République Algérienne Démocratique et populaire
Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique



Faculté des Sciences et de La Technologie
Département de Génie des procédés

Mémoire

Pour l'obtention du diplôme Master en

Génie des Procédés

Option : Bioprocédés pharmaceutiques

Option : Bioprocédés pharmaceutiques

Thème

Etude de faisabilité de production d'α amylase par voie fongique

Réalisé par
- Beldjouhar wafa
- Goubeur chérifa

Proposé et Encadré
- *Dr. ARBIA .W*

Promotion 2015

Je dédie ce Travail ...

A la mémoire de ma mère et mon père que Allah les soigne au paradis

A la mémoire de mon cher Saad.

A mes frères : Mohamed, Amar, Khalil, Sahraoui, Kamel, Mahfoud.

A mes soeurs : Souad, Fatma, Djamila, Meriem, Amel

A Ma pro-matrice qui a toujours été prés de moi.

A mes amies : Hadjer, Amel, Halima, Sarah, Imène, zineb, Assia .

A mes très chères : Hakima, Fatima, Fouzia, Karima, Ghania, Zahra.

A ma meilleure amies : wafaâ, Halima, Soumia, Aicha, Souria, Mouna, Racha, Rafah , Malika .

A mes oncles : Abass, Massoud, Abd elkader, Omran.

Atout la promotion du génie des procédés 2014/2015 .

chérifa

Dédicace

Je dédie ce modeste travail :

A mon cher père

Tes conseils m'ont suivi et m'ont permis d'atteindre le bout du chemin. Sois fier de moi aujourd'hui et vois à travers ce travail mon amour sincère et ma gratitude profonde.

A ma chère mère

Ma douce et tendre mère. Quoique je fasse,je ne pourrais te rendre ce que tu as fait pour moi. Si je suis arrivée là, c'est bien grâce à toi. Que dieu te donne longue vie et te protège pour moi

A ma chère binôme et sa famille

A mes chers frères

Mohamed ;Elhadi ;Kader,Hakim ;Roudouane ;Ridha

J'ai beaucoup apprécié l'estime et l'amour fraternel que vous me portez. Que Dieu vous

préserve.

A mes chères soeurs

Laila ;Fouzia,Khadidja

A ma grande famille, grande et petite.

A mes très chères copines

Chérifa ;Halima,Imene, Soumia 2 ,,,,,,,,

A tout les travailleurs de la polyclinique D' OUZERA

A ma réele soeoeoeoeur W'assila

A ma promotrice Dr. ARBIA

A tout mes amies

Ainsi qu'à tous ceux qui me sont chers.

Tous qui m'on aider de proche ou de loin

Wafaâ

REMERCIEMENT

Nous tenons tout d'abord à remercier ALLAH qui nous a permis, D'atteindre notre but.

Nous voudrions exprimer notre gratitude à Madame ARBIA notre promotrice pour Ses nombreux conseils, pour sa guenilleuse, sa présence et Ses encouragements.

Nous la remercions de nous avoir toujours poussés vers l'avant.

Nous remercions vivement les membres de jury :

Monsieur le professeur ABOUSEOUD M. qui nous a honoré par sa présence en acceptant de présider notre jury. Qu'il trouve ici nos meilleurs remerciements et l'expression de notre profond respect.

DR. TASSIST A. qui malgré ses occupations, nous fait L'honneur d'examiner notre travail.

On la remercie également pour ses précieux conseils et sa patience.

Nous tenons également à remercier tous nos enseignants de Département de génie des procédés

الملخص

الهدف من هذا العمل هو دراسة جدوى إنتاج إنزيم ألفا اميلاز من أصل فطري وذلك من خلال تعفن الخبز و النشاء واستخراج العوامل القصوى التي يكون فيها الإنزيم في نشاطه الأمثل و الطريقة التجريبية و التحليلية تتم في ثلاثة مراحل1. تحديد السلالة المنتجة لأنزيم ألفا اميلاز2. التخمر 3. تطوير إنتاج إنزيم ألفا اميلاز. العوامل القصوى المتحصل عليها هي : بالنسبة لفطر العفنة 5غ/ل من النشاء، الحموضة 5.5 كبريتات ،الامونيوم / خلاصة الخميرة، لمدة 96ساعة في درجة حرارة الغرفة، تمكنا من التحصل على 0.64 وحدة دولية. أما بالنسبة للبنسيليوم 10غ/ل من النشاء، الحموضة 5.5 كبريتات ،الامونيوم / خلاصة الخميرة، لمدة 96ساعة في درجة حرارة الغرفة، تمكنا من التحصل على 0.766 وحدة دولية.

الكلمات المفتاح :
النشاط الإنزيمي- النشاء -إنزيم - فطر العفنة- البنسيليوم

Résumé

L'objectif de ce travail est l'étude de faisabilité de production de l'enzyme α- amylase par fermentation origine fongique en utilisant des moisissures ainsi que l'optimisation des conditions opératoires. Le travail était réalisé en trois étapes: 1. Identification de la souche productrice de l'α amylase, 2. La fermentation, 3. Optimisation de la production de l'α amylase. Les conditions optimales de la production enzymatique sont : pour *Mucor* sp : une concentration de 5 g/l en amidon à pH 5.5 à température ambiante et pendant 96 h nous a permis d'obtenir une activité enzymatique de 0.64UI. alors que pour *Penicillium* sp une concentration de 10 g/l en amidon à pH 5.5 à température ambiante et pendant 96 h nous a permis d'obtenir une activité enzymatique de 0.766UI.
Mots clé : α-amylase – amidon – activité enzymatique- *Mucor*- *Penicillium*.

Abstract

The objective of this work is the feasibility study of α-amylase production by fermentation using fungi and the optimization of operating conditions. The work was carried out in three steps: 1. Identification of the strain producing of α-amylase, 2. Fermentation 3. Optimization of the production of α-amylase. Optimal conditions for enzymatic production are: for *Mucor* sp: a concentration of 5 g/l starch at pH 5.5 at room temperature for 96 h allowed us to obtain an enzyme activity of 0.64UI. whereas *Penicillium* sp a concentration of 10 g/l starch at pH 5.5 at room temperature for 96 h allowed us to obtain an enzyme activity of 0.766UI.
Key words: α-amylase - starch - enzymatic activity- *Mucor*- *Penicillium*.

Sommaire

Introduction générale……. 1

Chapitre I. Les enzymes amylotiques

I.1. Introduction…….. 3
I.2. Caractéristiques des amylases……..... 3
I.2.1. Définition l'amylase …… 3
I.2.2. Les différents types d'amylase…….…… 4
I.2.2.1. α-Amylase ……. 4
I.2.2.2.β–amylase …….. 7
I.2.2.3.γ-amylase…… 7
I.3. Mécanisme et mode d'action……... 7
I.3.1. Mécanisme d'action…….. 7
I.3.2. Mode d'action……. 8
I.4. Les propriétés physico-chimiques de l'α-amylase …… 9
I.4.1. Spécificité de substrat……... 9
I.4.2. Le poids moléculaire……. 9
I.4.3. La température optimale……... 10
I.4.4. pH optimal…… 10
I.4.5. Les effecteurs ……... 12
I.5. Les Sources d'α-amylase……. 12
I.5.1. La source animale…….…… 12
I.5.2. La source végétale…… 12
I.5.3. La source microbienne…….. 13
I.5.3.1. Les α- amylases fongiques…… 13
I.5.3.2. Les α- amylases bactériennes……... 14
I.6. Les applications industrielles et biotechnologiques de l'α- amylase…….. 14
I.7. Avantages et inconvénients de l'utilisation des enzymes dans les procédés industriels……... 18

Chapitre II : Les différents aspects de production de l'α-amylase

II. 1. Introduction……..... 19
II. 2. Les moisissures …… 19
II. 2. 1. La physiologie des moisissures……. 19
II. 2. 1. 1. Les facteurs nutritionnels …… 19
20

- Source de carbone…….. 20
- Source d'azote…… 20
- Sels minéraux …… 20
- Facteurs de croissance et vitamines …… 21

II. 2. 1. 2. Facteurs physico-chimiques …… 21
- Température …… 21
- Activité de l'eau (Aw) …… 21
- pH…… 22
- Oxygène……. 22
- Lumière…….. 22

II. 2. 2. Intervention des moisissures dans le domaine industriel ……..... 24

II. 2. 2. 1. La production d'enzymes…… 24

II. 2. 3. Caractéristique de la moisissure d'intérêt industriel……..……..... 24

II. 3. La technologie de production d'α-amylase…….. 24

II.3. 1. Les méthodes de production……... 25

II. 3. 2. Les paramètres influençant le bioprocédé……. 26

II. 3.2.1. La température……. 26

II. 3.2.2. Le pH……... 26

II.3.2.3. Le temps de fermentation…… 26

II. 3.2.4. Le milieu de production……...…… 27
- Source de carbone…….. 27
- Source d'azote…… 27

Chapitre III : Matériel et méthodes

III. 1. Matériel……..…….. 29

III.1.1. Echantillonnage…….. 29

III. 1. 2. Criblage des souches amylolytiques…… 29

III.2. Méthodes expérimentales et analytiques……. 30

III. 2. 1. Identification de la souche productrice de l'α-amylase……... 30

III.2.2. La fermentation …… 30

III. 2. 3. Optimisation de la production d'α-amylase…… 31

III.2.3.1. Mesure du pH…….. 31

III.2.3.2. Mesure de la biomasse…… 31
III.2.3.3. Dosage colorimétrique des protéines totales …… 31
III.2.3.4. Dosage de l'amidon résiduel…… 32
III.2.3.5. Dosage de l'activité amylasique…… 32
III.2.3.6. Pré-purification par précipitation à l'acétone……. 34

Chapitre IV : Résultats et discussion

IV. 1. Criblage de souche productrice de α-amylase……... 37
IV. 2. Identification des souches sélectionnées…… 38
IV.2.1. La souche Sp …… 38
IV.2.2. La souche S_M …… 40
IV. 3. Cinétique de croissance des souches fongiques sélectionnées……... 41
IV. 4. Optimisation de la production d'α-amylase…… 45
IV.4.1. La concentration en amidon……... 46
IV.4.2. Le pH initial……... 48
IV.4.3. La source d'azote minérale…… 49
IV.4.4. Le temps de fermentation…… 50
Conclusion générale……... 56
Références bibliographiques…… 58

Listes de figures

Liste de figure

Figure I.1. Structure de l'enzyme…… 3
Figure I.2. Structure chimique de l'amylose et de l'amylopectine…….. 5
Figure I.3. Structure du site catalytique de l'α-amylase crée par RasMol……... 6
Figure I.4. Mécanisme catalytique des hydrolases glycosidiques……... 9
Figure III.1. Précipitation de l'α-amylase à l'acétone……. 35
Figure IV. 1. Test de criblage de souches amylolytiques sur PDA à 1% d amidon (a) témoin négatif (b) S_M (c) Sp (après 48 h d'incubation à température ambiante)……. 38
Figure IV.2a. Aspect macroscopique de la souche fongique isolée à partir du pain (Sp) (après 72 h d incubation à température ambiante)…….. 39
Figure IV.2b. Aspect microscopique de la souche fongique isolée à partir du pain (Sp) (après 72 h d incubation à température ambiante)…….. 39
Figure IV.3a. Aspect macroscopique de la souche fongique isolée à partir de la maizéna (S_M) (après 72 h d'incubation à température ambiante)……... 41
Figure IV.3b. Aspect macroscopique de la souche fongique isolée à partir de la maïzena (S_M) (après 72 h d'incubation à température ambiante)……... 41
Figure IV.4. Evolutions de la biomasse (densité optique) en fonction du temps à différentes concentrations initiales en amidon de *Mucor* sp (pH libre, température ambiante)…… 42
Figure IV.5. Evolutions de la biomasse (densité optique) en fonction du temps à différentes concentrations initiales en amidon de *Penicillium* sp (pH libre, température ambiante)…… 43
Figure IV.6. Evolutions du pH du milieu de fermentation en fonction du temps à différentes concentrations initiales en amidon de *Mucor* sp (pH libre, température ambiante)…… 44
Figure IV.7. Evolutions du pH du milieu de fermentation en fonction du temps à différentes concentrations initiales en amidon de *Penicillium* sp (pH libre, température ambiante)…… 45
Figure IV.8. Influence de la concentration initiale en amidon sur l'activité enzymatique de (a) *Mucor* sp. (b) *Penicillium* sp. (pH libre, à température d'incubation)……. 47
Figure IV.9. Influence du pH initial du milieu de fermentation sur l'activité enzymatique de (a) *Mucor* sp. (5 g/l d'amidon, pH libre, à température d'incubation) (b) *Penicillium* sp. (10 g/ d'amidon, pH libre, à température d'incubation)…… 48
Figure IV.10. Influence de la source d'azote minérale sur l'activité enzymatique de (a) *Mucor* sp. (5 g/l d'amidon, pH 5,5, à température d'incubation) (b) *Penicillium* sp. (10 g/ d'amidon, pH 5,5 à température d'incubation)…… 50

Figure IV.11. Influence du temps de fermentation sur l'activité enzymatique de (a) *Mucor* sp. (5 g/l d'amidon, pH 5,5, à température d'incubation) (b) *Penicillium* sp. (10 g/ d'amidon, pH 5,5 à température d'incubation)…….... 51
Figure IV.12. Evolutions de la concentration des protéines, du pH, de la densité optique de l'amidon et de la biomasse en fonction du temps à (a) 5g/l pour *Mucor* sp et (b) 10 g/l pour *Penicillium* sp (pH 5,5, NH_4SO_4/extrait de levure, température ambiante)……. 53

Listes de tableaux

Liste des tableaux

Tableau I.1. Les différentes nomenclatures d'α-amylase…….4
Tableau I.2. Les propriétés de certaines α-amylase et d'autres enzymes amylolytiques de différentes origines……...11
Tableau I.3. Les différentes α-amylases microbiennes et leur action…….13
Tableau II.1. Comparaison des différents rôles des moisissures…….23
Tableau II.2. Production d'enzymes amylolytiques par certains microorganismes……...28
Tableau IV.1 Diamètre des zones de lyse des souches fongiques amylolytiques……..37

Introduction générale

Depuis des siècles, les hommes savent utilisés des processus dans les quelles les enzymes jouent un rôle essentielle.

Jusqu'au début des années 1970, on a considéré que les plantes et les animaux étaient les meilleures sources d'enzymes. Cependant, différents microorganismes ont été intensivement utilisés pour la biosynthèse des enzymes amylolytiques. La naissance de l'industrie des enzymes a coïncidé avec le début du vingtième siècle et avec l'apparition des premières enzymes microbiennes essentiellement des amylases. L'intérêt de ces enzymes réside dans leur utilisation dans des secteurs variés, tels que les industries agroalimentaire, pharmaceutique, textile, de la brasserie, et des détergents.

En effet, le marché mondial des enzymes, qui sont les outils-clés des biotechnologies, est représenté par 80% des hydrolases, particulièrement les amylases et les protéases (Morvan,2010). Le succès commercial des amylases (30% des enzymes commerciales) est dû à l'industrie de l'amidon qui est l'une des plus grandes utilisatrices d'enzymes amylolytiques (Singhania *et al.*, 2009 ; Rajagopalan et Krishnan, 2008).

En Algérie, les α-amylases utilisées dans diverses industries (panification, biscuiterie, amidonnerie…etc) sont importées en totalité, ce qui nécessite la création des ateliers locaux pour la production de ces enzymes (Nouadri, 2011).

Toutefois, la production d'α-amylase par des procédés biotechnologiques (fermentations), nécessite non seulement l'identification et la sélection des microorganismes amylolytiques, mais également le choix d'un substrat de fermentation à faible coût d'une part, et convenable en point de vu composition en élément nutritifs nécessaires au développement des microorganismes et la production d'α-amylase, d'autre part.

Notre choix a porté sur les moisissures comme agents de fermentation, vu leur place importante sur le marché des enzymes amylolytiques et leur remarquable capacité à coloniser et à exploiter une grande variété de substrats (Leveau et Bouix, 1993; Boiron 1996).

Dans ce modeste travail nous nous sommes intéressés a étudier la faisabilité de production de l'enzyme α-amylase par fermentation fongique, en utilisant l'amidon comme substrat. Cette étude a été faite en deux grandes parties :

- La première partie, consiste en criblage des souches amylolytiques et la sélection des souches les plus performantes ;
- La deuxième partie, porte sur l'optimisation des conditions de production de l'α-amylase, en étudiant la cinétique de croissance et de production d'enzyme.

Ce mémoire s'organise en deux parties :

A) Une partie théorique qui regroupe des généralités sur les enzymes amylolytiques et spécialement l'α-amylase et leurs applications dans différents domaines (Chapitre I) ainsi qu'on a essayé de faire une petite synthèse bibliographique sur les différents aspects de la production de l' α-amylase.

B) Une partie expérimentale qui comporte deux chapitre : le premier (chapitre III) dans lequel nous avons présenté les conditions expérimentales de notre étude ainsi que les différentes méthodes d'analyse. Dans le second chapitre (Chapitre IV), nous avons présenté et interprété les résultats obtenus au cours de notre travail.

Chapitre I

Les enzymes amylolytiques

I.1. Introduction

Les enzymes amylolytiques ou amylases sont des enzymes qui hydrolysent l'amidon. Leur histoire a commencé en 1811, lorsque Kirchhof a découvert pour la première fois une enzyme dégradant l'amidon.

Les amylases extracellulaires ont été trouvées chez diverses espèces de levures, chez les champignons et les bactéries (Lagzouli et *al*., 2007). Elles appartiennent à la famille des hydrolases qui sont considérées parmi les plus importantes enzymes à l'échelle industrielle, ce qui les rendent l'un des outils-clés des biotechnologies (Little, 2004).

I.2. Caractéristiques des amylases

I.2.1. Définition

L'α-amylase est l'une des enzymes industrielles la plus importante et la plus ancienne (Gupta et al. 2008). C'est une macromolécule appartenant à la classe des protéines globulaires, de type endoglycanases, de la classe des hydrolases, qui agit sur les liaisons α (1- 4) de l'amidon. Son action fournit dès le début un mélange de glucose, de maltose et de dextrines. En fin de réaction elle fournit du glucose et des résidus correspondant aux liaisons α (1-6) situées aux points de ramification des chaines (Raimbault, 1981; Alais et *al*., 2008).

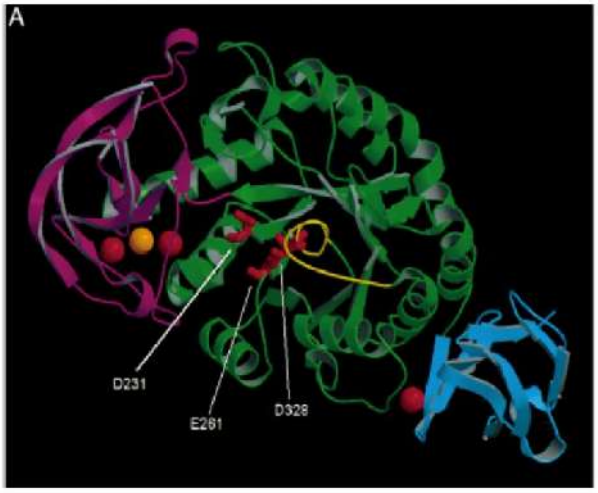


Fig. I. 1. Structure de l'enzyme

I.2.1. Les différents types d'amylase

I.2.1.1.α-Amylase

L'α-Amylase (EC3.2.1.1) est une hydrolase qui catalyse l'hydrolyse des liaisons α (1-4) de l'amidon pour donner des produits tels que le glucose et le maltose, elle possède différente nomenclature (tableau 1). C'est une métallo-enzyme de calcium c'est-à-dire qu'elle dépend de la présence d'un co-facteur métallique pour son activité (Sundarram et al., 2014) et au maintien de la stabilité de la structure en acides aminés d'enzyme qui varient d'une souche à une autre (Fogarty et *al.*, 1980).

