

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique

جامعة امحمد بوقرة – بومرداس

UNIVERSITE M'HAMED BOUGARA DE BOUMERDES



Faculté des Sciences

Département de Biologie

Mémoire de projet de fin d'études en vue de l'obtention du diplôme de

Master académique

Domaine : Science de la Nature et de la Vie (SNV)

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Biochimie appliquée

Thème :

**Essai de production du deux enzymes amylolytiques à partir  
des déchets agro-alimentaires**

Présenté par :

➤ M<sup>elle</sup> Alouane Radhia

M<sup>elle</sup> Ouatiat Sabrina

Soutenu le 29 /09 / 2022 devant le jury composé de :

. Mme OUZID Y.	Maître de conférences B	. UMBB	Présidente
. Mme FAZOUANE F.	Professeur	UMBB	Examinatrice
Mr BOUDJEMA K.	Maître de conférences A	UMBB	Promoteur
Mr Gherbi Y.	Doctorant	UMBB	Co-promoteur

Année universitaire 2021-2022



## Remerciements



Je tiens à remercier en premier lieu, Dieu tout puissant de m'avoir donné la force, le courage et santé à fin de réaliser ce modeste travail.

Je tiens à remercier Mr BOUJEMAK, de m'avoir proposé ce sujet et de diriger mon travail ainsi que pour ses conseils et suggestions.

Aussi mes remerciements à Mr GHERBI Younes (Co-promoteur), pour son aide scientifique, leurs discussions, ces efforts et ses conseils pour la réalisation de ce projet.

Un gros merci au personnel du laboratoire LRTA (Laboratoire de Recherche en Technologie Alimentaire, UMBB), spécialement le directeur de laboratoire Mr BOUREGHDA et les techniciennes de laboratoire pour leurs aides, leurs discussions, et leur gentillesse.

Je tiens à remercier aussi Hamza membre de l'équipe du laboratoire, assistant de recherche pour ces orientations et les innombrables services.

J'exprime ma sincère gratitude à Mr BOUTALEB chef de division de la police judiciaire pour les services qu'il m'a toujours rendus.

Mes remerciements s'adressent à Mr BENAYED, chef de laboratoire de contrôle de qualité au niveau de la police scientifique, pour son accueil et ses services.

Je voudrais également remercier les différents membres du jury Mme FAZOUANE et Mme OUZID pour avoir pris le temps de lire et d'évaluer ce travail.

J'exprime ma profonde gratitude à tous mes enseignants du département de biologie, en particulier madame Mameri, qui a contribué à ma formation universitaire.

J'exprime aussi ma gratitude à tous ceux qui m'ont aidé de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

## Dédicace

J'ai pu réaliser ce travail que je dédie A celle qui m'a ouvert les portails et m'a donné la tendresse et le courage A celle qui as attendu chaleureusement ce jour: «Ma grand-mère hadja T assadit » paix à son âme  
que ce travail soit le meilleur cadeau que je puisse t'offrir

À

Mes très chers parents que j'aime tant, ma mère Ourida et mon père Ahmed Pour votre sacrifice, aide et soutien tout au long de mon parcours, quoique je fasse ou que je dise je ne saurai point vos remercier comme il se doit.

Mes adorables sœurs : Khalida, Saloua, Nouara, Zahra et Ikram

Mon frère unique : Nadir

Mes neveux et nièces : Doua, Houssam, Aroua, Wail, Israa, Islam , Jaouad et Imad

Mon fiancé Walid qui m'a encouragé et source de mon bonheur.

Tous, du fond de mon cœur je vous dédie ce travail.

Radhia

## *Dédicace*

A mon cher père Mr. Ouatiat Mahdi

A celui qui m'a tout donné sans compter, à celui qui m'a soutenu toute ma vie, à celui à qui je dois ce que je suis et ce que je serai. Tous les mots du monde ne sauraient exprimer l'immense amour que je te porte, ni la profonde gratitude que je te témoigne pour tous les efforts et les sacrifices que tu n'as cessé de consentir pour mon instruction et mon bien-être. Ce modeste travail qui est avant tout le tien, n'est que la concrétisation de tes grands efforts et tes immenses sacrifices ! Puisse Allah, te protéger de tout mal, te combler de santé, de bonheur et t'accorder une longue et heureuse vie, afin que je puisse te rendre un minimum de ce que je te dois.

A ma chère mère Mme. Diguer Yamina

Aucune parole ne peut être dite à sa juste valeur pour exprimer mon amour et mon attachement à toi. Tes prières ont été pour moi d'un grand soutien au cours de ce long parcours. Tu m'as toujours donné de ton temps, de ton énergie, de la liberté, de ton cœur et de ton amour. En ce jour j'espère réaliser chère mère et douce créature un de tes rêves, sachant que tout ce que je pourrais faire ou dire ne pourrait égaler ce que tu m'as donné et fait pour moi. Qu'Allah, te garde, te procure santé, bonheur et longue vie pour que tu demeures le flambeau illuminant mon chemin.

A mon seule et unique frère Hamza, Merci mizou pour ton aide.

À mon cher fiancé Ali, pour la patience et le soutien dont il a fait preuve pendant toute la durée de ce travail et à qui je voudrais exprimer mes affections et mes gratitude.

À ma famille paternelle et maternelle Ouatiat et Diguer.

Je vous dédie tous ce travail pour votre soutien, amour et encouragements. Vous trouvez dans ce travail, l'expression de mon amour en vous souhaitant beaucoup de bonheur. Que Dieu le Tout Puissant vous garde et vous procure santé et bonheur.

Hommage à mon frère Halim, puisse dieux l'accueillir dans son vaste paradis.

A mes amies : Wissam, Mounira et Ibtisam.

Merci pour les moments de joie, les rires et les liens conviviaux qui nous unissent. Vous êtes formidables chers amis !

A ma binôme Radia et pour toute sa famille.

Sabrina

### Résumé

Objectif de cette étude s'intéresse à la production de deux enzymes amylolytiques : l'alpha amylase et le glucoamylase par une souche d'*Aspergillus niger* sur milieu solide. Pour cela, la première partie de cette recherche a porté sur la caractérisation physico-chimique et biochimique des deux types de son de blé dur alors que la seconde partie vise l'optimisation de quelques paramètres de la production des enzymes amylolytiques tels que l'addition de la solution minérale, le pH et la température. Les résultats présentent un bon substrat pour la production enzymatique à cause de leur richesse en éléments nutritifs essentiels pour la croissance de la souche fongique utilisée.

En outre, la production des enzymes amylolytiques par le champignon filamenteux microscopique *Aspergillus niger* cultivé sur son de blé dur 1 et 2 par fermentation sur milieu solide, a donné une production maximale dans les conditions optimales suivants ; pH=5, température =37°C et are =37°C et addition de la solution minérale .

**Mots clés :** Amylase, glucoamylase, , *Aspergillus niger*, fermentation en milieu solide, son de blé dur .

### Abstract

This study focuses on the production of two amylolytic enzymes mainly alpha amylase and glucoamylase using a strain of *Aspergillus niger* on solid medium. The first part of this research focused on the physicochemical and biochemical characterization of both types of wheat bran while the second part served to optimize some operating parameters of amylolytic enzymes production such as the addition of mineral solution, pH and temperature. After characterization, both wastes present a good substrate for enzymatic production because of their richness about the fundamental nutrient required to the growth of the used fungal strain. Moreover, the production of amylolytic enzymes by the microscopic filamentous fungus *Aspergillus niger* grown on two types of wheat bran (1 and 2) using the solid state fermentation (SSF) gave a maximum enzymatic production with the presence of the mineral solution and under the following optimal conditions; pH 5 and temperature 37°C.

**Keywords:** Amylase, glucoamylase, *Aspergillus niger*, solid state fermentation, wheat bran, optimization.

## Liste des abréviations

**BSA : Bovin Serum Albumin**

**DNSA: L'acide Di-Nitro-3,5 Salicylique**

**PDA: Potato Dextrose Agar**

**HPLC : High Performance Liquid Chromatography**

**SSF : Solid-State Fermentation**

**MG: Malt Gelose**

**EDTA: Ethylenediaminetetra-acetic acid**

**ASP : Aspartate**

**GLU : Glutamate**

**H : humidité**

**MS : Matière Sèche**

**Ms : Milli siemens**

**Liste des figures**

Figure I- 1: Les différentes couches cellulaires du son de blé constitutives industriel ..... 8

Figure I- 2: Schéma du champignon genre "Aspergillus" (Briki et Zitouni, 2013). ..... 10

Figure I- 3: Principales types d'amylases et leurs sites de coupure sur la molécule d'amidon . 14

Figure I- 4 : Structure tridimensionnelle de gluco-amylase ..... 21

Figure II- 1: vue macroscopique de moisissure Aspergillus niger. .... 23

Figure II- 2: Son de blé 1 (EX-SEMPAC) ..... 24

Figure II- 3: Son de blé 2 (Ouled-moussa) ..... 25

Figure III - 1: Production d'alpha-amylase aux différents pH sur son de blé dur 1 ..... 43

Figure III - 2: Production d'alpha-amylase aux différents pH sur le son de blé dur 2 ..... 44

Figure III - 3: Production de la glucoamylase aux différents pH sur le son de blé dur 1. .... 45

Figure III - 4: Production de la glucoamylase aux différents pH sur le son de blé dur 2. .... 45

Figure III - 5: Influence de la température d'incubation sur la production de l'alpha-amylase par A. niger sur son de blé dur 1. .... 46

Figure III - 6: Influence de la température d'incubation sur la production de l'alpha-amylase par A. niger sur son de blé dur 2. .... 46

Figure III - 7: Influence de la température d'incubation sur la production de la glucoamylase par A. niger sur son de blé dur 1. .... 47

Figure III - 8: Influence de la température d'incubation sur la production de la glucoamylase par A. niger sur son de blé dur ..... 48

**Liste des tableaux**

Tableau I - 1 :les domaines d'applications de la fermentation solide. (Pascal Chillet., 2011) .	6
Tableau I - 2: Composition des sons de blé(Maréchal, 2001).....	8
Tableau I - 3 :principaux micro-organismes producteurs de l'a-amylase (Schwimmer and Balls, 1949). .....	18
Tableau I - 4:Utilisation industrielle de l'alpha amylase .....	19
Tableau I - 5:propriétés de gluco-amylase de différentes origines (Bouquelet., 2016). .....	20
Tableau III- 1: Composition biochimique moyenne des sons de blé dur étudiés. ....	38
Tableau III- 2: Résultat récapitulatif sur la production d'alpha-amylase et gluco-amylase sur deux types de son de blé dur. ....	40
Tableau III- 3:Résultat récapitulatif sur la production des enzymes amylolytiques en présence et absence de la solution minérale. ....	42



# *Sommaire*

## Sommaire

Dédicace

Résumé

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction

### Chapitre I : Synthèse bibliographique

Fermentation sur milieu solide et matière première.....	4
1.2 La fermentation sur milieu solide.....	4
1.2.1 Définition.....	4
1.2.2 Les avantages de la fermentation sur milieu solide.....	4
1.2.3 Les inconvénients de la fermentation sur milieu solide.....	5
1.2.4 Les étapes suivies en fermentation sur milieu solide.....	5
1.2.5 Application de la fermentation solide.....	6
1.2.6 Les méthodes d'estimation de la biomasse en fermentation solide.....	7
1.3 Substrat de fermentation.....	7
1.3.1 Son de blé.....	7
1.3.2 Composition du son de blé.....	8
1.3.3 Application de son de blé.....	9
1.4 Les moisissures.....	9
1.4.1 Le genre <i>Aspergillus</i> .....	9
1.4.2 Le cycle fongique.....	10
1.4.3 Caractères cultureux.....	11
1.4.4 La souche <i>Aspergillus niger</i> .....	11
1.4.5 Écologie.....	12
1.4.6 Morphologie.....	12
1.5 Les enzymes amylolytiques.....	13
1.5.1 Définition.....	13

1.5.2	Classification des amylases .....	13
1.5.3	Données sur l' $\alpha$ -amylase .....	15
1.5.4	Donnés sur la gluco-amylase (EC 3.2.1.3).....	19

