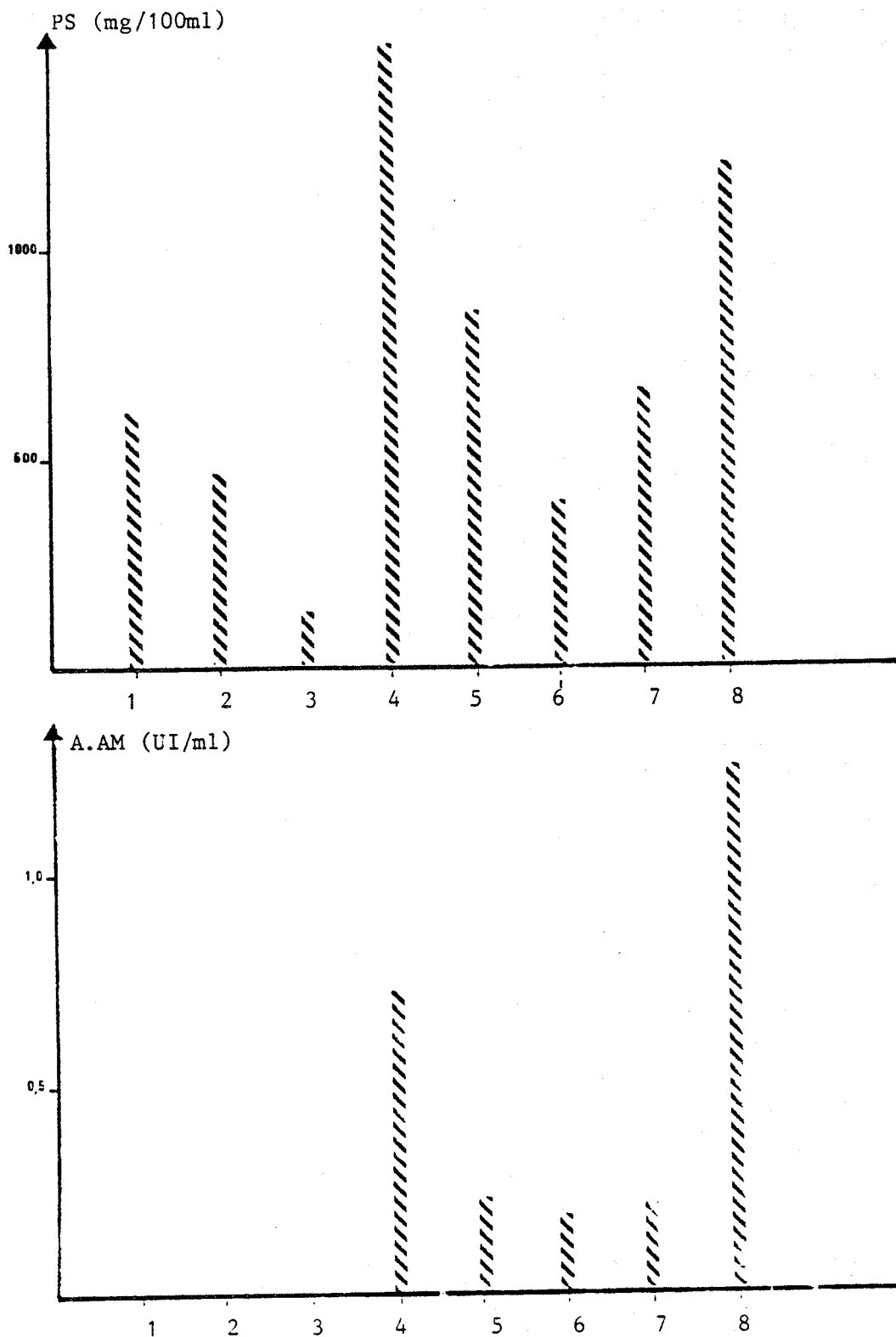
2. - Résultats

La figure 48 rassemble les résultats de croissance et de la production du complexe enzymatique obtenus dans les conditions décrites.

Une croissance restreinte et une absence de production enzymatique sont obtenues avec les sources nitrées simples.

Par contre, la croissance est fonction de l'ion d'accompagnement des sources ammoniacuées. Ainsi l'acétate, en système agité, n'induit qu'une croissance faible du champignon. Ce fait avait déjà été observé dans l'expérience préliminaire de cette troisième partie. Les meilleures croissances sont obtenues avec le nitrate et le phosphate d'ammonium.

FIGURE 48: Croissance (PS) et production enzymatique (A.AM, dosée à 60°C) en système agité et en fonction de la nature de la source d'azote minérale, mesure à 3 jours de culture.



BU
LILLE

LEGENDE: 1 KNO_3
2 NaNO_3
3 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$
4 NH_4NO_3

5 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
6 Acetate de NH_4
7 NH_4Cl
8 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$

On obtient une production enzymatique avec les différentes sources d'azote ammoniacé, ici encore les niveaux de production sont fonction de l'ion d'accompagnement.

La production enzymatique maximale a été obtenue avec le phosphate d'ammonium $(\text{NH}_4)_2 \text{HPO}_4$, ce qui souligne l'effet du phosphate dans la production enzymatique. Par contre, la production du complexe enzymatique est moins bonne avec le sulfate d'ammonium qu'avec le nitrate d'ammonium, comme source d'azote. Ceci élimine l'hypothèse d'un effet stimulateur de la production par l'ion sulfate.

L'hypothèse d'un apport unique de la forme d'azote ammoniacé est également critiquable aux vues des résultats obtenus avec le nitrate d'ammonium.

En conclusion de cette étude, les différentes hypothèses émises sur l'effet de la nature de la source d'azote ont été contrecarrées mais elle a permis de vérifier l'effet du phosphate dans la production enzymatique et dans la croissance. De plus, on peut envisager l'existence d'interactions influentes entre les 3 facteurs du plan centré composé, dans le domaine de concentration étudié.

V. - MESURE DES ACTIVITES ISOCITRATE LYASE ET ISOCITRATE DESHYDROGENASE DU METABOLISME INTERMEDIAIRE DE THERMOASCUS CRUSTACEUS

Dans le but d'expliquer les différences de comportement en système statique et en système agité de notre souche, nous avons voulu vérifier le type de métabolisme de celle-ci lors de sa croissance.

L'importance du métabolisme intermédiaire dans la synthèse enzymatique (Malard, 1981 ; Remi, 1984), la sexualisation (Vidal, 1983 ; Dehorter, 1985), la différenciation fongique (Turian, 1970 ; Smith et Galbraith, 1971) n'est plus à démontrer.

