



Article original

**Caractérisation d'une souche de *Candida tropicalis* thermophile utilisée dans la bio-transformation des déchets d'abattoirs**

*Characterization of a strain of *Candida tropicalis* thermophilic used in bio-processing of slaughterhouse waste*

Hicham LABIOUI, Mohammed RHIAT, Laaroussi ELMOUALDI, Zineb GUESSOUS, Mohammed OUHSSINE.

Laboratoire de Biotechnologie, Environnement et Qualité, Faculté des Sciences, Université Ibn Tofaïl, 14000 Kénitra, Maroc.

labioui\_h@yahoo.fr, mqua\_00@yahoo.fr, Ouhssine.m40@gmail.com.

**RESUME**

Afin d'améliorer un procédé de transformation des déchets de viandes rouges en présence de mélasse comme supplément en alimentation animale, des souches de levures performantes ont été recherchées pour être utilisées dans un levain en association avec des bactéries lactiques productrices de bactériocines.

Dix souches de levures à forte activités saccharolytiques et acidifiantes ont été isolées à partir du jus de presse de Canne à sucre au niveau de la chaîne de fabrication et de la mélasse d'une usine sucrière. La souche **LH7** a été retenue pour sa tolérance à la température, qui augmente considérablement au cours de la fermentation.

Il s'agit d'un *Candida tropicalis* qui présente en conditions optimales (pH 5, 3 g/l saccharose, 1 g/l (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> et 40°C) une activité enzymatique de 5720 U/l.

**Mots clés :** levures, *Candida tropicalis*, enzyme extramembranaire, activité β-fructofuranosidase

**ABSTRACT**

In order to improve the transformation process of green waste of slaughter-houses in presence of molasses into an ingredient fertilizing the ground and as supplement in animal feeds, performing yeast strains were searched to be used in a mixed leaven with lactic bacteria.

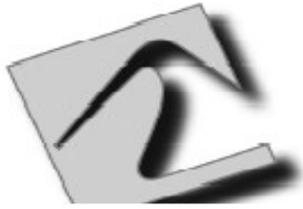
Ten yeast stocks with strong sucrolytic and acidifying activities were isolated starting from sugar cane press juice of the production line and from molasses from a sugar factory. **LH7** stock was retained for its tolerance to temperature, which increases considerably during fermentation. It corresponded to *Candida tropicalis*, which presented under optimal conditions (pH 5, 3 g/l sucrose, 1 g/l (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and 40°C) an enzymatic activity of 5720 UI/l.

**Key words:** *Candida tropicalis*, enzymatic activity, β-fructofuranosidase

**INTRODUCTION**

Les déchets d'abattoirs de viandes rouges au Maroc pèsent beaucoup en matière de pollution. Ils sont générateurs des problèmes de santé au même titre que les autres déchets à risques, qui sont généralement déposés anarchiquement en décharge

publique. Ces déchets constituent un sérieux problème pour la région du Gharb au Maroc. Nous avons mis en place une technique biologique de transformation de ces déchets en un produit stable pour des applications agronomiques, notamment comme fertilisant du sol et comme



supplément alimentaire des rations destinées à l'alimentation animale. Cette technique est basée essentiellement sur l'utilisation d'un levain mixte contenant des bactéries lactiques et des levures à fort pouvoir acidifiant et fermentaire en présence de 20 % de mélasse (Labioui *et al.*, 2007).

Dans le présent travail, nous nous sommes intéressés à l'isolement et à la caractérisation des levures saccharolytiques qui, en plus de posséder un pouvoir acidifiant et fermentaire, sont thermophiles, étant donné qu'au cours de la fermentation, la température augmente considérablement.

### **Matériels et méthodes**

#### **Milieu de culture**

Un milieu de culture semi-synthétique additionné de saccharose a été utilisé (3 g extrait de levure, 1 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1 g  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 1 ml solution de micro-éléments (Cooney et Levine, 1972) q.s.p. 1 l eau distillée). Le milieu semi-synthétique est rendu solide par addition d'agar (20 g/l). Les milieux sont autoclavés 20 min à 120°C. Les glucides sont ajoutés aseptiquement par filtration sur membrane filtrante type millipore (0,45  $\mu\text{m}$ ).

