

Isolement et caractérisation de *Candida guilliermondii* productrice d'une β fructofuranosidase endocellulaire

Latifa BOUSMAHA*, Mohammed OUHSSINE et Mohammed EL YACHIOUI

UFR Amélioration et transformation microbienne et végétale, laboratoire de biotechnologie microbienne, Université Ibn Tofail, Faculté des sciences, BP 133, Kénitra, Maroc

* Correspondance, courriel : latifa.bsm1@yahoo.fr

Résumé

L'invertase est produite par une large variété de microorganismes. L'intérêt grandissant vers cette enzyme est justifié par de nombreuses applications industrielles. Ainsi nous nous sommes intéressés à la caractérisation et à l'exploration des levures saccharolytiques possédant un grand pouvoir acidifiant pour une application ultérieure en fermentations végétales. Une douzaine de levures ont été isolées. La culture sur milieu synthétique à base de saccharose et dépourvu d'extrait de levure a permis la sélection de la souche L1. Cette levure est identifiée, il s'agit de *Candida guilliermondii*. Cette souche synthétise une β fructofuranosidase endocellulaire. L'activité fructofuranosidase maximale est obtenue au bout de 24h à 30°C et à pH 5,2 en présence de 5g/L de saccharose et de la source d'azote appropriée.

Mots-clés : *invertase, Candida guilliermondii, citron.*

Abstract

Isolation and characterization of *Candida guilliermondii* producing β fructofuranosidase endocellular

Invertase is produced by a wide variety of microorganisms. The growing interest to this enzyme is justified by many industrial applications. The interest is focused on the selection, characterization and exploration of saccharolytic yeasts with great acidifying capacities for subsequent application in vegetable fermentations. Culture in synthetic medium containing sucrose and without yeast extract resulted in the selection of the strain L1. This yeast belongs to *Candida guilliermondii*. This strain synthesizes a beta fructofuranosidase endocellular. Fructofuranosidase The maximum activity is obtained after 24 h at 30 ° C and pH 5.2 in the presence of 5 g / L of sucrose and suitable nitrogen source.

Keywords : *invertase, Candida guilliermondii, lemon.*

1. Introduction

Le saccharose est un sucre naturel utilisé en nutrition humaine pour son goût agréable et ses valeurs nutritives [1]. La canne à sucre représente la source la plus importante du sucre, contient de 14% à 20% du saccharose [2] [3]. Au Maroc, la betterave à sucre est cultivée dans les régions de Doukkala, du Gharb, du Loukkos, de Tadla et de la Moulouya. Le sucre représente, pour sa part, 75% des matières sèches de la racine. La canne à sucre est cultivée dans les régions du Gharb et du Loukkos. Les enzymes saccharolytiques sont principalement utilisées dans l'industrie alimentaire. Le saccharose est hydrolysé en un mélange de glucose et de fructose, plus solubles que le saccharose ce qui permet en confiserie de faire des bonbons dont la partie centrale reste liquide. L'invertase sert également à fabriquer du miel artificiel [4]. Il existe différentes formes d'invertases ; externes ou internes [5]. L'invertase endocellulaire est obtenue à partir de la levure de bière (*Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces carlsbergensis*), les cellules sont laissées s'autolyser en présence de toluène pour libérer de l'invertase [6].

L'hydrolyse du saccharose comme tout autre procédé biotechnologique est complexe vu le nombre de variables intervenants pour une bonne productivité : température, pH, agitation, etc. .. [7]. Le présent travail a pour but l'isolement et la purification de souches saccharolytiques possédant une activité β fructofuranosidase et un pouvoir acidifiant en vue d'une application ultérieure en fermentations végétales. Actuellement, en industrie alimentaire le recours à des bactéries lactiques possédant un fort pouvoir fermentatif et assurant une fermentation complète du saccharose et du glucose ne cesse d'augmenter en vue d'assurer une fermentation complète des sucres et inhiber par conséquent la croissance des germes indésirables [8]. Il serait donc intéressant de sélectionner des levures assurant une fermentation du saccharose et du glucose vu que la présence d'un représentant des levures en conjugaison avec une bactérie lactique au moins et un représentant des bactéries productrices d'acide acétique est indispensable en fermentations végétales [9] [10] [11]. Les conditions optimales de prolifération de la levure et de biosynthèse de l'enzyme sont déterminées.