De plus, l'étude menée au laboratoire de Cryptogamie de Lille sur la synthèse d' α -amylase par *Aspergillus oryzae* a montré qu'une souche hyperproductrice de cet enzyme possédait un métabolisme dit oxydatif, lié à l'activité du cycle de Krebs. Par contre, une souche faiblement productrice avait un métabolisme lié au cycle glyoxylique (Malard, 1981 ; Remi, 1984).

Aussi, avons-nous mesuré l'activité de l'enzyme permettant de visualiser l'activité du cycle de Krebs, isocitrate déshydrogénase (IDH) et celle du shunt glyoxylique, isocitrate lyase (IL).

1. - Méthode d'étude

L'activité de ces 2 enzymes intracellulaires : isocitrate lyase (IL) et isocitrate déshydrogénase (IDH) a été mesurée pour des cultures de *Th. crustaceus* (P6) sur milieu P6 en système agité (110 rpm) et en système statique à 37°C et à l'obscurité.

Les techniques de préparation des enzymes et les conditions de dosage enzymatique sont présentées en annexe de ce mémoire.

FIGURE 49: Cinétiques de croissance (PS), de production enzymatique (A.AM) et des activités intracellulaires: isocitrate lyase (IL) et isocitrate deshydrogénase (IDH), en système statique.

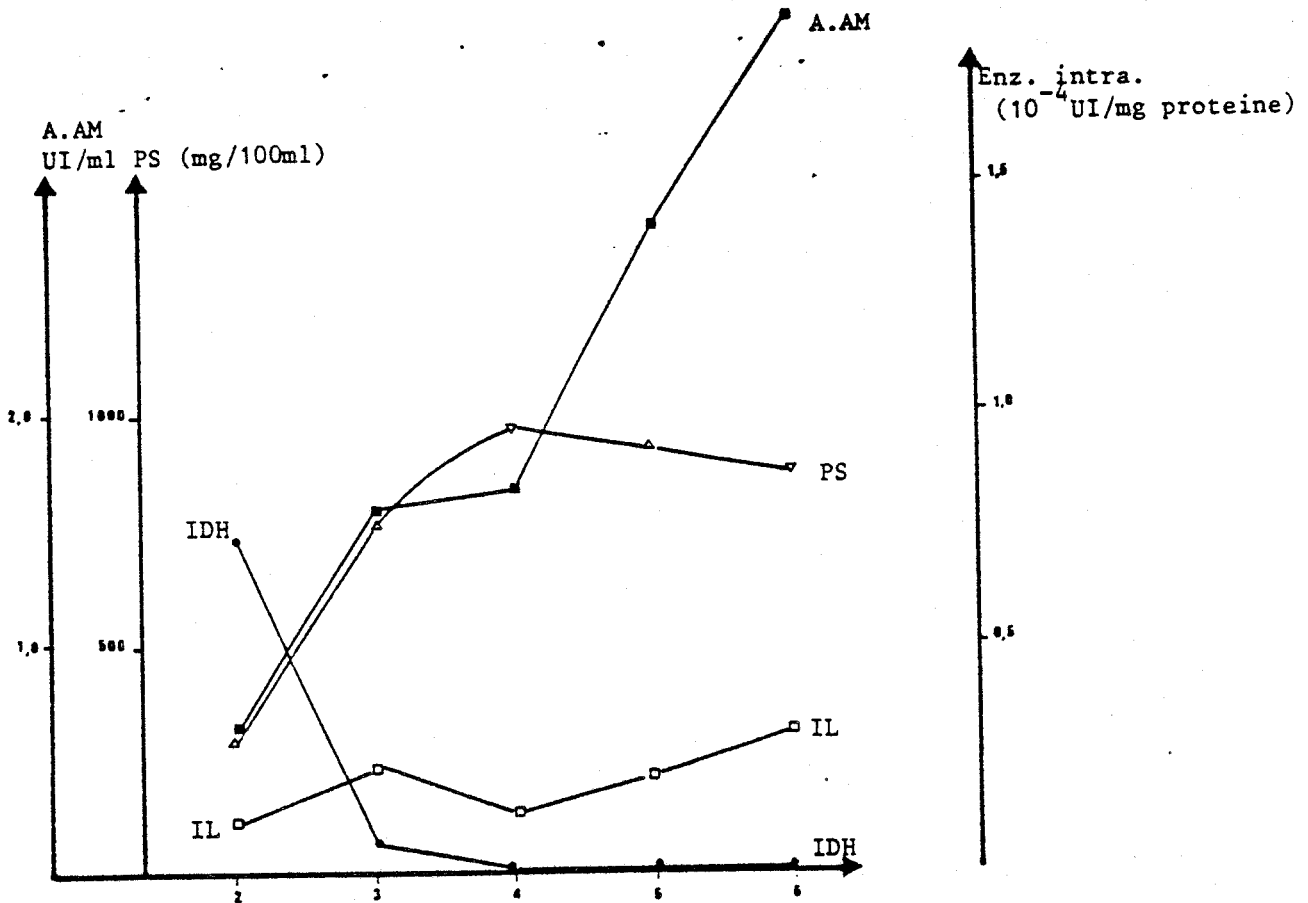
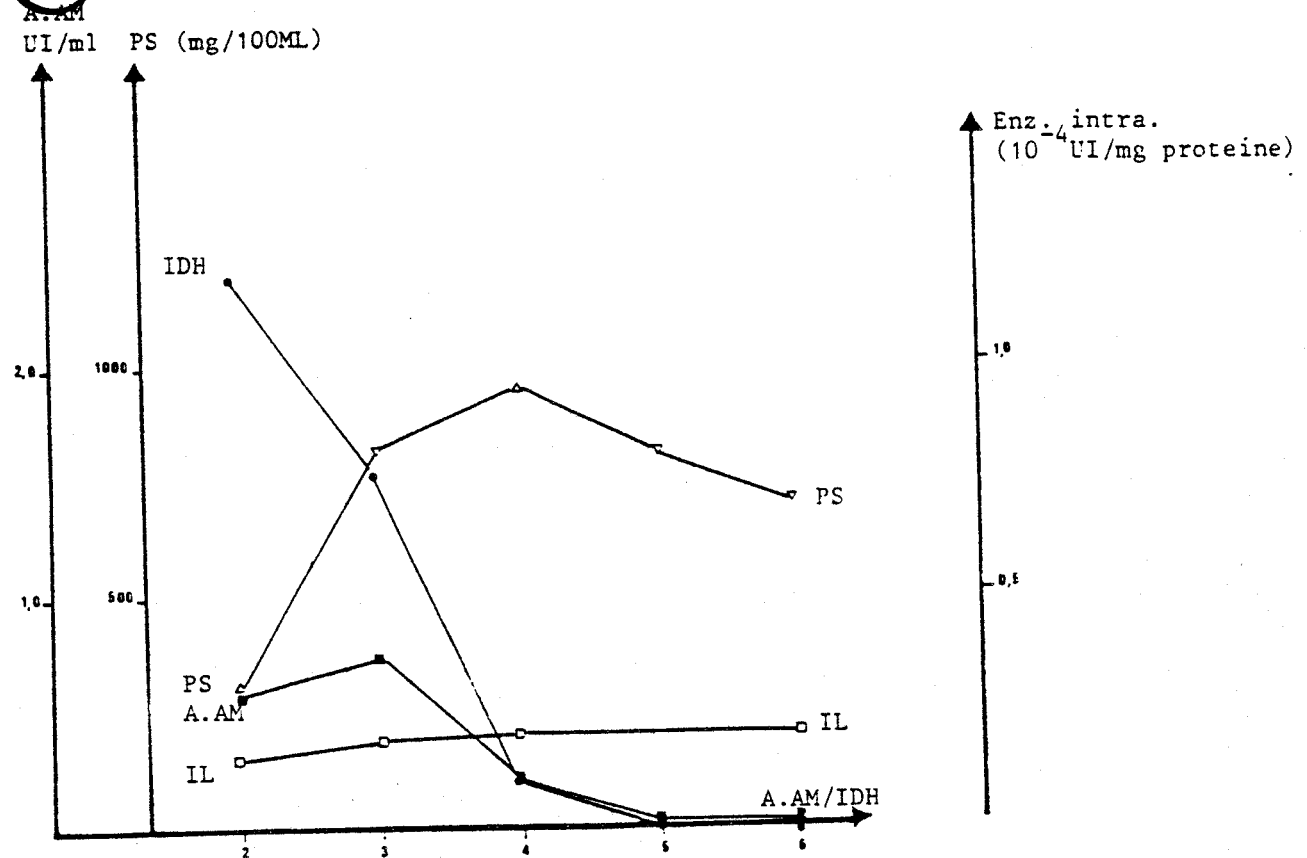