**CHAPITRE II : Matériel et méthodes**

1.	Matériel .....	23
1.1	Matériel non biologique (Annexe I) .....	23
1.1.1	Matériel biologique .....	23
1.2	Méthodes .....	24
1.2.1	Substrat de fermentation.....	24
1.2.2	Caractérisation physico-chimiques et biochimiques des déchets agroalimentaires.....	25
1.3	Etude de la production des enzymes $\alpha$ -amylase et amyloglucosidase par la souche <i>Aspergillus niger</i> par fermentation en milieu solide.....	32

**Chapitre III : Résultats et discussions**

1.	Caractérisation physicochimique et biochimique des deux types de son de blé dur.....	38
2.	Etude de la production des enzymes $\alpha$ -amylase et glucoamylase par la souche <i>Aspergillus niger</i> sur milieu solide. ....	40
3.	Optimisation de la production de $\alpha$ -amylase et glucoamylase.....	41
a)	Effet de la solution minérale sur la production .....	41
b)	Effet du pH sur la production des enzymes amylolytiques.....	42
c)	Effet de la température de la production des enzymes amylolytiques .....	45

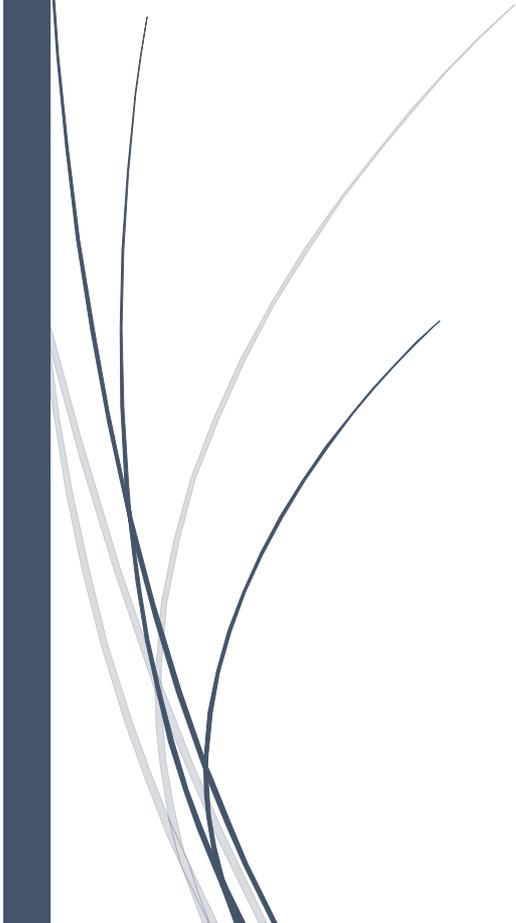
Conclusion et perspectives

Références bibliographiques

Annexes



# *Introduction*



### Introduction

Les enzymes appartenant à la famille des hydrolases telles que, les amylases sont parmi les plus importantes enzymes à l'échelle industrielle, ce qui les rendent l'un des outils-clés des biotechnologies (**Little, 2004**). En effet, le marché mondial des enzymes est représenté par 80% des hydrolases, particulièrement les amylases et les protéases (**Morvan, 2010**).

En Algérie, les enzymes amylolytiques, largement 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.

Les enzymes d'origine microbienne présentent des propriétés et des spécificités diverses. Ces propriétés reflètent de plus en plus leurs utilisations dans divers domaines d'applications, tels que l'industrie alimentaire humaine et animale, les détergents pour lessives, l'industrie des tanneries et l'industrie pharmaceutique. Environ 40% des enzymes industrielles sont d'origine fongique (**Botton et al., 1990**). En particulier, l' $\alpha$ -amylase et la glucoamylase qui sont considérés comme les enzymes industrielles les plus importantes et les plus anciennes d'après **Gupta et al (2008)**.

Le son de blé est l'un des substrats les plus intéressants pour la fermentation en milieu solide afin de produire des enzymes, des métabolites secondaires et d'autres produits d'intérêt biotechnologique. Il présente l'avantage de faciliter la pénétration du mycélium dans le substrat et d'être peu coûteux. Le son de blé étant riche en fibres alimentaires insolubles (75% de teneur en germes de blé et plus de 90% de teneur en son), le son de blé est utilisé comme substrat de base dans le cas d'une fermentation sur milieu solide, avec jusqu'à bonne capacité de rétention d'eau de 80 % (**Abdullah et al., 1985**). Par conséquent, il est possible de travailler dans une humidité élevée qui permet une bonne croissance des champignons.

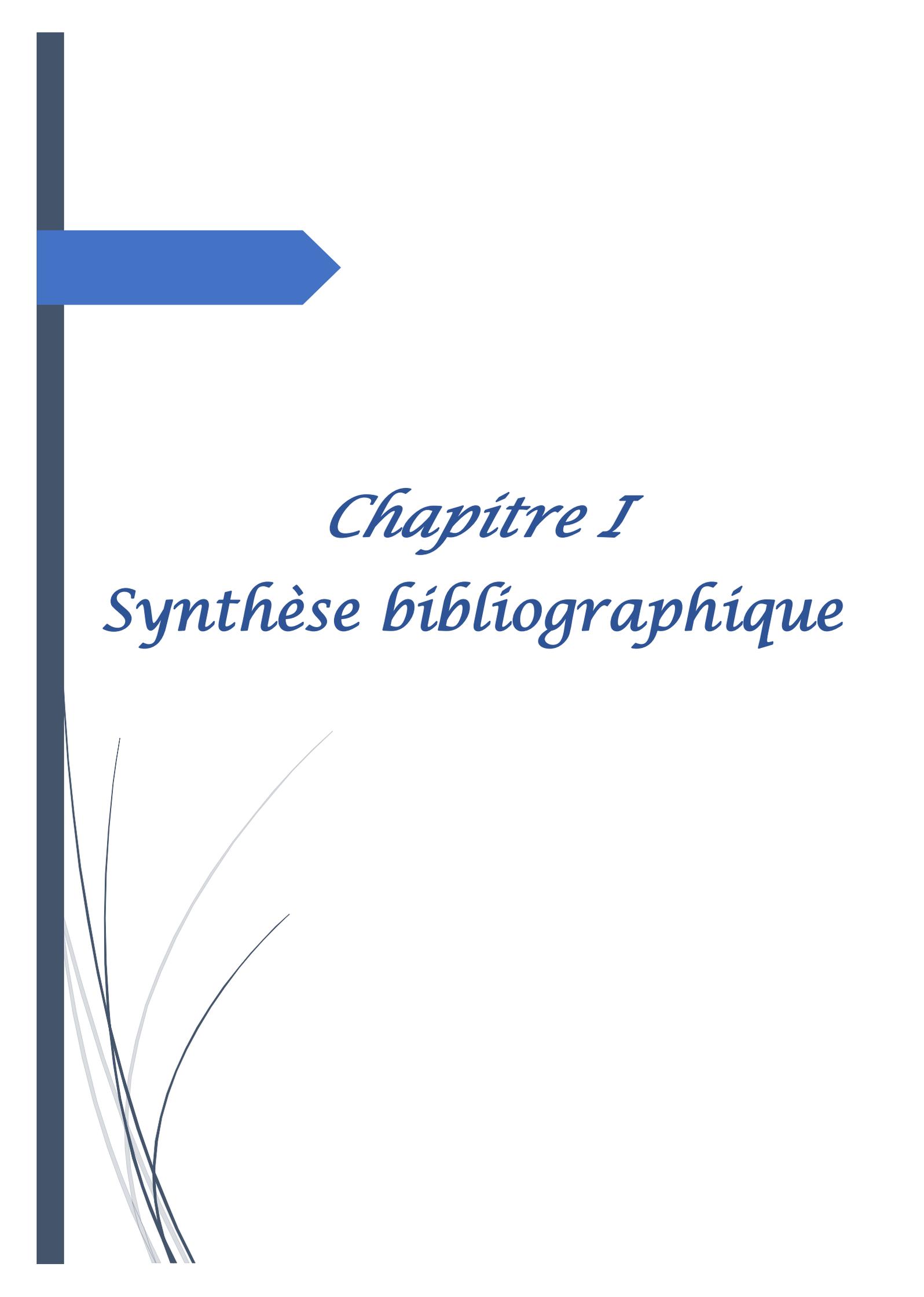
Durant ce travail, nous avons utilisé une souche de moisissure (organismes pluricellulaires), *Aspergillus niger* comme agent de fermentation en raison de leur présence importante sur le marché des enzymes amylolytiques et de leur remarquable capacité à coloniser et à utiliser une variété de substrats (**Leveau et Bouix, 1993 ; Boiron 1996**).

L'objectif de ce travail consiste d'une part à valoriser le son de blé comme substrat de fermentation afin de produire des enzymes amylolytiques en utilisant une souche fongique

Locale « *Aspergillus niger* ». Le second volet visera l'optimisation des paramètres impliqués dans la production des enzymes amylolytiques (solution minérale, température et Ph).

Ce manuscrit comprend une première partie relatant l'état des connaissances sur les moisissures, le son de blé, la fermentation sur milieu solide et les enzymes glycolytiques (l' $\alpha$ -amylase et la glucoamylase).

La deuxième partie expérimentale renferme les méthodes ainsi que les résultats et leur discussion.



*Chapitre I*  
*Synthèse bibliographique*

### Chapitre I : Synthèse bibliographique

#### 1- Fermentation sur milieu solide et matière première

##### 1.1 La fermentation sur milieu solide

###### 1.1.1 Définition

Le terme « **fermentation solide**» (également connu sous le nom de «fermentation à l'état solide» ou Solid State Fermentation «SSF») fait référence à la croissance de micro-organismes sur des particules solides humides en l'absence d'eau libre (**Durand, 2003; Gervais et al., 2003 ; Rahardjo et al., 2006**). De façon simplifiée, les microorganismes se développent dans un système à trois phases : une matrice solide, une phase liquide qui lui est liée et une phase gazeuse prise au piège dans les particules ou entre celles-ci.

###### 1.1.2 Les avantages de la fermentation sur milieu solide

Les avantages de la fermentation solide sont nombreux :

1. Elles tiennent compte de la simplicité de la technologie (adaptée aux zones rurales) et du manque d'équipements complexes nécessaires au contrôle permanent des paramètres environnementaux (facultatifs). Il y a donc un faible coût pour les opérations et l'équipement.
2. Le volume des installations de fermentation et la contamination bactérienne peuvent être considérablement réduits en l'absence d'eau libre. En fait, la majorité des bactéries ont besoin d'un taux d'humidité élevé pour survivre. Parce qu'il n'y a pas beaucoup d'eau disponible, certains processus métaboliques qui n'apparaissent pas ou apparaissent rarement dans la culture liquide peuvent prospérer. Par exemple, *Monascus* produit dix fois plus de pigment rouge en milieu solide qu'en fermentation liquide (**Mathot, 1996**).
3. De plus, contrairement aux fermentations liquides, les opérations de mélange peuvent être facilement ajustées afin qu'aucune mousse ne soit produite pendant les fermentations solides. La stérilisation préalable du substrat n'est pas nécessaire pour la majorité des procédés de fermentation solide car ils utilisent l'humidité. Il réduit le coût énergétique requis. En calibrant précisément les particules du substrat (hachage, broyage, tamisage, etc.).
4. Une agitation passive, non agitée ou intermittente peut être utilisée pour assurer l'aération. Une porosité bien étudiée facilite le passage de l'air et son contact avec les humidités installées à la surface des particules en situation d'aération active ou forcée.

5. En revanche, les milieux liquides sont fréquemment rendus nettement plus visqueux par l'humidité filamenteuse. Des problèmes d'agitation et de transport d'oxygène en découlent.

6. Lors de la production d'aliments pour animaux, tout le produit est utilisé, sans eau usée. Les coûts potentiels de séchage sont diminués.

7. En conclusion, les recherches suggèrent que la fermentation solide est une méthode peu coûteuse, facile à utiliser et adaptable aux milieux ruraux. Il a également la réputation d'être un équipement léger (**Mathot, 1996**).