Il y a deux types d'hydrolases:

- Endo-hydrolases : agissent à l'intérieur de la molécule de substrat,
- Exo-hydrolases : agissent sur les extrémités terminales non réductrices (Gupta et al., 2003).

Par conséquent, des résidus glucose terminaux et les liaisons α (1-6) peuvent ne pas être clivés par l'α-amylase.

Tableau I.1 : les différentes nomenclatures d'α-amylase (Mercier, 1985).

Nom Systématique	α (1 - 4) D-glucane glucanohydrolase
Non codifié	E.C .3.2.1.1
Nom Recommandé	Alpha-amylase.
Synonymes	glycogenase, endoamylase, maxilase, taka-amylase A, takatherm, thermolase, amylotherm, clarase, amylopsin, spitase CP1, G995, kleistase L1, THC 250, maxamy, ptyalin

Le substrat de l'α-amylase est l'amidon. Ce dernier est un polysaccharide composé de deux types de polymères :

- **L'amylose** constitue de 20 à 25% de la molécule d'amidon. C'est une chaîne linéaire constituée de motifs répétitifs de glucose liés par des liaisons glycosidiques α (1-4).

- **Amylopectine** constitue 75-80% de l'amidon, et se caractérise par des chaînes ramifiées d'unités de glucose. Les unités de glucoses linéaires successifs sont reliées

par des liaisons glycosidiques α (1-4), tandis que la ramification se produit toutes les 15 à 45 unités de glucose par des liaisons α (1-6).

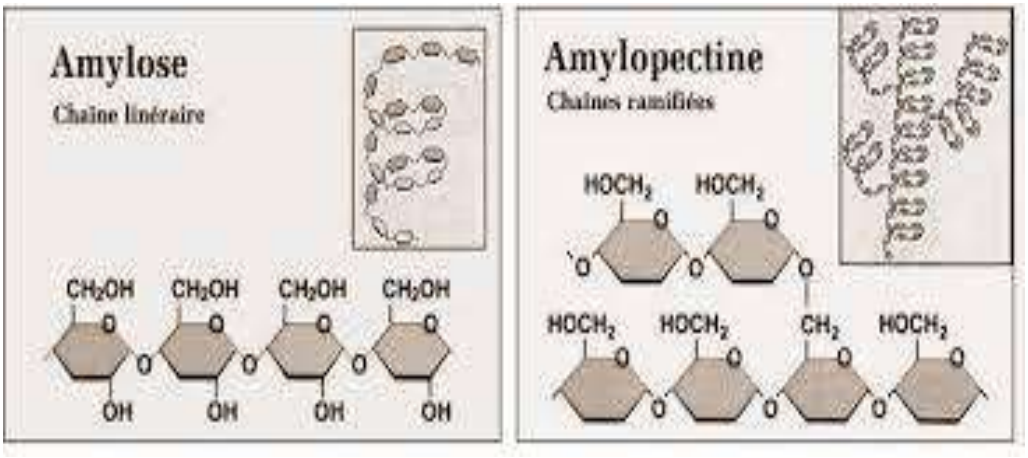


Fig.I. 2. Structure chimique de l'amylose et de l'amylopectine

La composition de l'hydrolysat de l'amidon est très dépendante de l'effet de la température, des conditions d'hydrolyse et de l'origine de l'enzyme.

Les α-amylases sont des enzymes monomériques, de poids moléculaire variant entre 41 et 78 kDa, retrouvées largement dans le règne vivant, aussi bien chez les animaux, les plantes supérieures que chez les microorganismes. Ces enzymes hydrolysent les liaisons glycosidiques α (1-4) de l'amidon, du glycogène et des poly- et oligosaccharides apparentés. Elles sont très importantes, tant par leurs applications industrielles et biotechnologiques (biodégradation ou transformation de l'amidon, par exemple) que par leur implication dans certains troubles métaboliques (diabète, obésité, etc.) faisant de ces enzymes des cibles thérapeutiques.

A ce jour, 13 structures d'α-amylases de différents organismes ont été déposées. On dénombre ainsi cinq structures d'α-amylases de microorganismes, trois de mammifères (2 humaines et 1 porcine), un de ver, deux de champignons et deux de plantes (orge).

Bien que les α-amylases de différentes origines aient très peu de séquences d'acides aminés identiques, leur structure tridimensionnelle et l'organisation de leur sites actifs sont similaires (Mercier, 1985). Leur chaîne polypeptidique est organisée

en trois domaines formé chacun d'un tonneau de huit segments bêta, entourés par huit hélices alpha. Leurs sites actifs sont constitués d'un ensemble de sous-sites (Scriban, 1999) appelé aussi « *TIM Barrel* » (Banner et *al.*, 1975).

Structurellement, les α-amylases sont également considérées comme des glycoprotéines renfermant 478 acides aminés répartis en 2 domaines globulaires appelés A (1-380 résidus) et B (381- 478 résidus). Ces domaines sont associés par une chaîne polypeptidique constituée principalement de résidus hydrophobes. Les résidus constituant le site de fixation du substrat ainsi que ceux constituant le site catalytique sont localisés dans le domaine A qui montre que l'α-amylase est formée de 8 feuillets β plissés et de 8 hélices α (Chiba, 1988 ; Burhan, 2003).

Le site actif d'α-amylase contient trois groupements d'acides aminés (de couleur blanche et rouge) qui agissent ensemble pour cliver la liaison entre deux sucres dans une chaîne d'amidon, c'est le glutamate (233) et l'aspartate (197, 300). Cette structure contient une courte chaîne de cinq unités de sucre (de couleur jaune et orange) liée dans le site actif (PDB, 2006).

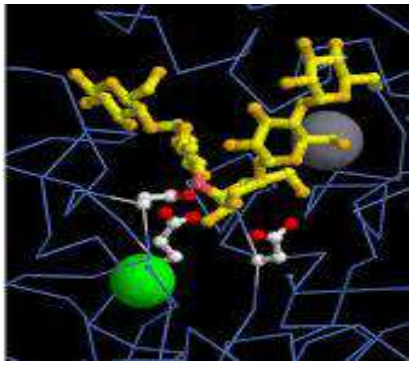


Fig.I.3.Structure du site catalytique de l'α-amylase crée par RasMol (PDB, 2006).

Le site de clivage en rose. Un ion calcium, la sphère grise, se trouve à proximité, un ion chlorure montré la sphère verte, (PDB, 2006).

I.2.1.2.β–amylase :

β-amylase (EC 3.2.1.2) est une enzyme exo-hydrolase qui agit à partir de l'extrémité non réductrice d'une chaîne de polysaccharide par hydrolyse des liaisons glycosidiques α (1-4) pour donner des unités de maltose successif. Étant donné qu'il est incapable de cliver des liaisons ramifiées des polysaccharides ramifiés tels que le glycogène ou l'amylopectine, l'hydrolyse est incomplète et les unités de dextrine demeurent.

Les principales sources de β-amylase sont les graines de plantes supérieures et les patates douces. Au cours de la maturation des fruits, la β-amylase décompose l'amidon en maltose résultant dans la douceur des fruits mûrs.

Le pH optimal de l'enzyme varie de 4,0 à 5,5. La β-amylase peut être utilisé dans les études structurales de l'amidon et le glycogène molécules produites par divers procédés, et dans l'industrie, pour la fermentation en brasserie, en distillerie et pour produire des sirops riches en maltose (Sivaramakrishnan et al., 2006).

I.2.1.3.γ-amylase

Les γ-amylase (EC 3.2.1.3) clivent les liaisons glycosidiques α (1-6), en plus de la liaison glycosidique α(1-4) à l'extrémité non réductrice de l'amylose et l'amylopectine, contrairement aux autres formes de l'amylase, ce qui donne le glucose. En plus, γ- amylase est la plus efficace en milieu acide et a un pH optimal de 3.

Dans cette étude, nous allons nous intéresser à l'étude du mode d'action de l'α-amylase parce que l'objectif de notre travail est la production d'α-amylase.

I.3. Mécanisme et mode d'action

I.3.1. Mécanisme d'action

L'α-amylase, quelque soit son origine végétale, animale ou microbienne, agit sur les polysaccharides (amidon, glycogène) et les oligosaccharides. Elle hydrolyse les liaisons glycosidiques α(1-4) de l'amidon et des substrats relatifs (Heslot, 1996).

Le mécanisme d'action de l' α-amylase nécessite la participation de 3 fonctions du site actif impliquant un attaquant nucléophile, un stabilisateur de la charge positif de l'atome attaqué et un donneur de proton au groupe déplacé ceci signifie que la rupture de la liaison osidique fait intervenir une série d'échange d'électrons et de protons entre certains résidus de l'enzyme et du substrat. Les groupes impliqués dans

la réaction du site actif sont deux acides carboxyliques et un noyau imidazole (Parkc *et al.* 1997).

Ce mécanisme est une caractéristique de l'enzyme dans les conditions expérimentales telles que la température, pH, taille de l'enzyme….etc. Son action peut se faire de différentes façons :

1. Une attaque aléatoire, en coupant les liaisons α (1-4) à partir de l'extrémité non réductrice. Il en résultera, principalement, la formation du glucose, du maltose et surtout d'α –dextrines (Scriban, 1999).

2. Mécanisme uni-chaine où l'α-amylase dégrade une chaîne avant de passer à l'autre. Cette action est due à la formation du complexe actif avec le premier substrat. L'enzyme catalyse la réaction et ne forme pas de complexes actifs, jusqu' à l'achèvement de la dégradation de la première chaîne (Berry et Paterson, 1990).

3. Mécanisme multi-chaine, la dégradation des chaînes est simultanée (Pazur et Marchetti, 1992).

4. Attaque multiple ou répétitive, le déplacement de l'enzyme, fixée tout au long de la chaîne, conduit à plusieurs hydrolyses avant la dissociation du complexe enzyme-substrat (Nakatani, 1996 et Kandra *et al.* 1997).

I.3.2. Mode d'action

Le site actif se compose d'un nombre important de groupements chargés, dont trois acides aminés essentiels à l'activité catalytique de l'α-amylase : Asp 231, Glu 261 et Asp 328 (McCarter et Withers, 1996, Uitdehaag *et al.* 1999).

La réaction catalytique est réalisée en trois étapes (Sinnot, 1990, McCarter et Withers, 1994, Davies et Henrissat, 1995 et McCarter et Withers, 1996)

1- Protonation de l'oxygène glycosidique par le donneur de proton (Glu 261). Celle-ci, est suivie d'une attaque nucléophile, sur le C_1 du résidu du sucre en position 1 par l'Asp 231 et départ de la pièce d'aglycone (Davies *et al.* 1997).

2- Activation d'une molécule d'eau, vraisemblablement par le maintient du Glu 261 deprotonné (Nielsen *et al*. 2001).

3 - Hydrolyse du lien covalent entre l'oxygène nucléophile de l'Asp 231 et le C_1 du résidu du sucre en position 1, permettant l'accomplissement du cycle catalytique (Nielsen *et al*. 2001)

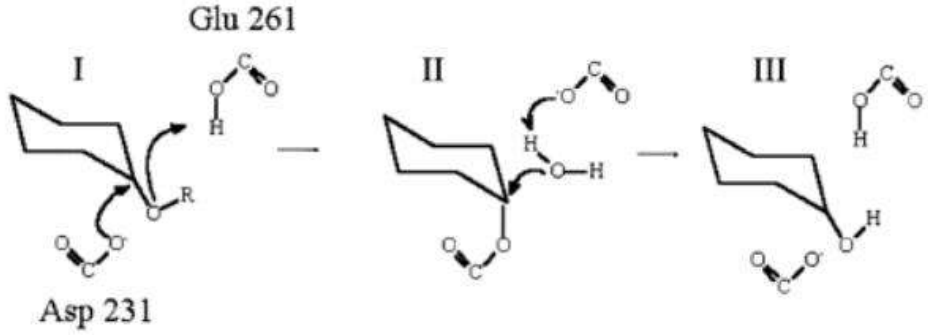


Fig.I.4.Mécanisme catalytique des hydrolases glycosidiques (Nielsenet et *al.* 2001)

I.4. Les propriétés physico-chimiques de l'α-amylase

Pour qu'une enzyme réponde aux exigences potentielles en vue d'une production industrielle, il est nécessaire de déterminer ses propriétés physico-chimiques à savoir : la spécificité du substrat, le poids moléculaire, la température optimale, le pH optimal…etc. Le tableau I.2, présente les propriétés de quelques enzymes amylolytiques citées dans la bibliographie.

I.4.1. Spécificité de substrat

Le substrat naturel de l'α-amylase est l'amidon (Pandey et *al*. 2000 ; Alais et *al*. 2008). Dans la molécule d'amidon, les unités de glucose sont reliées par des liaisons glyosidiques α (1- 4) en formant ainsi des chaînes hélicoïdales d'amylose, sur lesquelles de courtes chaînes de même constitution se branchent par des liaisons osidiques α (1-6) (Mercier, 1985)

La production d'α-amylase par certaines souches fongiques (*Aspergillus* sp., *Rhizopus* sp. et *Penicillium* sp.) est contrôlée par l'amidon; il s'agit d'une induction de l'enzyme par son substrat naturel (Leveau et Bouix, 1993; Nouadri 2011).

I.4.2. Le poids moléculaire

Selon Sicard (1982), le poids moléculaire de la majorité des α –amylases apparaît être de l'ordre de 50.000 Dalton (Berry et Paterson, 1990). Sur gel filtration, deux fractions peuvent être obtenues, le composant le plus rapide à un PM de 50.000

Dalton et le plus lent à un PM 100.000 Dalton (Mercier, 1982). Une autre étude, réalisée sur l' α-amylase d'origine bactérienne par la même méthode, montre que l'enzyme est un tétramère contenant du Zn^{++} et possédant une masse moléculaire d'environ 96.000 Dalton (Kim et *al*, 1995).

I.4.3. La température optimale

En général, les α-amylases ont une température optimale comprise entre 25°C et 70°C, avec une grande stabilité thermique pour les α-amylases bactériennes (Larpent-gourgaud et Sanglier, 1992).

Vertiani et *al*. (1998), signalent que la température optimale des α-amylases bactériennes varie de 50°C à 90°C, avec possibilité de résistance à des températures dépassant 100°C, pour celles isolées des souches hyperthermophiles. Cependant la température optimale des α-amylases fongiques varie de 40 °C à 60 °C avec un optimum plus élevé (65°C) pour l'α amylase de la souche *Rhizopus oryzae* (Lucio et *al*. 1996).

I.4.4. pH optimal

Les α-amylases sont généralement stables dans une gamme de pH de 4 à 9, avec un optimum variant de 4 à 5 pour les α-amylases fongiques, et un optimum supérieur à la neutralité, soit 6 à 8.5 pour les α-amylases bactériennes (Larpent-gourgaud et Sanglier, 1992).

Selon Lucio et *al.* (1996), l'α-amylase de la souche *Rhizopus oryzae* a un pH optimal se situant entre 4 et 6,5.

Tableau I.2 : Les propriétés de certaines α-amylase et d'autres enzymes amylolytiques de différentes origines

Enzymes	Organismes	Propriétés de l'enzyme		Références
		pH optimum	Température Optimale	
α-amylases	*Bacillus subtilis* *Bacillus lichenformis* *Pyrococcus furiosus* Orge maltée Sorgho malté *Penicillium* *Aspergillus*	7 - - 4.7-5.4 5.5-6 5-8 - -5.5	135°C 100°C 140°C 50-55°C 65 °C 40^0C-55^0C	Konsoula et Liakopoulou-kyriakides, 2007 Prakash et Jaiswal**,** 2010 Gomes et al., 2007 Muralikrishna et Nirmala, 2005 Nour et Yagoub**,** 2010
Pullulanase	*Bacillus flavocaldarius*	5	75-85°C	Gomes et al., 2007
Isoamylase	*Rhizopus oryzae*	-	55°C	Ghosh et Ray, 2010
β-amylase	*Thermotoga maritime* Sorgho malté *Bacillus sp*	5.5-6	90°C 55°C 50°C	Gomes et al., 2007 Nour et Yagoub, 2010 Young et al., 2001
Glucoamylase	*Clostridium thermosulfuricum* *Clostridium thermosaccarolyticum* *Paecilomyces variotii*	7.5	70°C 70°C 55°C	Gomes et al., 2007 Michelin et al., 2008

I.4.5. Les effecteurs

Les α-amylases sont des métalloprotéines absolument dépendantes du Ca^{2+}, qui est vraisemblablement un activateur allostérique (Egas et al., 1998).

Le calcium ne participe pas directement à la formation du complexe enzyme-substrat, mais il maintient l'enzyme dans une conformation optimale pour un maximum d'activité et de stabilité vis-à-vis de la dénaturation thermique (Savcheko et *al.* 2002; Peixoto-Nogueira et *al*., 2008) et de la dénaturation par protéolyse (Nigam et *al*.,1995; Mc tigue et *al*., 1995).

L'activité enzymatique de l'α-amylase n'est pas modifiée par les ions potassium (K^+), sodium (Na^+), ammonium ($NH4^+$), mais elle est fortement inhibée par l'éthylène diamine tétra acétate (EDTA) et les métaux lourds (Igarashi et *al.*, 1998; Talamond et *al*., 2002)

I.5. Les Sources d'α-amylase

L'α-amylase peut avoir différentes sources, elle peut être d'origine végétale, animale ou microbienne. Cependant, les sources microbiennes sont les plus préférées pour la production à grande échelle (Haq *et al*. 2002)

I.5.1. Source animale

Les amylases d'origine animale sont généralement extraites à partir de la salive et du pancréas des mammifères (French, 1975). Les α-amylase animales sont incapables d'hydrolyser la liaison α(1-6) de l'amylopectine ou du glycosyl oligosaccharides, l'hydrolyse complète de l'amylose et de l'amylopectine par les α-amylases animales donne respectivement du maltose et du D-glucose pour l'amylose et du glucose, maltose et des dextrines pour l'amylopectine (Coolbear *et al.* 1992).

I.5.2. Source végétale

Les α-amylases d'origine végétale possèdent une importance primordiale dans le métabolisme glucidique où elles participent à la conversion de l'amidon en le réduisant en sucres réducteurs qui sont la source énergétique nécessaire à la germination et elles sont généralement incapables d'hydrolyser le maltose (Octávio *et al.* 2000).

Ces enzymes végétales sont synthétisées par un mécanisme cellulaire compliqué, au cours de la germination des graines qui requiert une activité enzymatique très importante pour la mobilisation des réserves et le développement de l'embryon (Brawn *et al.* 1993).

I.5.3. Source microbienne

Deux types sont distingués: les α-amylases bactériennes et les α- amylases fongiques (tableau I.3).

I.5.3.1. Les α-amylases fongiques

La production industrielle d'enzymes à partir des microorganismes fongiques (*Aspergillus, Penicillium*) existe depuis longtemps du fait que la première production d' α-amylase a été réussie par Takamine en 1894.

L'α-amylase fongique est d'une thermostabilité assez faible, son optimum d'action se situe entre 50°C et 55°C (Fogarty *et al.* 1994).

Actuellement d'autres genres de moisissures dont *Rhizopus* et *Alternaria* sont utilisés pour la production d'α-amylase relativement thermostable (Lateef et *al.* 2004 ; Ait Kaki *et al.*, 2012). Les levures participent également à la production d'α-amylase (Leveau et Bouix, 1993).