#### **Isolement et purification des souches**

Des échantillons sont prélevés à partir du jus de presse de Canne à sucre au niveau de la chaîne de fabrication d'une usine sucrière et de la mélasse. Les cultures sont réalisées sur le milieu semi-synthétique solide additionné de 3 g de saccharose incubé pendant 72 h à 40°C. La purification des souches est vérifiée par un contrôle microscopique après quatre cycles successifs de repiquage en milieu liquide et sur milieu solide.

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

#### **Identification de la souche sélectionnée**

L'identification des souches est réalisée selon des tests biochimiques sur une galerie API 20E (bioMérieux). Les souches à identifier ont été incubées 24 h à 30°C à l'obscurité. Les différents puits ont été inondés par 0,1 ml de cette culture. Après 24 h d'incubation, l'identification est effectuée selon les références du fabricant.

#### **Localisation de l'activité $\beta$ -fructofuranosidase**

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

#### **Facteurs influençant la croissance et l'apparition de l'activité enzymatique**

Le milieu semi-synthétique liquide contenant 3 g/l de saccharose à différents pH (2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 et 9) est utilisé pour déterminer l'influence de pH sur la croissance et la production de l'enzyme. La biomasse et l'activité enzymatique sont contrôlées en fin de culture.

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

Diverses concentrations de saccharose (1, 3, 5, 7, 8 et 10 g/l) ont été testées avec le milieu semi-synthétique liquide sur la croissance de la levure et l'apparition de l'activité enzymatique à 35°C, pH 5 et à 105 t/min.

Les cultures de la levure **LH7** sont réalisées dans le milieu semi-synthétique liquide contenant un glucide simple (glucose, fructose, galactose), un diholoside (saccharose, lactose), un triholoside (raffinose) ou un polymère (amidon, inuline et cellulose) à 3 g/l. Les glucides sont additionnés après filtration sur membrane millipore (0,45  $\mu\text{m}$ ) au milieu de culture dans les conditions optimales de température et de pH (35 °C et pH 5). La température qui tolère la levure (< 30°, 40°, 45°), et le pH optimum soit (3, 4, 5, 6).



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

#### 6 - Détermination de la biomasse microbienne

L'étude de la croissance revient alors à évaluer la biomasse microbienne lorsque les bactéries et les levures se trouvent dans un milieu favorable et dans des conditions physicochimiques optimales. On détermine la biomasse des levures par la mesure de densité optique à 600 nm du trouble d'une suspension microbienne proportionnel à la biomasse présente dans la suspension du milieu de culture.

#### 7- Étude de la croissance et l'apparition de l'activité enzymatique en fermenteur

Les cellules ont été cultivées dans un fermenteur SETRIC (SET 002M) muni d'une cuve de 2 litres, 1800 ml de milieu de culture à pH de 5,5 autoclavés 30 min à 120°C sont inoculées avec 200 ml de préculture (pendant 24h à 30°C).

Sur milieu semi-synthétique liquide, des échantillons sont prélevés périodiquement pour le suivi de la biomasse et l'activité enzymatique pendant 24 heures d'incubation.

L'activité enzymatique est déterminée par dosage des sucres réducteurs par la méthode de Nelson (1944) améliorée par Somogy (1952).

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

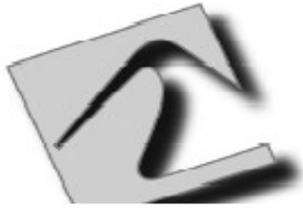
## II - Résultats & discussions

### II-1 Isolement et identification des souches

À partir de jus de presse, de la chaîne de fabrication et de la mélasse d'une usine sucrière de région du Gharb au Nord Ouest du Maroc), des échantillons sont prélevés pour l'isolement et la sélection de nouvelles souches. La sélection est basée non seulement sur l'activité saccharolytique, mais aussi sur la thermophilie et la présence d'enzymes extracellulaires ou extra membranaires convenables à une éventuelle application industrielle. La sélection a été effectuée sur un milieu semi-synthétique contenant le saccharose comme source de carbone (Tableau I).