FIGURE 50: Cinétiques de croissance (PS), de production enzymatique (A.AM) et des activités intracellulaires: isocitrate lyase (IL) et isocitrate deshydrogénase (IDH), en système agité.



2. - Résultats

La figure 49 représente les cinétiques de croissance (PS), de production du complexe enzymatique (A.AM) et des activités intracellulaires (IL et IDH) en système statique et la figure 50 celles en système agité.

L'observation de ces 2 figures nous montre un comportement enzymatique du métabolisme intermédiaire similaire mais décalé, en systèmes statique et agité. Ainsi, l'activité IDH est très importante en début de développement, activité qui se réduit à 3 jours de culture en système statique et à 4 jours en système agité. Par contre, l'activité isocitrate lyase reste constante tout au long de la croissance mycélienne.

Il semble donc que le cycle de Krebs n'est fonctionnel dans son intégralité qu'en début de croissance, mais que le shunt glyoxylique, réducteur, est actif de façon constante à un bon niveau.

L'aération semble activer le cycle de Krebs un peu plus longtemps qu'en système peu aéré. Et il apparaît que l'aération est globalement défavorable à la synthèse du complexe enzymatique.

De plus, une étude métabolique plus précise permettra d'envisager réellement le rôle de l'aération et du type de métabolisme lié à la production du complexe et à la croissance.

CONCLUSION

En quatre étapes successives, la zone optimale de la production du complexe le plus thermostable a été atteinte pour les facteurs étudiés.

De plus, dans cette étude, nous avons mis en évidence que les mécanismes régissant la production des deux enzymes constituant le complexe ne sont pas identiques. La production de l'amyloglucosidase faiblement thermostable (suivie en partie par la réponse Y_1) n'est pas intimement liée à la croissance de la souche, à l'inverse de la production de l' α -glucosidase, support de la thermostabilité du complexe enzymatique.

CONCLUSION GENERALE

Le *Thermoascus crustaceus* (P6), ascomycète de la famille des *Thermoascaceae* a été étudié en cultures statique et agitée après sa sélection basée sur une étude de la thermostabilité de l'activité amyloglucosidase produite par 846 souches fongiques isolées et déterminées au laboratoire.

Les exigences culturales du *Thermoascus crustaceus* ont été étudiées par une méthode unifactorielle en culture statique. Après avoir déterminé les plages optimales de chacun des facteurs intervenant au cours de la croissance, nous avons poursuivi une étude en système agité en utilisant cette fois une méthode plurifactorielle. Cette efficacité a été amplifiée par les résultats dus à la méthode unifactorielle.

En effet, les méthodes multifactorielles peuvent être inadéquates à la suite de mauvais choix des différents facteurs, de leurs niveaux, des réponses analysées. Ce risque peut être réduit soit par la connaissance du problème, soit par une expérimentation personnelle, soit par une connaissance bibliographique précise de l'organisme et du sujet à étudier. Dans notre cas, nous nous sommes basés sur l'expérience acquise au laboratoire sur la production d'--amylase, la sexualisation; la connaissance bibliographique étant réduite sur le *Th. crustaceus*.

Dans ce mémoire, nous avons démontré un certain parallèle des résultats entre la croissance pondérale du *Thermoascus crustaceus* (P6) et la synthèse d'un complexe enzymatique le plus thermostable. Le complexe enzymatique de la lyse de l'amidon synthétisé par ce champignon est constitué d'au moins une amyloglucosidase non thermostable et d'une --glucosidase ayant une thermostabilité exceptionnelle. De plus, nous avons constaté que les conditions de production de ces 2 enzymes étaient dissociées pour de nombreux paramètres. Il apparaît donc que les mécanismes régissant la synthèse de ces enzymes sont différents.

Cette étude a constitué une première approche de la compréhension de la physiologie de l'espèce *Th. crustaceus* en vue de la production d'enzyme hautement thermostable. Ce champignon thermophile n'ayant été que peu étudié, de nombreuses observations ont été effectuées que nous n'avons pu analyser lors de ce travail. Soulignons cependant l'effet négatif du fer dans la synthèse de ce complexe enzymatique ainsi que l'effet inhibiteur de l'âge de l'inoculum, sur la réaction enzymatique. Le sulfate d'ammonium, en système agité, stimule l'excrétion des enzymes en tout début de culture et inhibe corrélativement la croissance, l'inhibition de l'agitation des cultures sur la croissance et la production enzymatique du champignon par l'effet de l'immersion du mycélium ou par une aération excessive.