Tableau I.3 : les différentes α-amylases microbiennes et leur action

Enzyme	Source	Action
α-amylase	*Bacillus amyloliquefaciens* *Bacillus lichenformis* *Aspegillus* *Saccharomyces*	Hydrolyse des liaisons α-(1,4) au hasard à l'intérieur de la chaine, en donnant de l'α- dextrine, de maltose et de glucose.
α-amylase saccharifiante	*Bacillus subtilis*	Comme la précédente, sauf qu'elle produit jusqu'à 50% du glucose.

I.5.3.2. Les α-amylases bactériennes

Ce type d'enzyme est obtenu principalement par fermentation de Bacillacées (Milner *et al.* 1997). Historiquement la première enzyme a été produite à partir de souches de *Bacillus amyloliquefaciens, B. licheniformis* (Bousseboua, 2002) ou *B. subtilis* fermentant en surface (Mctigue *et al.* 1995). De nombreuses amylases aux propriétés industrielles ont été découvertes chez des bactéries acidophiles, alcalinophiles et thermophiles.

Ces enzymes interviennent dans la transformation de l'amidon par hydrolyse rapide en clivant les liaisons α (1-4) (Nadirman *et al.2006*).

I.6. Les applications industrielles et biotechnologiques de l'α- amylase

L'α-amylase gagne une attention accrue en raison de ses propriétés d'hydrolyse de l'amidon et les activités qui peuvent être réalisées grâce à cette propriété. Il existe de nombreuses applications potentielles et largement utilisés de cette enzyme sur le plan industriel. Les enzymes ont remplacé les méthodes chimiques utilisés précédemment dans divers secteurs industriels pour la protection de l'environnement et la facilité des processus.

Les α- amylases microbiennes sont parmi les enzymes les plus utilisées dans les procédés industriels et dans différents domaines.

I.6.1. Domaine agro-alimentaire

I.6.1.1. Glucoserie

La principale industrie utilisatrice de l'α- amylase est la glucoserie qui, à partir d'un substrat complexe, l'amidon, développe un nombre important de transformations faisant appel aux enzymes, parmi lesquelles les α- amylases bactériennes ou fongiques qui sont utilisées pour la dégradation de l'amidon (Martin *et al,* 2003).

I.6.1. 2. La sucrerie

L'α- amylase est utilisée pour faciliter les opérations d'extraction et de raffinage du saccharose à partir de la betterave ou de la canne à sucre pour éliminer les traces d'amidon qui peuvent gêner la purification. De plus, des α- amylases fongiques sont très utilisées pour la préparation des sirops sucrés à base d'amidon de maïs et de sirops de chocolats (Martin *et al.,* 2003).

I.6.1. 3. Panification et biscuiterie

L'usage de l'α-amylase «améliorant de panification» est devenue une pratique de fabrication machinal dans l'industrie panaire, non seulement pour améliorer la qualité du pain mais aussi pour contrôler le processus, de fabrication ce qui conduit à un gain en temps et en énergie. Cette industrie emploie les α- amylases fongiques d'*A. oryzae* pour la régulation des activités diastasiques des farines en dégradant l'amidon en maltose. Cette opération favorise la formation de la mie souple en boulangerie et améliore la texture des gâteaux pâtissiers et des biscuites (Malhotra *et al.*, 2002). Cependant, les enzymes doivent être dosées avec précision, un surdosage entraînant un défaut au niveau du produit.

- α- amylase fongique et amyloglucosidase

La quantité de sucres directement fermentescibles présents dans la farine n'est pas suffisante pour assurer la totalité de la fermentation. L'action combinée de l'α-amylase et de la β-amylase présente naturellement dans la farine et d'autre part l'action de l'amyloglucosidase consistent à fractionner l'amidon en sucres, que la levure transforme en suite en CO2 et en alcool.

L'α-amylase fongique a une action liquéfiante importante au cours des premières minutes de la cuisson : l'activité de l'amylase augmente jusqu'à 55°C entraînant un assouplissement de la pâte et facilitant sous l'effet du CO2 le développement des pâtons. Tout le sucre formé n'est pas consommé par la levure. Il participe à la coloration de la croûte au cours de la cuisson. En cas de surdosage, entraîne le collant de la pâte voire de la mie.

- α-amylase bactérienne et exo-amylase maltogène

Elles sont utilisées pour obtenir une meilleure coloration de la croûte à la cuisson et au grillage (des biscottes). Plus stables que l'α-amylase fongique, leur activité facilite la production de sucres qui se caramélisent et forment avec les protéines des complexes de couleurs brunes. Elles ont également une action antirassissement. En cas de surdosage, entraîne le collant de la pâte voire de la mie.

I.6.1. 4. Industrie des boissons

Dans ce secteur l'α-amylase fongique intervient essentiellement dans la fabrication d'alcool éthylique, de boissons sucrées non alcoolisées et de jus de fruits

(Mamo *et al,* 1999). En brasserie, elle permet d'obtenir des bières sans dextrines, dites bières à basses calories.

I.6.2. Domaine médical

L'augmentation du taux des α-amylases dans le sang peut témoigner d'une pancréatite aiguë et se rencontre également dans certains cancers digestifs, dans les oreillons (Lo *et al,* 2001) et l'insuffisance cardiaque (Pandey et al, 2000). Elles sont donc employées en diagnostic médical pour détecter certaines maladies.

I.6.3. Domaine pharmaceutique

Dans le domaine pharmaceutique, l'α-amylase est utilisée comme agent anti-inflammatoire en soutenant le traitement par des antibiotiques, ou comme un aide digestif pour éviter les dyspepsies et les fermentations intestinales (Vidal, 2003).

. L'α-amylase peut être également utilisé dans le traitement du diabète et l'obésité (Cuveillier, 1999).

I.6.4. D'autres domaines

Les α-amylases sont aussi utilisées dans l'industrie textile pour le désencollage des tissus ainsi que dans les domaines de la tannerie, de la papeterie (Teodoro *et al.*, 2000) et des détergents pour les lessives où elles facilitent la disparition des tâches en dégradant les souillures, permettant ainsi l'augmentation du pouvoir blanchissant. Elles sont utilisées aussi dans le traitement des eaux résiduaires pour l'élimination de l'amidon (Malhotra *et al,* 2002).

I.6.4.1. Désencollage des textiles

Les processus de production modernes dans l'industrie textile peuvent causer la rupture du fil de chaîne. Pour renforcer le fil, des agents de collage sont utilisés en formant une couche sur elle et peut être enlevé à la fin du tissage.

L'amidon est un agent d'encollage préféré car il est facilement disponible, moins coûteux et peut être facilement retiré du tissu. La couche de l'amidon est soumise à une hydrolyse dans le procédé de désencollage où l'α-amylase est utilisée pour cliver les particules d'amidon, au hasard, en composants solubles dans l'eau qui peuvent être enlevés par lavage. L'enzyme agit spécifiquement sur les molécules

d'amidon seul, en laissant les fibres non affecté (Gupta et al., 2003; Sivaramakrishnan et al., 2006).

I.6.4.2. Production de détergent

L'utilisation d'enzymes dans les détergents a augmenté avec l'évolution des techniques de lavage et de la lessive. En effet, les produits chimiques utilisés dans les détergents sont toxiques pour l'homme, lorsqu'ils sont ingérés, et nocifs pour l'environnement lorsqu'ils sont déversés dans la nature. Grace à leur biodégradabilité, leur action spécifique et leurs douces conditions de travail, les détergents à base d'enzymes présentent une voie alternative des détergents chimiques.

L'α-amylase est utilisée pour digérer l'amidon contenant dans les particules alimentaires en petits oligosaccharides hydrosolubles. L'amidon peut attirer les particules de sol sur les vêtements, donc le retrait de l'amidon est également important pour garder la blancheur du linge. La stabilité des α-Amylase à basse température et à pH alcalin contribue à son utilisation étendue dans les détergents.

L'inconvénient de l'utilisation de l'α-amylase est la dépendance au calcium et la sensibilité des enzymes aux oxydants. Cette limitation peut être surmontée en utilisant une α-amylase à partir d'organismes génétiquement modifiés. Des scientifiques de Novozymes et Genencore International, deux grands fournisseurs d'enzymes détergentes, ont travaillé sur ce point. Ils ont remplacé l'acide aminé sensible, Methionine, à la position 197 par Leucine dans l'α-amylase de *B. licheniformis* (rcsb.org (http://rcsb.org/pdb/images/1hny_bio_r_500.jpg?bioNum=1)

.

I.6.4.3. Industrie de papier

Comme les textiles, le papier est également traité avec des agents d'encollage pour le protéger des contraintes mécaniques au cours du traitement. Le dimensionnement contribue également à améliorer la qualité du papier en termes de résistance, la douceur, l'écriture et l'effacement. (Tolan, 1996).

L'amidon est couramment utilisé comme agent d'encollage. Le rôle de l'α-amylase dans l'industrie du papier est l'hydrolyse partielle de l'amidon pour la rendre moins visqueuse dans un procédé discontinu ou un procédé continu. Cela est dû à la nature très visqueuse d'amidon naturel qui le rend impropre pour le revêtement sur le papier (Gupta et al., 2003).

V.5.4. Production de carburant : l'éthanol

Parmi les biocarburants, l'éthanol est le plus largement utilisé. Comme l'amidon est une matière de départ économique, il est utilisé pour la production d'éthanol en tant que biocarburant. Ceci est fait dans une série d'étapes. Tout d'abord, l'amidon est soumis à une liquéfaction pour former une suspension d'amidon visqueuse. Ceci est suivi par le processus de saccharification où l'amidon est hydrolysé par l'α-amylase pour obtenir les sucres fermentescibles. Ces sucres sont ensuite fermentés par des levures pour produire de l'alcool.

Comme une improvisation de ce processus, la fusion de protoplastes entre les souches de levures amylolytiques *Saccharomyces fibuligera* et *S. cerevisiae* a été réalisée pour obtenir une nouvelle souche de levure qui peut directement produire des biocarburants à partir d'amidon, ce qui élimine la nécessité d'une étape de saccharification (http://rcsb.org/pdb/images/1hny_bio_r_500.jpg?bioNum=1)

V. 6. Avantages et inconvénients de l'utilisation des enzymes dans les procédés industriels

Les avantages que présentent les enzymes dans les procédés industriels sont nombreux, parmi on cite :

- Utilisation dans des conditions douces (pH, température) ;
- Économie d'énergie ;
- Équipements adaptés ;
- Très haute spécificité enzymatique ;
- Synthèses régiospécifiques et stéréospécifiques ;
- Les enzymes sont de nature spécifique et donc biodégradable ;
- Catalyseurs qui agissent à des doses très faibles (peu de problèmes de stockage des préparations enzymatiques) très hautes vitesses de réaction et contrôle aisé de la réaction.

Cependant, elles présentent certains inconvénients à savoir

- Prix élevé pour certaines applications ;
- Problèmes liés à la dénaturation des enzymes
- Nécessité de la présence de co-facteurs, pour certaines réactions, et qui sont couteux.
- Contrôle et ajustement du pH et de la température ;

- Milieux réactionnels variés induisant des mécanismes enzymatiques complexes: catalyse homogène en milieu aqueux, catalyse hétérogène (substrats insolubles, enzymes immobilisées, réactions en milieu organique).

Chapitre II

les Différents aspects de production de l'α-amylase

II. 1. Introduction

La production industrielle des enzymes porte surtout sur les amylases et les protéases qui représentent 80 % du marché mondial des enzymes (Morvan ,2010). Les enzymes les plus importantes en termes de revenus sont encore les protéases qui couvraient 34,4 % du marché en 1995 et, à l'horizon 2015, elles risquent d'être détrônées par les lipases (38,5 % du marché prévu) qui sont suivies par les amylases (30,5 %) (Marché européen des enzymes dans les applications alimentaires) (Morvan ,2010)

Dans la plupart des cas, la production industrielle des enzymes amylolytiques se fait à partir de souches bactériennes ou de souches fongiques. Cependant, les moisissures sont considérées comme les microorganismes les plus importants en biotechnologies pour leur fort potentiel de développement (Sicard, 1982)

II. 2. Les moisissures

Les moisissures sont des champignons inférieurs microscopiques comportant environ 1850 genres et 15000 espèces (Botton et al., 1990), essentiellement aérobies et saprophytes mais certains parasitent des animaux et des végétaux (Bourgeois *et al.*, 1989 ; Leveau et Bouix, 1993). Elles se présentent sous forme de filaments et de cellules avec un noyau ainsi que des hyphes plus ou moins enchevêtrés (Samson et al., 1977).

Leurs propriétés de dégradation et de synthèse sont très développées. Elles ont fait l'objet d'un grand nombre d'utilisations industrielles pour la production d'antibiotiques, d'enzymes ou d'acides organiques (Sicard et al., 1982) ainsi que dans la transformation des stéroïdes (Taylor et al.,1995). Ce sont des éléments importants de dégradation qui s'attaquent dans les lieux humides à toutes les matières organiques (Vayssier et al., 1990).

Le nombre et la variété des champignons rendent leur classification difficile tandis que la multiplication asexuée détermine leur classification. Les champignons ne montrent pas une forme de reproduction sexuée connue.

II. 2. 1. La physiologie des moisissures

II. 2. 1. 1. Les facteurs nutritionnels

Les éléments nutritifs de base qu'exigent les moisissures pour se développer sont le carbone, l'azote et les éléments minéraux (Davet, 1997)

- Source de carbone

Pratiquement, tous les composés organiques peuvent êtres utilisés comme source de carbone et d'énergie par les moisissures. La plupart d'entre elles peuvent métaboliser le glucose et le saccharose, avec quelques polysaccharides comme l'amidon et la cellulose (Boiron, 1996; Nicklin et *al.*, 2000).

Certaines d'entres elles, produisent des lipases extracellulaires capables d'hydrolyser les lipides en glycérol et acides gras, qui peuvent êtres assimilés par beaucoup d'espèces fongiques, alors que seulement certaines espèces utilisent les acides organiques et l'éthanol (Boiron, 1996).

- Source d'azote

La plupart des moisissures assimilent l'azote sous forme de NH_4^+, dont la présence réprime l'utilisation d'autres sources azotées (nitrate, acides aminés et protéines). L'ammoniaque est transformé en acide glutamique, en glutamine ou en d'autres acides aminés par transamination (Boiron, 1996), alors que seules certaines espèces utilisent le nitrate, d'autres ne peuvent croître qu'en présence d'azote organique et aucune moisissure ne peut fixer l'azote atmosphérique (Punt *et al.*, 2002).

- Sels minéraux

Certains minéraux, tels que le phosphore (assimilé sous forme $H_2PO_4^-$), soufre (assimilé sous forme sulfate ou composés réduits), potassium…etc., sont exigés à concentration relativement élevée (environ 10^{-3}M).

Cependant, certains minéraux, tels que le fer, le cuivre, le manganèse, le zinc et le molybdène sont exigés à concentration faible (10^{-6}M ou moins) (Boiron, 1996).

- Facteurs de croissance et vitamines

Boiron (1996), signale que les stérols, les acides gras et certains vitamines de groupe B sont nécessaires pour le développement d'un certains nombre d'espèces fongiques.

II. 2. 1. 2. Facteurs physico-chimiques

Les facteurs physicochimiques ont une influence importante sur le développement des moisissures. Parmi ces facteurs, les plus importants :

- Température :

La température joue un rôle prépondérant dans la croissance mycélienne, elle intervient également dans la sporulation et la germination des spores (Bourgeois *et al.*, 1989). La plupart des moisissures sont mésophiles se développant bien à des températures de 25 à 35°C (Botton et *al.*, 1990; Julien, 2002). Quelques espèces sont thermotolérantes ou thermophiles et peuvent croître à hautes températures (au dessus de 50°C), avec une croissance optimale aux environ de 20 à 25°C, *Aspergillus fumigatus* est un bon exemple (Botton *et al.*, 1990; Nicklin *et al.*, 2000).

D'autres sont des psychrophiles ou psychrotolérantes, se développant à basses températures (entre -5 et 10°C), telles que *Helicostylum pulchrum*, *Chrysosporium pannorum* et *Cladosporium herbarum*. Ces espèces peuvent même survivre à (-60°C) et elles sont rencontrées dans des entrepôts frigorifiques (Davet, 1997; Botton *et al*., 1990).

- Activité de l'eau (Aw)

Théoriquement, les limites pour la croissance microbienne s'étendent de 0.65 à 1, avec une limite inférieure absolue de 0.55. En pratique, si l'aw dans le matériau peut être maintenu sous 0.75, la croissance microbienne sera limitée, tandis qu'il n'y aura pratiquement aucune croissance microbienne sous une activité de l'eau de 0.65, même sur les matériaux les plus facilement attaquables.

Les spores de moisissures pourront toutefois, rester viables sous ces valeurs et ce, sur de longues périodes de temps (Halwyn *et al.*, 2002).

- pH

Les moisissures peuvent se développer dans une large gamme de pH allant de 4.5 à 8 (Larpent-gourgaud et Sanglier, 1992). Toutefois, les variations du pH, peuvent influencer la croissance fongique, soit indirectement en agissant sur la disponibilité de certains nutriments, soit directement par action sur la membrane cellulaire, sachant que la plupart des moisissures peuvent ajuster le pH du milieu à leur convenance (Boiron, 1996).

- Oxygène

La quantité d'oxygène mise à la disposition des moisissures est un facteur important de développement. La plupart sont aérobies, les plus exigeantes vivent dans les régions

périphériques des substrats, les moins exigeantes peuvent se développer en profondeur comme *Fusarium oxysporum* et *Aspergillus fumigatus*. Certaines peuvent même supporter une anaérobiose très stricte, comme *Neocallimastix* (Bourgeois *et al.*, 1989 ; Botton *et al.*, 1990).

- Lumière

La lumière peut influencer favorablement ou défavorablement la croissance et la sporulation de certaines moisissures, mais la plupart d'entres elles se développent aussi bien à lumière qu'à l'obscurité (Leveau et Bouix, 1993).

Toutefois, Boiron (1996) signale que la lumière influence la croissance de certaines moisissures, soit par destruction photochimique de constituants du milieu, soit en agissant directement sur le métabolisme fongique (induction de la biosynthèse des pigments caroténoïdes de *Fusarium aquaeductuum*).

II. 2. 2. Intervention des moisissures dans le domaine industriel

Les moisissures sont souvent dotées de propriétés lytiques importantes (cellulolytiques, pectinolytiques, amylolytiques, protéolytiques…) qui en font des agents de dégradation dangereux mais aussi parfois des alliés utiles (notamment lors de l'affinage de fromages ou la production d'enzymes).

En ce qui concerne l'action «positive» des moisissures (tableau II. 1), on constate une grande utilité de celles-ci dans l'agriculture (le champignon filamenteux *Botrytis* à l'origine de la «pourriture noble» des raisons du Sauternes, ainsi que dans l'industrie (production de fromages, production de molécules à activité pharmacologiques, d'enzymes industrielles). (Larpent, 1991).

II. 2. 2. 1. La production d'enzymes

Les enzymes fongiques restent toujours les outils clés de la biotechnologie et reflètent de plus en plus l'importance et le rôle infini des moisissures dans les différentes applications alimentaires.

Aspergillus niger est un bon exemple, il produit la cellulase, les amylases, l'invertase et la pectinase, employées principalement comme des catalyseurs biologiques en glucoserie, brasserie et pour la fabrication des boissons. Cette moisissure secrète aussi des protéases, des

lipases et des estérases, utilisées dans différentes applications alimentaires (Kosikowski, 1988 ; Scriban, 1999).