**Tableau I : Isolement des souches de levures à activité saccharolytiques  
Cultures réalisées sur un milieu semi-synthétique à pH 5,5 48 h et 30°C.**

Souches	Détermination	Origine JP ou M	Biomasse initiale	Biomasse finale	Température		pH <sub>i</sub>	pH <sub>f</sub>	Activité enzymatic μM.L <sup>-1</sup> .min <sup>-1</sup>
					30°C	40°C			
LH1	<i>Candida</i> sp.	JP	0,09	1,95	+	-	5,51	4,51	786,80
LH2	<i>Pichia</i> sp.	JP	0,15	2,13	+	-	5,57	4,38	1239,40
LH3	<i>Candida</i> sp.	JP	0,32	3,58	+	+	5,56	5,19	2120,10
LH4	<i>Saccharomyces</i> sp	JP	0,19	0,99	+	-	5,60	5,35	486,01
LH5	<i>Candida</i> sp.	M	0,08	1,84	+	-	5,57	4,82	921,10
LH6	<i>Saccharomyces</i> sp	M	0,35	3,65	+	-	5,47	5,07	2961,10
LH7	<i>Candida tropicalis</i>	JP	0,08	3,98	+	++	5,63	4,01	4884,20
LH8	<i>Candida pelliculosa</i>	JP	0,19	3,18	+	++	5,50	4,45	3174,60
LH9	<i>Candida</i> sp.	JP	0,12	2,98	+	-	5,60	4,43	1368,60
LH10	<i>Candida</i> sp.	JP	0,08	2,87	+	-	5,64	4,40	1870,50



Dix souches de levures à fort pouvoir saccharolytique ont été isolées et purifiées. 7 souches sont mésophiles, la température optimale de croissance et de production optimale de l'enzyme optimale étant de 30°C, et 3 souches possèdent une croissance et une production d'enzymatique importante entre 35 et 45°C. Grâce à son pouvoir saccharolytique et sa thermophilie, la souche **LH7** a été retenue. D'après les caractères biochimiques (galerie API 20 E), il s'agit d'une souche de *Candida tropicalis*.

**Localisation de l'activité enzymatique**

L'activité enzymatique se trouve essentiellement sur la fraction cellulaire FII avec une activité de 4370 UI/l (Tableau II). La fraction insoluble FIV présente aussi une valeur proche de la fraction cellulaire.

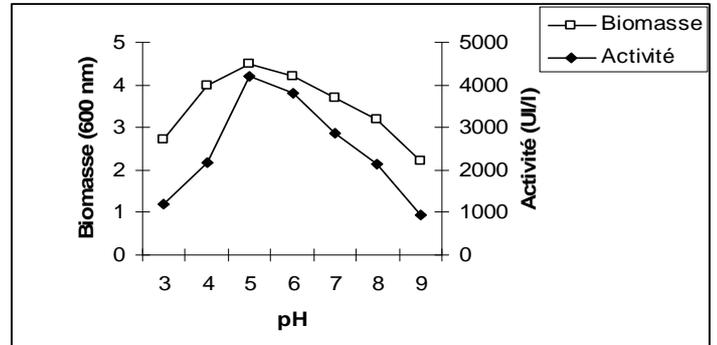
**Tableau II : Localisation de l'activité enzymatique sur différentes fractions cellulaires après culture sur milieu semi-synthétique à 30°C et à pH 5,5.**

	Surnageant FI	Cellules intactes FII	Fraction Soluble FIII	Fraction Insoluble FIV
Activité enzymatique	250	4370	350	3120
% d'activité enzymatique	5.18	87.57	7.25	64.62

Alors l'action enzymatique au niveau du surnageant et la fraction soluble reste très faible. Ceci suggère que l'AE de la souche sélectionnée est exclusivement extramembranaire.