2. Matériel et méthodes

2-1. Isolement et purification des souches

Des fermentations spontanées des citrons sont réalisés par immersion des citrons bien triés dans des saumures à différentes concentrations de sel (5%, 10%, 15% et 30%) pour l'isolement de levures (Bousmaha et al, 2006) [10]. Les levures ont été isolées sur milieu PDA en premier lieu à partir de la saumure des citrons. Le pouvoir acidifiant des levures est estimé par mesure du pH final après incubation 48 h à 30°C dans un milieu synthétique liquide (3 g glucose, 3 g extrait de levure, 1 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1 g MgSO_4 , 1 g KH_2PO_4 , q.s.p. 1 L eau distillée) à pH de 5,88 constant obtenu par addition de NaOH et d'HCL. Les levures isolées sont purifiées et conservées à 4°C dans un milieu PDA en gélose inclinée en tubes.

2-2. Milieu sélectif des levures

Un milieu de culture synthétique solide (3 g saccharose, 1 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1 g MgSO_4 , 1 g KH_2PO_4 , q.s.p. 1 L eau distillée) est utilisé pour la sélection préliminaire de souches saccharolytiques et ceci pour favoriser l'utilisation de la source de carbone (Saccharose) par les levures vu l'absence de l'extrait de levure.

La levure L1 est retenue Par la suite, un milieu semi-synthétique (5 g saccharose, 3 g extrait de levure, 1 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1 g MgSO_4 , 1 g KH_2PO_4 , q.s.p. 1 L eau distillée) est utilisé pour la mise en évidence des conditions optimales de croissance de la levure et de biosynthèse de l'enzyme.

2-3. Identification de la levure

La levure L₁ retenue pour son pouvoir acidifiant et sa bonne croissance sur milieu à base de saccharose. Elle est identifiée par galerie Candida V2, il s'agit de *Candida guilliermondii*.

2-4. Localisation de l'activité fructofuranosidase

Les cultures sont arrêtées en fin de la phase exponentielle de croissance. Après centrifugation de la suspension cellulaire à 12000 g pendant 20 minutes, on obtient le milieu de culture (fraction I) et le culot contenant les cellules intactes (fraction II). Une partie des cellules est remise en suspension dans le tampon phosphate à pH 5 puis lysée. Une nouvelle centrifugation aboutit à la fraction soluble (fraction III) et la partie insoluble (fraction IV). Le dosage de l'activité enzymatique est effectué pour chaque fraction (Somogy, 1952) et (Nelson, 1944) : Le milieu réactionnel contient 0,1 mL du surnageant, 0,25 mL d'une solution substrat (saccharose) et 0,15 mL de tampon phosphate à pH 5.

Le milieu réactionnel est incubé dans un bain marie à 40°C pendant 10 minutes. La réaction est arrêtée par addition du réactif de Somogy puis chauffage à 100°C pendant 15 minutes, 1 mL du réactif de Nelson est ajouté après refroidissement. La densité optique à 540 nm de chaque échantillon est lue en comparaison avec son témoin, constitué du même échantillon sans substrat qui est ajouté après l'ajout du réactif de Somogy. La quantité des sucres réducteurs est déterminée par rapport à une courbe étalon, l'activité enzymatique est exprimée en $\mu\text{mol/L}/\text{min}$. Le réactif de Somogy reste le réactif le plus approprié pour le blocage de l'activité invertase (Vitolo et Borzani, 1983). La quantité de sucres réducteurs est déterminée par rapport à une courbe étalon et l'activité enzymatique est exprimée en $\mu\text{M.L}^{-1}\text{min}^{-1}$