Tableau II.1 : comparaison des différents rôles des moisissures.

Moisissures utiles	Moisissures d'altération
Penicillium roqueforti : fabrication de fromages à pâte persillée *Penicillium camemberti* : fabrication de fromages à croûte fleurie *Penicillium album* : flore de surface du saucisson, couverture de certains fromages *Mucor* : flore de surface de certains fromages, fabrication de produits divers *Aspergillus Oryzae* : fermentation de produits à base de riz et de soja	*Aspergillus flavus* : élabore des composés très toxiques et cancérigènes (aflatoxines) *Aspergillus terreus* : contribue à la décomposition de la matière organique *Alternaria dauci* : infecte les feuilles de carottes cultivées *Fusarium avenaceum* : responsable de l'altération de fruits

Elles permettent l'affinage des fromages et se développent à la surface de la croute donnant aux différents fromages leur aspect spécifique. En effet, le genre *Penicillium camenberti* est responsable de la croûte fleurie du camembert ou encore *Penicillium roqueforti* responsable de la couleur bleuâtre à l'intérieur du Roquefort.

Comme pour les levures, les moisissures étant à la surface de la croûte, elles consomment l'acide lactique et contribuent à la diminution du pH du fromage, avec une efficacité supérieure à celle des levures). De plus, elles ont une activité enzymatique protéolytique et lipolytique qui permet de libérer divers produits (acides aminés et acides gras) participant à la flaveur du fromage (Branger et *al*. 2007).

En ce qui concerne les enzymes amylolytiques, beaucoup de travaux ont étudié leurs propriétés. Cependant, la caractéristique la plus recherchée est la thermostabilité. Pour l'industrie de transformation de l'amidon, il est souhaitable que les α-amylases soient actives à des températures élevées de gélatinisation (100-110°C) et de liquéfaction (80-90°C). Ces dernières années, beaucoup de recherches ont été faites sur la production d'amylases par les

microorganismes thermophiles (Gomes *et al*., 2007). Ainsi des amylases fonctionnant à des températures élevées ont été découvertes. Aujourd'hui, le marché annuel des enzymes thermostables représente environ 250 millions de dollars et les α-amylases thermostables en occupent une bonne part (Prakash et Jaiswal, 2010).

II. 2. 3. Caractéristiques de la moisissure utilisée

Le choix de la souche utilisée selon Botton et al., (1990) doit répondre à un certain nombre de critères parmi lesquels :

- Facilité d'emploi de la souche ;
- Absence de pathogénicité ;
- Stabilité génétique ;
- Résistance à des inhibiteurs susceptibles d'être présents dans les milieux ;
- Robustesse, c'est-à-dire bonne résistance aux accidents d'utilisation (évolution du milieu, des conditions de culture, contamination et stabilité des systèmes enzymatiques) ;
- Coût d'utilisation ;
- Exigences nutritives limitées ;
- Utilisation possible de substrats bon marché (sous produits recyclés) ;
- Aptitude au développement dans des conditions simples ;
- Performance de la souche ;
- Vitesse de production ;
- Rendement de production ;
- Productivité ;
- Qualité du produit obtenu ;
- Caractéristiques recherchés de l'α-amylase.

II. 3. La technologie de production d'α-amylase

II. 3. 1. Les méthodes de production

Il existe principalement deux méthodes qui sont utilisées pour la production d'α-amylase à l'échelle industrielle : la fermentation submergée (ou en milieu liquide) et la fermentation sur milieu solide. Cette dernière est une, assez, nouvelle méthode alors que la première est une méthode traditionnelle de production d'enzymes à partir de microorganismes qui a été utilisé pendant une longue période de temps (Sundarram et al., 2014).

La Fermentation submergée emploie des substrats liquides, comme la mélasse et des bouillons. Les produits issus de la fermentation sont sécrétés dans le bouillon de fermentation. Cette technique de fermentation est adaptée aux microorganismes qui exigent une forte teneur en humidité pour leur croissance.

Elle est principalement utilisé pour l'extraction des métabolites secondaires qui doivent être utilisées sous forme liquide (Couto et al., 2006). Ce procédé présente plusieurs avantages :

- Elle permet l'utilisation d'organismes génétiquement modifiés à une plus grande mesure que la fermentation en milieu solide.
- La purification peut être effectuée facilement.
- De plus, le contrôle des paramètres du procédé tels que la température, le pH, l'aération, le transfert de l'oxygène et de l'humidité peut se faire commodément (Kunamneni et al., 2006).

La fermentation en milieu solide est une méthode utilisée pour les microorganismes qui exigent moins d'humidité pour leur croissance. Les substrats solides couramment utilisés dans ce procédé sont : le son de blé, la bagasse, et la pâte à papier.

Le principal avantage, de cette méthode, c'est que les déchets riches en nutriments peuvent être facilement recyclés et utilisés comme substrats. De plus, cette technique nécessite un matériel plus simple, productivité volumique plus importante et moins d'effluents générés (Couto et al., 2006). Pour ces raisons, la fermentation en milieu solide, est considéré comme un procédé prometteur pour la production commerciale d'enzymes.

En effet, la production de l'enzyme α-amylase par fermentation fongiques a été étudiée en utilisant les deux méthodes : liquide et solide. Toutefois, des études révèlent que les fermentations sur milieu solide est le procédé le plus approprié dans les pays en développement en raison des avantages qu'il offre et pour sa rentabilité (Kunamneni et al., 2006).

II. 3. 2. Les paramètres influençant le bioprocédé

Les paramètres optimaux de contrôle d'un bioprocédé varient en fonction du microorganisme utilisé, du produit final souhaité et de la méthode de fermentation utilisée ainsi que de nombreux autres facteurs.

II. 3. 2. 1. La température

Il ya deux températures qui doivent être optimisée dans un bioprocédé. Ce sont : la température optimale pour la croissance du microorganisme et la température optimale d'une production maximale.

Les températures optimales pour la croissance microbienne et la production d'α-amylase ont été étudiées chez les deux souches de *Bacillus licheniformis* and *Bacillus subtilis*. L'optimum pour la croissance et la production se sont révélées être de 45 à 46°C et 50°C, respectivement. Chez *B. subtilis* 29, la température optimale pour la croissance (42°C) était plus élevée de 5°C à celle de la production de l'α-amylase (37°C) (Kenneth et al., 1993).

II. 3. 2. 2. Le pH

Le pH optimal est un facteur critique pour la stabilité de l'enzyme produite. Les enzymes sont sensibles au pH, donc il faut prendre soin de contrôler le pH du procédé de production. *Pyrococcus furiosus* produit α-amylase qui présente une activité optimale à un pH de 6,5 à 7,5 (Haki et al., 2003). *Aspergillus* sp.tel que *A. oryzae*, *A. ficuum* et *A. niger* ont un pH optimal de production de pH 5.0–6.0 par fermentation en milieu liquide (Carlsen et al., 1996 ; Moller et al., 2004 ; Djekrif-Dakhmouche et al., 2005). *Saccharomyces cerevisiae* et *S. kluyveri* ont montré un taux maximum de production d'enzyme à pH 5.0 (Knox et al., 2004 ; Tanyildizi et al., 2005) et pH of 7.0, respectivement (Syn et al., 1997 ; Vieille et al., 2001 ; Ashraf et al., 2005).

II. 4. 2. 3. Le temps de fermentation

C'est un facteur crucial dans le processus de fermentation. Si le procédé est réalisé pendant une période de temps plus courte que la durée optimale, le maximum de produit ne peut pas être obtenu. L'activité de l'enzyme augmente avec l'augmentation du temps d'incubation jusqu'à ce qu'il atteigne la durée optimale. Dans la plupart des cas, la production d'enzyme commence à diminuer si la durée d'incubation est encore augmentée. Cela pourrait être dû à l'épuisement des nutriments dans le milieu (Lévêque et al., 2000 ; Raul et al., 2014) ou la libération de substances toxiques.

II. 4. 2.4. Le milieu de production

Le choix du milieu approprié de fermentation est essentiel pour les microorganismes, aussi bien pour la croissance que pour la production d'enzymes. La production d'enzymes

amylolytiques par les levures a été considérablement améliorée par l'addition de différentes sources de carbone et d'azote. Les sources de carbone ont affecté non seulement la croissance mais aussi l'apparition des amylases et la vitesse avec laquelle les hydrates de carbone sont métabolisés. De même, la source d'azote organique ou inorganique est essentielle pour la formation de biomasse cellulaire et d'enzymes (tableau II.2).

- **Source de carbone**

Les sources de carbone les plus utilisées sont : le glucose, sucrose et maltose. *A. tamarii* produit activement l'α-amylase lorsqu'il est cultivé dans un milieu contenant du maltose, l'amidon et le glycogène. Aujourd'hui on utilise des déchets de légumes (Anto et al., 2006) ou de l'industrie agro-alimentaire pour la valorisation des déchets et protection de l'environnement d'une part et pour diminuer le prix de revient et la rentabilité du procédé d'autre part.

- **Source d'azote**

La source d'azote utilisée pour la production d'α-amylase peut être organique ou inorganique. Parmi les sources d'azote inorganiques on cite le sulfate d'ammonium, chlorure d'ammonium et l'ammonium hydrogène phosphate. Les sources d'azote organiques sont les plus couramment utilisés parmi eux on cite : la peptone, l'extrait de levure et de la farine de soja (Paquet et al., 1991).

Tableau II.2: Production d'enzymes amylolytiques par certains microorganismes

Microorganismes	Substrats	Types de fermentation	Activités détectées	Références
***Bacillus sp* PS-7**	Son de blé Son de riz Son de maïs	Solide (37°C, 48h) Solide (37°C, 48h) Solide (37°C, 48h)	220400U/g (α-amylase) 145000 U/g (α-amylase) 97600 U/g (α-amylase)	Sodhi et al., 2005
***Bacillus subtilis* RSKK96**	Farine de maïs	Liquide (37°C, 72 h)	445 U/mg (α-amylase)	Akcan et al., 2011
Aspergillus oryzae	Son de blé	Solide (30°C, 72h)	1986 U/g (glucoamylase)	Zambare, 2010
Aspergillus niger	Résidu de banane Plantain	Solide (29°C, 144h)	33 EU (β-amylase)	Adeniran et al., 2010
***Thermomyces lanuginosus* ATCC 58160**	Son de blé	Solide (50°C, 120h)	250 U/g (α-amylase)	Kunamneni et al., 2005
***Penicillium janthinellum* (NCIM 4960)**	Son de blé	Solide (35°C, 96h)	300 U/g (α-amylase)	Sindhu et al., 2009
***Bacillus subtilis* CM3**	Résidus de manionc	Solide (50°C, 144h)	6200 U/g (α-amylase)	Swain et Ray 2007
Chrysosporium asperatum	Amidon de pomme de terre	Liquide (30°C, 72h)	97 IU/ml/min (α-amylase)	Sanghvi et al., 2011

Chapitre III

Matériel et méthodes

L'objectif de ce travail est l'étude de la faisabilité de production de l'enzyme α-amylase par fermentation fongique en utilisant des souches fongiques criblées à partir de différents sources alimentaires en utilisant un milieu spécifique de production d'α-amylase.

Notre étude était réalisée en trois étapes :

- Dans une première étape, on a criblé la souche de champignon qui présente une importante activité amylasique.
- Dans la deuxième étape, on a optimisé quelques paramètres physicochimiques qui influencent la production d'α-amylase à savoir : la concentration en amidon, le pH initial, la source d'azote minérale et le temps de fermentation.
- La dernière étape consiste en une pré-purification par précipitation à l'acétone.

III. 1. Matériel et méthodes

Produits et matériel utilisés

Produits	Matériel
-glucose -l'agar -l'amidon soluble -NaoH (0.675M) -H_2SO_4 (0.1M) -$Na_2S_2O_3$ (0.1M) -extrait de levure -KH_2PO_4 -$(NH_4)_2SO_4$ -$MgSO_4$, $7H_2O$ -Hcl (1 M) -lugol -solution d'oligoélément -solution tampon phosphate (0.1 M) de PH=5	Les fioles jugées 1000 ml Les Erlenmeyer Bicher Pipettes graduées Balance Eprouvettes Autoclave Spectrophotomètre Bain Marie Agitateur Boites de Pétrie tubes à essais bec bunsen pipettes Pasteurs entonnoir les flacons

III. 1. 1. Méthode de travail

III. 1. 1. 1. Echantillonnage

Les souches utilisées dans ce travail ont été prélevées à partir de différents aliments pourris : légumes (tomate, orange), céréales (riz), farine, maïzena et le pain. A l'aide de pipettes Pasteur, on a fait des prélèvements par touche à la surface de chaque aliment et on la ensemencé sur une boite de pétri contenant du milieu PDA**.** Après incubation à température ambiante pendant 7 jours, deux repiquages successifs ont été effectué par touche centrale afin de purifier la souche. A la fin les souches isolées ont été codées comme suit :

Souche à partir de tomate	**S_T**
Souche à partir d'orange	S_O
Souche à partir du riz	S_R
Souche à partir de la maïzena	S_M
Souche à partir du pain	S_P
Souche à partir de la farine	S_F

III. 1. 1. 2. Criblage des souches amylolytiques

La sélection est effectuée sur un milieu PDA, additionné d'amidon soluble à 1% (Annexe). Les boites sont ensuite incubées à température ambiante pendant 03 jours. Après incubation, une solution de lugol est versée sur la surface de la boite, afin de mettre en évidence l'activité amylasique. Les souches, à halo clair sur le pourtour, sont considérées comme productrices d'amylases (Tatsinkou et al., 2005).

Le diamètre des zones de lyse, est pris en considération pour la sélection de la souche amylolytique la plus performante.

III.2. Méthodes analytiques et expérimentales

III. 2. 1. Identification de la souche productrice de l'α-amylase

Une identification en utilisant la coloration simple au bleu de méthylène été réalisée. La souche sélectionnée est repiquée à partir de culture pure, conservée à 4°C sur un milieu solide PDA, et incubée à température ambiante pendant 48 à 72 h.

Mode opératoire

- Couper un morceau de ruban adhésif de 1,5 cm de long en évitant absolument de laisser ses empreintes sur la face adhésive.

- Appliquer la face adhésive sur la colonie de moisissures.
- Poser une goutte de bleu de méthylène sur une lame propre
- Poser le morceau de ruban sur la goutte et faites l'observation.

III.2.2. La fermentation

Des cultures en batch ont été réalisées dans des Erlenmeyers de 250 ml avec un volume utile de 200 ml.

La chaîne d'ensemencement comporte deux étapes qui précèdent l'ensemencement du fermenteur :

1- Dans le but de réactiver la souche, nous avons réalisé, tout d'abord, une culture sur un milieu PDA incubé à température ambiante pendant 5 jours. Il a été entrepris, par la suite, une pré-culture.

2- La pré-culture consiste à prélever 4 à 5 disques de la culture de champignon, les ensemencer dans 100 ml de milieu PDB (annexe) liquide puis incubée à température ambiante pendant 5 jours.

3- La culture ainsi obtenue servira à ensemencer le fermenteur de 200 ml à raison de 10% (volume/volume).

III. 2. 3. Optimisation de la production d'α-amylase

Des prélèvements sont effectués régulièrement chaque 24 heures à partir de chaque essai expérimental réalisé. Après récupération de la biomasse par centrifugation à 5000 rpm à 4°C pendant 5 minutes, les paramètres suivants sont mesurés :

III. 2. 3. 1. Mesure du pH

Ce paramètre nous permet d'avoir une idée sur l'évolution du pH de la fermentation. La valeur du pH est déterminée par une lecture directe à l'aide d'un pH mètre.

III. 2. 3. 2. Mesure de la biomasse

La mesure de l'opacification du milieu de culture est une technique très précise pour mesurer la biomasse. Donc on a réalisé une lecture directe de la biomasse à une longueur d'onde de 650 nm.

III.2.3.3. Dosage colorimétrique des protéines totales

Le dosage des protéines totales dans les échantillons liquides, prélevés du milieu de fermentation, a été réalisé par la méthode de Biuret à 540 nm (Apria, 1981). En milieu alcalin, les composés contenant au moins deux groupements (−CO−NH ou $-CO-NH_2$) forment avec les ions cuivriques (Cu^{2+}) un complexe bleu-violet. Cette coloration se développe en particulier avec le Biuret, $NH_2-CO-NH-CO-NH_2$ d'où son appellation de coloration de Biuret.

L'intensité de la coloration est proportionnelle au nombre de liaisons peptidiques. Il en résulte que pour une protéine pure, l'intensité est proportionnelle à la concentration de celle-ci. Toute fois, cette concentration ne doit pas excéder 10mg/l.

a) Courbe d'étalonnage

- A partir du sérum étalon dont le titre en protéines est connu, réaliser des dilutions de 1/10ème, 1/20ème, 1/40ème et 1/80ème , pour cela, prélever 2ml, 1ml, 0,5ml et 0,25ml de sérum puis compléter à 20 ml avec de l'eau physiologique.
- Dans une série de tubes à essai (1, 2, 3, 4), introduire 1ml de chacune des dilutions et 4ml du réactif de cornall (voir annexes).
- Le témoin ou le blanc est réalisé avec 1ml d'eau physiologique et 4ml du réactif de cornall.
- Mélanger, attendre 30mn à température ambiante et à l'obscurité.
- Une fois que la coloration est stable, lire la densité optique (DO) de chaque tube contre le blanc à 540nm.

b) Dosage des protéines totales

- Prélever 1ml de l'échantillon à doser et ajouter 4 ml du réactif de cornall, bien mélanger, attendre 30mn à l'obscurité et lire au spectrophotomètre (DO).
- A partir de la valeur lue (DO), la concentration est déduite de la courbe d'étalonnage, en tenant compte de la dilution.

III.2.3.4. Dosage de l'amidon résiduel

Pour la détermination de l'amidon résiduel, 1ml de surnageant de la culture a été ajouté à 2,4 ml d'une solution d'iode et sa densité optique a été lu à 540 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (Chahrour, 2013).

III.2.3.6. Dosage de l activité amylasique

L'activité α-amylasique est mesurée par oxydation douce des aldoses. En milieu basique et froid la fonction aldéhyde (R-CHO) est oxydée en ion gluconate par le diiode en excés. L'excés de diiode est dosé par le thiosulfate de sodium.

L'activité enzymatique est exprimée par l'unité internationale, correspondant à une micromole de maltose libérée par minute, à 40°C et à pH 5 par millilitre de suspension enzymatique.

Substrat : dissoudre 1g d'amidon dans 100 ml de tampon phosphate 0,1 M, pH 5.

- Ajouter 12,5 ml d'une solution de l'extrait enzymatique à 12,5 ml de substrat ;
- Incuber à 40°C pendant 30 minutes ;
- Arrêtez la réaction par l'ajoute de base (1,5 ml de NAOH 0,675 M) ;
- Ajuster le volume à 50 ml avec l'eau distillée ;
- La préparation du test témoin est la même que pour l'essai sauf que l'on doit ajouter, 1.5 ml de NAOH 0.675 M, avant l'ajout du substrat.