Une ébauche d'interprétation a été envisagée par l'effet de l'agitation des cultures et a été confortée par des mesures d'activités enzymatiques du métabolisme intermédiaire: l'isocitrate lyase et l'isocitrate deshydrogénase du *Th. crustaceus* cultivé soit en système statique, soit en système agité. Il apparaît que le cycle de Krebs, oxydatif, n'est fonctionnel dans son intégralité, qu'en début de croissance, que le shunt glyoxilique, réducteur, prend le relais assez rapidement.

Enfin, grâce à cette étude, nous avons mis en évidence que la production du complexe thermostable exige des conditions culturelles très précises. Néanmoins, une étude génétique est nécessaire pour déterminer les capacités d'hyperproduction de ce champignon. De plus une optimisation "économique" en milieu utilisé en industrie sera nécessaire, si une hyperproduction est révélée. Cette optimisation prendra, dans ce cas, appui sur la présente étude. La nécessité d'une bonne connaissance physiologique du champignon et des mécanismes de la production enzymatique s'avère indispensable.

Durant cette étude, une méthodologie a été réalisée qui demeure applicable à tous problèmes physiologiques.

BIBLIOGRAPHIE



REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ABDEL-HAFEZ S.I.I., ABDEL-HAFEZ A.I.I. and M.I.A. ABDEL-KADER, 1983.- Composition of the fungal flora of syrian soils. IV.- Thermophilic fungi. *Mycopathologia*, 81, (3), p. 177-182.
- ADAMS P.R. and J.J. DEPLOY, 1978.- Enzymes produced by thermophilic fungi. *Mycologia*, 70, p. 906-910.
- 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.
- 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.
- ATTIA R.M. and S.A. ALI, 1974.- Nitrogen sources for glucoamylase production by *Aspergillus awamori*. *Agric. Res. Rev.*, 52, (4), p. 131-135.
- AUDEN J., GRUNER J., NUESCH J. and F. KNUSEL, 1967.- Some statistical methods in nutrient medium optimisation. *Path. Microbiol.*, 30, p. 858-866.
- BARTON L.L, LINEBACK D.R. and C.E. GEORGI, 1969.- The influence of nitrogen and carbon sources on the production of glucoamylase by *Aspergilli*. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 15, p. 327-344.
- 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*. *Current 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. *The Italian J. Biochem.*, 35, (4), p. 207-220.
- 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.
- BERRY D.R., 1975.- The environmental control of the physiology of filamentous fungi. in *The filamentous Fungi*, Vol I: Industrial Mycologia, p. 16-32. Eds. J.E. Smith and D.R. Berry.
- 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.
- BOX G.E.P. and K.B. WILSON, 1951.- On the experimental attainment of optimum conditions. *J. Royal Stat. Soc. B.*, 13, p. 1-45.
- 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.
- BURNETT J.H., 1968.- *Fundamentals of mycology*. Edward Arnold, London, LTD.

- 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.
- CLARKE A.J. and B. SVENSSON, 1984.- The role of tryptophanyl residues in the fonction of *Aspergillus niger* glucoamylase G₁ and G₂. *Carlsberg Res. Commun.*, 49, p.111-112.
- COCHRANE V.W., 1958.- *Physiology of fungi*. John Wiley & Sons, Inc., USA.
- 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.
- 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.
- DAVIES R., 1963.- Microbial extracellular enzymes, their uses and some factors affecting their formation. in *Biochemistry of industrial Microorganisms*, p. 68-150. Eds. C. Rainbow and A.H. Rose, Academic Press, London.
- DEHORTER B., 1985.- Déterminisme et physiologie de la reproduction sexuée du *Nectria galligena* Bres. Thèse d'état, université de LILLE I.
- DE MEO M., LAGET M., PHAN TAN LUU R., MATHIEU D. and G. DUMENIL, 1985.- Application des plans d'expériences à l'optimisation des milieux et conditions de culture en fermentation. *Bio Sciences*, 4, (4).
- DEMING S.N. and S.L. MORGAN, 1973.- Simplex optimization of variables in analytical chemistry. *Analytical chemistry*, 45, (3), p. 278-283.
- DE MOT R. and H. VERARCHTERT, 1985c.- Purification and characterization of extracellular amylolytic enzymes from the yeast *Filobasidium capsuligenum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 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 amyolytic yeasts using β -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 amyolytic yeasts. *Biotechnol. Lett.*, 6, p. 581-586.
- DE MOT R., VAN OUDEN DIJCK E. and H. VERARCHTERT, 1985a.- Purification and characterization 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 amyolytic 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.
- DESHAYES M.P., 1980.- Utilisation de modèles mathématiques pour l'optimisation en fermentation. Application aux transformations par les microorganismes. *Bull. Soc. Chim. de France*, (1-2), p. 24-34.
- DESMAZEAUD M.J., 1985.- Enzymes utilisables en industrie alimentaire. Contrainte législatives. *Biofutur*, (35), p. 29-32.
- DEVERALL B.J., 1965.- The physical environment for fungal growth. 1. Temperature. in *The Fungi*, Vol I: The fungi cell, p. 543-557. Eds. G.C. Ainsworth and A.S. Sussman, Academic Press.
- DUMENIL G., CREMIEUX A., PHAN TAN LUU R. and M. COMBET, 1975a.- Bioconversion from DL Homoserine to L Threonine. I. Application of factorial designs. *Europ. J. Appl. Microbiol.*, 1, p. 213-220
- DUMENIL G., CREMIEUX A., PHAN TAN LUU R. and J.P. AUNE, 1975b.- Bioconversion from DL Homoserine to L Threonine. II. Application of the simplex method of optimization. *Europ. J. Appl. Microbiol.*, 1, p. 221-231

- 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.
- DVADTSATOVA E.A., VORONTSOVA N.N., KOMAROVA G.I., BURTSOVA E.I. and L.I. VORONOVA, 1977.- Influence of age and amount of inoculum on glucoamylase biosynthesis by the mutant *Aspergillus awamori* T. *Appl. Biochem. Microb.*, 13, (1), p. 24-26.
- ELLIS D.H., 1981a.- Ultrastructure of thermophilic fungi: I.- Ascocarp morphology of *Thermoascus aurantiacus*, *Trans. Bri. Mycol. Soc.*, 76, (1), p. 457-466.
- ELLIS D.H., 1981b.- Ultrastructure of thermophilic fungi: II.- Ascus and ascospore development in *Thermoascus aurantiacus*, *Trans. Bri. Mycol. Soc.*, 76, (1), p. 467-478.
- ESTRELA A.I., LEMOS M. and I. SPENCER-MARTINS, 1982.- A note on the effect of growth temperature on the production of amylases by the yeast *Lipomyces kononenkoae*. *J. Appl. Bacteriol.*, 52, p. 465-467.
- FAIRBAIN D.A., PRIEST F.G. and J.R. STARK, 1986.- Extracellular amylase synthesis by *Streptomyces limosus*. *Enz. Microb. Technol.*, 8, p. 89-92.
- FAYRET J., 1975.- Etude du cycle de reproduction du *Gnomonia leptostyla* (Fr.) Ces. et de Not, déterminisme et physiologie. Thèse d'état, Toulouse. 296 pages.
- 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.
- FELDMAN K.A., LOVETT J.S. and G.T. TSAO, 1982.- The effect of glucose on cellulase production by *Thermoascus aurantiacus*. *International union of microbiological societies. 13^e international congress of microbiology, Boston USA.*
- 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.