2-5. Optimisation de la croissance cellulaire et de la production enzymatique

Diverses concentrations de saccharose sont testées sur milieu semi synthétique : 0,5 ; 1 ; 3 ; 5 ; 7 et 10 g/L. L'incubation est réalisée 24 h à 30°C. Différents sucres (glucose, maltose, lactose, mannitol et fructose) sont testés à 5 g/L. Le milieu semi synthétique liquide avec 5 g/L de saccharose à différents pH (2,5, 3, 5, 7 et 9) est utilisé pour déterminer l'influence du pH. La biomasse et l'activité enzymatique sont contrôlées en fin de culture. Des substances azotées organiques (peptone) et inorganiques (NH_4Cl , NaNO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) variables sont testées. Les cultures sont réalisées 24 h à 30°C et à pH 5,2 sur milieu semi synthétique avec 5 g/L de saccharose. La croissance et la production de l'enzyme sont suivies à 20, 30 et 45°C sur un milieu semi synthétique avec 5 g/L de saccharose à pH 5,2.

3. Résultats

3-1. Isolement et purification des souches

Tableau 1 : Levures isolées des citrons en fermentation spontanée et estimation du pouvoir acidifiant après incubation en milieu semi synthétique contenant le glucose (3g/L), l'extrait de levure(3g/L), Mg₄So₄(1g/L), KH₂ PO₄(1g/L) et (NH₄)₂SO₄(1g/L) à 30°C pour 48h

Levures isolées	Croissance sur milieu sélectif	pH obtenu après 48h d'incubation sur milieu semi synthétique, pH initial 5,88
L1	+	3,6
L2	-	4,5
L3	-	4,9
L4	-	5,1
L5	-	4,7
L6	-	4,8
L7	-	5,1
L8	-	4,0
L9	-	4,9
L10	-	5,3

3-2. Localisation de l'activité enzymatique

Après 24 h de culture à 30°C dans un milieu semi synthétique (3g/L de saccharose) plusieurs fractions sont préparées, l'activité enzymatique se trouve essentiellement dans le culot, ce qui suggère que la β fructofuranosidase élaborée est essentiellement endocellulaire. Dans le but d'améliorer le rendement en enzyme, certains paramètres de culture de *Candida guilliermondii* seront étudiés.

Tableau 2 : Localisation de l'activité β -fructofuranosidase après culture de la souche L₁ de *Candida guilliermondii* 24 h à 30°C sur milieu semi-synthétique avec 3 g/L de saccharose

Fraction enzymatique	Activité enzymatique (μ mol/ L/min)
Fraction I	1,16
Fraction II	4,35
Fraction III	23,20
Fraction IV	0,29

Optimisation de la croissance cellulaire et de la production enzymatique. L'activité enzymatique augmente avec la concentration en saccharose pour atteindre un maximum à 5 g/L (**Tableau 3**).

Tableau 3 : *Influence de la concentration en saccharose sur la croissance cellulaire et l'activité β -fructofuranosidase de la souche L_1 de *Candida guilliermondii* après 24 h à 30°C sur milieu semi-synthétique*

Concentration en saccharose g/L	DO 24h 600 nm	pH initial	pH 24h	Différence de pH 24h	Activité enzymatique 24h ($\mu\text{mol/L/min}$)
0,5	1,28	6,63	5,53	1,1	1,28
1	1,43	6,66	5,52	1,14	12,47
3	1,52	6,00	5,06	1,25	16,58
5	1,8	6,04	4,46	1,58	24,96
7	1,7	6,32	4,90	1,42	23,52

L'activité enzymatique est presque nulle pour les sucres simples. On conclut qu'il s'agit d'une enzyme induite (**Tableau 4**).

Tableau 4 : *Influence de la nature du sucre sur la souche L_2 de *Candida guilliermondii**

Sucre	DO 24h	Activité enzymatique ($\mu\text{mol/L/min}$)
Glucose	1,34	1,64
Maltose	1,55	1,55
Lactose	0,93	1,99
Saccharose	1,51	24,86
Galactose	1,2	1,37
Fructose	1,32	1,65

L'optimum de production de l'enzyme est à pH 5,2 (**Tableau 5**).