Dosage enzymatique

- A chaque essai et témoin ajouter 25 ml d'iode (0,05 M) et 5 ml NaOH (0,675M)
- Agiter et laisser agir 15 min à température ambiante.
- Ajouter 5 ml de H_2SO_4 (0,05M)
- Titrer avec une solution de thiosulfate de sodium $Na_2S_2O_3$ (0,05M)

Calcul de l'activité amylasique

En milieu alcalin il se produit une dismutation du diiode selon la réaction suivante

Réduction de I_2: $I_2 + 2é = 2I^-$ (1)

Oxydation de I_2: $I_2 + 12OH^- = 2\,IO_3^- + 6H_2O + 10é$ (2)

Bilan 5X(1) + (2) à simplifier par 2 :

$$\mathbf{6I_2 + 12OH^- = 2\,IO_3^- + 10I^- + 6H_2O}$$

Suivie d'une oxydation des aldéhydes

Réduction de I_2 : $IO_3^- + 3H_2O + 6é = I^- + 6OH^-$ (3)

Oxydation de R-CHO : $R\text{-}CHO + 3\,OH^- = R\text{-}CO_2^- + 2H_2O + 2é$ (4)

Bilan : (3) + 3 X (4) :

$$\mathbf{IO_3^- + 3R\text{-}CHO + 3\ OH^- = I^- + 3R\text{-}CO_2^- + 3H_2O}$$

Régénération du diiode en milieu acide

Titration du diiode par une solution de thiosulfate de sodium

Réduction de I_2: $I_2 + 2é = 2I^-$ (5)

Oxydation de $S_2O_3^{2-}$: $2\ S_2O_3^{2-} = S_2O_6^{2-} + 2é$ (6)

Bilan: (5) + (6) :

$$\mathbf{I_2 + 2S_2O_3^{2-} = 2I^- + S_4O_6^{2-}}$$

Résultats des titrages

La quantité de diode en excès dosée

$n_{I2\ (e)}$ = ½ n $\mathbf{S_2O_3^{2-}}$ (versé)

$\mathbf{n_{I2\ (e)} = ½\ [S_2O_3^{2-}]\ Ve}$ (Ve= volume de titrage de l'essai)

La quantité de diode introduite

$\mathbf{n_{I2\ (t)} = [I_2]_o\ V_t}$ (Vt= volume de titrage de l'essai)

La quantité de diode $n_{I2(c)}$ consommée par la réaction d'oxydation

$\mathbf{n_{I2\ (c)} = n_{I2\ (t)} - n_{I2\ (e)}}$

L'activité enzymatique = $n_{I2\ (c)}$/12,5. 30 (µmol /ml min)

III.2.4. Pré-purification par précipitation à l'acétone (Fig. III. 1)

- Mettez un volume de l'extrait enzymatique (V = 50 ml) dans un Erlenmeyer maintenu dans un cristallisoir contenant de la glace (pour éviter la dénaturation de l'enzyme car c'est une réaction exothermique) ;
- Remplissez une burette avec 3V de l'acétone ;
- Versez le volume goutte à goutte jusqu'à ce que le volume de l'acétone sera totalement épuisé ;
- Laissez pendant le temps nécessaire pour la précipitation (2 heures).
- Effectuez une filtration et récupérer l'enzyme sur le filtre.
- Séchez à température ambiante.

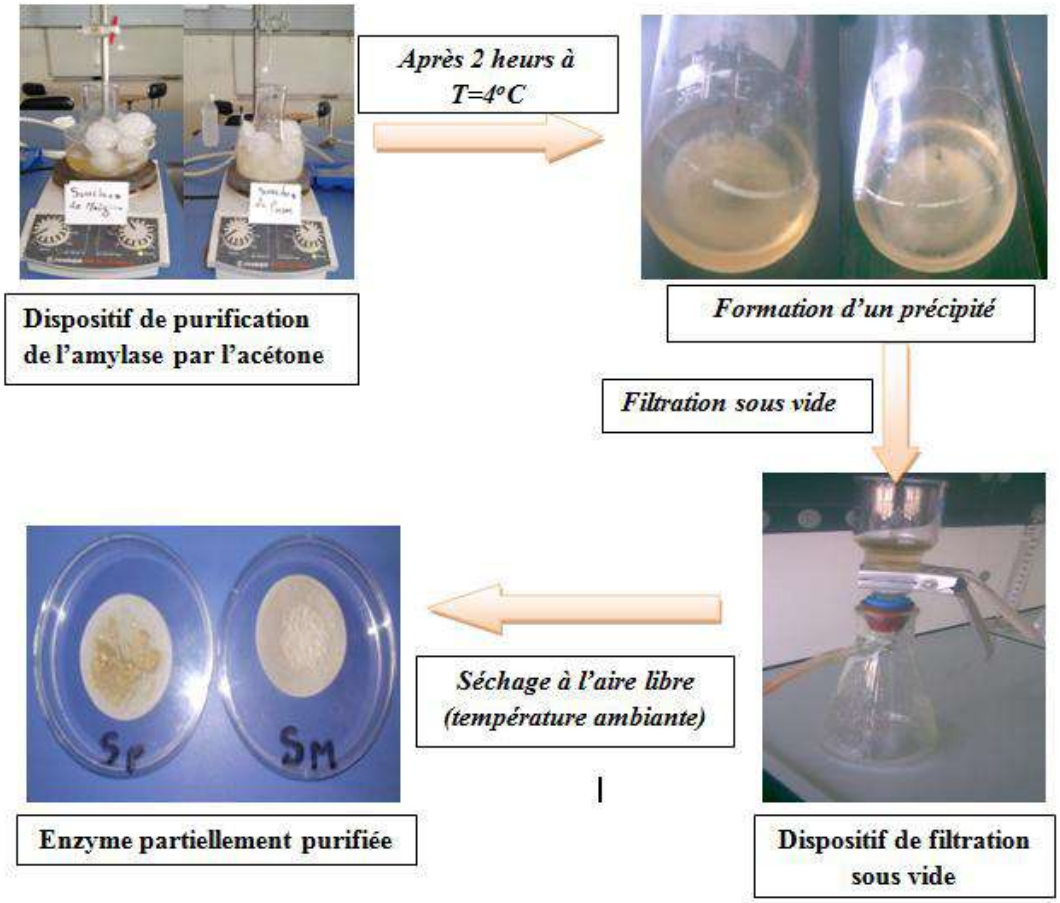


Fig. III.1. Précipitation de l'α-amylase par l'acétone

Test de l'activité enzymatique de culot

- Après le séchage, on gratte la poudre de l'enzyme et on l'a fait dissoudre dans 25 ml d'une solution tampon pH 5.
- Réalisez le test de l'activité enzymatique en préparant le milieu réactionnel précédemment cité ;
- Calculez l'activité amylasique

Calcul de rendement de précipitation

- Calcul l'activité totale :

$A_{enzy\ totale} = A_{enzy}$ X V_T (V_T = volume du milieu de fermentation 50 ml)

Calcul l'activité enzymatique de l'extrait brut (semi purifié)

$A_{enzy\ totale\ (culot)} = A_{enzy\ (culot)} \times V_{T\ (c)}$ ($V_{T\ (c)}$ = volume du culot 25 ml)

$$\mathbf{R= [\ A_{enzy\ totale\ (culot)} / A_{enzy\ totale}\ ]x100}$$

Chapitre IIII

Résultats et discussions

IV. 1. Criblage de souche productrice de l' α-amylase :

Pour la mise en évidence de l'activité amylasique chez les 6 isolats, nous avons utilisé un milieu PDA à 1 % d'amidon (milieu sélectif). Après l incubation (à température ambiante pendant 48h), nous observons des zones de lyse de différentes dimensions (tableau V. 1).

Tableau IV.1. Diamètre des zones de lyse des souches fongiques amylolytiques

La souche	Diamètre (cm)
S_T	8
S_O	8
S_R	4
S_M	**8,5**
S_P	**9**
S_F	7

Le tableau IV. 1, montre que la souche (**S_R**) présente la zone de lyse la plus faible (4 cm), suivie de la souche (**S_F)** avec un diamètre de 7 cm et en dernier les deux souches (**S_T** et **S_O)** présentes des zones de lyse de même diamètre (8cm) ; alors que les deux autres souches (**S_M** et **S_P**) ont des zones de lyse plus développée (diamètre de 8,5 et 9 cm, respectivement.) (Figure 1). Par leur forte capacité à hydrolyser l'amidon, les souches **S_M** et **S_P**, ont été sélectionnées pour la suite de ce travail.

La comparaison des diamètres des zones de lyse obtenus dans notre travail semble être nettement supérieure à ceux obtenus dans d'autres travaux similaires. Merabti (2006), a obtenu des diamètres qui varient entre 6 mm et 16,5 mm en utilisant des souches levuriennes amylolytiques sélectionnées à partir du sol saharien algérien. Tandis que, Lagzouli et al. (2007), qui ont travaillé sur la production de glucoamylase extracellulaire par *Candida guilliermondii*, ont obtenu des diamètres de zones de lyse qui varient entre 13 et 26 mm.

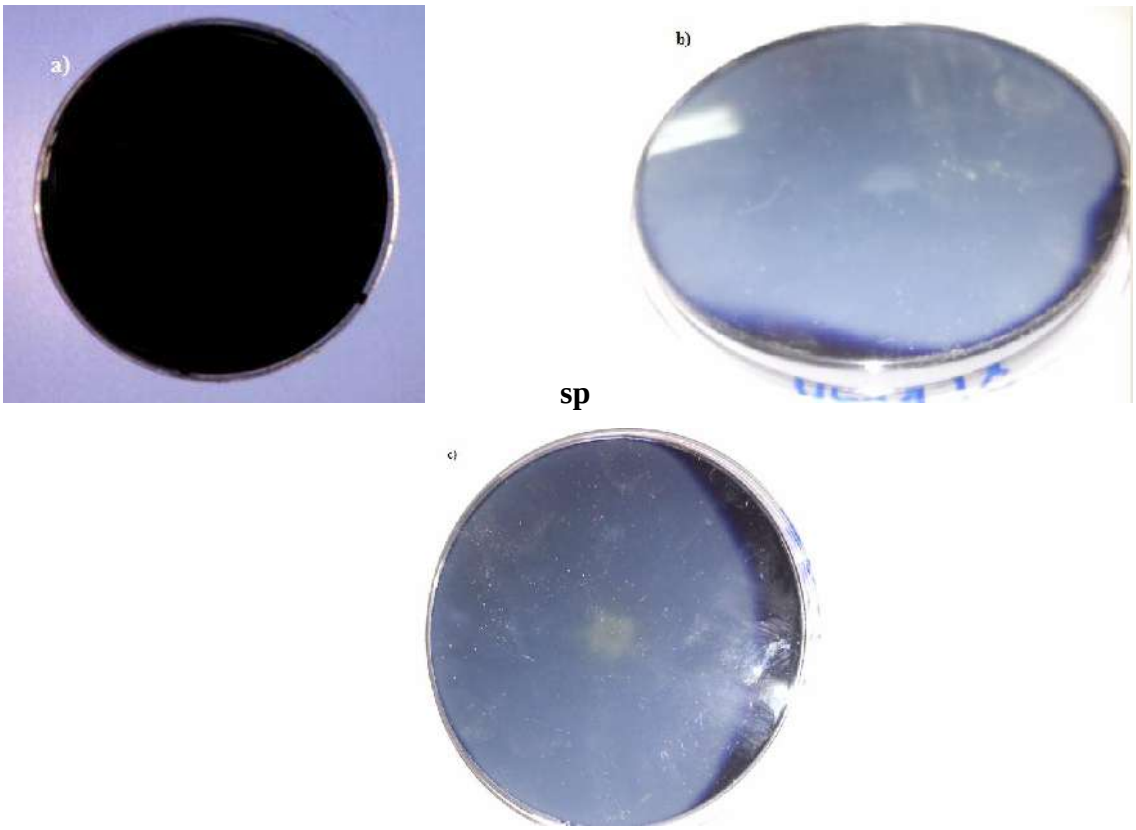


Fig. IV. 1. Test de criblage de souches amylolytiques sur PDA à 1% d amidon
(a) témoin négatif (b) S_M (c) Sp (après 48 h d'incubation à température ambiante)

IV. 2. Identification des souches sélectionnées

L'identification des souches fongiques sélectionnées est basée, non seulement sur les observations macroscopiques du mycélium fongique qui permet de déterminer l'aspect extérieur des colonies, mais également sur l'observation microscopique à l'aide d'une coloration simple au bleu de méthylène. Les résultats obtenus sont présentés dans la figure ci-dessous (Fig. V.2).

IV.2.1. La souche Sp :

L'observation macroscopique nous a permis de remarquer un développement rapide et facile sur le milieu PDA. A température ambiante et après 2 jours d'incubation, on a observé des petites colonies plates, formées de courts filaments aériens habituellement blancs. Après 3 à 4 jours d'incubation, la sporulation confère aux colonies leur teinte vert-gris avec un revers jaunâtre.

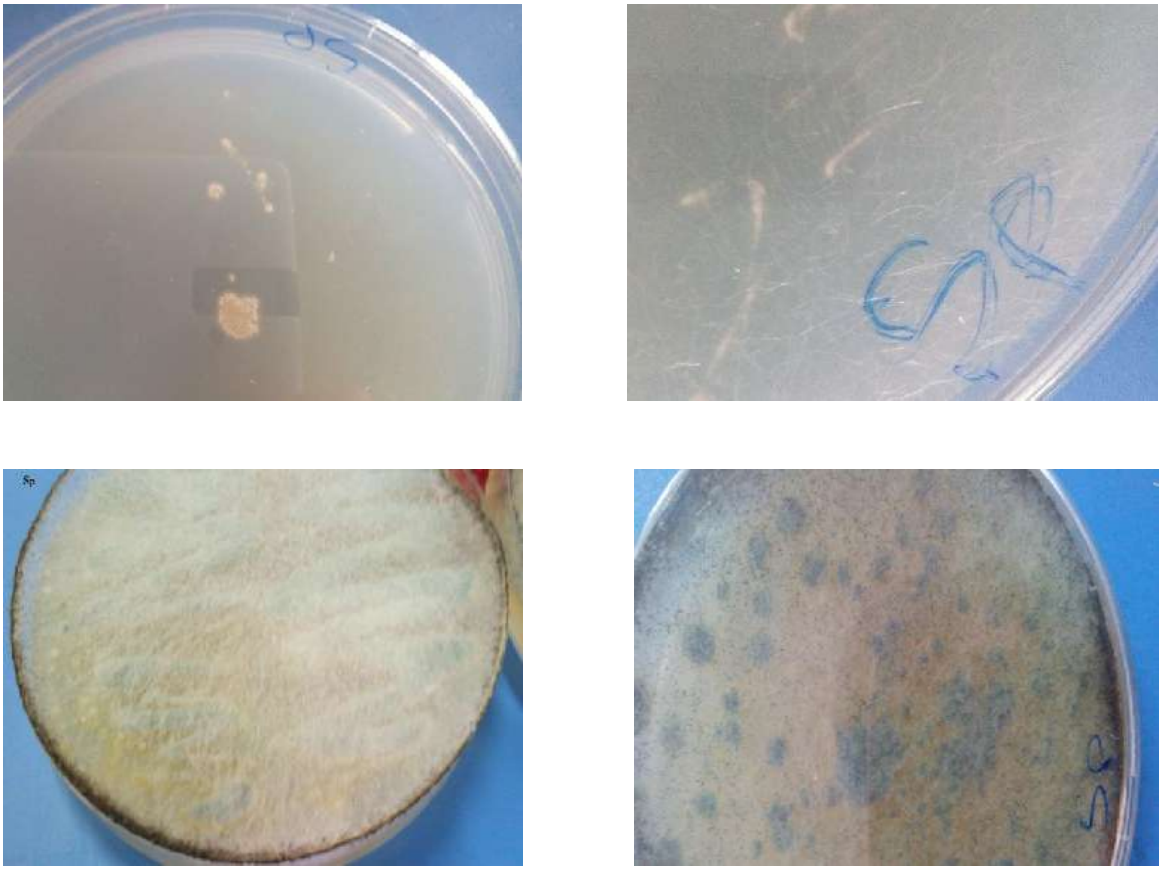


Fig. IV. 2a. Aspect macroscopique de la souche fongique isolée à partir du pain (Sp) (après 72 h d incubation à température ambiante)

L'observation microscopique, nous a permis d'observer une organisation en pinceau. Le thalle est formé de filaments mycéliens septés, prote un conidiophore ramifié. Les philiades sont insérées par l'intermédiaire de métules et donnent naissance à des conidies disposées en longues chaînes (Fig. 2b). Cette description semble correspond au genre *Penicillium* sp.

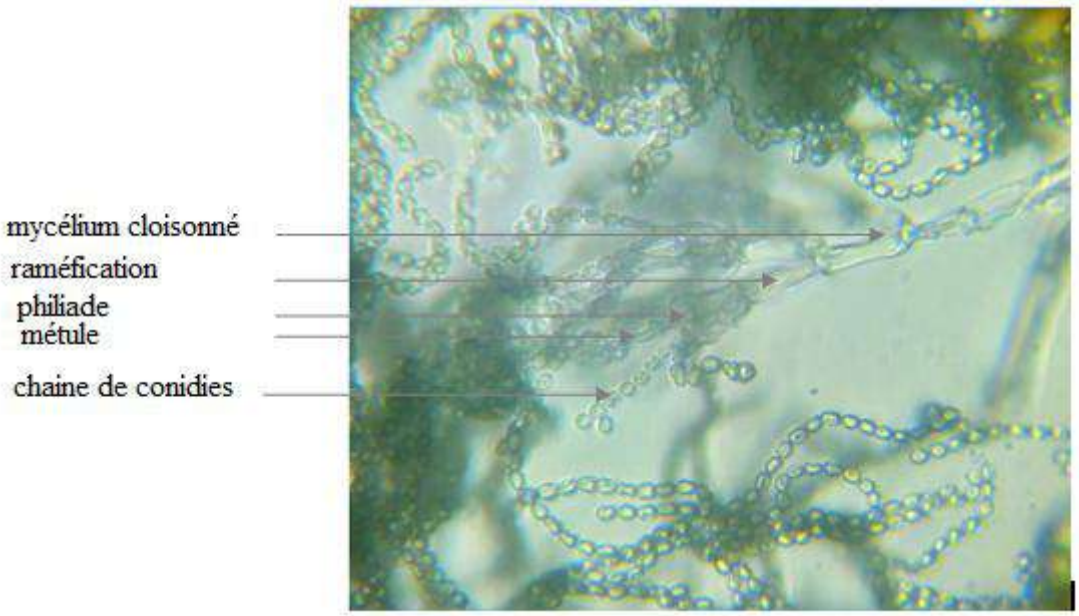
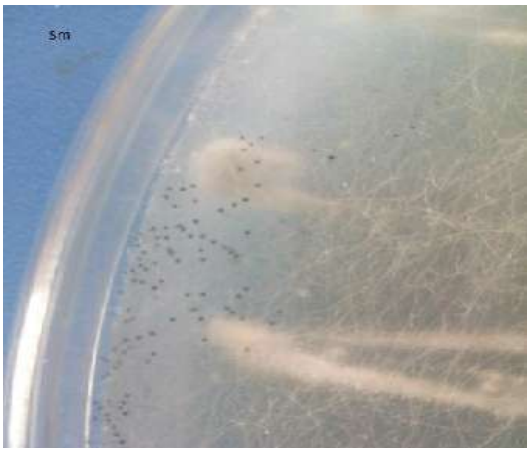


Fig. IV. 2b. Aspect microscopique de la souche fongique isolée à partir du pain (Sp) (après 72 h d incubation à température ambiante)

IV.2.2. La souche S_M :

L'observation macroscopique nous a permis de remarquer que les colonies sont d'abord blanchâtres, puis bleu-vertes et enfin vert foncé à gris noirâtres quand elles sporulent. L'observation microscopique nous a permis de constater que les mycéliums ne sont pas cloisonnés et que le sporange est globulaire on peut dire que cette moisissure appartient au genre *Mucor* sm.