- 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.
- FRIES N., 1965.- The chemical environment for fungal growth. 3. Vitamins and other organic growth factors. in *The Fungi*, Vol I: The fungi cell, p. 491-524. Eds. G.C. Ainsworth and A.S. Sussman, Academic Press.
- 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.
- GRAF U., BORMANN E.J., ROTH M. and M. NEIGENFIND, 1986.- Mutants of *Streptomyces hygrosopicus* 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.
- GREASHAM R. and E. INAMINE, 1986.- Nutritional improvement of processes. in *Manual of industrial Microbiology and Biotechnomogy*, (4), p. 41-48. Eds. A.L. Demain and N.A. Solomon, American Society of Microbiology.
- GRIFFITHS M.W. and T.K. SUNDARAM, 1973.- Isocitrate lyase from a thermophilic *Bacillus* effect of salts on enzyme activity. *J. Bacteriol.*, 116, 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.
- GRUNINGER H. and A. FIECHTER, 1986.- A novel highly thermostable D-xylanase. *Enz. Microb. Technol.*, 8, p. 309-314.

- GUPTA S.K., MAGGON K.K. and T.A. VENKITASUBRAMANIAN, 1977.- Effect of zinc on tricarboxylic cycle intermediates and enzymes in relation to alfatoxin biosynthesis. *J. Gen. Microbiol.*, 99, p. 43-48.
- HABERSTICH H.V. and H. ZUBER, 1974.- Thermoadaptation 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.
- HAYASHIDA S., 1975.- Selective submerged productions of 3 types of glucoamylases by a black koji mold. *Agr. Biol. Chem.*, (39), (11), p. 2093-2099.
- 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.
- HOCKENHULL D.J.D. and D. HERBERT, 1945.- The amylase and maltase of *Clostridium acetobutylicum*. *Biochem. J.*, 39, p. 102-109.
- HUNT G.R. and R.W. STIEBER, 1986.- Inoculum development. in *Manuel of industrial Microbiology and Biotechnology*, p. 32-40. Eds. A.L. Demain and N.A. Solomon, American Society for Microbiology.
- 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.
- IMANAKA T., SHIBAZAKI M. and M. TAKAGI, 1986.- A new way of enhanced the thermostability of proteases. *Nature*, 324, p. 695-697.
- 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.*, 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.
- KASSIM A.E., 1983.- Effect of nutritional and physiological conditions on the production of α -amylase and glucoamylase by a selected strain of *Aspergillus oryzae*. *Microbiology*, 52, (3), p. 330-334.
- 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.
- 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.
- 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.
- KUNDU A.K., DAS S. and T.K. GUPTA, 1973.- Influence of culture and nutritional conditions on the production of amylase by a submerged culture of *Aspergillus oryzae*. *J. Ferment. Technol.*, 51, (2), p. 142-150.
- 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 culturelle du genre *Leptosphaeria* Cesati et de Notaris. Déterminisme de la reproduction sexuelle. *Thèse d'état*, Université de toulouse, 234 pages.
- LATGE J.P. and J.J SANGLIER, 1985.- Optimisation de la croissance et de la sporulation de *Conidiobolus obscurus* en milieu défini. *Can. J. Bot.*, 63, p. 68-85.
- LENDERS J.P., GERMAIN P. and R.R. CRICHTON, 1985.- Immobilisation of a soluble chemically thermostabilized enzyme. *Biotechnol. Bioeng.*, 27, p. 572-578.

- LILLY V.G., 1965a.- Chemical constituents of the fungal cell. 1. Elemental constituents and their roles. in *The Fungi: an advanced treatise*, Vol I: The fungi cell, p. 163. Eds. G.C. Ainsworth and A.S. Sussman, Academic Press.
- LILLY V.G., 1965b.- The chemical environment for fungal growth. 1. Media, macro and micro nutrients. in *The Fungi: an advanced treatise*, Vol I: The fungi cell, p. 465-478. Eds. G.C. Ainsworth and A.S. Sussman, Academic Press.
- LONG D.E., 1969.- Simplex optimization of the response from chemical systems. *Anal. Chim. Acta*, 46, p. 193-206.
- LOWRY O.H., ROSEBROUGH N.J., FARR A.L. and R.J. RANDALL, 1951.- Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, p. 265-275.
- Mc DANIEL L.E., BAILEY E.G., ETHIRAJ S. and H.P. ANDREWS, 1976.- Application of response surface optimization technics to polyene macrolide fermentation studies in shaken flasks. *Dev. Ind. Microbiol.*, 17, p. 91-98.
- Mc WETHY S.J. and P.A. HARTMAN, 1979.- extracellular maltase of *Bacillus brevis*. *Appl. Env. Microbiol.*, 37, p. 1096-1102.
- MADDOX I.S. and S.H. RICHERT, 1977.- Use of response surface methodology for rapid optimization of microbiological media. *J. Appl. Bacteriol.*, 43, p. 197-204.
- MALARD P., 1981.- Contribution à l'étude de la production d' α -amylase par *Aspergillus oryzae* (Alb.) cohn. Thèse de troisième cycle, Université de Lille I, 133 pages.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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'intéret industriel*. Eds. Mouvanche A. and C. Costes. Bordas, 359 pages.
- MEYER R.M., 1952.- cité par W.M. FOGARTY and C.T. KELLY, 1980. in *Economic microbiology*, p. 115-170. Ed. A.H. ROSE, Academic Press, N.Y. & London.
- MEYRATH J., 1963.- Influence of the size of inoculum on various growth phases in *Aspergillus oryzae*. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 29, p. 57-78.
- MEYRATH J. and G. VOLAVSEK, 1975.- Production of microbial enzymes. in *Enzymes in food processing*, p. 255-300. Ed. G. Reed, Academic Press, N.Y.
- MEYRATH J. and G. SUCHANEK, 1972.- Inoculum techniques- effects to quality and quantity of inoculum. in *Methods in Microbiology*, 7B, p. 159-209. Academic Press, Inc., New York.
- 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.
- MICHELENA V.V. and F.J. CASTILLO, 1984.- Production of amylase by *Aspergillus foetidus* on rice flour medium and characterization of the enzymes. *J. Appl. Bacteriol.*, 56, p. 395-407.
- 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.
- 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.