### 1.1.3 Les inconvénients de la fermentation sur milieu solide

Le recours aux micro-organismes est limité. En effet, seuls les microorganismes se développant bien aux basses humidités peuvent être employés. Les connaissances physiologiques et technologiques sur la croissance des microorganismes dans les environnements solides sont faibles. Les problèmes d'oxygène et de transfert thermique font qu'il est difficile d'augmenter l'échelle des processus. En effet, le peu d'eau ralentit l'échange de chaleur, ce qui peut créer des problèmes de surchauffe lorsque de grandes masses sont mises en fermentation. L'évaporation neutralise en partie ce chauffage, mais en réduisant l'eau disponible. L'évacuation des calories métaboliques peut donc poser un problème qu'il s'agit de résoudre lors du passage de petits essais de laboratoire aux applications en vraie grandeur. La nature solide et hétérogène des substrats utilisés complique le suivi direct des paramètres de fermentation. Les sondes utilisées en fermentation liquide ne sont pas utilisables, même si **Bellon-Maurel et al. (2003)** proposent de nouveaux types de sondes adaptées aux cultures solides. Il est pratiquement difficile d'assurer une distribution parfaitement homogène de substances ajoutées au substrat et donc du milieu de culture. Ce qui rend le contrôle on line des paramètres de culture tels que le pH, l'humidité et la concentration des nutriments, assez aléatoire. Les microorganismes étant inséparables du substrat, l'estimation de la biomasse est délicate. Etant donné la forte concentration des métabolites obtenus, des produits inhibiteurs générés par les microorganismes peuvent s'accumuler en concentration élevée dans le milieu de culture.

### 1.1.4 Les étapes suivies en fermentation sur milieu solide

Tout processus de fermentation solide comprend cinq étapes majeures : Préparation du substrat ou du milieu de culture, stérilisation optionnelle du milieu (habituellement à 120 °C pendant 20 minutes) dans un autoclave, suivie d'un refroidissement, préparation de

l'inoculum, incubation du milieu inoculé, maintien d'un environnement optimal autant que possible (température, pH, l'aération de la culture).

### 1.1.4.1 La préparation du substrat carboné

Les substrats de carbone utilisés dans la fermentation solide viennent principalement de résidus agricoles et agroalimentaires. Ce sont les substrats lignocellulosiques (sous forme de paille, de son, de bagasse, de pulpe, etc.), les féculents (résidus de banane, de soja, les graines, etc.), les supports synthétiques (mousse de polyuréthane, résine polymérique, etc.). La préparation du substrat carbonaté est destinée à subir différents traitements physiques, chimiques ou biologiques (enzymes) afin de promouvoir une grande accessibilité des composants aux micro-organismes (Meziani et Mahcene, 2017).

### 1.1.4.2 L'inoculation du milieu de culture

Le milieu de culture est le plus souvent inoculé au moyen d'une suspension de spores (Mathot, 1996). Elles restent viables plus longtemps que le mycélium, sont moins sensibles aux conditions externes et se conservent plus facilement. La quantité optimale de spores à inoculer diffère selon les cas. Un excès de spores peut parfois inhiber la germination. Les spores sont cependant métaboliquement dormantes, impliquant que la dégradation du substrat ne peut s'installer qu'après la germination. Pour minimiser cet inconvénient, un pré germination des spores est parfois envisagé. Des inocula spores + mycélium + substrat de production peuvent être utilisés également (Meziani et Mahcene., 2017).

### 1.1.5 Application de la fermentation solide

La fermentation solide est utilisée dans divers applications.

**Tableau I - 1les domaines d'applications de la fermentation solide. (Pascal Chillet., 2011)**

Domaine d'application	Produits
Production d'enzymes	Les amylases, cellulases, xylanases
Production d'acides organiques	Acide citrique, acide lactique
Production de métabolites secondaire	Les arômes, pénicilline
L'alimentation humaine	Les fromages, pulpes de betterave

### 1.1.6 Les méthodes d'estimation de la biomasse en fermentation solide

Le dosage de la biomasse est l'une des plus grandes difficultés de la fermentation solide, contrairement à la fermentation liquide. La détermination directe de la biomasse est très compliquée en fermentation solide à cause des contraintes pour séparer la biomasse microbienne du milieu de culture. La plupart des études utilise les méthodes de séparation de la biomasse, de suppression de la matrice solide et d'estimations indirectes basées sur le dosage de composés spécifiques de la biomasse (protéines, acides nucléiques, glucosamine, ergostérol) et sur l'activité métabolique de la biomasse (respiration : oxygène consommé ou CO<sub>2</sub> produit, production d'enzymes extracellulaires, production d'ATP). La méthode de séparation de la biomasse n'est faisable que pour les organismes unicellulaires où de simples comptages microbiologiques sont possibles. Elle a été utilisée sur du riz fermenté par *Candida lipolytica* et pour *Saccharomyces cerevisiae* sur divers substrats amylicés. La méthode de suppression de la matrice solide a été appliquée lors de la fermentation de riz par *Aspergillus oryzae* en vue d'éliminer l'amidon du substrat à l'aide d'amylases, puis à récupérer le mycélium par filtration (Mathot, 1996).

## 1.2 Substrat de fermentation

### 1.2.1 Son de blé

Le son de blé est une enveloppe externe multi-lamellaire composée des tissus maternels (bande hyaline, testa, péricarpe et cuticule), au sens anatomique du terme, additionné de la couche aleurone et de restes de l'endosperme. Le son de blé est un coproduit des minoteries et des semouleries (Kabel et al., 2006). Actuellement, il est principalement destiné à l'alimentation animale et pour une petite part à l'alimentation humaine. Le son de blé est histologiquement composé des couches cellulaires suivantes (figure 1).

- o La couche à aleurone ou assise protéique
- o La bande hyaline ou couche nucellaire
- o La testa ou endotesta ou tégument séminal
- o Le péricarpe

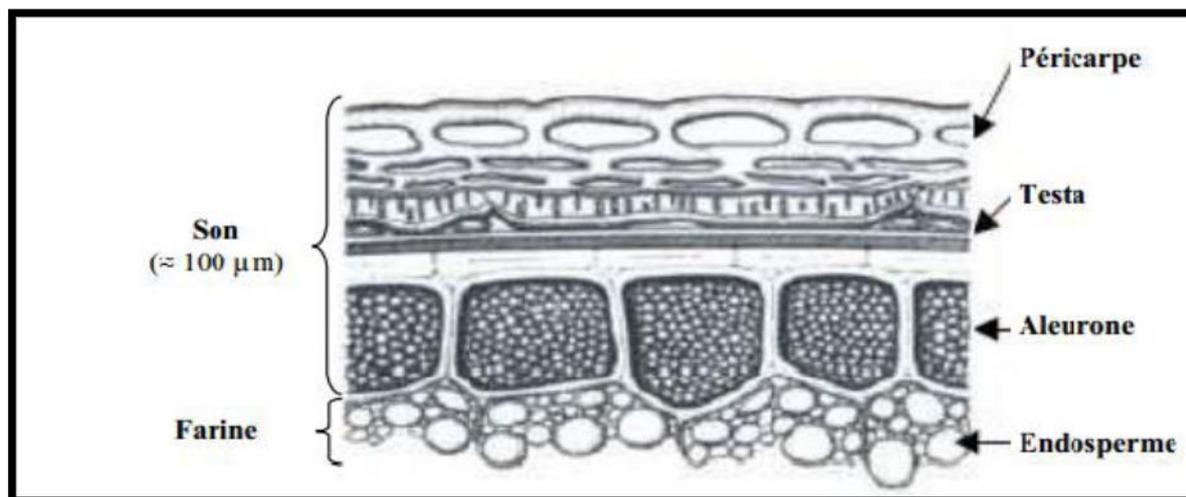


Figure I- 1: Les différentes couches cellulaires du son de blé constitutives industriel.

### 1.2.2 Composition du son de blé

Du fait des variétés, des origines et des maturités différentes des grains de blé, ainsi que des techniques de mouture et de conservation variées qui sont employées, les sons de blé peuvent présenter des compositions très variables (**tableau 02**). De plus, les méthodes de dosage mises en œuvre vont aussi influencer sur la précision des mesures. Aussi, les travaux recensant la composition chimique des sons de blé présentent une hétérogénéité forte. (**Rosanne Raynal-Ioualalen., 1996**).

Tableau I - 2: Composition des sons de blé (Maréchal, 2001).

	(Raynal-Ioualalen,1996)		(Bataillonet <i>al.</i> , 1998)		(Maréchal,2001)
	Son brut	Son désamidonné	Son brut	Son désamidonné	Son désamidonné
<b>Cellulose*</b>	9,2	15,5	11,0	25,0	18,7
<b>Hémicelluloses*</b>	37,0	60,0	19,0	45,0	62,3
<b>Lignine*</b>	6,7	8,0	6,0	3,0	3,8
<b>Amidon*</b>	20,0	Nd**	29,0	1,0	Nd**
<b>Protéines*</b>	14,8	15,2	14,0	9,0	15,6
<b>Lipides*</b>	Nd**	Nd**	6,0	6,0	Nd**
<b>Matières minérales*</b>	5,3	1,0	4,0	1,0	1,5

Nd : non déterminé

### 1.2.3 Application de son de blé

Des études ont montré que le son de blé peut avoir un effet bénéfique sur la prévention des maladies, y compris certains cancers (en particulier le cancer colorectal), les maladies cardiovasculaires, l'obésité et certaines maladies gastro-intestinales, y compris les maladies diverticulaires, la constipation et le syndrome du côlon irritable (SII). Cependant, l'application principale du son de blé concerne l'alimentation animale: en raison de ses propriétés nutritionnelles, il permet d'améliorer la qualité nutritionnelle des produits alimentaires de source animale (Leo et al, 2012).

### 1.3 Les moisissures

Les moisissures sont des microorganismes hétérotrophes dépendants d'une source de carbone organique. Généralement peu exigeants sur les conditions environnementales du substrat, ces champignons peuvent contaminer les milieux les plus divers comme : les céréales, les produits d'origine animale (lait, viande) mais aussi le papier, les tissus, les matières organiques en décomposition, où elles trouvent une source de carbone et d'azote accessible. Les genres les plus importants de point de vue économique et médical sont les *Aspergillus* qui représentent les contaminants les plus fréquents des aliments. On les retrouve aussi dans de nombreux autres produits végétaux et d'origine animale.

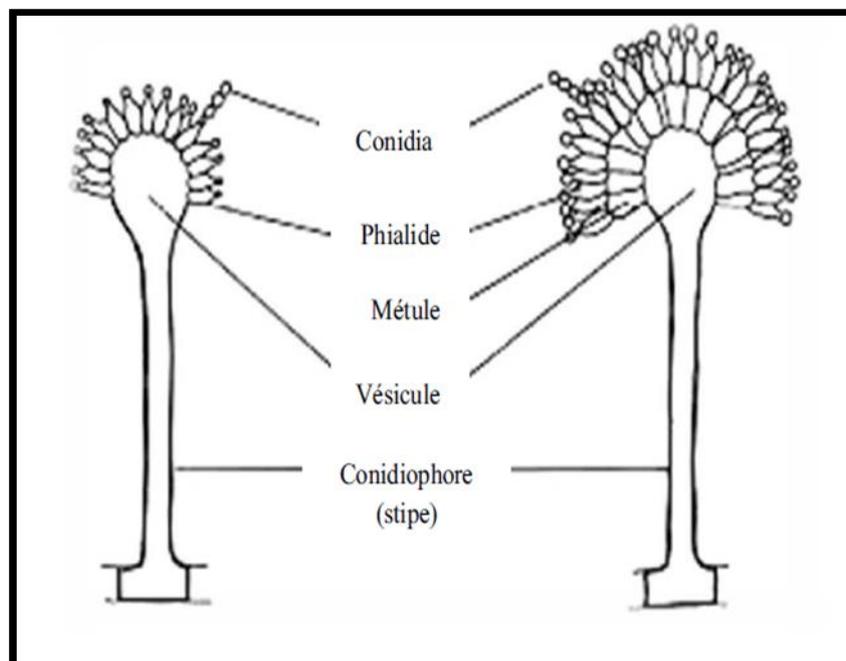
#### 1.3.1 Le genre *Aspergillus*

Les champignons du genre *Aspergillus* sont saprophytes et cosmopolites. Les spores aspergillaires, ou conidies, sont ubiquitaires et retrouvées constamment en suspension dans l'atmosphère. En cas de réceptivité particulière de l'hôte, certaines espèces telles que *Aspergillus fumigatus*, peuvent être à l'origine d'un large spectre de maladies, allant de mycoses localisées, comme les aspergillomes, à des infections invasives d'évolution souvent mortelles, en passant par des formes cliniques particulières d'origine immuno-allergique (Desoubeaux et Chandener, 2010). Les *Aspergillus* dont la première description date de 1729 (Micheli et al., 1729), sont des moisissures saprophytes à filaments hyalins, cloisonnés, et sont haploïdes. Le genre *Aspergillus* appartient au groupe phylogénétique des *Ascomycètes* et à la famille des *Trichocomaceae*. Il comprend aujourd'hui 185 espèces, dont une vingtaine retrouvées en pathologie humaine. Les *Aspergillus* sont des moisissures présentes partout dans le monde, plus particulièrement à la fin de l'été, en automne et en hiver (Mullins et al., 1976). Ils ont un métabolisme aérobie et participent au recyclage du carbone et de l'azote de l'environnement (Pitt et al., 1994). Ils sont thermophiles, pouvant survivre à des

températures atteignant 70°C pour certaines espèces, et ne requièrent pas de nutriments spécifiques.