**Paramètres influençant la croissance et l'apparition de l'activité enzymatique**

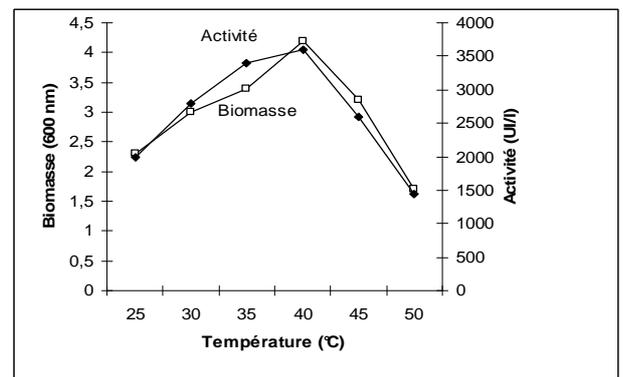
La biomasse et l'activité enzymatique de la souche LH7 varie en fonction du pH initial du milieu (Figure 1). Elles augmentent parallèlement à l'augmentation du pH pour atteindre 4325 UI/l avec une biomasse importante (A= 4,4) à pH 5. Au-delà de cette valeur, une diminution régulière est constatée jusqu'à un pH de 9.



**Fig. 1 : Effet du pH sur la croissance et l'apparition de l'activité enzymatique. Cultures réalisées sur milieu synthétique à 30°C 24 h à 105 tours /min.**

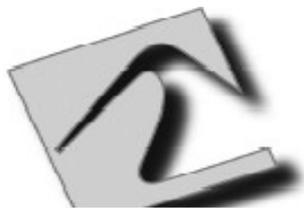
La souche LH7 montre une stabilité de croissance et de production d'enzyme de 25 à 45°C (Figure 2) avec une croissance optimale à 35 et 40°C et une production d'enzyme estimée à 3600 UI/l et une croissance de densité optique de 4,20.

À 45°C, la croissance et l'apparition de l'activité enzymatique restent importantes alors qu'à 50°C, la croissance et l'apparition de l'activité enzymatique elles diminuent. Ceci montre que la souche *Candida tropicalis* est thermophile. Ces résultats de thermophilie concordent avec ceux mentionnés par Blanco et al. (1994).



**Fig. 2 : Effet de la température sur la croissance et l'apparition de l'activité enzymatique, cultures réalisées sur milieu synthétique à pH 5, 24 h à 105 tours /min.**

Pour ce qui est de la concentration en saccharose (Tableau III), la croissance et l'apparition de l'activité enzymatique (5120 UI/l) sont maximales à 5 g/l. Au-delà, la croissance et l'activité enzymatique diminue.



**Tableau III : Effet de la concentration du saccharose sur la croissance et la biosynthèse de l'enzyme. Culture effectuée sur milieu semi-synthétique à pH 5, 24 h à 35°C.**

Saccharose (g/l)	pH <sub>i</sub>	pH <sub>f</sub>	AE à 0 h	AE à 10 h	AE à 24 h
1	5,43	4,08	0,27	34,05	2127,06
3	5,35	4,1	0,23	118,22	3380,00
5	5,32	4,02	0,27	253,40	5120,00
7	5,30	4,10	0,21	228,39	3322,70
8	5,21	4,40	0,19	167,30	2530,30
10	5,19	4,50	0,14	125,20	1140,20

La croissance reste importante alors que l'apparition de l'activité enzymatique est quasi nulle en présence des sucres simples (Tableau IV). En présence de diholosides (maltose et lactose), l'activité enzymatique est faible. De même, en présence de polymères (inuline, cellulose et amidon), l'activité enzymatique est aussi très faible ceci suggère que l'enzyme est fortement induite par le saccharose avec une activité de 4570,02 UI/l (Kig et al, 2005).

