

Mise en évidence des activités enzymatiques des levures isolées à partir de grignon d'olive

L'isolement de levures est réalisé à partir de grignon d'olives sur les milieux sélectifs additionnés d'antibactérien et d'antifongique. La production d'enzymes est recherchée qualitativement sur des milieux solides. Les enzymes à étudier sont : **α amylase, cellulase, pectinase, lipase, protéase et maltase.**

1. Recherche d' α -amylase

Ce test est réalisé sur le milieu YPSA. Après 3-5 jours d'incubation à 30°C, la gélose est recouverte d'une solution de Lugol. L'hydrolyse est mise en évidence par l'absence de coloration autour des colonies (anneau clair) et les souches sont considérées comme productrices d' α -amylase. A l'inverse les zones contenant de l'amidon se colorent en bleu-violet.

Composition de milieu YPSA (Yeast Peptone Starch Agar)

Composant	Quantité (g/L)
Peptone	20
Amidon	20
Extrait de levure	15
Agar	20
Eau distillée	1L pH=5,4

2. Recherche de cellulase

L'activité cellulolytique est réalisée sur le milieu gélosé à cellulose. Les cultures étaient inoculées et incubées à 30 °C pendant 3-5 jours. Pour la visualisation de la zone claire par inondation, on utilise le rouge Congo comme réactif. Une solution de colorant rouge Congo à 1% pendant 15 min suivie d'une décoloration en utilisant une solution de NaCl 1M pendant 15-20 min.

Composition de gélose à cellulose

Composant	Quantité (g/L)
Cellulose	0,5
NaNO ₃	0,1
K ₂ HPO ₄	0,1
MgSO ₄	0.05
Extrait de levure	0,05
Agar	15
Eau distillée	1L pH=5,4
Rouge Congo à 1% NaCl 1M	1g de rouge de Congo+100 mL eau distillée 40g + 1L eau distillée

3. Recherche de pectinase

Ce test est réalisé sur le milieu pectine agar. Ensemencer les boîtes en stries après incubation de 3-5 jours à 30° C. Les boîtes sont recouvertes (par inondation) en utilisant la solution de Lugol et laisser à température ambiante pendant 20 minutes. L'apparition d'un halo d'hydrolyse claire autour de la colonie indique la présence d'une activité pectinolytique.

Composition de milieu de pectine agar YPPA (Yeast Peptone Pectine Agar)

Composant	Quantité (g/L)
Pectine	20
Peptone	20
Extrait de levure	15
Agar	20
Eau distillée	1L, pH=5,4

4. Recherche de maltase

Cette activité est réalisée sur le milieu gélosé additionné de maltose. Les cultures étaient inoculées et incubées à 30 °C pendant 3-5 jours. Une solution de colorant rouge Congo à 1% est ajoutée pendant 20 min suivie d'une décoloration en utilisant une solution de NaCl 1M pendant 20 min. L'activité positive est révélée par l'apparition d'une zone claire en formant un anneau clair autour des colonies de levures par rapport au reste du milieu qui est rouge.

Composition de milieu YPMA (Yeast Peptone Maltose Agar)

Composant	Quantité (g/L)
Maltose	20g
Peptone	20g
Extrait de levure	15g
Agar	20g
Eau distillée	1L pH=5,4

5. Recherche de lipase

L'ensemencement a été fait par la méthode de stries à partir des cultures levuriennes jeunes. Les boîtes sont incubées à 30°C pendant 3 à 7 jours. La zone a été détectée directement sans utilisation d'un détecteur. La présence d'un halo clair autour des colonies indique une activité lipolytique.

Composition de milieu TPA (Tween Peptone Agar)

Composant	Quantité (g/L)
Peptone	10 g
NaCl	0,1g
CaCl ₂ , 2H ₂ O	20g
Tween 20	10 ml
Agar	20g
Eau distillée	1L PH=5,4

6. Recherche de protéase