### 1.3.2 Le cycle fongique

Dans l'environnement, les *Aspergillus spp* se présentent sous la forme de champignons filamenteux septes et ramifiés. Cette forme végétative est appelée mycélium. En conditions de sevrage ou d'autres stress, des structures spécialisées vont se développer à partir du mycélium : il s'agit d'organes de fructification, appelés conidiophores, au bout desquels les têtes aspergillaires, ou vésicules terminales, sont retrouvées (**Figure 2**). Les conidies, spores asexuées unicellulaires et uni nucléées, sont produites au niveau des organes de fructification par les phialides, cellules conidiogènes fertiles en forme de bouteilles. Les phialides (encore appelées stérigmates) prennent naissance sur la vésicule terminale. Ces conidies mesurent 2-3  $\mu\text{m}$  de diamètre et sont très volatiles, responsables de la dissémination dans l'environnement du champignon. La germination des spores se déroule en deux étapes. Dans des conditions adéquates, les conidies gonflent, ce stade de croissance « iso-diamétrale » durant 3 à 4 h à 37°C. Après cette phase de gonflement, la croissance devient polarisée, avec l'apparition d'un tube germinatif. Ce tube germinatif va s'allonger et produire un filament ramifié qui formera la colonie typique de tous les champignons filamenteux (**Denning, 1998**).



**Figure I- 2:** Schéma du champignon genre "*Aspergillus*" (Briki et Zitouni, 2013).

### 1.3.3 Caractères cultureux

Les *Aspergillus* présentent une croissance rapide sur les milieux de culture classiques (Gélose au malt, Sabouraud, PDA additionnés d'antibiotiques). Après 48 heures d'incubation, on observe des colonies plates, formées de courts filaments aériens, blancs ; après 96 heures d'incubation, les colonies vont prendre leur teinte caractéristique, brune, verte, jaune ou noire selon les espèces. La majorité des *Aspergillus* poussent à 22-25°C ; les espèces thermophiles (*A. fumigatus*) se développent à 37-40°C est parfois jusqu'à 57°C. Les *Aspergillus* forment des colonies souvent poudreuses ou granuleuses. La couleur de colonies permet une orientation rapide dans l'identification d'espèces : gris-vert pour *A. fumigatus*, vert-jaune pour *A. flavus*, vert foncé à chamois pour *A. nidulans*, brun cannelle pour *A. terreus*, chamois clair, jaune et rose pour *A. versicolor*, jaune puis noir pour *A. niger* et blanche pour *A. candidus*. Le revers de la colonie est incolore ou jaune, mais il peut brunir ou rougir avec l'âge. (Briki et Zitouni, 2013).

### 1.3.4 La souche *Aspergillus niger*

*Aspergillus niger* est un champignon filamenteux haploïde qui est utilisé pour la gestion des déchets et des biotransformations en plus de ses utilisations industrielles, telles que la production d'acide citrique et d'enzymes extracellulaires. On le trouve le plus souvent dans la végétation, le sol ou les plantes en décomposition, mais on ne peut le considérer comme particulièrement dangereux par rapport à *Aspergillus fumigatus*, l'agent pathogène le plus répandu dans l'air. *Aspergillus niger*, la moisissure la plus abondante trouvée dans l'environnement, a également été la source de plusieurs composés bioactifs et d'enzymes industrielles (Schuster et al., 2002).

La position systématique d'*Aspergillus niger* est résumée comme suivant (Chabasse et al., 1999 ; Meyer et al., 2004) :

Phylum :	<i>Tallophyta</i>
Sous-phylum :	Fungi ( <i>Mycota</i> )
Division de sous-phylum :	<i>Eumycota</i>
Subdivision :	<i>Deuteromycotina</i> (Fungi imperfecti)
Classe :	Hyphomycètes (forme filamenteuse)
Ordre :	Moniliales
Famille :	<i>Moniliaceae</i>
Sous-famille :	<i>Hyalosporae</i>

Tribu :	<i>Aspergilleae</i>
Genre :	<i>Aspergillus</i>
Espèce :	<i>Aspergillus niger</i>

### 1.3.5 Écologie

De nombreux *Aspergillus* noirs ont été isolés du monde entier (**Briki et Zitouni, 2013**). *A. niger* est l'un des champignons les plus communs dans l'environnement humain, qui vive en saprobiose (**Bensmail, 2012**). Dans la nature, Il est très répondeu dans les zones sombres et humides, les sols, le compost, pousse à la surface des matières organiques en décomposition, des denrées alimentaires, des sous-produits agricoles surtout les céréales et ses dérivés (son de blé, son de riz, bagasse...) et de nombreux autres substrats où les acides aminés et les sucres sont initialement insuffisants. *Aspergillus niger* est capable de croître dans la plage température large de 6–47 ° C avec une température relativement élevée avec un optimum de 35 à 37 ° C. La limite d'activité de l'eau pour la croissance est 0,88 (aw) qui est relativement élevée comparativement aux autres espèces d'*Aspergillus*. *Aspergillus niger* peut pousser sur une très large gamme de pH : 1,4-9,8. (**Briki et Zitouni, 2013**).

### 1.3.6 Morphologie

Les *Aspergillus* sont caractérisés par la présence de longs filaments perpendiculaires (stipes) aux hyphes végétatifs. Les stipes se terminent par une vésicule supportant les cellules de la conidiogenèse : les phialides (**Leyral et Vierling, 2007**) (7-10 x 3-3,5 µm) sont portées par des métules brunâtres (**Badillet et al., 1987**), ou sont portées directement par la vésicule Les phialides produisent des spores ou conidies qui caractérisent le mode de reproduction asexuée des champignons (**Leyral et Vierling, 2007; Masayuki et Katsuya, 2010**). Les conidies sont habituellement globuleuses, parfois légèrement aplaties. Elles mesurent 3,5-5 µm de diamètre, sont brunes, échinulées à très verruqueuses. Les sclérotés parfois différenciés, sont crème à chamois foncé au début, puis virent au chamois vinacé (**Badillet et al., 1987**). Si les phialides sont directement insérées sur la vésicule, ces *Aspergillus* sont appelés *Aspergillus* unisériés. Mais, si les phialides sont portées par des cellules intercalaires (métules) insérées sur la vésicule, ces *Aspergillus* sont appelés *Aspergillus* bisériés (**Jesus et Cordova, 1999**).

#### 1.3.6.1 Aspect macroscopique

Ce champignon pousse rapidement (2-3 jours) sur les milieux de culture classiques (géloses au malt et Sabouraud). La température optimale de croissance varie généralement entre 25 et

30°C, mais *A. niger* peut se développer jusqu'à 42°C. Les colonies d'*A. niger* sont granuleuses, blanches au début, puis jaunâtres et à maturité elles deviennent noires. Le revers des colonies est incolore ou jaune pâle montrant parfois des zones concentriques (**Guillaume, 2006**).

### 1.3.6.2 Aspect microscopique

Les têtes conidiennes, bisériées et radiées, sont disposées en plusieurs colonnes brunâtres à noires. Les conidiospores sont longs atteignant 1,5-3  $\mu\text{m}$ , lisses à stipes non cloisonnés, hyalins ou brunâtres dans leur moitié supérieure, formés d'une cellule courte appelée cellule podale (footcell) avec un hyphes fertile. Les vésicules (50-70 $\mu\text{m}$ ) sont globuleuses avec des têtes aspergillaires hémisphériques volumineuses, à panache radié. Les phialides (7-10 x 3-3,5  $\mu\text{m}$ ) sont portées par des métules brunâtres, de dimensions variables (10-15 $\mu\text{m}$ ). Les conidies sont habituellement globuleuses, parfois légèrement aplaties de couleur brunâtre et qui mesurent 3,5 à 4,5  $\mu\text{m}$  ; parfois jusqu'à 6  $\mu\text{m}$  de diamètre (**Abraca et al., 2004 ; Pasqualotto, 2010**).

## 1.4 Les enzymes amylolytiques

### 1.4.1 Définition

Les amylases sont des enzymes de conversion de l'amidon. La structure moléculaire de l'amidon est un paramètre majeur dans le choix des enzymes pour son hydrolyse (**Martin and Smith, 1995**). Les amylases sont des hydrolases importantes qui ont été largement utilisées depuis de nombreuses décennies (**Gupta et al., 2008 ; Sundarram et Murthy, 2014**). Ce sont des enzymes qui catalysent spécifiquement l'hydrolyse de l'amidon. L'amidon est le constituant polysaccharidique majeur de certains produits agricoles comme les produits amylicés (blé, maïs, riz,...) et les tubercules notamment la pomme de terre. Les amylases représentent 56 % du marché des enzymes dans le monde. (**Van der Maarel et al ; 2002**).

### 1.4.2 Classification des amylases

L'hydrolyse enzymatique de l'amidon, substrat spécifique des amylases, est à l'origine de la classification de ces dernières en trois types d'enzymes amylolytiques de genre glycosyl hydrolases (figure 3) (**Sundarram et Murthy, 2014**).

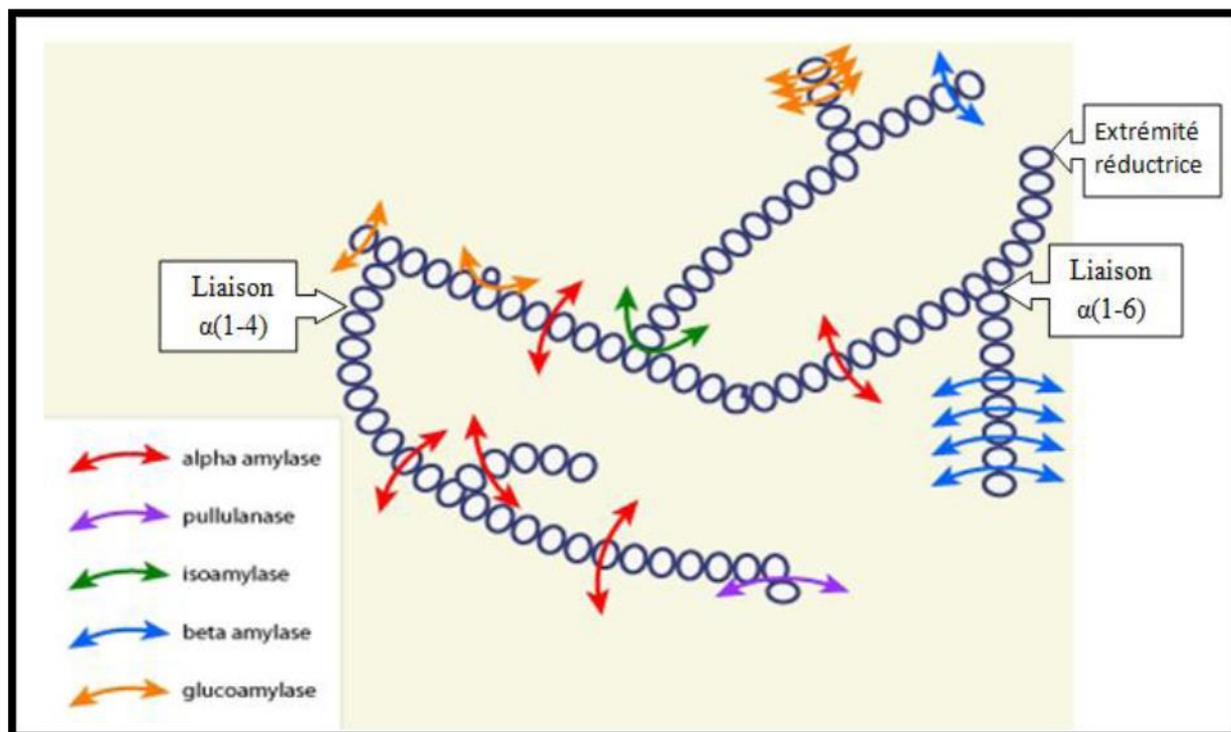


Figure I- 3:Principales types d'amylases et leurs sites de coupure sur la molécule d'amidon