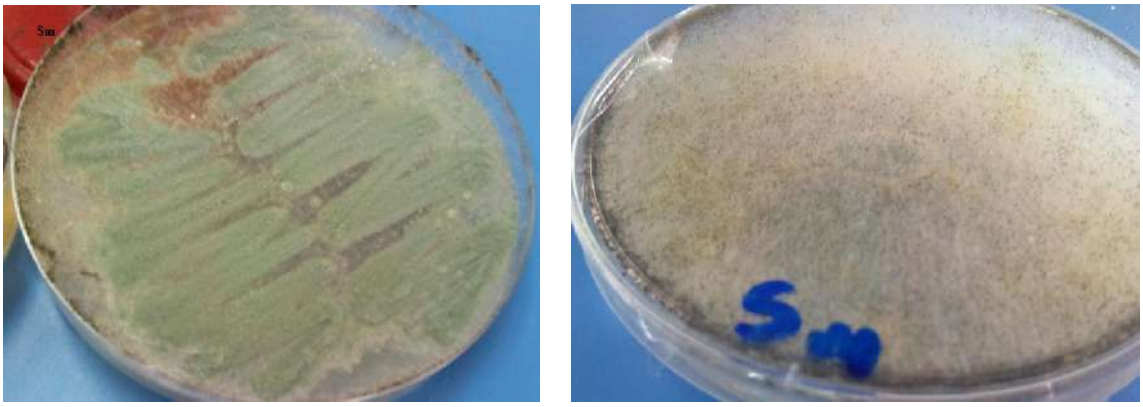


Fig. IV. 3a. Aspect macroscopique de la souche fongique isolée à partir de la maïzena (S_M)
(Après 72 h d incubation à température ambiante)

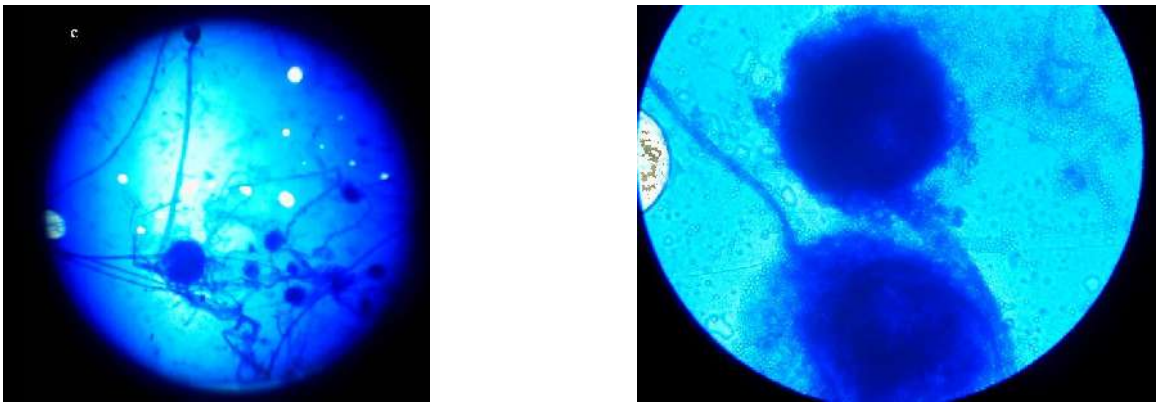


Fig. IV. 3b. Aspect microscopique de la souche fongique isolée à partir de la maïzena (S_M)
(après 72 h d incubation à température ambiante)

Donc en conclusion de cette partie, on peut dire que la souche isolée à partir du pain est ***Penicillium* sp**. Et celle isolée à partir de la maïzena est ***Mucor* sp**.

IV. 3. Cinétique de croissance des souches fongiques sélectionnées

La croissance des microorganismes est conditionnées par plusieurs paramètres physicochimiques à savoir la concentration des nutriments, la température d'incubation, le pH du milieu, le temps de fermentation…etc.

Dans cette étude, et avant d'entamer l'optimisation de la production de l'enzyme α-amylase, on a suivi l'évolution de la biomasse de chaque souche, durant le temps d'incubation d'une part, et les variations du pH du milieu, d'autre part.

Les résultats de la cinétique de croissance de la souche *Mucor* sp ainsi que la variation du pH des milieux de fermentation, sont illustrés dans la figure V. 4.

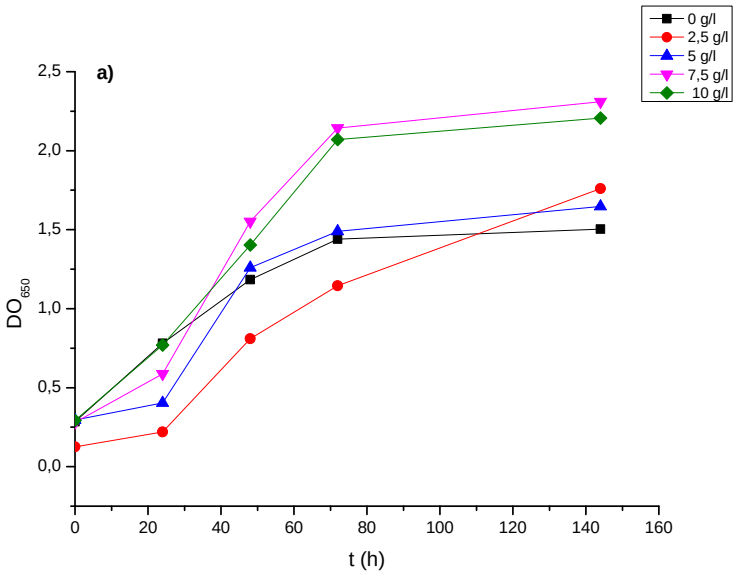


Fig. IV. 4. Evolutions de la biomasse (densité optique) en fonction du temps à différentes concentrations initiales en amidon de *Mucor* sp (pH libre, température ambiante)

Les cinétiques de l'évolution de la biomasse de *Mucor* sp (Fig. IV. 4) montre que, pour les concentrations initiales en amidon 2,5 g/l, 7,5 g/l et 5 g/l, l'existence de 4 phases de croissance :

[0- 24h] : une phase de latence.

[24h- 50h] : une phase exponentielle avec une DO de 0,81 pour 2,5 g/l, 1,26 pour 5 g/l et 1,55 pour 7,5 g/l.

[50- 72h] : une phase de décélération pour 5 g/l et 7,5 g/l. Tandis qu'une une longue et lente phase de décélération, allant jusqu'à 140, pour la concentration 2,5 g/l en amidon avec un maximum de biomasse de 1,504.

[72- 140h] une phase stationnaire avec un maximum de 1,49 et 2,143 pour 5 g/l et 7,5 g/l, respectivement.

Pour les concentrations initiales en amidon 0 g/l et 10 g/l on note l'absence de phase de latence, ce ci peut être du à ce que la préculture contient 10g/l d'amidon ce qui justifie l'adaptation de la souche à ces conditions.

[0- 72h] : une longue et importante phase exponentielle à 10 g/l avec un maximum de production de 2,07. Ensuite de [72- 140h], une phase stationnaire avec un maximum de DO de 2,207.

Par contre avec 0 g/l en amidon, la phase exponentielle atteint son maximum à 50h avec une DO de 1,184. [50- 72h], une phase de décélération et en fin la phase stationnaire avec un maximum de production de 1,504 de 72h jusqu'à 140h.

Les résultats de la cinétique de croissance de la souche *Penicillium* sp ainsi que la variation du pH des milieux de fermentation, sont illustrés dans la figure V. 5.

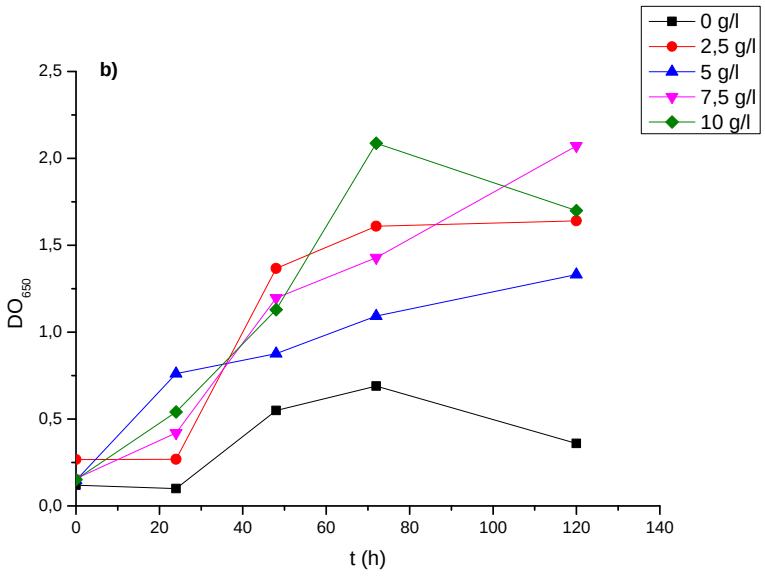


Fig. IV. 5. Evolutions de la biomasse (densité optique) en fonction du temps à différentes concentrations initiales en amidon de *Penicillium* sp (pH libre, température ambiante)

Les cinétiques de l'évolution de la biomasse de *Penicillium* sp (Fig. IV. 5) montre que, pour les concentrations initiales en amidon 0 g/l et 2,5 g/l, la cinétique de la biomasse présente la même évolution. Il existe 4 phases de croissance :

[0- 24h] : une phase de latence.

[24h- 50h] : une phase exponentielle avec une DO de 0,549 pour 0 g/l et 1,366 pour 2,5 g/l.

[50- 72h] : une phase de décélération avec un maximum de 0,69 et 1,61 pour 0 g/l et 2,5 g/l, respectivement.

[72- 120h] : une phase de déclin.

Pour les concentrations initiales 5 g/l et 10 g/l, on note l'existence de 2 phases de croissance :

Avec 5 g/l en amidon, [0- 24h] : une phase exponentielle avec une DO de 0,761 et une longue phase de décélération allant de [50- 72h], avec un maximum de 1, 331.

Avec 10 g/l en amidon, une longue phase exponentielle de [0- 72h], avec une DO maximale de 2,087 et une phase de déclin de [72- 120].

Quant aux variations du pH (Fig IV. 6 et Fig. IV. 7), ce dernier varie à son tour d'une souche à l'autre en fonction de la concentration initiale en amidon et le temps d'incubation.

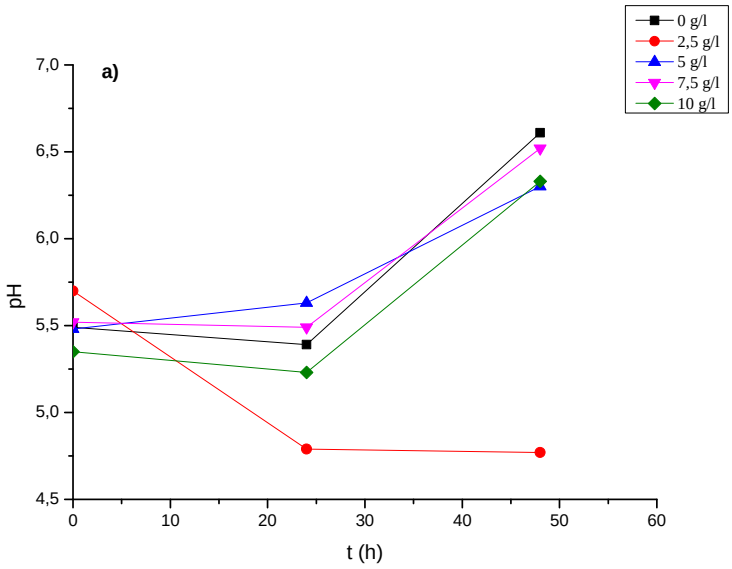


Fig. IV. 6. Evolutions du pH du milieu de fermentation en fonction du temps à différentes concentrations initiales en amidon de *Mucor* sp (pH libre, température ambiante)

Pour la souche *Mucor* sp (Fig IV. 6), on remarque que pour toutes les concentrations, le pH diminue progressivement dés les premières heures d'incubation pour atteindre des valeurs minimales qui tourne autour de 5,63 jusqu'à 4,79 avec la concentration 2,5 g/l en amidon, au bout de 24h. Au delà de 24h, on note la remonté du pH jusqu'à des valeurs qui

tournent autour de 6 sauf pour la concentration 2,5 g/l ou le pH se stabilise à la valeur 4,77 jusqu'à la fin de la fermentation. La remontée du pH est probablement du à un métabolisme oxydatif ou il y a eu épuisement total de la source de carbone. Par contre à 2,5 g/l, on note une acidité persistante qui s'explique par un métabolisme fermentaire de la souche étudiée.

Pour la souche *Penicillium* sp, la figure IV.7, montre qu'il y a diminution du pH du milieu de fermentation dés les premières heures de fermentation pour atteindre une valeur qui tourne autour de 5 pour les concentrations 0 g/l, 7,5 g/l et 10 g/l au bout de 24h, qui remonte pour atteindre une valeur de 6 pour ces mêmes concentrations. .

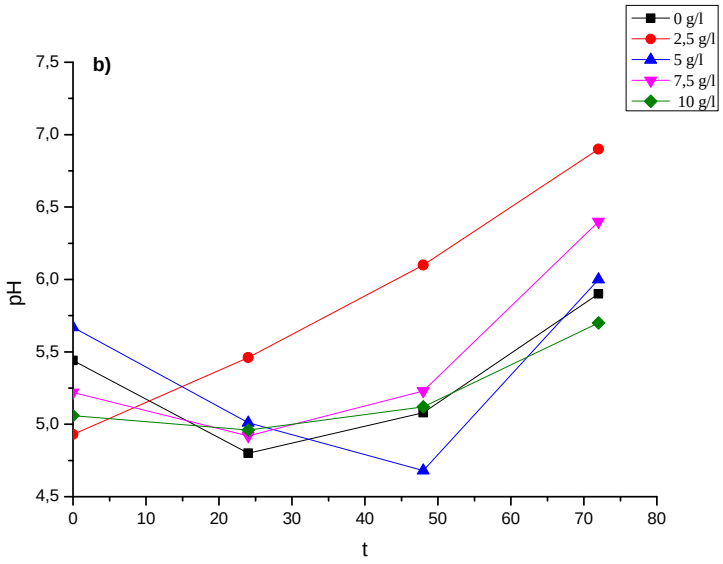


Fig. IV. 7. Evolutions du pH du milieu de fermentation en fonction du temps à différentes concentrations initiales en amidon de *Penicillium* sp (pH libre, température ambiante)

Pour 5 g/l en amidon, on note une diminution en continu du pH pour atteindre une valeur minimale de 4,68 au bout de 48h, puis remonte à pH 6 au bout de 72. Par contre à 2,5 g/l en amidon, on note une remontée du pH dés le début de la fermentation pour atteindre un pH 7 au bout de 72h.

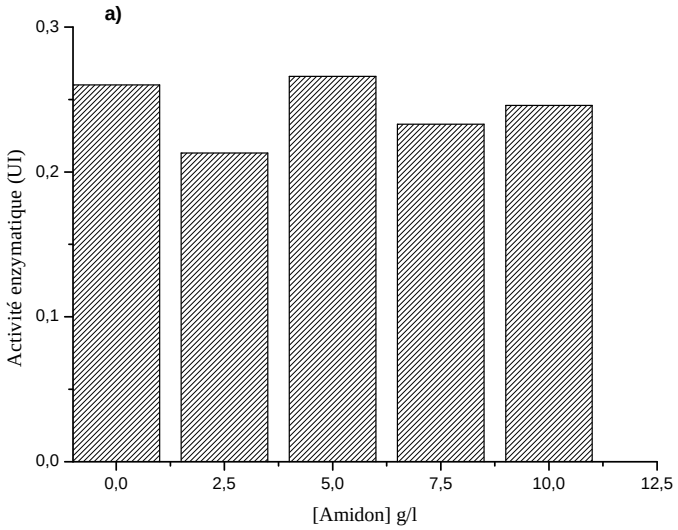
IV. 4. Optimisation de la production d'α-amylase

Plusieurs paramètres physico-chimiques peuvent influencer la croissance des souches fongiques et par conséquent, la production de l'enzyme α-amylase.

Les paramètres qui ont été optimisés dans notre travail sont : la concentration initiale en amidon (0- 10 g/l), le pH initial du milieu de fermentation (3, 4.5, 5.5, 6, 7 et 8), la source d'azote minérale ou on a testé l'influence de l'urée et le chlorure d'ammonium (NH_4Cl) et le temps de fermentation (24h, 48h, 72h, 96h, 120h et 168h).

IV.4.1. La concentration en amidon

Dans le but de déterminer la concentration optimale de production de l'α-amylase par les souches de *Penicillium* et *Mucor* cultivées sur milieu de production (voir annexe). L'influence de la concentration d'amidon sur la production de l'enzyme α-amylase, a été estimée par le calcul de l'activité enzymatique exprimée en unité internationale (UI/ml) qui correspond à la quantité de maltose, en micromole, libéré par hydrolyse de l'amidon par millilitre d'enzyme par minute. Les résultats obtenus sont illustrés dans la figure IV. 8.



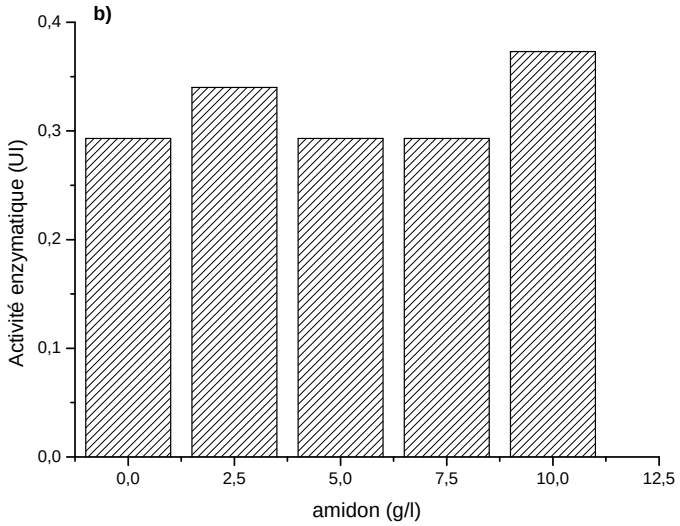


Fig. IV. 8. Influence de la concentration initiale en amidon sur l'activité enzymatique de (a) *Mucor* sp. (b) *Penicillium* sp. (pH libre, à température d'incubation)

On constate que pour la souche de *Mucor* sp l'activité maximale 0,266 UI/ml (10640 µM/mn.l) est obtenue avec une concentration de 5 g/l en amidon. Alors que, pour *Penicillium*, l'activité maximale 0,373 UI (14920 µM/mn.l) a été obtenue avec une concentration de 10 g/l en amidon.

L'étude réalisée par Lagzouli et *al*. (2007), qui consiste en la production de glucoamylase extracellulaire par *Candida guilliermondii*, a donné une activité maximale de 792 µM/mn.l. Merabti (2006) a pu obtenir une activité amylasique maximale de 6582U en utilisant la levure *Lipomyces* sp. isolée à partir du sol saharien algérien et cultivée sur des rebuts de dattes (Hchefs) enrichi. Anto et al. (2006), ont obtenu une activité de 94U/g de substrat en utilisant *Bacillus cereus* cultivé sur des déchets de riz.