Tableau 5 : *Influence du pH sur la souche L_1 de *Candida guilliermondii**

pH initial	pH 24h	DO 24 h 600nm	Activité enzymatique 24h ($\mu\text{mol/L/min}$)
2,5	2,57	0,6	1,41
3	2,91	1,1	7,21
5,2	4,41	1,44	22,13
7	5,8	1,40	5,85
9	6,27	1,33	1,66

Une bonne croissance avec une grande activité enzymatique en présence de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (**Tableau 6**). L'optimum de croissance et le maximum d'activité sont obtenus à 30°C, (**Tableau 6**).

Tableau 6 : Influence de la source azotée et de la température sur la souche L₁ de *Candida guilliermondii*

Source d'azote	DO 24h 600nm	Activité enzymatique (μmol/L/min)
NH ₄ CL	1,37	12,80
Na No ₃	1,27	11,77
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,56	23,32
Température	DO 24h 600 nm	Activité enzymatique (μmol/L/min)
20°C	0,532	12,46
30°C	1,02	23,14
45°C	0,606	5,34

4. Discussion

Candida Guilliermondii est décrite dans diverses monographies comme étant une souche productrice d'acide citrique [12]. Les levures se succèdent selon leur ordre d'acidotolérance et d'adaptation au cours de la fermentation des citrons. Diverses successions ont été élaborées et une grande diversité écologique de levures dans les aliments est signalée dans différents écrits [13]. L'intérêt a été focalisé sur la sélection d'une souche de levure capable d'hydrolyser le saccharose avec une bonne acidification pour application en mixture avec des bactéries lactiques en fermentation contrôlée du citron. La présence d'un représentant au moins des levures, des bactéries productrice d'acide lactique et d'acide acétique est indispensable en fermentations végétales [14]. Parmi les souches isolées de la saumure du citron, seul la levure L₁ a pu proliférer en milieu synthétique à base de saccharose et dépourvu d'extrait de levure. Il s'agit de *Candida Guilliermondii*.

L'optimisation des paramètres de croissance de *Candida guilliermondii* a permis d'atteindre une activité enzymatique de 24,86 μM.L⁻¹.min⁻¹. Au-delà de 5 g/l, le saccharose devient inhibiteur de la croissance et de l'apparition de l'activité saccharolytique en accord avec d'autres auteurs [15-16]. Les récepteurs enzymatiques pourraient être saturés. Pour une concentration inférieure, les levures se développent moins car moins de substrat est mis à leur disposition. Les levures croissent dans une large gamme de pH allant de 2,4 à 5,8 avec une valeur optimale vers 4 à 5 [17]. Ces résultats ne contredisent pas l'optimum de production de l'enzyme trouvé à pH 5 et 4,5 [18-20]. Toutes les levures ne sont pas aptes à utiliser des sources d'azote minéral. Ainsi, *Candida utilis* assimile les nitrates alors que *Saccharomyces cerevisiae* en est incapable. Les acides aminés sont utilisés en fonction des capacités de désamination des levures.

Chaque microorganisme exige une température déterminée pour sa croissance optimale. Les enzymes sont extrêmement sensibles aux conditions environnementales, en particulier à la température et au pH [21]. Des températures trop élevées provoquent la dénaturation de l'enzyme [15]. L'invertase est dénaturée à 7°C et à 45°C [22]. *Candida guilliermondii* présente un optimum de croissance et de production de fructofuranosidase à 30°C et peut être considéré comme une levure mésophile. La présence de fructofuranosidase chez *C. guilliermondii* pourrait trouver des applications en biotechnologie alimentaire. La souche L_{1a} fait d'ailleurs l'objet d'essais de fermentation contrôlée des citrons et olives [10-11].

5. Conclusion

La présence de fructofuranosidase chez *C. guilliermondii* pourrait trouver des applications en biotechnologie alimentaire. La souche L1 fait d'ailleurs l'objet d'essais de fermentation contrôlée en présence de saccharose.