#### 1.4.2.1 Les enzymes spécifiques des liaisons $\alpha$ -(1, 4)

##### ➤ L'alpha-amylase (EC 3.2.1.1)

L' $\alpha$ -amylase ou  $\alpha$ -(1,4) D-glucane glucanohydrolase est une endo-glycanase appartenant à la classe des hydrolases. C'est une enzyme ubiquitaire synthétisé dans tous les genres de la vie. L'alpha amylase est une enzyme en agissant, hydrolyse de façon aléatoire les liaisons alpha (1-4) et conduit à la formation d'oligosaccharides linaires et dextrans (**Janecek ; 1994**). Elle a un pH optimal d'activité pouvant aller de 3 à 7. Une  $\alpha$ -amylase idéale pour la liquéfaction de l'amidon doit avoir une activité optimale à 100°C à pH 4.0 à 5.0, et sa stabilité doit être indépendante de la présence d'ions  $\text{Ca}^{2+}$  (**Vieille and Zeikus, 2001**). L' $\alpha$ -amylase est considérée comme l'enzyme industrielle la plus importante et la plus ancienne d'après (**Gupta et al., (2008)**).

##### ➤ La bêta-amylase (EC 3.2.1.2)

La  $\beta$ -amylase ou  $\alpha$ -(1,4) glucane maltohydrolase est une exo-glycanase. Elle attaque les chaînes d'amylose et d'amylopectine à partir de l'extrémité non réductrice pour produire du  $\beta$ -maltose de manière récurrente. Comme il est impossible de franchir les liaisons ramifiées

dans l'amylopectine, l'hydrolyse s'arrête à deux ou trois résidus de glucose avant celles-ci. Cette action est donc incomplète, ce qui conduit à la production de 50 à 60% de maltose et le reste est formé de dextrine (Vallier et al., 1977 ; Sundarram et Murthy, 2014).

### 1.4.2.2 Les enzymes spécifiques des liaisons $\alpha$ -(1,6)

#### ➤ L'Iso amylase (EC 3.2.1.68)

L'Iso amylase est dite enzyme débranchante car elle hydrolyse les liaisons  $\alpha$ -(1,6) présentes dans les polysaccharides tels que l'amylopectine. Elle provient généralement des levures et moisissures (Dicko, 1999). Cette enzyme libère des fragments d'amylose ou des oligomères de glucose.

#### ➤ La pullulanase (EC 3.2.1.41)

C'est également une enzyme spécifique à l'hydrolyse des liaisons  $\alpha$ -(1,6) de pullulane et qui peut être obtenue à partir d'*Aerobacter aerogenes* (Dicko, 1999). La pullulanase est incapable d'hydrolyser totalement l'amylopectine qui est beaucoup plus ramifiée que le glycogène (Scriban, 1993). Elle est donc combinée avec l'amyloglucosidase pour le processus de saccharification complète de l'amidon (Dicko, 1999).

### 1.4.2.3 Les enzymes spécifiques des liaisons $\alpha$ -(1,4) et $\alpha$ -(1,6)

#### ➤ La gamma-amylase (EC 3.2.1.3)

La  $\gamma$ -amylase encore appelée : glucoamylase ou acide maltase, clive les liaisons glucosidiques  $\alpha$ -(1,6), en plus de cliver les dernières liaisons glucosidiques  $\alpha$ -(1,4) à l'extrémité non réductrice de l'amylose et de l'amylopectine. Cette enzyme est la plus efficace dans les milieux acides, d'où son nom acide maltase. Elle a un pH optimal d'activité pouvant aller de 3 à 7 (Sundarram et Murthy, 2014).

## 1.4.3 Données sur l' $\alpha$ -amylase

L' $\alpha$ -amylase est l'enzyme amylolytique la plus étudiée. De ce fait, une partie présentant son origine, sa structure, son mode d'action et quelques-unes de ses caractéristiques leur sont consacrées.

### 1.4.3.1 Origine de l' $\alpha$ -amylase

L' $\alpha$ -amylase est une enzyme ubiquitaire qui peut être isolées à partir de divers organismes vivants soit par extraction à partir de cellules animales ou végétales, soit par fermentation de cellules microbiennes (HAQ et al., 2002).

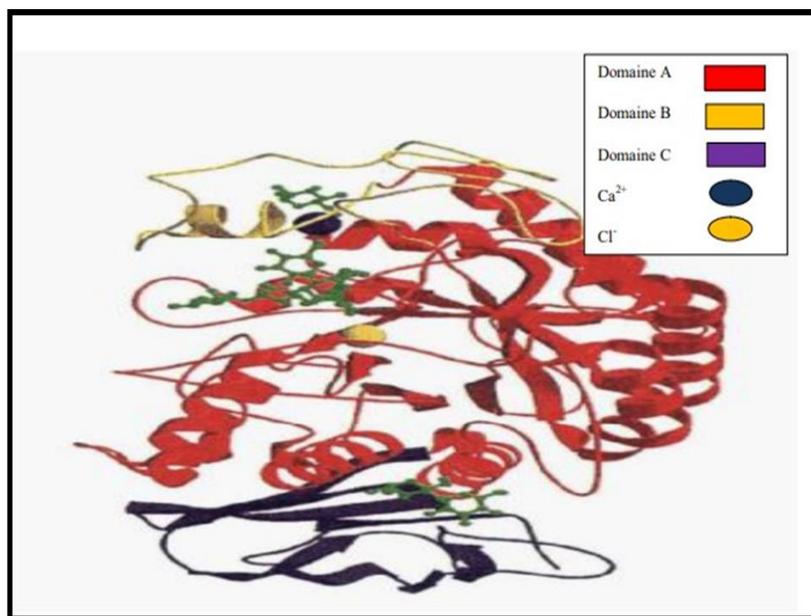
### 1.4.3.2 Caractéristiques de l' $\alpha$ -amylase

Son poids moléculaire diffère d'une origine à une autre et d'une espèce à une autre. Il peut varier de 40 à 90 kDa. Généralement celui des  $\alpha$ -amylases fongiques s'échelonne entre 40 et 70 kDa (**Berry et Paterson, 1990**). Pour que cette enzyme soit active, elle nécessite un cofacteur qui est le calcium (**Sundarram et Murthy, 2014**). Ce dernier 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. Cependant, à haute concentration (généralement supérieure à 20 mM), le calcium devient inhibiteur de l'activité enzymatique (**Kolli et Zatout, 2015**). Par ailleurs, l'activité enzymatique de l' $\alpha$ -amylase n'est pas modifiée par les ions  $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $NH_4^+$ , mais elle est fortement inhibée par l'éthylène diamine tétra acétate (EDTA) et les métaux lourds (**Igarashi et al., 1998 ; Talamond et al., 2002**). En ce qui est de la température optimale d'action de l' $\alpha$ -amylase, elle varie selon l'origine et se situe entre 40 et 90°C avec une faible thermostabilité pour l' $\alpha$ -amylase fongique dont l'optimum est de 50 à 70°C (**Bakri, 2003**). Par contre, l' $\alpha$ -amylase bactérienne est réputée pour sa grande thermostabilité. En effet celle du genre *Bacillus* est caractérisée par un optimum de température allant de 70 à 90°C (**Kolli et Zatout, 2015**). Quant au pH optimal d'activité, il est généralement compris entre 4 et 8. Les  $\alpha$ -amylases bactériennes présentent un optimum supérieur à la neutralité, alors que les  $\alpha$ -amylases fongiques ont des optima compris entre 4 et 6 (**Kolli et Zatout, 2015**).

### 1.4.3.3 Structure de l' $\alpha$ -amylase

L'alpha amylase est une glycoprotéine monomérique avec une structure tridimensionnelle capable de se lier au substrat, et par l'action des groupes catalytiques hautement spécifiques, favorise la rupture des liaisons glucosidiques. Elle renferme une partie glucidique formée essentiellement de D-mannose mais aussi de D-glucose, D-galactose, D-xylose et D-glucosamine (**Stefanova et Emanuilova, 1992**). La partie glucidique est chimiquement associée à la chaîne polypeptidique constituée de 471 à 483 résidus d'acides aminés, avec 4 ou 5 ponts disulfures (**Heslot, 1998**). Le domaine central A, forme un tonneau ( $\beta/\alpha$ ) contenant 8 feuillets  $\beta$  plissés et qui se disposent de façon parallèle et de 8 hélices. Il porte le site actif à la partie C-terminale des feuillets (**Burhan et al, 2003**). Le domaine B est formé d'une boucle de 64 résidus d'acides aminés et constitue une sorte de « couvercle » au-dessus du site actif.

Le domaine C, essentiel pour le repliement post traductionnel de l' $\alpha$ -amylase, est constitué d'un tonneau de 8 feuillets antiparallèles (**figure 4**).



**Figure 1:**Structure tridimensionnelle de l' $\alpha$  – amylase ( Kraulis ,1991)

#### 1.4.3.4 Mode d'action de l' $\alpha$ -amylase

L'activité catalytique de l'enzyme implique la participation des trois acides aminés du site actif : Asp 231 (nucléophile catalytique), Glu 261 (donneur catalytique de l'hydrogène) et Asp 328 (l'aide de catalyse qui est un stabilisateur de la charge positive de l'atome attaqué) (**Park et al., 1997**). Les deux premiers acides carboxyliques sont les groupes impliqués dans la réaction catalytique qui est réalisée en trois étapes:

- ❖ Le Glu en position 261 va fournir un proton à l'oxygène glucosidique. Cette étape est aussi tôt suivie d'une attaque nucléophile sur carbone anomérique du sucre par Asp en position 231. De ce fait, il y a libération de l'extrémité réductrice du substrat.
- ❖ Le maintien du Glu 261 en forme déprotonée aboutit à la mise en place d'une molécule d'eau remplaçant ainsi l'oxygène de la liaison osidique rompue.
- ❖ Régénération de l'état initial et libération de l'autre fragment du substrat, par hydrolyse du lien covalent entre l'oxygène nucliophile de l'Asp 231 et le carbone anomérique de résidu du sucre (**Nielson et al. , 2001**).

### 1.4.3.5 Microorganismes producteurs de l' $\alpha$ -amylase

Les principaux microorganismes producteurs de l' $\alpha$ -amylase sont écrits dans le tableau au-dessous.

#### ➤ Les $\alpha$ -amylases fongiques

La production industrielle d'enzymes à partir des microorganismes fongiques appartenant surtout aux genres *Aspergillus* et *Penicillium* (Takamine, 1894). L' $\alpha$ -amylase fongique est d'une thermostabilité assez faible, avec une température optimale comprise entre 50-55°C (Fogarty et Kelly, 1994). certains genres de moisissures telles que *Rhizopus* et *Alternaria* sont utilisés dans la production d' $\alpha$ -amylase thermostable. Les levures interviennent également dans la production d' $\alpha$ -amylase (Leveau et Bouix, 1993).

#### ➤ Les $\alpha$ -amylases bactériennes

Les amylases sont principalement obtenues par procédé de fermentation lors de l'inoculation des bactéries appartenant à la famille de Bacillaceae telles que *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus licheniformis* et *Bacillus subtilis* (Milner et al., 1997 ; Bousseboua, 2002 ; Mc Tighe et al., 1995).