**Tableau IV : Effet de la source de carbone sur la croissance et l'activité  $\beta$  fructofuranosidase de la levure *Candida tropicalis*. Cultures réalisées en milieu synthétique à pH 5, 24 h à 35 °C.**

Sucres	pH <sub>i</sub>	pH <sub>f</sub>	Activité enzymatique UI/l à 24 h	Activité glucide /Activité saccharose en %
Glucose	5,87	4,41	120,50	2,77
Galactose	5,87	5,04	17,20	0,33
Maltose	5,91	4,33	23,14	0,57
Lactose	5,89	5,10	11,02	0,21
Saccharose	5,57	3,65	4570,02	100,00
Amidon	5,47	4,56	27,30	0,57
Cellulose	5,51	5,03	117,25	3,17
Inuline	5,60	5,01	87,50	2,78

Pour la source d'azote inorganique, la meilleure croissance est obtenue avec le sulfate d'ammonium avec une activité enzymatique estimée à 4350 UI/l (Tableau V), alors que pour la source d'azote.

organique, la meilleure croissance et apparition de l'activité enzymatique sont obtenues avec de l'extrait de levure 4185,20 UI/l. Pour les cultures mixtes contenant le sulfate d'ammonium à 1 g/l, la meilleure croissance est obtenue avec un mélange avec l'extrait de levure à 2 g/l avec une activité enzymatique est de 5120 UI/l.

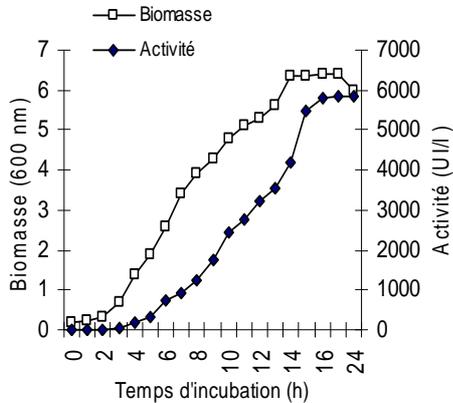
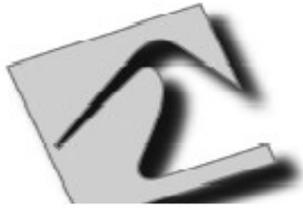
**Tableau V : Effet de la source d'azote sur la croissance et la biosynthèse de l'enzyme. Culture effectuée sur milieu semi-synthétique à pH 5, 24 h à 35 °C.**

Source d'azote	pH <sub>i</sub>	pH <sub>f</sub>	Biomasse (i)	Biomasse (f)	Activité enzymatique UI/l à 0 h	Activité enzymatique UI/l à 24 h
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HP O <sub>4</sub>	5,53	5,10	0,33	1,65	19,20	328,57
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	5,52	4,16	0,27	3,70	388,66	4350,00
C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> NO <sub>2</sub>	5,56	4,96	0,13	1,70	29,04	423,74
NaNO <sub>3</sub>	5,60	4,88	0,17	1,50	22,17	198,17
CO(NH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub>	5,54	4,81	0,14	2,10	113,19	634,00
Extrait de levure	5,58	4,73	0,30	3,50	218,38	4185,20
Peptone (P)	5,40	5,01	0,17	2,50	178,31	383,67
Tryptone	5,55	4,61	0,19	1,40	44,30	272,33
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> + Extrait de levure	5,62	4,02	0,67	4,30	616,04	5120,00
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> + P	5,60	4,18	0,55	4,11	750,00	3411,00
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> + tryptophane	5,51	4,41	0,33	4,13	580,02	3420,00

### Suivi de la croissance et de l'apparition de l'enzyme en fermenteur

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

L'activité enzymatique s'effectue régulièrement et parallèlement à la croissance de la levure (Figure 3). Le maximum de production est obtenu après 14 heures de culture, l'activité enzymatique obtenue est de l'ordre de 5720 UI/l avec un taux de conversion du saccharose de 90 %. à 5 g/l de saccharose



**Fig. 3: Cinétique enzymatique de la souche LH7. Culture réalisée dans un fermenteur contenant un milieu semi-synthétique à 5 g/l saccharose à 40°C et pH 5.**

Il s'agit d'une enzyme extramembranaire fortement induite par le saccharose à pH 5,5 et de 35 à 45 °C, fortement favorisée par un mélange de sulfate d'ammonium et d'extrait de levure.

Des travaux antérieurs ont montré que l'activité de l'inulinase de *K. fragilis* et de l'invertase de *Sacharomyces cerevisiae* (Yurkevich et al, 1972; Grootwassink et Fleming, 1980) diminue de plus de 50 % pour une concentration de saccharose supérieure à 5 g/l, par contre, la croissance de *Candida sp* est possible avec les mono-, di- et trisaccharides,

particulièrement avec le saccharose. Seul ce dernier conduit à une activité enzymatique élevée. Il s'agit donc d'une enzyme fortement induite par le saccharose (Liu et al, 2006).