- 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.
- MORQUER R., 1931.- Recherches morphogénétiques sur le *Dactylium macrosporion*. *Thèse Doct. Sci. Nat.*, Toulouse.
- 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.
- 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.
- NG F.M.W. and E.A.DAWES, 1973.- Chemostat studies on the regulation of glucose metabolism in *Pseudomonas aeruginosa* by citrate. *Biochem. J.*, 97, p.129-140.
- NICHOLAS D.J.D., 1965.- Utilization of inorganic nitrogen compounds. in *The Fungi: an advance Treatise*, Vol I: The fungi cell, p. 349-376. Eds by G.C. Ainsworth and A.S. Sussman, Academic Press.
- NIKOLOV T., KIBARSKA T. and D. NEVADA, 1970.- Studies of the effect of various carbon sources on the induced synthesis of amylolytic enzymes by *Aspergillus oryzae* in deep cultivation. *Comp. ren. Acad. Sci. Agric. Bul.*, 3, (2), p. 145-149.
- OBERT F., 1978-1979.- Sul metabolismo di mono-, oligo- E polisaccaridi in *Thermoascus aurantiacus* Miehe. *Allionia*, 23, p. 79-82.
- OBERT F., 1980-81. - Su una α -glucosidasi del micelio di *Thermoascus aurantiacus* Miehe. *Allionia*, 24, p. 79-84.
- OBERT F., 1983-1984.- Su un'amilasi secreta da *Thermascus aurantiacus* Miehe osservazioni preliminari. *Allionia*, 26, p. 49-53.
- OGUNDERO V.W., 1979.- Thermophilic and thermotolerant fungi in poultry droppings in Nigeria. *J. Gen. Microbiol.*, 115, (1), p. 253-254.
- OKADA G., 1983.- Purification and properties of a glucoamylase from *Hypocrea peltata*. *J. Jpn Soc. Starch Sci.*, 30, (1), p. 48-56.
- OKAZAKI M. and G. TERUI, 1966.- An inquiry into the physiology of preferential synthesis of glucoamylase in relation to multistage continous culture. *J. Ferment. Tech.*, 44, p. 287.

- 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.
- OREN A., 1983.- A thermophilic amyloglucosidase from *Halobacterium sodomense*, a halophilic bacterium from the dead sea. *Current Microbiology*, 8, p. 225-230.
- PAK R., 1969.- Effets de certains éléments à l'état de traces dans la production d' α -amylase par *Aspergillus oryzae*. *J. Biochem.*, 2, (2), p. 67-71.
- PATEMAN J.A. and J.R. KINGHORN, 1976.- Nitrogen metabolism. in *The Filamentous Fungi*, Vol II: Biosynthesis and metabolism, p. 159-237. Eds. J.E. Smith and D.R. Berry, Edward Arnold.
- PAZUR J.H. and K. KLEPPE, 1962.- The hydrolysis of α -D glycosides by amyloglucosidase from *Aspergillus niger*. *J. Biochem.*, 237, (4), p. 1002-1005.
- PERLMAN D., 1965.- The chemical environment for fungal growth. 2. Carbon sources. in *The Fungi: an advanced Treatise*, Vol I: the fungi cell, p. 479-490. Eds. G.C. Ainsworth and A.S. Sussman, Academic Press.
- 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.
- PILAT P., VOTRUBA J., DOBERSKY P. and A. PROKOP, 1976.- Application of mathematical optimization methods in microbiology. *Folia Microbiol.*, 21, p. 391-405.
- PLACKETT R.L. and J.P. BURMAN, 1943.- The design of optimum multifactoriel experiments. *Biometrika*, 33, p. 305-325.
- POLAKIS E.S. and W.BARTLEY, 1965.- Change in the enzyme activities of *Saccharomyces cerevisiae* during aerobic growth on different carbon sources. *Biochem. J.*, 97, p.284-296.
- 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 *Humicola 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. *Molecular and cellular biology*, 6, (9), p. 3034-3041.
- 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 amyolytic enzymes of a strain of *Aspergillus niger*. *Starch/Stärke*, 30, (8), p. 272-275.
- RAMACHANDRAN N., SREEKANTIAH K.R. and V.S. MURTHY, 1979.- Influence of media composition on the production of α -amylase and amyloglucosidase by a strain of *Aspergillus niger*. *Starch/stärke*, 31, (4), p. 134-138.
- 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.
- REESE E.T., MAGUIRE A.H. and F.W. PANISH, 1968.- Glucosidases and exoglucanases. *Can. J. Biochem.*, 46, p. 25-34.
- REMI J.P., 1984.- Métabolisme intermédiaire d'*Aspergillus oryzae* (Alhb.) Cohn.: étude de sa régulation et de ses rapports avec la production d' α -amylase. Thèse de troisième cycle, Université de Lille I. 129 pages.
- RINDERKNECHT H., WILDING P. and B.J. HAVERBACK, 1967.- A new method for the determination of α -amylase. *Experimentia*, 23, (10), p. 805.
- ROSE A.H., 1980.- History and scientific basis of commercial exploitation of microbiol enzymes and bioconversions. in *Economic microbiology*, p. 1-47. Ed. A.H. Rose, Academic press, N.Y. and London.
- ROSS R.G. and F.D.J. BREMNER, 1971.- Effect of ammonium nitrogen and amino acids on perithecial formation of *Venturia inaequalis*. *Can. J. Plant. Sci.*, 51, p. 29-33.
- 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.
- SANGLIER J.J., 1977.- Contribution à l'étude de la différenciation conidienne chez *Claviceps purpurea* (Fr.) Tul. Thèse, Clermont-Ferrand.