**Tableau I - 3 : principaux micro-organismes producteurs de l' $\alpha$ -amylase (Schwimmer and Balls, 1949).**

Microorganismes	Espèces
Moisissures	<i>Penicillium fellutanum</i> <i>Penicillium chrysogenum</i> <i>Rhizopusorzae</i> <i>Aspargillus niger</i> <i>Alternaria</i>
Levures	<i>Candida guilliermondii</i> <i>Candida tropicalis</i> <i>Sacharomyces cerevisae</i>
Bactéries	<i>Bacillus licheniformis</i> <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> <i>Bacillus sibtilis</i>

### 1.4.3.6 Utilisation industrielle de l' $\alpha$ amylase

La première utilisation des  $\alpha$ -amylases remonte à 1984, comme aide pharmaceutique pour le traitement de désordres digestifs (Bennett, 1998). De nos jours, cette enzyme trouve une

application dans tous les processus industriels se rapportant à l'amidon. Le **tableau 04** rapporte en bref les divers domaines d'application des  $\alpha$ -amylases.

**Tableau I - 4:Utilisation industrielle de l'alpha amylase**

	<b>Exemple de microorganisme utilisé</b>	<b>Exemple d'application industrielle</b>
<b><math>\alpha</math>-amylase</b>	<p><i>Aspergillus niger</i>  <i>A.Oryzae</i>  <i>A.Sojae</i>,  <i>Penicillium expansum</i>  <i>Rhizopus</i> sp.  <b>(Aunstrup et al,1979).</b></p>	<p>Boulangerie :diminution de la viscosité de la pate, accélération de la fermentation ,augmentation du volume du pain, meilleure conservation.</p> <p>Agroalimentaire :fabrication des sirops du glucose.</p> <p>Pharmaceutique :aide à la digestion.</p> <p>Glucoserie : Solubilisation de l'amidon, accompagnée d'une chute importante de la viscosité (liquéfaction) (<b>Sicard, 1982</b>).</p> <p>Industrie pharmaceutique: Agent anti-inflammatoire. -Un aide digestif (contre la dyspepsie et les fermentations intestinales).                      Traitement du diabète et de l'obésité.  <b>(Nielsen et Borchert, 2000).</b></p> <p>Industrie textile :                      Le désencollage textile, qui permet d'éliminer la colle d'amidon qui enduit les fibres et les protège au cours du tissage (<b>Ahlawat et al ; 2009</b>).</p>

### 1.4.4 Donnés sur la gluco-amylase (EC 3.2.1.3)

La glucoamylase est une exo-enzyme, encore appelée : amyloglucosidase ; $\gamma$ -amylase ou acide maltase, enzyme de la famille des glycosides hydrolases. Cette enzyme est impliquée dans la digestion et exprimée dans les cellules de l'intestin grêle. Elle permet de rompre les liaisons entre deux glucoses contenus dans les polymères tels que l'amidon

Sa particularité est d'hydrolyser les résidus à partir des extrémités de la molécule. Cette enzyme est donc qualifiée d'«exoglycosidase».

### 1.4.4.1 Origine de la gluco-amylase

L'amyloglucosidase (EC 3 2 1 3) est une enzyme essentiellement produite par des moisissures du genre *Aspergillus sp.*, *Penicillium sp.*, *Rhizopus sp* et peu de bactéries.

**Tableau I - 5:propriétés de gluco-amylase de différentes origines (Bouquelet., 2016).**

Origine de l'enzyme	Masse moléculaire (KDa)	pH optimum	Température optimale °C
<b>Amyloglucosidase</b>			
<i>Aspergillus awamori</i>	88	4.5	60
<i>Aspergillus niger</i>	100	4.5 - 5	60
<i>Aspergillus oryzae</i>	40 - 76	4.5	40 - 60
<i>Mucor sp.</i>	50 - 60	5	55
<i>Rhizopus delemar</i>	100	4.5	40

### 1.4.4.2 Mode d'action

La glucoamylase (EC 3.2.1.3) hydrolyse les polysaccharides des extrémités non réductrices de la chaîne par clivage consécutif des liaisons glycosidiques  $\alpha$ -1,4 et  $\alpha$ -1,6. Leur mécanisme d'action est de type externe, c'est-à dire, une action au niveau du glucose résiduel non-réducteur externe de la chaîne et, donc, le seul produit final est le glucose

les amyloglucosidases convertissent la configuration anomérique alpha en configuration beta. La plupart des glucoamylases utilisées dans l'industrie sont d'origine fongique (Satyanarayana et al., 2013).

Cette enzyme est la plus efficace dans les milieux acides, d'où son nom acide maltase. Elle a un pH optimal d'activité pouvant aller de 3 à 7 (Sundarram et Murthy, 2014).

Les glucoamylases sont principalement utilisés dans la production de sirop de glucose, de sirop de maïs à haute teneur en fructose et dans l'hydrolyse des grains entiers et de l'amidon pour la production d'alcool (Jennylynd et al, 2007)

1.4.4.3 Structure de gluco-amylase

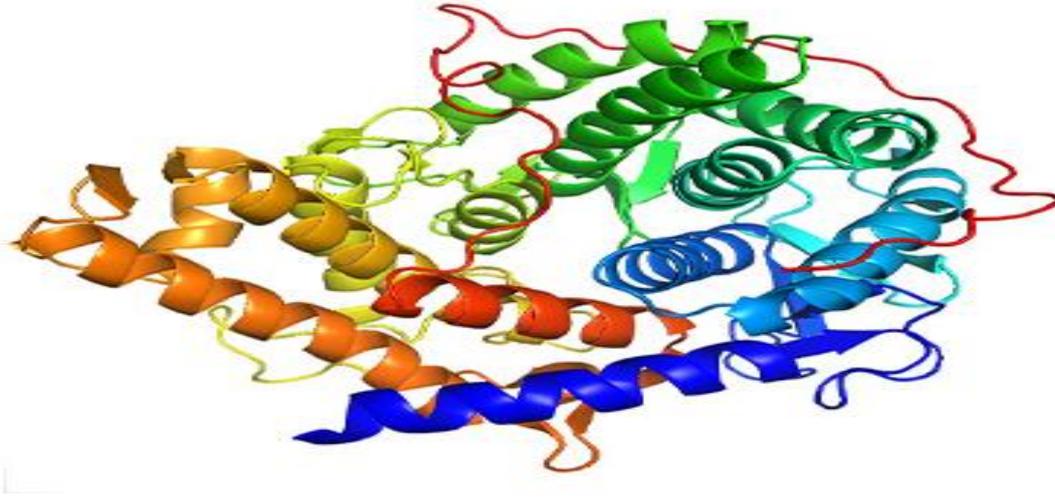


Figure I- 4 : Structure tridimensionnelle de gluco-amylase



*Chapitre II*  
*Matériels & Méthodes*

### CHAPITRE II : Matériel et méthodes

Notre partie expérimentale a été réalisée au sein de deux laboratoires : le laboratoire central de la police scientifique et technique (Alger) ainsi que Le laboratoire de Recherche en Technologie Alimentaire (LRTA) (FT, UMBB).

- L'objectif de ce travail consiste à la production des deux enzymes extracellulaires (alpha amylase et amyloglucosidase) par une fermentation sur un milieu solide (déchets agroalimentaires) en utilisant une souche fongique *Aspergillus niger*.

#### 1. Matériel

##### 1.1 Matériel non biologique (Annexe I)

###### 1.1.1 Matériel biologique

L'espèce fongique utilisée dans ce travail est *Aspergillus niger* (souche isolée et identifiée par le doctorant Gherbi Younes). La souche est conservée dans des tubes PDA inclinés à 4°C (Voir composition: annexe). Un repiquage s'effectue tous les deux mois sur le même milieu afin d'assurer la préservation de la vitalité de la souche.



**Figure II- 1:vue macroscopique de moisissure *Aspergillus niger*.**

### 1.2 Méthodes

#### 1.2.1 Substrat de fermentation

Deux types de son de blé dur sont utilisés comme substrat de fermentation dans cette étude. Le premier déchet nous a été gracieusement fourni par l'usine EX-SEMPAC (Corso, Algérie) alors que le deuxième a été donné par le groupe des Grands Moulins Dahmani (Ouled Moussa, Algérie). Le son de blé a été broyé afin de réduire la taille des particules (0,425-0,850 mm), puis conservé dans des sachets en plastique ou dans des boîtes stériles avant l'utilisation (**Boudouma, 2009**).



**Figure II- 2:Son de blé 1(EX-SEMPAC)**



**Figure II- 3:Son de blé 2(Ouled-moussa)**

### **1.2.2 Caractérisation physico-chimiques et biochimiques des déchets agroalimentaires**

Ces analyses ont été effectuées en trois (03) essais.

#### **1.2.2.1 Mesure de pH (AFNOR ,1986)**

Nous faisons dissoudre 10 grammes de poudre dans 100 ml d'eau distillée à l'aide d'un homogénéisateur, nous laissons reposer la solution puis nous introduisons l'électrode du pH-mètre dans la solution à analyser pour lire la valeur de pH.

#### **1.2.2.2 Détermination de la conductivité électrique**

La conductivité électrique d'un échantillon est la conductance des colonnes d'eau comprises entre deux électrodes métalliques de 1 cm<sup>2</sup> de surface et séparées l'une de l'autre de 1 cm (**Rodier, 1997**). Cette aptitude à conduire le courant dépend des ions présents dans la solution, de leur concentration totale, de leur valence, de leur mobilité, de leur concentration relative et de la température de la solution. Elle nous renseigne aussi sur la teneur en sels solubles du produit (salinité). Elle est mesurée par un conductimètre de type (**JENWAY 4520**).

#### **1.2.2.3 Détermination de la teneur en matière sèche (AFNOR, 1986)**

On met à l'intérieur de l'analyseur d'humidité une prise d'essai de 3g (poudre de déchets) et on règle la température de séchage à 80°C, on laisse chauffer, après quelques minutes, le

résultat est enregistré sur l'écran de l'appareil, ceci indique le pourcentage de l'extrait sec total.

### 1.2.2.4 Détermination de l'humidité

L'humidité de la poudre de déchet peut être directement calculée à partir de la teneur en matière sèche selon la formule suivante :

Avec

$$H = 100\% - MS$$

H : humidité et MS : matière sèche

### 1.2.2.5 Demande chimique en oxygène (DCO)

La demande chimique en oxygène est la quantité d'oxygène consommée par les matières existantes dans l'eau et oxydable dans des conditions opératoires bien définies. Elle est d'autant plus élevée qu'il y a des corps oxydables dans le milieu. L'oxygène affecte pratiquement la totalité des matières organiques biodégradables et non biodégradables. La DCO est mesuré en mg d'O<sub>2</sub>/L (Fyeche, 2014).

#### Mode opératoire

On introduit 2ml de l'échantillon à analyser dans le tube contenant le kit spécifique au dosage de la DCO avec précaution. Après, mélanger le contenu pour avoir une solution homogène. Fermer la cuve, nettoyer l'extérieur de celle-ci, et mélanger. Ce tube est chauffé dans le thermostat HT 200 S pendant 15 minutes. Faire sortir la cuve chaude et le déverrouillé, retourner 2 fois avec précaution Puis laissé à refroidir à une température ambiante dans le thermostat. Les résidus doivent être complètement éliminés avant l'évacuation. A la fin, bien nettoyer l'extérieur de la cuve et mesurer.

### 1.2.2.6 Demande biochimique en oxygène pendant 5 jours (DBO<sub>5</sub>)

La demande biochimique en oxygène pendant 5 jours (DBO<sub>5</sub>) est évaluée par la méthode respirométrique dite manométrique qui permet de suivre automatiquement l'évolution de la demande biochimique en oxygène au cours de l'oxydation des matières organiques.

Nous introduisons 2ml de l'échantillon à analyser dans le tube contenant le kit spécifique au dosage de la DCO avec précaution. Après, mélanger le contenu pour avoir une solution homogène. Fermer la cuve, nettoyer l'extérieur de celle-ci, et mélanger. Ce tube est chauffé dans le thermostat HT 200 S pendant 15 minutes. Faire sortir la cuve chaude et le déverrouillé, retourner 2 fois avec précaution Puis laissé à refroidir à une température

ambiante dans le thermostat. Les résidus doivent être complètement éliminés avant l'évacuation. A la fin, bien nettoyer l'extérieur de la cuve et mesurer.