L'étude de production d'α-amylase par une souche *d'Aspergillus niger* isolée à partir du sol et cultivée sur des substrats bon marchés tel que son de blé, balle de riz, déchets de légumes (pomme de terre, tomate, aubergine) et la peau de banane, a montré que la meilleure activité enzymatique 0,08 U/mn.ml a été obtenue avec le son de blé, suivi par les déchets de légumes 0,06 U/mn.ml, peau de banane 0,05 U/mn.ml (Khan et Kumar, 2011).

IV.3.2. Le pH initial

L'influence du pH initial sur la production d'α-amylase été étudiée en faisant varier le pH initial du milieu de fermentation. Les résultats obtenus sont illustrés dans la figure IV. 9.

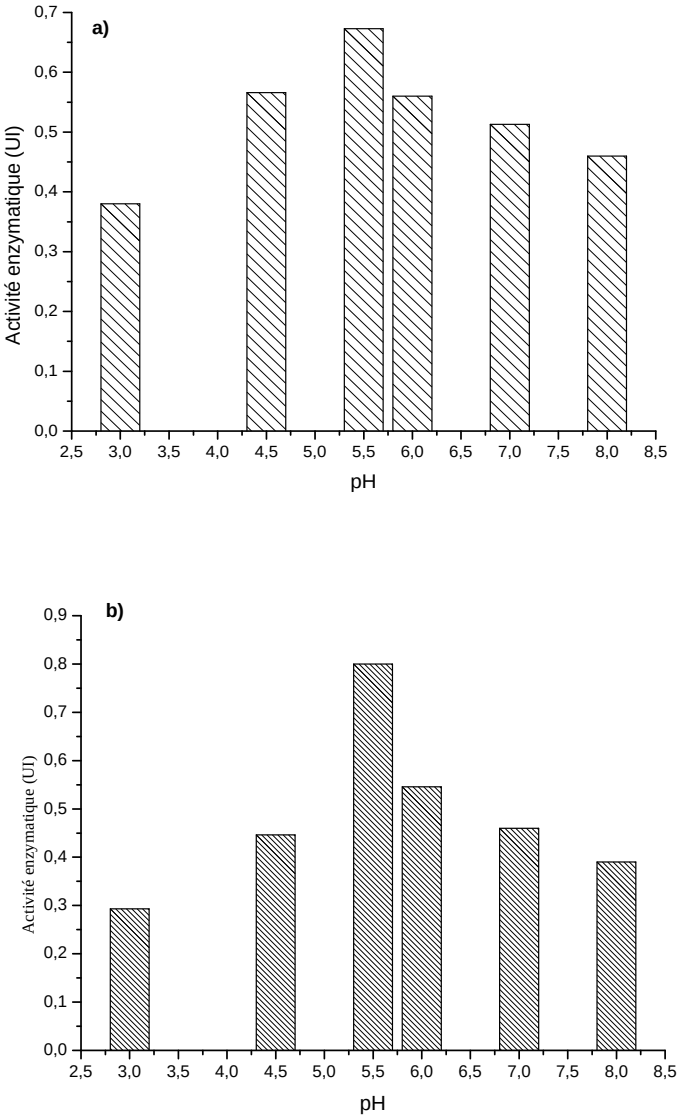
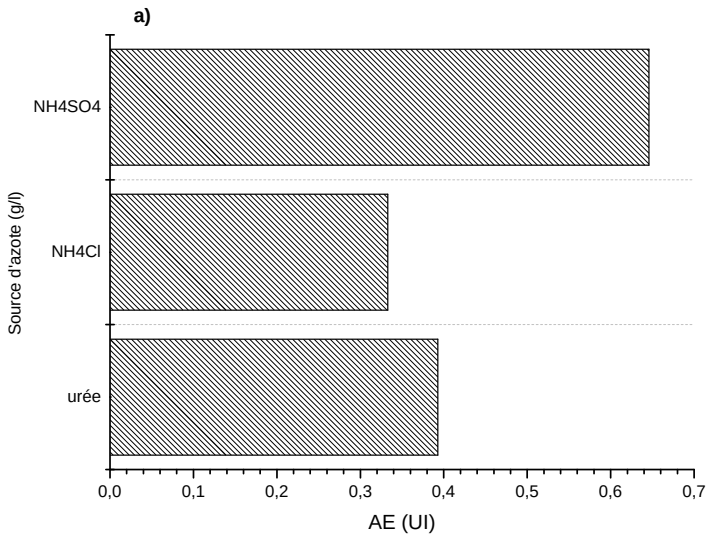


Fig. IV. 9. Influence du pH initial du milieu de fermentation sur l'activité enzymatique de (a) *Mucor* sp. (5 g/l d'amidon, pH libre, à température d'incubation) (b) *Penicillium* sp. (10 g/ d'amidon, pH libre, à température d'incubation)

On remarque que l'activité enzymatique maximale 0,673 UI/ml et 0,8 UI/ml ont été obtenue à pH 5,5 par *Mucor* sp. et *Penicillium* sp., respectivement. Ce résultat corrobore avec celui rapporté par la bibliographie (Lagzouli et al., 2007). Par contre, Anto et al. (2006) ont montré que le pH optimal de la production d'α-amylase par *Bacillus cereus* est 5.

IV.3.3. La source d'azote minérale

Le milieu de production utilisé dans notre travail contient une source d'azote minérale sulfate d'ammonium $(NH_4)\ SO_4$ en association avec l'extrait de levure. Dans le but d'étudier l'influence d'autres sources d'azote minérale sur la production de l'α-amylase, nous avons utilisé l'urée et le NH_4Cl à la place du $(NH_4)\ SO_4$. Les résultats obtenus sont présentés dans la figure IV. 10.



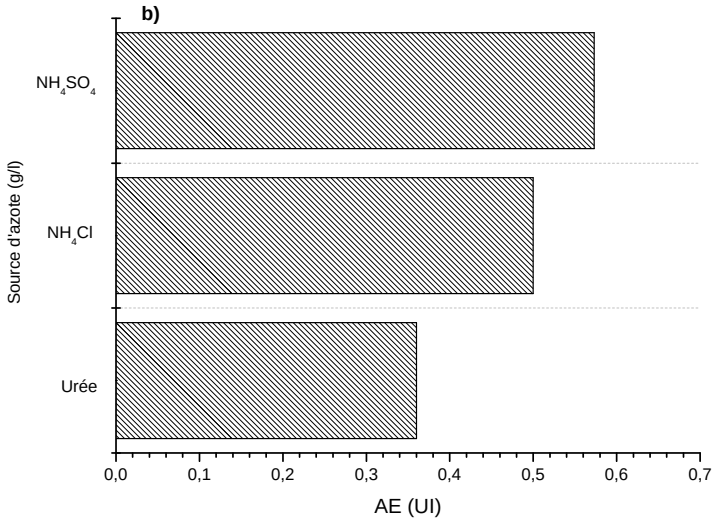


Fig. IV. 10. Influence de la source d'azote minérale sur l'activité enzymatique de (a) *Mucor* sp. (5 g/l d'amidon, pH 5,5, à température d'incubation) (b) *Penicillium* sp. (10 g/ d'amidon, pH 5,5 à température d'incubation)

Les résultats obtenus montrent que, *Mucor* sp. présente la plus forte activité enzymatique 0,646 UI/ml avec l'association NH_4SO_4/ extrait de levure, 0,393UI/ml et 0,333UI/ml avec les associations Urée/ extrait de levure et NH_4Cl/ extrait de levure, respectivement. Le même résultat a été obtenu avec *Penicillium* sp. Ou l'association NH_4SO_4/ extrait de levure a donné 0,573 UI/ml. Tandis que, l'association NH_{4Cl}/ extrait de levure a donné une activité enzymatique (0,5 UI/ml) plus importante que celle donnée par l'association Urée/ extrait (0,36 UI/ml). Lagzouli et al. (2007), ont testé d'autres associations. Ils ont trouvé que l'association Urée/ extrait de levure a donné la meilleure activité enzymatique (2519 µM/l.mn), suivi de l'association peptone/ urée (1930 µM/l.mn) et enfin l'association extrait de viande/urée (1706 µM/l.mn).

IV.3.4. Le temps de fermentation

Le temps de fermentation est un paramètre très important et qui influence fortement les rendements de production dans les bioprocédés. Les résultats de l'évolution de la production enzymatique en fonction du temps nous ont permis d'obtenir la figure suivante.

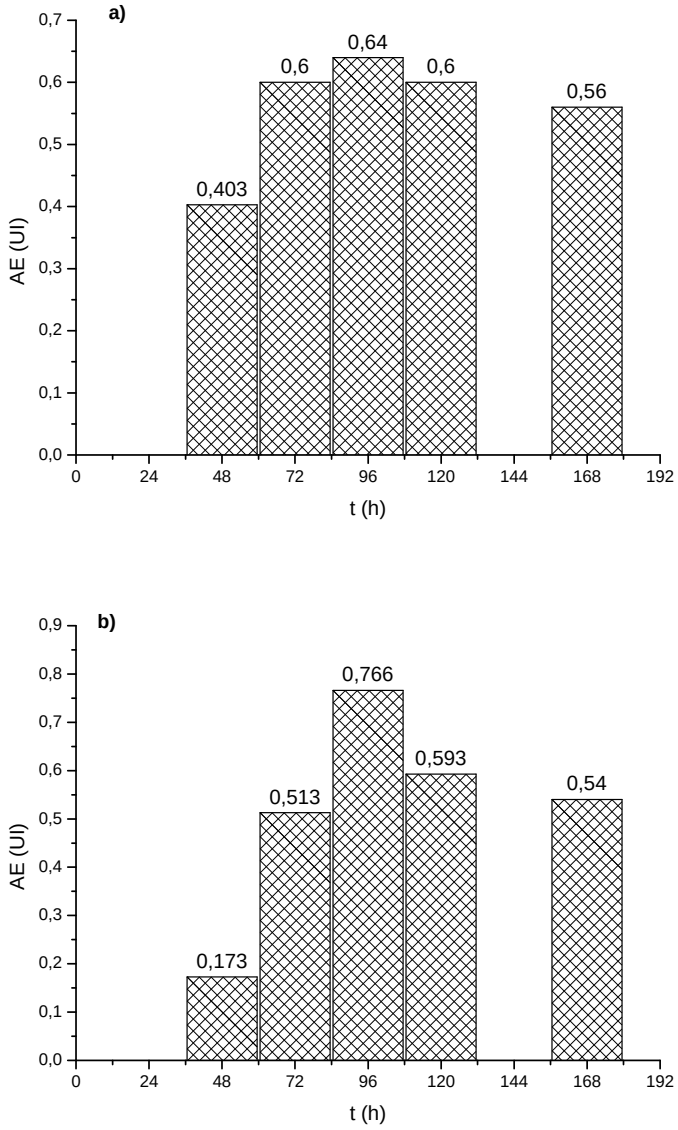
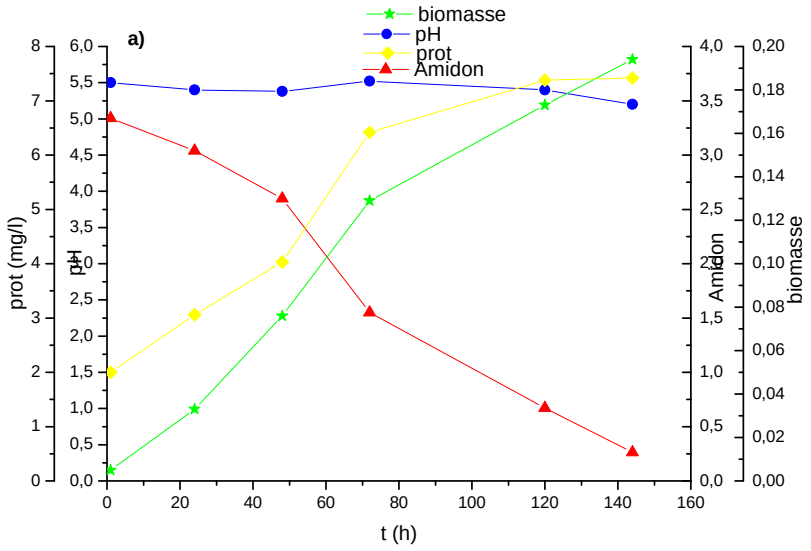


Fig. IV. 11. Influence du temps de fermentation sur l'activité enzymatique de (a) *Mucor* sp. (5 g/l d'amidon, pH 5,5, à température d'incubation) (b) *Penicillium* sp. (10 g/ d'amidon, pH 5,5 à température d'incubation)

La figure IV. 11, montre qu'au bout de 96h de fermentation une activité enzymatique maximale de 0,64 UI et 0,766 UI est obtenue par *Mucor* sp. et *Penicillium* sp. Lagzouli et al. (2007), ont obtenu une activité maximale de 2519 µM/l.mn au bout de 72h.

Comparativement à d'autres études, ce temps varie d'une souche à une autre et d'un milieu à un autre dont le maximum d'activité amylasique est observé au cours de la phase d'accélération de la croissance ; 78 heures pour la souche *Lipomyces sp* cultivée sur un milieu à base de déchets de dattes (Merabti, 2006) avec une activité maximale de 6582U. Tatsinko et al. (2005), ont trouvé un maximum d'activité (298.5±01 g/ml.h) au bout de 48h en cultivant une souche de levure isolée à partir du sol et cultivée sur des grains de blé.

Dans le but de comprendre ce qui se passe à l'intérieur du fermenteur, on a suivi les cinétiques de l'évolution de la concentration des protéines, du pH, de la densité optique de l'amidon et de la biomasse en fonction du temps pour *Mucor* sp et *Penicillium* sp dans les conditions optimales (pH 5,5, NH_4SO_4/extrait de levure, température ambiante) et concentration en amidon de 5 g/l et 10 g/l, respectivement. Les résultats obtenus sont présentés dans la figure IV. 12.



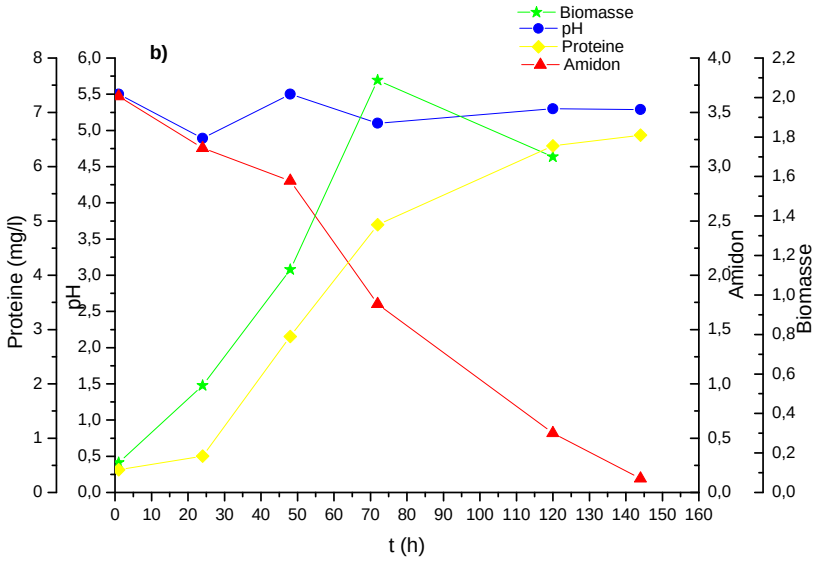


Fig. IV. 12. Evolutions de la concentration des protéines, du pH, de la densité optique de l'amidon et de la biomasse en fonction du temps à (a) 5g/l pour *Mucor* sp et (b) 10 g/l pour *Penicillium* sp (pH 5,5, NH_4SO_4/extrait de levure, température ambiante)

Pour les deux graphes, on remarque une évolution rapide de la reproduction cellulaire caractérisée par l'absence de phase de latence et une longue phase exponentielle, permet d'atteindre une croissance maximale de 0.127 et 2.087, au bout de 72, pour les deux souches *Mucor* sp et *Penicillium* sp, respectivement. On remarque également que l'évolution de la concentration en protéine présente la même allure que celle de la biomasse ou le maximum de production de protéine 7.42 mg/l pour *Mucor* sp à 144h.

Pour *Penicillium* sp le maximum de protéine est de 5.66 mg/l au bout de 96h en coïncidence avec la phase de déclin, puis elle augmente lentement pour atteindre un maximum de 6.58 mg/l à la fin de la fermentation.

Le maximum de protéines produites pendant la phase de décélération et de déclin pour les deux souches explique l'activité enzymatique maximale obtenue, car pendant ces phases la cellule essaye de se maintenir en vie donc elle produit encore l'α-amylase pour assimiler l'amidon et les oligosaccharides. Au-delà de ce temps on a remarqué une faible augmentation des protéines et diminution de l'activité enzymatique. Ce –ci peut être expliqué par l'arrêt de la production de l'enzyme α-amylase et peut être à la libération du contenu cellulaire après la lyse de ces dernières (phase de déclin sur la figure IV.12).

En effet, l'activité amylasique était maximale 0.64 UI/ml et 0.766 UI/ml à 96h, dans ces conditions pour les deux souches *Mucor* sp et *Penicillium* sp, respectivement. Ce mécanisme d'activité s'explique probablement par les changements morphologiques et physiologiques des souches fongiques influençant la production de l'α-amylase.

Le temps de fermentation nécessaire pour atteindre une activité amylasique maximale optimale est le même pour les deux souches (96h) (Fig.IV. 11). La figure, montre que l'enzyme commence à apparaitre après 48h d'incubation, pour les deux souches. Ceci peut être expliqué par le fait qu'au début de fermentation (24heures), les souches utilisent les nutriments, tel que le glucose qui provient de la préculture. Cependant, au-delà de 24 heures et avec l'épuisement du glucose, les souches s'adaptent au milieu, et commencent à secréter des enzymes extracellulaires, telles que l'α-amylase leur permettant de dégrader l'amidon pour garantir leur survie. La faible production d'α-amylase en présence d'amidon et de glucose suggèrent que l'enzyme produites par *Mucor* sp et *Penicillium* sp est une enzyme fortement induite par l'amidon, et que son activité est probablement sous l'effet d'une répression catabolique du glucose.

La répression catabolique de l'expression des gènes est un système de normalisation fondamental et omniprésent, à fin de répondre aux changements de disponibilité nutritive (Chung et al., 1998). Des études (Bhella et Altossar, 1987), ont démontré que la biosynthèse de l'α-amylase est régulée uniquement par répression au cours de la transcription et/ou au cours de la traduction. Chez les micro-organismes, le glucose ou d'autres sources de carbone rapidement métabolisables, répriment l'expression des gènes qui codent pour des enzymes liées au métabolisme d'autres sources de carbone (Chung et al., 1998).

En effet, la répression catabolique de la production de l'α-amylase par le glucose à forte concentration, est mise en évidence chez *Aspergillus oryzae* (Morkeberg et al., 1995) , *Streptomyces kanamyceticus* (Flores et al.,1993), *Bacillus* sp (Kichakova, 1991) et notamment chez les levures *Lipomyces kononenkoa*e (Sa-Correia et Van Uden, 1981) et *Schwanniomyces castelli* (Pasari et al.,1987).

Par ailleurs, l'amidon, le maltose et d'autres oligosaccharides, sont décrits comme inducteurs des amylases (Fabiana et al., 2001). Néanmoins, dans certains cas, le maltose n'assure pas la production de niveaux élevés de l'α-amylase, car il est aisément hydrolysé en

glucose et la production de l'enzyme est négativement affectée (Sadhukhan et al.,1992 ; Brock et al.,1994 ; Ray et al.,1996). Ceci, peut expliquer la diminution de l'activité enzymatique des deux souches au delà de 96h (Fig. IV. 11).