- 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 developmentally controlled glucoamylase from normal and mutant strains of the basidiomycete *Schizophyllum commune*. *Biochemical Genetics*, 9, (4), p. 359-367.
- 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.
- 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.
- 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.
- SINGLETON R. and R.E. AMELUNXEN, 1973.- Proteins from thermophilic microorganisms. *Bacteriol. Review*, 37, (3), p. 320-342.
- SMITH J.E. and J.C. GALBRAITH, 1971.- Biochemical and physiological aspects of differentiation in fungi. *Advance in Microbiol. Physiol.*, 5, p. 45-134.
- SNEDECOURT G.W. and W.G. COCHRAN, 1957.- Experiences factorielles. in *Méthodes statistiques*, p. 379-424. A.C.T.A.
- SOPP O.J.O., 1912.- Monographie der pilzgruppe *Penicillium* mit besonderer berücksichtigung der in Norwegen gefundenen 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 nutritional 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 stearotherophilus*. *Enz. Microb. Technol.*, 6, p. 422-426.
- STEINER K., 1960.- The influence of trace elements on growth and enzyme production by *Aspergillus oryzae*. *Zentr. Bakteriol. Parasitenk.*, 114, p. 47-106.
- STOLK A.C., 1965.- Thermophilic species of *Talaromyces* Benjamin and *Thermoascus* Miehe. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 31, p. 262-276.
- 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.
- 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.
- 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.
- TAYLOR P.M., NAPIER E.J. and I.D. FLEMING, 1978.- Some properties of a glucoamylase produced by the thermophilic fungus *Humicola lanuginosa*. *Carbohydrate Research*, 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.
- 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.
- 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.
- TURIAN G., 1970.- Aspects biochimiques de la différenciation fongique (modèle *Neurospora*). *Physiol. Végét.*, 8, p. 375-386.
- UEDA S. and S.I. UDAGAWA, 1983.- *Thermoascus aegyptiacus*, a new thermophilic ascomycete. *Trans. Mycol. Soc. Japan*, 24, p. 135-142.
- 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.
- VIDAL G., 1983.- Relations entre le métabolisme intermédiaire, le métabolisme lipidique et la reproduction sexuée du *Leptosphaeria typhae* (Auersw) Karsten. Thèse d'état, Université de Lille I.
- VIDAL G. LEBBE T. and L.LACOSTE, 1974/1975.- Etudes des conditions de développement et de reproduction sexuée du *Leptosphaeria typhae*. Mise au point d'un milieu de culture chimiquement défini. *Rev. Mycol.*, 39, p. 43-52.
- VON ARX, J.A. 1970.- *The genera of fungi sporulating in pure culture*. p. 84, Ed. J. Cramer, Lehre.
- VOTRUBA J., PILAT P. and A. PROKOP, 1975.- Optimization of nutrient medium for culturing microorganisms by means of modified Rosenbrock's method. *Biotechnol. Bioeng.*, 17, p. 1833 .
- 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.
- WELKER N.E. and L.L. CAMPBELL, 1963.- *J. Bacteriol.*, 86, p. 1196. (cité par Meyrath J. and G. Volavsek, 1975).

- WELLS A.J. and D.B. POWERS, 1986.- In vivo formation and stability of engineering disulfide bonds in substilisin. *J. Biol. Chem.*, 261,(14), p. 6564-6570.
- 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.
- 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 α -amylases from *Bacillus stearothermophilus* grown at different temperatures. *J. Biochem.*, 74, p. 573-579.
- YUTANI K., OGASAMARA K., SUGINO Y. and A. MATSUSHIROA, 1987.- *Nature*, 207, p. 274-275.
- ZUBER H., 1979.- Structure and fonction of enzymes from thermophilic microorganisms. in *Strategies of microbial life in extreme environnements*, p. 393-416. Edit. by M. Shilo, Verlag Chemie-Weinheim, 590 p.



BIBLIOGRAPHIE POUR LA SYSTEMATIQUE DES CHAMPIGNONS

- AL-MUSALLAM A., 1980.- A revision of the black Aspergillus species. *PhD Thesis Utrech.* 92 p.
- 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.
- LODDER J. and N.J.W. KREGER-VAN RIJ., 1952.- The Yeasts. 2ND edition. *North Holland Publishing Compagny.* 713 p.
- NAUMOV N.A., 1939.- Clé des Mucorinées. *Paul Lechevalier.* 173 p.
- PITT J.I., 1979.- The genus Penicillium. *Academic Press.* 634 p.
- RAPER K.B. and FENNEL D.I., 1977.- The genus Aspergillus. RE *Krieger Publishing Compagny.*
- SAMSON R.A., 1974.- Paecilomyces and some allied hyphomycetes. *Studies in Mycology*, 6, p. 1-116.
- SAMSON R.A., 1979.- A compilation of the Aspergilli described since 1965. *Studies in Mycologia*, 18, p.1-37.
- SCHIPPER M.A.A., 1978.- On certain species of Mucor with a key to all accept species. *Studies in Mycology*, 17, p.1-53.
- THOM C. and RAPER K.B., 1945.- Manuel of the Aspergilli. *Williams and Wilkins Compagny.* 373 p.
- VON ARX S.A., 1970.- The genera of fungi sporulating in pure culture. *Verlay Von J.Cramer.* 288 p.

BIBLIOGRAPHIE GENERALE CONCERNANT LES CHAMPIGNONS
ET LEUR PRODUCTION D'ENZYMES.

- AINSWORTH G.C. and A.S. SUSSMAN, 1965.- *The fungi: I. the fungi cell.* Academic Press.
- AINSWORTH G.C. and A.S. SUSSMAN, 1966.- *The fungi: II. the fungal organism.* Academic Press.
- AINSWORTH G.C. and A.S. SUSSMAN, 1968.- *The fungi: III. the fungal population.* Academic Press.
- BIOFUTUR, 1985.- Les enzymes, n° 35.
- DEMAIN A.L. and N.A. SOLOMON, 1986.- *Manual of industrial microbiology and biotechnology.* American Society for Microbiology, 466 pages.
- DURAND G. and P. MONSAN, 1982.- *Les enzymes: productions et utilisations industrielles.* Gauthier-Villars, collection biochimie appliquée, 352 pages.
- MONTIES B., 1980.- *Les polymères végétaux: polymères pariétaux et alimentaires non azotés.* Gauthier-Villars, collection biochimie appliquée, 345 pages.
- MOURANCHES A. and C. COSTES, 1985.- *Hydrolases et dépolymérase: enzymes d'intérêt industriel.* Gauthier-Villars, collection biochimie appliquée, 359 pages.
- ONIONS A.H.S., ALLSOPP D. and H.O.W. EGGINS, 1981.- *Smith's introduction to industrial mycology.* Edward Arnold, 398 pages.
- ROSE A.H., 1980.- *Economic microbiology.* Academic Press.
- SMITH J.E., BERRY D.R. and B. KRISTIANSEN, 1973.- *The filamentous fungi: I.- industrial mycology.* Edward Arnold.
- SMITH J.E., BERRY D.R. and B. KRISTIANSEN, 1976.- *The filamentous fungi: II.- biosynthesis and metabolism.* Edward Arnold.
- SMITH J.E., BERRY D.R. and B. KRISTIANSEN, 1978.- *The filamentous fungi: III.- developmental mycology.* Edward Arnold.
- SMITH J.E., BERRY D.R. and B. KRISTIANSEN, 1983.- *The filamentous fungi: IV.- fungal technology.* Edward Arnold.