Les sucres réducteurs issus de la dégradation du saccharose sont utilisés par les cellules aussitôt leur libération dans le milieu.

### Conclusion

Parmi les dix levures isolées sur un milieu synthétique contenant le saccharose comme source de carbone, la souche **LH7** a été sélectionnée. Il s'agit d'une souche de *Candida tropicalis* thermotolérante.

La croissance et la production de l'enzyme en fermenteur est prometteuse pour une production industrielle. L'étude de l'enzyme produite par *Candida tropicalis* est en cours de réalisation.

L'optimisation des paramètres de croissance de la souche *Candida tropicalis* a permis d'augmenter l'activité  $\beta$ -fructofuranosidase à des valeurs satisfaisantes (5720 U/I) comparables à celles retrouvées chez d'autres souches microbiennes (De Roover et al, 1999). Cette souche possède un fort pouvoir acidifiant, saccharolytique, et un caractère intéressant de la thermophilie, étant donné qu'au cours de la fermentation des déchets, la température augmente considérablement. Elle est retenue pour les essais de biotransformation des déchets des abattoirs

## REFERENCES

**Blanco (C.), Sieiro (C.A.), Daiz (A.), Villa (T.G.)** - Production and partial characterization of an endopolygalacturonase from *Saccharomyces cerevisiae*. - *Can. J. Microbiol.*, 1994, **40**(11), 974-977.

**-Cooney (C.L.), Levine (D.W.)** - Microbial utilization of methanol. - *Adv. Appl. Microbiol.*, 1972, **15**, 337-365.

**-Groot-Wassink (J.W.D.), Fleming (S.E.)** - Non specific  $\beta$ -fructofuranosidase (inulase) from *Kluyveromyces fragilis*: batch and continuous fermentation, simple recovery method, and some industrial properties. - *Enzym. Microbiol. Technol.*, 1980, **2**, 45-53.

**-Labioui .H, Elmoualdi .L, Elyachioui .M, Berny .H, Ouhssine M.** Souche de *candida colliculosa* saccharolytique à activité

$\beta$ -fructofuranosidase membranaire. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, 2007, **146**, 39-50.

**-Kig (C.), Turkel (S.), Temizkan (G.)** - Isolation and characterization of glucose derepressed invertase mutants from *Schizosaccharomyces pombe*. - *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 2005, **69**(12):2475-2478.

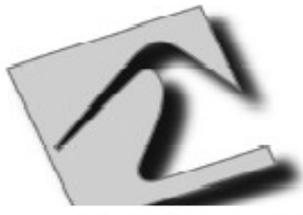
**-Nelson (N.J.)** - A photometric adaptation of the Somogy method for the determination of glucose. - *J. Biol. Chem.*, 1944, **153**(2), 375-380.

**-De Roover (J.), De Winter (M.), Van Laere (A.), Timmermans (J.W.), Van den Ende (W.)** - Purification and properties of a second fructan exohydrolase from the roots of *Cichorium intybus*. *Physiol. Plantarum*, 1999, **106**, 28-34.

**-Liu (C.C.), Huang (L.C.), Chang (C.T.), Sung (H.Y.)** - Purification and characterization of soluble invertases from suspension-cultured bamboo (*Bambusa edulis*) cells. - *Food Chem.*, 2006, **96**(4), 621-631.

**-Somogyi (M.)** - Notes on sugar determination. - *J. Biol. Chem.*, 1952, **195**(1), 19-23.

**-Yurkevich (V.V.), Kovaleva (N.S.)** - [Sucrose and inulinase functions of the beta-fructosidase active center of *Kluyveromyces (Saccharomyces) fragilis*.] (russe) - *Dokl. Akad. Nauk. S. S. S. R.*, 1972, **207**(5), 1233-1235



LES TECHNOLOGIES DE LABORATOIRE - 2010, Volume 5, N°21

1