Le pH initial de la culture a été fixé à 5,5, pour une activité maximale pour les deux souches. Et on remarque que le pH est resté stable pendant toute la durée de la fermentation. Des valeurs similaires variant de 5 à 6,5 ont permis de donner un maximum de production des enzymes amylolytiques chez *Filobasidium capsuligenum* (De mot et Verachtert, 1985). Un pH de 5,5 chez *Candida guilliermondii* (Lagzouli et al., 2007) et *Lipomyces kononenkoae* (Spencer, 1982) a permis de donner une meilleure production d'enzymes amylolytiques. De même, d'après Taylor et al. (1978), *Humicola lanuginosa* produit deux formes de glucoamylases, présentant un optimum de pH de 4,9 et de 6,6. Contrairement à d'autres bactéries, un *Bacillus* a présenté un optimum de pH pour la croissance et la production d'amylase de 7 (Teodoror et Martins, 2000).

L'amidon ajouté au milieu de culture à 5 g/l et 10 g/l, pour *Mucor* sp et *Penicillium* sp, respectivement, a permis d'obtenir une activité enzymatique maximale. La même concentration (5 g/l) a été utilisée pour la production de glucoamylase par *Candida guilliermondii* (lagzouli et al., 2007), *Filobasidium capsuligenum* (Kiran et al., 2005), *Clostridium thermosulfurogenes* (Hyun et Zeikus, 1985) et *Clostridium thermohydrosufuricum* (Pedersen et Nielsen, 2000), alors que pour d'autres espèces de levures, comme *Lypomyces kononenkoae (*Spencer, 1982*)* et *Schwanniomyces alluvius* (Madi et al., 1987), la concentration en amidon utilisée pour produire l'α-amylase est de 10 g/l.

L'α-amylase pré-purifiée par précipitation à l'acétone. Le rendement de précipitation obtenu est de l'ordre de 27.81% dans le cas de l'α-amylase provenant du *Mucor* sp. et 22.59% dans le cas de l'α-amylase provenant de la souche du *Penicillium* sp. Ces faibles rendements sont probablement du à la faible concentration en protéines dans les deux cultures qui est de l'ordre de 7.42 mg/l et 6.58 mg/l, à la fin de fermentation de *Mucor* sp. et *Penicillium* sp., respectivement.

Conclusion générale

Les enzymes actives sur l'amidon ont depuis longtemps suscité un intérêt pour leur utilisation potentielle en industrie (amidonnerie) pour l'hydrolyse de l'amidon ou la production de dérivés de l'amidon. Par ailleurs, dans le domaine médical, l'α-amylase, enzyme recombinante, peut être utilisée comme aide digestive.

L'objectif de notre travail était de produire l'enzyme α-amylase par fermentation fongique et qui a été réalisé en deux parties. Le première consistait en criblage de souches productrices d'enzymes amylolytiques et la deuxième partie portait sur l'optimisation de la production d'α-amylase.

En effet, l'isolement des moisissures, a permis de sélectionnés 6 souches (S_T, S_O, S_R, S_M, S_P et S_F). Pour le criblage, nous avons utilisé un milieu PDA à 1% d'amidon. Toutes les souches étudiées possèdent une activité amylolytique. Cependant, les souches S_M, S_P s'avèrent plus performantes. Elles ont ensuite subi des tests pour leur caractérisation : études macroscopique et une étude microscopique à l'aide de la coloration simple. La souche S_M semble appartenir au genre *Mucor* et la souche S_P semble appartenir au genre *Penicillium*.

Pour l'optimisation de la production d'alpha amylase Les paramètres qui ont été optimisés dans notre travail sont : la concentration initiale en amidon (0- 10 g/l), le pH initial du milieu de fermentation (3, 4.5, 5.5, 6, 7 et 8), la source d'azote minérale ou on a testé l'influence de l'urée et le chlorure d'ammonium (NH_4Cl) et le temps de fermentation (24h, 48h, 72h, 96h, 120h et 168h).

L'étude cinétique, de la production de l'α-amylase, révèle que les conditions optimales de l'activité enzymatique maximale (0.64 UI) obtenue par la souche *Mucor* sp sont 5 g/l en amidon à pH 5.5 en utilisant l'association NH_4SO_4/ extrait de levure pendant un temps d'incubation de 96h.

Alors que, pour la souche *Penicillium*, l'activité maximale 0,766 UI a été obtenue avec une concentration de 10 g/l en amidon à pH initial 5.5 pendant 96h d'incubation.

La précipitation par l'acétone a donné de très faible rendement, 27.81 % pour *Mucor* sp et 22.59 % pour *Penicillium* sp, respectivement. Ces rendements sont, probablement, dus aux faibles concentrations en protéines dans le milieu de fermentation 7.38 mg/l pour *Mucor* sp et 6.38 mg/l pour *Penicillium* sp.

En perspectives, on propose

- Une identification des espèces des souches isolées ;
- Une optimisation du milieu de production de l'alpha-amylase en étudiant tout les paramètres qui peuvent influencer ce bioprocédé et en utilisant des substrat bon marchés riches en sucres et éléments minéraux ;
- Une purification plus poussée et caractérisation de l'enzyme et pourquoi pas faire une application en industries alimentaires ou pharmaceutique.

Références bibliographes

- A -

- Ashraf, H., MA, Q., & Iqbal, J. "Pearl millet, a source of alpha amylase production by *Bacillus licheniformis*". Bioresource technology, 96 (10), 1201-1204.

- B -

- Berry D . R and Paterson .A.(1990). Enzymes in food industry *In*: Sucking C.J.(ed.), Enzyme chemestry impact and application . Editions chapman and hall Lordon, 2nd edition. p: 306-351.

- Boiron p. (1996). Organisation et Biologie des champignons. Edition Nathan, 149p.

- Botton B., Breton A., Fevre M., Gauthier S., Guy P.H., Larpent J.P., Reymond P., Sanglier J.J., Vayssier Y., Veau P., 1990. Moisissures utiles et nuisibles importance industrielle. 2ème édition. Masson. Collection Biotechnologies, pp.34-428.

- Bourgeois C.M., Mescle J.F. et Zucca J., 1989. Microbiologie alimentaire. Aspect

- C -

- Carlsen M., J. Nielsen, J. Villadsen, 1996. "Growth and a-amylase production by *Aspergillus oryzae* during continuous cultivations" Journal of Biotechnology., 45, 81-93.

- Chahrour Wassila, 2013. La transformation des sucres solubles des fourrages en acide lactique et propionique par les bactéries lactiques naturellement présentes sur le fourrage. Thèse de Doctorat LMD, Université d'Oran.

- Cours SVT / 1re S, La structure des enzymes, Maxicours.mht, paris 2000-2012.

- Chi, Z., Chi, Z., Liu, G., Wang, F., Ju, L., & Zhang, T. "*Saccharomycopsis fibuligera* and its applications in biotechnology". *Biotechnology advances*, *27* (4), 423-431, (2009).

- Couto, S. R., & Sanromán, M. A. "Application of solid-state fermentation to food industry-a review" Journal of Food Engineering, 76 (3), 291-302, (2006).

- Cuveillier G. F. (1999). Réacteurs enzymatiques à enzymes libres. In Scriban R. (Ed) :Biotechnologie. Ed. Lavoisier. 401-425.

- D -

- Davet R., 1997. La Communauté Fongique : Son organisation et rôle dans l'écosystème. Marcel Dekker, Inc., New York.

- Davies G.J., and Henrissat H. (1995). Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. *Structure*, 3, p: 853–859.

- Djekrif-Dakhmouche S., Z. Gheribi-Aoulmi, Meraihi Z.,L.Bennamoun, 2005. "Application of a statistical design to the optimization of culture medium for a-amylase production by *Aspergillus niger* ATCC 16404 grown on orange waste powder" . Journal of Food Engineering. 73, 190-197.

- E -

- Egas M. C., Da Cota M. S., Cowman D. A. et Pieres E. M. (1998). Extracellular α-amylase from *Thermus Filiformis* ork A2: purification and biochemical characterization. Extremophiles. 2(1): 23-32

- F -

- Fogarty W. M. et Kelly, C. T., 1994. Microbial Enzymes and Biotechnology .*Applied Science*, London, New York. (43):71-132.

- G -

- Gupta A., Gupta V-K., Modi D-R. et Yadava L-P., 2008. Production and characterization of α- amylase from *Aspergillus Niger*. *Biotechnologie* **7** (**3**), pp.551-556. Asian Network For Scientific Information. ISSN 1686-296X..

- Gupta, R., Gigras, P., Mohapatra, H., Goswami, V. K., & Chauhan, B. "Microbial α-amylases: a biotechnological perspective", *Process Biochemistry*, *38* (11), 1599-1616, (2003).

- H -

- Haki G. D. and Rakshir S. K., 2003. "Developments in industrially important thermostable enzymes: a review". Bioresource technology. 89, 1, 17- 34.

- Halwyn. M.A., Lercterc J.M., King N., Belonger M., Legris M. et Frenett Y., 2002. Les risques à la santé associés à la présence de moisissure en milieu interieur, Rapport scientifique. ISBN.Quebec. Canada, 165 p.

- Haq I.U., Rani S., Ashraf H. et Qadeer M.A., 2002. Biosynthesis of alpha amylase by chemically treated mutant of *Bacillus subtilis*. *J.Biol. Sci*. 2 (**2**), pp 73-75.

- Heslot H. (1996). L'ingenierie des proteines et ses applications. Lavoisier Tcc et Doc.p: 424- 432.

- I -

- Igarashi k., Hatada Y., Hagihara H., Saeki K., Takaiwa M., Uemura T., Ara K., Ozaki K., Kawai S., Kobayashi T. et Ito S. (1998). Enzymatic properties of a novel liquefying α-amylase from an alkalophilic isolate and entire nuclertide and amino acid sequences. Applied and Envirnmental Microbiology. 64(9) : 3282-3289.

- J -

- Julien R., 2002. Les moisissures parlons-en. *Objectif prevention*. 25 (4), pp.7-8.

- K -

- Kandra L., Gyemant G., Farkas E. et Liptak A. (1997). Action pattern of porcine pancreatic α-amylase on three different series of beta-maltooligosaccharide glycosides. *Carbohydr. Res.* 289(3) : 237-242

- Kenneth A. Laderman, Bradley . R. Davis, Henry C. Krutzsch, B. Marc S. Lewis, Y. Griko V., Peter L. Privalov, and Christia B. 1993."The Purification and Characterization of an Extremely thermostable α-Amylase from the hyperthermophilic *Archaebacterium Pyrococcus furiosus"* Journal of biological chemistry, 268, 32, 24394- -24401.

- Knox A. M., du Preez J. C., and Kilian S. G., 2004. « Starch fermentation characteristics of *Saccharomyces cerevisiae* strains transformed with amylase genes from *Lipomyces kononenkoae* and *Saccharomycopsis fibuligera*". Enzyme and microbial technology, 34, 5, 453-460.

- Kosikowski F. V., 1988. Dairy foods research papers. Enzyme behavior utilization in dairy technology. *J. Dairy Sci.* 71, pp.557-573.

- Kunamneni, A., Permaul, K., & Singh, S. "Amylase production in solid state fermentation by the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus*". Journal of bioscience and bioengineering, 100(2), Biological 168-171, (2005).

- L-

- Lagzouli Mohamed, Charouf Reda, El Yachioui Mohamed, Ouhssine Mohamed, Berny El Hassan et Jadal Mohamed, 2007. Optimisation de la croissance et de la production de glucoamylase extracellulaire par *Candida guilliermondii*. Bull. Soc. Pharm. Bordeaux (146), 251- 270.

- Larpent-gourgaud M. et Sanglier J.J., 1992. Biotechnologies, principes et méthodes. Ed Doin., pp 574-581.

- Lateef A., Oloke J-K., Gueguim-Kana E-B. et Adebayo I., 2004. Aspects of the isolation and characterizaton of thermostable α -amylase from *Alternaria alternata*. *Global Journal of Pure and Applied Sciences* Vol 10, N°1, pp. 75-79.

- Leveau J.Y. et Bouix M., 1993. Les moisissures. *In :* Florent J. Ed. Microbiologie industrielle. Les micro-organismes d'intérêt industriel. Edition Tec et Doc .Lavoisier .Apria, pp.110-170.

- Lévêque, E., Janeček, Š., Haye, B., & Belarbi, A. "Thermophilic archaeal amylolytic enzymes". Enzyme and Microbial Technology,. 26 (1), 3-14, (2000).

- Lucio de Souza E., Erika M. E. H., Castilho V. M., Delima A., Bellini M. Z., Cruz D. et Cruz Z. R. (1996). Purification and characterization of α-amylase from *Rhizopus sp. Arq. Biol. Technol.* 39 (4), 831-839.

- M-

- McCarter J.D and Withers S.G. (1996). Unequivocal identification of Asp-214 as the catalytic nucleophile of *Saccharomyces cerevisiae* -glucosidase using 5-fluoro glycosyl fluorides. *J. Biol. Chem.* 271, p: 6889–6894.

- Mercier C., 1985. Les enzymes amylolytiques. *In* : Mouranche A. Coste C. hydrolases et dépolymérases. Ed Gauthier-Villars., pp.110-140.

microbiologique de la sécurité et de la qualité des aliments. Lavoisier. Paris, pp. 216-244

- Moller K., Sharif M.Z., Olsson L., 2004. "Production of fungal a-amylase by *Saccharomyces kluyveri* in glucose-limited cultivations". Journal of Biotechnology, 111, 311- 318.

- N -

Nakatani H., 1996. Ronte carlo stimulation of multiple attack mechanism of α-amylase.Biopolymers.39 (5), p:665-669.

- Nicklin J., Graeme-Cook K., Paget T. et Killington R., 2000. L'essentiel en microbiologie. Berti. Paris, pp.210-216.

- Nielsent J.E ., Borchert T. V and Vriend .G., 2001. The determinants of -amylase pH– activity profiles **.** Protein Engineering, Oxford University Press. 14 (7), p:505-512.

- P -

- Pandey A., Nigam P., Soccol C. R., Soccol U. T., Singh D. et Mohan R. (2000). Advances in microbial analyses. Biotechnol. appl. Biochem. 31(2) : 135-152.

- Pazur J. H and Marchetti N.T. (1992). Action patterns of amylolytic enzymes as determined by the [1-14 C]malto-oli_gosaccharides mapping method. Carbohydr. Res. 227, p :215-225.

- Punt P. J., Van Biezen N., Conesa A., Albers A., Mangnus J. et Van den Hondel C., 2002. Filamentous fungi as cell factories for heterologous protein production. *Trends Biotechnol.* 20 (5), pp.200-206.

- R -

- Raimbault M., 1981. Fermentation en milieu solide : Croissance de champignons filamenteux sur substrat amylacé. Travaux et documents de L'O.R.ST.O.M, N°127, 273p

- S -

- Samson R.A., Eckalorolt C. et Orthe R., 1977. The taxonomy of *Penicillium* spies for fermented cheese Henkel et cie Gmbh, dept of microbiology D- 4000 Düsseldorf, pp.341-350.

- Scriban R., 1999. Biotechnologie. 5eme édition. Technique et Documentation. Lavoisier. Paris, pp.149-159.

- Sivaramakrishnan S., S., Gangadharan D., Nampoothiri K. M., Soccol C. R., & Pandey A, 2006. "α-Amylases from Microbial Sources—An Overview on Recent Developments". Food Technology & Biotechnology, 44 (2).

- Sundarram Ajita, and Thirupathihalli Pandurangappa Krishna Murthy, 2014. "α-Amylase Production and Applications: A Review." Journal of Applied & Environmental Microbiology, vol. 2, no. 4, 166-175. doi: 10.12691/jaem-2-4-10.

- Syu, M. J., & Chen, Y. H. "A study on the α-amylase fermentation performed by *Bacillus amyloliquefaciens*". Chemical Engineering, Journal, 65 (3), 237-247.

- T-

- Tanyildizi M.S., D. Ozer, M. Elibol, 2005. "Optimization of a-amylase production by Bacillus sp. using response surface methodology". Process Biochemistry., 40, 2291-2296.

- Teodoro C.E.De S., Martins M.L.L., 2000. Culture conditions for the production of thermostable amylase by *Bacillus* sp. - *Braz. J. Microbiol*, 31(4): 298-302.

- Tolan J-S., 1996. Pulp and paper. *In*: Godfrey T, West S., editors. Industrial enzymology, 2nd ed. New York: Stockton Press, pp.327-38.

- U-

- Uitdehaag J.C., Mosi R., Kalk K.H., van der Veen B.A., Dijkhuizen L.,Withers S.G and Dijkstra B.W., 1999. X-ray structures along the reaction pathway of cyclodextrin glycosyltransferase elucidate catalysis in the -amylase family. *Nature Struct. Biol.* 6, p: 432–436

- V -

Vieille K., G.J. Zeikus, "Hyperthermophilic enzymes: Sources, uses and molecular mechanisms of thermostability", Microbiology and Molecular Biology Review, 65, 1-43.

Site électronique

rcsb.org (http://rcsb.org/pdb/images/1hny_bio_r_500.jpg?bioNum=1)

Annexes

Les milieux de culture

Milieu de criblage PDA+1% d'amidon

250 g pomme de terre

20 g de glucose

20 g d'agar

Autoclavage 15 min à 120°C

Milieu de préculture liquide PDB

250 g pomme de terre

20 g glucose

Autoclavage 15 min à 120°C

Milieu de production liquide

10 g d'amidon

20 g $(NH_4)_2SO_4$

3 g KH_2PO_4

0.5 g $MgSO_4$, $7H_2O$

4 g extrait de levure

01 ml de solution d'oligoéléments

Autoclavage 15 min à 120°C

La préparation des solutions :

Préparation de tampon phosphate (0.1M) de PH=5 :

Dissoudre 1.74g de phosphate monobasique (K_2HPO_4) dans une fiole de 200 ml et complété avec l'eau distillé. En prendre 100 ml de tompon phosphate et en verse un volume de 5 ml de Hcl à (1M)

Solution d'oligoéléments

$Cacl_2$,$2H_2O$ (1.3 g/l)

$ZnSO_4$,$7H_2O$ (0.4 g/l)

$MnSO_4$,$4H_2O$ (0.4 g/l)

$CuSO_4$,$5H_2O$ (0.1 g/l)

- Mélanger tout les produits dans une fiole de 1 L et compléter à 1 L avec l'eau distillée.

Préparation d'iode

- Dans un fiole de 250 ml, mettez 40 g de KI
- Ajouter 100 ml d'eau distillée
- Agiter à température ambiante
- Ajouter 12.7 g de I_2 et bien agiter.
- Arrêter l'agitation et attendez la dissolution complète d'iode
- Transférer dans une fiole 1 L , ajouter 3 gouttes de Hcl concentré (37%) et ajuster le volume à 1L avec l'eau distillée.

Réactif de coronall

- Dissoudre 1.5 g de $CuSO_4$.$5H_2O$ dans 250 ml d'eau distillée
- Dissoudre 6 g de tartrate double de sodium et de potassium dans 250 ml d'eau distillée
- Dissoudre 30 g de NaOH dans 300 ml d'eau distillée

Faire le mélange de ces trois solutions et compléter à 1 litre avec l'eau distillée

Préparation de NAOH (0.675M) :

- Verser 2.7 g de NaOH (2.5 M) dans un 100 ml l'eau distillée

Préparation de thiosulfate d'ammonium :

- Verser 12.5 g de dans un 500 ml l'eau distillée

Préparation de H_2SO_4 (0.05 M):

- Verser 1.39 ml de H_2SO_4 dans un 500 ml l'eau distillée

<u>Les courbes d'étalonnage</u>