### Mode opératoire

L'échantillon mesuré à l'aide d'une fiole à trop-plein, est introduit dans des flacons ambrés maintenus dans une enceinte thermostatée est mis à incuber en présence d'air à une température de 20 °C, pendant 5 jours sous agitation constante. Les micro-organismes présents consomment l'oxygène dissous qui est remplacé en permanence par de l'oxygène en provenance du volume d'air situé au-dessous de l'échantillon. L'anhydride carbonique formé est piégé par de l'hydroxyde de potassium placé dans le réservoir fixé au goulot. Chaque flacon est muni d'un manomètre qui enregistre la dépression provoquée par la consommation de l'O<sub>2</sub> et la fixation du CO<sub>2</sub> (Rodier et al., 2009).

### 1.2.2.7 Détermination de la teneur en protéines (Méthode de Kjeldahl)

Le principe de la méthode est basé sur la transformation de l'azote organique en sulfate d'ammonium sous l'action de l'acide sulfurique en présence d'un catalyseur, alcalinisation des produits de la réaction puis distillation de l'ammoniac libéré et titrage.

### Mode opératoire

On introduit dans un matras de minéralisation 1 g de son de blé dur et une pincée de catalyseur (sulfate de cuivre et de potassium), puis on ajoute 15 ml d'acide sulfurique pur ; on applique un chauffage progressif : d'abord une attaque à froid pendant 15 min jusqu'à l'apparition de vapeur blanche d'anhydride sulfurique, puis le chauffage est rendu plus énergique, attaque à chaud pendant 4 à 5 heures ; quand la solution devient limpide, elle est refroidie et complétée à 100 ml avec de l'eau distillée. La distillation est réalisée dans un distillateur semi-automatique (VELP) où l'ajout de 20 ml de lessive de soude à 35 % dans le matras et 25 % d'acide borique dans une fiole de 250 ml est réalisé. Le dégagement d'ammoniac est récupéré dans une solution d'acide borique contenant l'indicateur coloré (mélange de bleu de méthylène et rouge de méthyle). L'excès d'ammoniac est alors dosé par l'acide sulfurique 0,05 N dans un titrateur automatique. Un témoin est réalisé dans les mêmes conditions sans échantillon.

La teneur en azote total est déterminée par la formule suivante :

$$N (\%) = \frac{v}{v'} \cdot (n - n') \cdot 0,05 \cdot 1,4$$

**p**

Où  $V$  est le volume de la solution minéralisée (ml),  $V'$  est le volume de la solution de soude ajoutée (ml),  $N$  est la quantité d'acide sulfurique lue après titrage (ml) avec l'acide sulfurique de normalité 0,05 N,  $N'$  est le volume de l'acide sulfurique dépensé dans le titrage du témoin (ml) et  $P$  est le poids de la prise d'essai (g).

La teneur en protéines est calculée en multipliant le taux d'azote total  $N$  (%) par le coefficient 6,25 (Khalil et al., 2002 ; Ben Thabet et al., 2007).

$$\text{Concentration en protéines (g/l)} = \text{Azote total (g/l)} \times 6,25$$

### 1.2.2.8 Détermination de la teneur en matière grasse (NF EN ISO 734-1, 2000)

On sèche le ballon de 500 ml dans une étuve à 100°C pendant 1 heure. Après refroidissement dans un dessiccateur, on détermine son poids (vide) et on met 20 à 25 g de l'échantillon dans la cartouche en papier filtre. Puis, on place cette dernière avec l'échantillon dans l'appareil soxhlet en versant 200 ml d'hexane dans le ballon et 50 ml dans l'extracteur. On chauffe ensuite le ballon sur la chauffe ballon pendant 5 heures jusqu'à épuisement de la matière grasse. Après l'élimination du solvant par distillation, on sèche le ballon à une température de 70-80 °C puis on le pèse après refroidissement dans un dessiccateur. On répète l'opération de séchage jusqu'à l'obtention d'un poids constant.

La teneur en matière grasse est déterminée selon la formule suivante :

$$\text{MO (\%)} = \frac{(P2-P1)}{P} \cdot 100$$

Où  $P1$  est le poids du ballon vide (g),  $P2$  est le poids du ballon avec l'huile extraite (g) et  $P$  est le poids de la prise d'essai (g).

### 1.2.2.9 Dosage des cendres

Son principe consiste à évaporer à sec d'une quantité connue du produit à analyser, puis à l'incinérer dans un four à moufle à une température de 530°C pendant 5 heures et à le refroidir dans un dessiccateur (AFNOR, 1986).

### Expression des résultats

Le taux des cendres de l'échantillon exprimé en g/l est donné par la formule suivante :

$$\text{Teneur en cendre (g/l)} = \frac{P_1 - P_0}{P_2 - P_0}$$

D'où : P0 : poids du creuset vide.

P1 : poids du creuset vide + la prise d'essai.

P2 : poids du creuset vide + résidu après incinération.

#### 1.2.2.10 Détermination de la teneur en sucres réducteurs (Miller, 1959)

Seuls les sucres réducteurs sont mesurés par cette méthode. La fonction réductrice se complexe sous certaines conditions avec le réactif DNS (acide di-nitro-3,5 salicylique), ce qui se traduit par une coloration orangée. L'intensité de cette coloration est proportionnelle à la teneur en sucres réducteurs.

#### Mode opératoire

Pour réaliser le dosage, on effectue dans un tube à essai le mélange de 1 ml de réactif de DNS avec 1 ml d'échantillon à analyser. Après homogénéisation du mélange, on porte le tout à 100 °C pendant 10 minutes. À la sortie du bain-marie, le refroidissement dans un bain de glace et l'ajout de 10 ml d'eau distillée arrête la réaction. La lecture de l'absorbance à 540 nm permet de déterminer, à partir de la gamme étalon et en tenant compte des dilutions, la teneur en sucres réducteurs des différents échantillons (exprimée en g/l) (Akin, 2008).

#### 1.2.2.11 Estimation de la teneur en amidon

##### ➤ Méthode 1

La teneur totale en amidon des sons de blé dur a été mesurée selon la méthode de Keer (1950).

#### Mode opératoire

La teneur en glucose de son de blé dur a été déterminée par la méthode de l'acide phénol sulfurique (AOAC 1980). Une courbe standard a été préparée en utilisant une concentration connue de glucose. Différentes dilutions ont été préparées à partir de la solution mère de glucose. Dans chaque tube, 1 ml de phénol à 5 % et 5 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentré à 96 %. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a été ajouté et laissé refroidir pendant 20 min. Après cela, la DO a été mesurée à 490 nm à l'aide d'un spectrophotomètre. À partir de la courbe standard, la concentration de glucose

dans les échantillons de son de blé dur a été déterminée et la teneur en amidon a été calculée à l'aide de la formule suivante :

$$\text{Glucose (g/100 ml)} \times 0,93 = \text{Amidon (g/100 ml)}.$$

### ➤ Méthode 2

Dosage de l'amidon par spectroscopie infra-rouge par transformée de fourrier (F.T.I.R)

#### **Principe**

Il est basé sur l'étude des interactions entre l'échantillon et le rayonnement électromagnétique dans la région du spectre comprise entre 4000 à 650  $\text{cm}^{-1}$ .

**Mode opératoire :** Cette analyse est pratiquée à l'aide d'un spectrophotomètre à transformée de Fourier PERKIN-ELMER modèle Spectrum One, selon les conditions opératoires suivantes :

- Technique : U.A.T.R ;
- Bande : 4000 à 650  $\text{cm}^{-1}$  ;
- Résolution : 4  $\text{cm}^{-1}$ .

#### **1.2.2.12 Dosage des sels minéraux**

Le dosage des ions  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  et  $\text{Mg}^{2+}$  a été réalisé par spectrophotométrie d'absorption atomique tandis que le phosphore est dosé par méthode colorimétrique et les chlorures ont été quantifiés par titrimétrie.

##### **2.2.2.12.1 Dosage des sels minéraux par spectrophotométrie d'absorption atomique (SAA) (AFNOR ,1986).**

Le principe consiste en une aspiration de l'échantillon sous forme liquide dans une flamme à une température de l'ordre de 1700 à 2550 °C pour permettre la formation d'une vapeur atomique qui est ensuite irradiée par une lampe spectrale à cathode creuse. En général, cette dernière émet des raies de transition des atomes recherchés et la mesure de leur l'intensité est effectuée à une longueur d'onde spécifique.

### **Mode opératoire**

Après minéralisation de 0,5 g de matière sèche, les cendres ainsi obtenus sont mis dans 3 ml d'eau distillée et 3 ml d'acide chlorhydrique concentré. Ce mélange est chauffé ensuite sur une plaque chauffante, sans dépasser 250°C, jusqu'à la dissolution complète des cendres. A la fin, la solution obtenue est versée dans une fiole jaugée d'une capacité de 100 ml et complétée au trait de jauge avec de l'eau distillée. Elle servira au dosage des sels minéraux par spectrophotométrie d'absorption atomique de type PU 9200 X Philips.

#### **2.2.2.12.2 Dosage du phosphore par spectrophotométrie**

Ce dosage est effectué selon la méthode décrite par **Colombie (2005)** en utilisant le molybdate d'ammonium.

### **Mode opératoire**

4 ml d'étalon ou d'échantillon sont additionnés au 0,8 ml de molybdate d'ammonium. Le mélange ainsi obtenu est agité vigoureusement puis est laissé reposer 15 minutes. La lecture se fait par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 720 nm contre un blanc composé de 4 ml d'eau distillée et 0,8 ml de molybdate d'ammonium. Une courbe de corrélation est établie entre la densité optique et une gamme d'étalon comprise entre 0 et 5 mg/l de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$

**(Annexe B).**

#### **2.2.2.12.3 Dosage des chlorures**

Les chlorures sont dosés par la méthode de Charpentier Volhard décrite par **AFNOR (1980)** principe repose sur la dissolution de la matière organique du déchet par le permanganate de potassium et l'acide nitrique puis détermination de la teneur en chlorures par titrage argentimétrique dans une solution d'acide nitrique en présence de thiocyanate de potassium et alun de fer comme indicateur.

### **Mode opératoire**

Dans une fiole de 100 ml, on introduit 20 ml de produit à analyser, 2 ml d'hexacyanoferrate II de potassium à 15 % et 2 ml d'acétate de zinc à 30 %. Nous agitons la mixture et nous complétons avec de l'eau distillée jusqu'au trait de jauge de la fiole. Après filtration, 20 ml de filtrat est additionné aux 5 ml de nitrate d'argent à 0,1 N, 1 ml d'acide nitrique concentré et 2 ml d'alun de fer à 38 % puis ce mélange est titré à l'aide de thiocyanate de potassium (0,1N) jusqu'à coloration orangée.

### Expression de résultats

La teneur de chlorures est donnée en gramme de NaCl par litre selon la formule suivante :

$$\text{Teneur en chlorures (g/l)} = 0,585 (5 - V)$$

Où :

V : Volume en ml de la solution de thiocyanate de potassium nécessaire pour l'obtention de la couleur rouge.

### Principe

L'analyse des sucres par la chromatographie liquide à haute performance a fait l'objet de plusieurs travaux (**Mathlouthi et Reiser, 1995**). HPLC constitue une technique analytique très employée. Elle correspond à une évolution de la chromatographie préparatoire sur colonne dont les performances, en termes de sélectivité et résolution dont, une relation est établie entre l'intensité des pics chromatographiques et la concentration des solutés, par étalonnage. Le type de détecteur utilisé est dépendant des composés à analyser, pour les sucres, il s'agit d'un réfractomètre (**Fulki et al., 1994**).

### 1.3 Etude de la production des enzymes $\alpha$ -amylase et amyloglucosidase par la souche *Aspergillus niger* par fermentation en milieu solide.