Références

- [1] - Ana Claudia Santana ,Sucrose hydrolysis catalyzed by auto-immobilized invertase into intact cells of *Cladosporium cladosporioides* *Electron. Biotechnol. v.8 n.1 Valparaíso abr. /8/1/2005.*
- [2] - GLAZER, Alexander N. and NIKAIDO, Hiroshi. *Microbial Biotechnology: Fundamentals of Applied Microbiology.* 2nd ed., New York, W.H. Freeman and Company, (1995).640
- [3] - Mémento de l'agronome Editions Quae, (2002)1691
- [4] - Rivière, 1975. *Les applications industrielles de la microbiologie.* Masson et Cie éditeurs
- [5] - Chu (F.K.), Takase (K.), Guarino (D.), Maley (F.) - Diverse properties of external and internal forms of yeast invertase derived from the same gene. - *Biochemistry*, 24(22) (1985) 6125-6132
- [6] - Rivière - L'exploitation industrielle des microorganismes. - *Cah. Ing. Agron.*, (242)(1970) 9-26.
- [7] - Bonestroo (M.H.), Kusters (B.J.), De Wit (J.C.), Rombouts (F.M.) - Glucose and sucrose fermenting capacity of homofermentative lactic acid bacteria used as starters in fermented salads. - *Int. J. Food. Microbiol.* 15(3-4)(1992) 365-376.
- [8] - Schwan (R.F.). - Cocoa fermentations conducted with a defined microbial cocktail inoculum. - *Appl. Environ. Microbiol.*, 64(4)(1998)1477-1483.
- [9] - Bousmaha. (L), Ouhssine (M.) et El yachoui (M.). «Fermentation du citron par inoculation microbienne» , *Afrique SCIENCE*, (2006)
- [10] - Bousmaha. (L), Ouhssine (M.) et El yachoui (M.). «Amélioration du procédé de fermentation traditionnelle des olives vertes» , *Afrique SCIENCE* (2009)
- [11] - Djadjat T, Noemi A et Ian S. Maddox, citric acid production in a bubble —column reactor using cells of the yeast *Candida guilliermondii* immobilized by adsorption onto sawdust. *Enzyme and microbial technology*, 19 (1996)
- [12] - Vilojoen Environmental Monitoring of Bacteria. *Methods in Biotechnology*, 12 (1999)
- [13] - Schwan (R.F.). - Cocoa fermentations conducted with a defined microbial cocktail inoculum. - *Appl. Environ. Microbiol.*, 64(4)(1998) 1477-1483.
- [14] - Aiba (S.), Humphrey (A.E.), Millis (N.F.) - *Biochemical engineering.* New York: Acad. Press, 1965
- [15] - Lehninger (A.L.), Cox (M.M.), Nelson (D.L.) - *Principes de biochimie*, « Médecine-Sciences », Flammarion. 1994, 2e éd., 1035 p.
- [16] - Oteng-Gyang (K.) - *Introduction à la microbiologie alimentaire dans les pays chauds.* Paris : Ed Lavoisier- Tec et Doc., 43-62 (1984) 272 p.
- [17] - Vitolo (M.), Duranti (M.A.) et Pellegrim, (M.B.) - Effect of pH, aeration and sucrose feeding on invertase activity of intact *S. cerevisiae* cells grown in sugarcane blackstrap molasses. - *J. Ind. Microbiol, Basingstoke*, 15 (1995) 75-79.
- [18] - Abrahão-Neto (J.), Infanti (P.) et M. Vitolo (M.) — Influence of pH, temperature and dissolved oxygen concentration on the production of glucose 6-Phosphatate dehydrogenase and invertase by *Saccharomyces cerevisiae* .- *Braz. J. Chem. Eng.*, 14(1)(1997)
- [19] - Bergamasco (R.), Bassetti (F.J), de Moraes (F.F) et Zanin (G.M.) -Characterization of free and immobilized invertase regarding activity and energy of activation.- *Braz. J. Eng.*, 17 (2000), 4-7.
- [20] - Purves (W.K.), Orians (G.H.), Heller (C.H.), Sadava (D.) - *Le Monde du vivant*, Traité de biologie, deuxième édition, Médecine - Sciences Flammarion. 2000
- [21] - Matulaitite (E.), Avizhenis (V.), Ianulaitene (A.K.), Geguzhene (A.A.) - Purification and characterization of beta fructofuranosidase from yeast *Saccharomyces cerevisiae*. - *Prikl. Biokhim. Mikrobiol.*, 16(4) (1980) 528-537.