A N N E X E

ANNEXE

RECHERCHE DES ACTIVITES ENZYMATIQUES INTRACELLULAIRES

Environ 5 grammes de mycélium frais sont récupérés par filtration sous vide puis lavés 2 fois par 50ml d'eau distillée à 4°C. Le mycélium est ensuite transféré dans 10ml de tampon phosphate pH 7.5, 0.2M à 4°C contenant 5mM de MgCl₂, 1mM d'EDTA et 0,5 mM de cystéine.

Le mélange est ensuite broyé à l'ultra-turrax en veillant à conserver la température sous les 5°C par un bain de glace. Le broyat ainsi obtenu est centrifugé 30mn à 15.000 g et à 4°C, le surnageant est récupéré et stoké à 4°C pour l'étude des activités enzymatiques. Ces activités seront exprimées en μ moles de substrat transformés par min et par mg de protéines (soit en UI par mg de protéines). Les protéines sont dosées suivant la technique de Lowry et collaborateurs (1951).

Les modes opératoires ont fait l'objet de recherches en vue de donner des activités optimales pour le *Th. crustaceus* et comportent donc des variants par rapport aux protocoles initiaux des auteurs.

**Isocitrate lyase* (E.C.4.1.3.1.) selon Polakis et Bartley (1965)

0,5 ml Tampon phosphate	0,2 M	pH 7,5
0,1 ml MgCl ₂	0,1 M	
0,1 ml Cystéine	0,1 M	
0,1 ml Phenylhydrazine	0,1 M	
0,1 ml Isocitrate	0,4 M	
0,05 à 0,1 ml d'extrait acellulaire		
QSP 1ml		
à 37°C, ϵ : 1,7 10 ⁴		
DO mesurée à 324nm		
blanc: remplacer 0,1 ml d'isocitrate par 0,1 ml d'eau distillée.		

**Isocitrate Deshydrogénase NADP⁺ dépendant* (E.C.1.1.1.42) selon la technique de Ng et Dawes (1973)

0,5 ml Tampon phosphate	0,2 M	pH 7,5
0,1 ml MgCl ₂	0,1 M	
0,1 ml KCN	0,1 M	
0,1 ml NADP ⁺	0,01 M	
0,1 ml Isocitrate	0,4 M	
0,05 à 0,1 ml d'extrait acellulaire		
QSP 1 ml		
à 37°C, ϵ : 6,22 10 ³		
DO mesurée à 340 nm		
blanc: remplacer 0,1 ml d'isocitrate par 0,1 ml d'eau distillée.		

*Isocitrate Deshydrogénase NADP⁺ dépendant (E.C.1.1.1.41)
selon la technique de Ng et Dawes (1973)

0,5 ml	Tampon phosphate	0,2 M	pH 7,5
0,1 ml	MgCl ₂	0,1 M	
0,1 ml	KCN	0,1 M	
0,1 ml	NAD ⁺	0,01 M	
0,1 ml	Isocitrate	0,4 M	

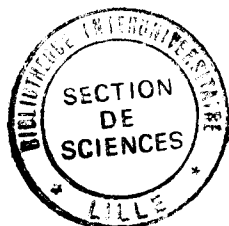
0,05 à 0,1 ml d'extrait acellulaire

QSP 1 ml

à 37°C, ϵ : 6,22 10^3

DO mesurée à 340 nm

blanc: remplacer 0,1 ml d'isocitrate par 0,1 ml d'eau
distillée



RESUME

A partir de biotopes chauds ou amylicés, 846 souches fongiques ont été isolées et déterminées. Une première sélection parmi celles-ci a montré que certains champignons présentent une activité enzymatique dégradant les liaisons α -1-4 des maltodextrines: *Aspergillus niger* v. *niger*, *Aspergillus carbonarius*, *Penicillium* de la série *restricta*, *Aspergillus fumigatus* et deux espèces du genre *Thermoascus*: *Th. aurantiacus* et *Th. crustaceus*. Ces dernières synthétisent le complexe le plus thermostable, constitué d'une amyloglucosidase non thermostable et d'une α -glucosidase à thermostabilité exceptionnelle. Elles ont donc été retenues pour la suite de l'étude. Les avantages cultureux du *Th. crustaceus* l'ont fait préférer au *Th. aurantiacus*.

Une étude unifactorielle des différentes exigences culturelles de la croissance du champignon, de la production du complexe enzymatique et de la composition de celui-ci a été réalisée en culture statique. Les besoins particuliers à la croissance pondérale maximale du *Th. crustaceus* bien que peu spécifiques ont été définis: 37°C, substrat carboné non cellulosique, substrat azoté ammoniacal ou organique et milieu minéral comportant les 9 sources ioniques classiques. Corrélativement les exigences de la production enzymatique maximale ont été précisées: 37°C, pH 5,8, substrat carboné glucosé ou constitué de polymères du glucose en α -1,4 et α -1,6, substrat azoté ammoniacal ou certaines sources organiques, milieu minéral carencé en fer et en calcium et apport de thiamine et biotine. La composition du complexe enzymatique est essentiellement fonction de la nature de la source d'azote et de la solution minérale de culture.

Cette analyse unifactorielle a été reprise par une étude multifactorielle effectuée en culture agitée. Grâce à deux matrices d'Hadamard successives, l'effet principal de onze facteurs a été analysé et les concentrations optimales pour la production du complexe le plus thermostable ont été précisées. Les teneurs optimales en azote, KH_2PO_4 et vitamines et l'effet de la vitesse d'agitation des cultures ont été évalués selon la méthode d'un plan factoriel complet 2^4 , où aucune interaction entre ces paramètres n'a été observée. L'utilisation d'un plan centré composé a permis d'étudier l'influence des concentrations en azote, KH_2PO_4 et vitamines pour des teneurs proches de leur optimum pour la croissance et la thermostabilité de l'activité enzymatique.

La production du complexe enzymatique a donc été améliorée grâce à l'adaptation du milieu au champignon.

MOTS CLES: *Thermoascus crustaceus*, alpha-glucosidase, amyloglucosidase, multifactorielle, physiologie.