#### 1.3.1.1 Revivification de la souche *Aspergillus niger*

Elle est réalisée par prélèvement de quelques spores ou un fragment mycélien à partir des tubes PDA inclinés, que l'on transfère sur le même milieu coulé dans des boîtes de Pétri sous les conditions d'asepsie. La culture fongique est incubée à  $37\pm 2^\circ\text{C}$  pendant 5-7 jours.

#### 1.3.1.2 Préparation de l'inoculum

L'inoculum correspond à la suspension de spores de l'*Aspergillus niger*, servant à l'ensemencement du milieu de fermentation. La récupération des spores s'effectue à partir des cultures d'*A. niger* sur milieu Sabouraud incubées à  $37\pm 2^\circ\text{C}$  pendant 5-7 jours, par l'addition d'une solution stérile de Tween 80 à 0,1% (10 ml/boîte de Pétri). À l'aide d'une anse de platine stérile, on gratte légèrement la surface de la gélose afin de mettre en suspension les spores fongiques, qui sont filtrées par passage sur papier filtre stérile entreposé un entonnoir.

### 1.3.1.3 Dénombrement des spores

A 1 ml de suspension de spores préalablement agitée, on ajoute 9 ml d'eau tweenée (eau + tween), la solution mère ainsi obtenue permet de préparer la gamme étalon. Le nombre de spores dans chaque dilution est déterminé par la technique de dénombrement en utilisant la cellule de malassez. Le nombre de cellules par unité de volume est donné par la formule:

$$N = n/V \text{ (ou } N = (n/V) \times f \text{ en cas de dilution)}$$

Avec:

**n** = Nombre de cellules comptées

**V** = Volume de comptage

**F** = Facteur de dilution

L'examen s'effectue au microscope au grossissement (G40). La courbe d'étalonnage est établie par mesure de l'absorbance de chaque dilution à 650 nm au spectrophotomètre de type UV-VIS 9200 en fonction du nombre de spores comptées sur la cellule 1.

Avant chaque inoculation, le nombre de spores est estimé par référence à la courbe d'étalonnage puis, la suspension est diluée de manière à obtenir un nombre de spores de  $2 \times 10^6$ / ml (El hachemi, 2012).

### 1.3.1.4 Conservation des souches

Les souches sont maintenues sur milieu Sabouraud (Incubation à 37°C jusqu'à une bonne sporulation). Les spores sont récupérées par addition de 10 ml d'eau distillée avec le glycérol à 20% (agent cryoprotecteur). Ces suspensions de spores sont ensuite stockées au congélateur, afin de garder leur viabilité jusqu'à leur utilisation (Botton *et al.*, 1990).

### 1.3.1.5 Préparation des fermentations en milieu solide

Les fermentations en milieu solide sont réalisées dans des erlenmeyers de 250 ml à col large. Dans chaque erlenmeyer, 5 g de son de blé dont le taux d'humidité initiale est de 10 %, sont introduits puis les erlenmeyers sont bouchés avec du coton cardé, recouverts avec du papier aluminium et autoclavés à 120°C pendant 20 minutes. Après refroidissement, les erlenmeyers sont inoculés par une suspension de spores à raison de  $2 \times 10^6$  spores par grammes de substrat. Les erlenmeyersensemencés sont ensuite incubés à 37°C dans une étuve, pendant 5 jours. Toutes les expériences sont réalisées en triplicate.

### 1.3.1.6 Dosage des activités enzymatiques

Afin de caractériser les extraits enzymatiques, plusieurs dosages sont effectués sur ces extraits bruts obtenus par simple filtration des milieux de fermentation.

#### 2.2.3.6.1 Dosage de l'activité $\alpha$ -amylasique

L'activité amylolytique a été estimée selon la méthode de **Bernfeld (1955)**, encore appelée méthode de dosage des sucres réducteurs à l'acide dinitrosalicylique (DNSA).

##### ➤ Principe

Le principe de cette méthode est basé sur les propriétés réductrices des sucres libérés lors de l'hydrolyse enzymatique de l'amidon notamment le maltose. A chaud et en milieu alcalin, il y a réduction de l'acide 3,5-dinitrosalicylique (ou acide 2-hydroxy-3,5- dinitrobenzoïque) qui joue le rôle d'oxydant, le maltose étant le réducteur. Cette réaction de réduction aboutit à la formation de l'acide 3-amino-2-hydroxy-5-nitrosalicylique qui un composé de couleur rouge. La réaction est colorimétrique et l'intensité de la coloration rouge est proportionnelle à la quantité du maltose libérée. L'activité enzymatique est exprimée par unité internationale (U/ml), correspondant à une  $\mu$ mole du maltose libéré par minute et par millilitre d'extrait.

##### Protocole expérimentale

Un ml de chaque extrait enzymatique est ajouté à 1ml de la solution d'amidon à 1% préparé dans du tampon phosphate pH 5. Après agitation le mélange a été incubé à 40°C pendant 30 minutes avec un tube témoin représentant le blanc. La réaction est arrêtée par l'addition de 1 ml de DNSA suivie d'un chauffage à 100°C pendant 10 minutes. Après refroidissement dans un bain de glace, 10 ml d'eau distillée sont ajoutés. L'absorbance est mesurée à 540 nm contre le blanc. La concentration du maltose libéré lors de l'hydrolyse de l'amidon est déterminée à partir d'une courbe d'étalonnage établie avec des concentrations du maltose.

#### 2.2.3.6.2 Dosage de l'activité amyloglucosidase

Cette activité a été déterminée selon le protocole suivant :

On introduit 1 ml de substrat (1% d'amidon) et 1 ml de l'extrait enzymatique puis on incubé l'échantillon à 40 C ° dans un bain marie durant une période de 30 minutes et on chauffe ensuite le mélange pendant 10 min à 100 C° avec une plaque chauffante dans le but d'arrêter la réaction enzymatique.

Après chauffage, on ajoute 20  $\mu$ l de l'extrait enzymatique avec 1 ml du réactif spin react (GLUCOSE GOD-PAP). Le mélange ainsi obtenu est agité puis incubé à 37 C° durant 10

min dans un bain marie ou laissé dans une température ambiante pendant 20 min. La lecture des résultats s'effectue par spectrophotomètre à une longueur d'onde de 510 nm. La concentration du glucose libéré lors de l'hydrolyse de l'amidon est déterminée à partir d'une courbe d'étalonnage établie avec des différentes concentrations en glucose.

### 2.2.3.7 Dosage des protéines

Le dosage des protéines totales de l'extrait enzymatique a été réalisé selon la méthode de **Bradford, (1976)** ; c'est une méthode colorimétrique qui permet de déterminer la concentration d'une solution protéique.

#### ➤ Principe

Elle est basée sur l'interaction en milieu acido-alcoolique entre les protéines et le BBC G-250. Ce colorant s'adsorbe sur les protéines ce qui provoque un déplacement de son pic d'absorption maximale qui passe du rouge (464 nm, forme cationique) au bleu (595 nm, forme anionique) (**Bradford, 1976**). Cette adsorption se fait principalement et de façon spécifique par des liaisons ioniques avec des acides aminés basiques (Arg, Lys, His) de la molécule protéique.

#### ➤ Protocole expérimentale

Une gamme étalon est préparée à partir d'une solution mère de sérum albumine bovine (BSA) (1mg/1ml) selon les quantités suivantes : 0, 20, 40, 60, 80 et 100 µg. Toutes les dilutions des solutions protéiques sont effectuées en présence de l'eau distillée. Les échantillons et le blanc sont ajustés à un volume final de 100 µl. Après addition de 3 ml du réactif de Bradford et agitation, l'absorbance est mesurée à 595 nm contre le blanc. Les concentrations protéiques des extraits enzymatiques seront déduites à partir de cette courbe d'étalonnage.

### 2.2.3.8 Optimisation de la production de $\alpha$ -amylase et d'amyloglucosidase

Il est très connu que la production des enzymes microbiennes est fortement influencée par la composition du milieu de fermentation (spécialement la source de carbone, d'azote et les sels minéraux), les facteurs physicochimiques (température, pH, l'oxygène dissous, taux d'inoculum) et par le temps d'incubation (**Oh et al., 2000; Celik et Calik, 2004; Rao et al., 2006; Djekrif-Dakhmouche et al., 2006**).

Après chaque étape d'optimisation, le dosage des protéines (**Bradford, 1976**), la détermination de l'activité  $\alpha$ -amylasique (**Bernfeld 1955**) et la mesure de l'activité amyloglucosidase des extraits enzymatiques sont déterminés dans les conditions standards.

### 2.2.3.8.1 La solution minérale

L'influence sur la production de l' $\alpha$ -amylase et amyloglucosidase d'*A. niger* a été évaluée par l'utilisation d'une solution minérale (SM) (voir composition : annexe A). Dans chaque Erlenmeyers de 250ml, on introduit 5g de son de blé et 5 ml de la solution minérale, dont le pH initial est ajusté à 4. Le mélange est ensuite stérilisé à 121°C pendant 15-20min. Après refroidissement, chaque milieu est inoculé par 1ml de la suspension fongique ( $2 \times 10^6$  spores/ml), puis incubé à 37°C pendant 5 jours. Toutes les expériences sont réalisées en triplicate.

### 2.2.3.8.2 Température d'incubation

L'effet de la température de fermentation sur la production de l' $\alpha$ -amylase et amyloglucosidase d'*A. niger* a été étudié sur des cultures à base de son de blé incubées à différentes températures : 30, 35, 37, 40 et 45 et 30°C pendant 5 jours, en utilisant la solution minérale pour assurer une meilleure production.

### 2.2.3.8.3 Ph initial de la solution minérale

Afin d'étudier l'influence du pH de la solution minérale sur la production de l' $\alpha$ -amylase et amyloglucosidase d'*A. niger*, des fermentations sont conduites à la température optimale mais à différents pH variant de 4 à 6 pendant 5 jours. L'ajustement du pH est effectué avec une solution d'HCl et /ou du NaOH (1N).



# *Chapitre III*

## *Résultats & Discussion*

**Chapitre III : Résultats et discussions**

Cette partie expose l'ensemble des résultats obtenus portant sur la caractérisation physicochimique des deux types de son de blé dur et sur l'optimisation de la production de l'alpha-amylase et de glucoamylase par fermentation en milieu solide en utilisant une souche fongique « *Aspergillus niger* »

**1. Caractérisation physicochimique et biochimique des deux types de son de blé dur**

**Tableau III- 1: Composition biochimique moyenne des sons de blé dur étudiés.**

Paramètres Son de blé	Son de blé dur type 1	Son de blé dur type 2
pH	6,4 ± 0,02	6,361 ± 0,10
Conductivité électrique (us/cm)	700 ± 0,08	828,11 ± 0,04
Extrait sec total (%)	91 ± 0,15	90,77 ± 0,16
Humidité (%)	9 ± 0,04	9,23 ± 0,07
Les cendres (%)	3,835 ± 0,2	3,055 ± 0,09
Amidon (%)	36,97 ± 0,12	40,73 ± 0,17
Les sucres réducteurs (%)	7,6 ± 0,10	2,93 ± 0,16
La matière grasse (%)	3,65 ± 0,30	3,15 ± 0,14
Les protéines (%)	5,70 ± 0,33	5,77 ± 0,06
COD (mg/l)	3000 ± 0,13	2955 ± 0,01
DBO5 (mg/l)	1650 ± 0,18	1587 ± 0,22
Les sels minéraux (g/100g)		
Na	0,014 ± 0,038	0,00956 ± 0,047
Ça	0,1600 ± 0,123	0,1358 ± 0,11
K	1,500 ± 0,090	1,278 ± 0,099
Zn	0,07 ± 0,25	0,036 ± 0,20
Mg	0,50 ± 0,025	0,368 ± 0,018
p	1, 38 ± 0,033	1,2334 ± 0,03
Cl	0,10 ± 0,17	0,075 ± 0,212

D'après les résultats portés dans le tableau 05, nous constatons que la composition biochimique moyenne des deux types de son de blé dur n'est pas très différente. Toutefois les valeurs sont légèrement inférieures ou supérieures ce qui s'expliquerait par le fait des variétés, des origines et des maturités différentes des grains de blé, ainsi que des techniques de mouture et de conservation variées qui sont employées, les sons de blé peuvent présenter des compositions très variables (**Maréchal, 2001**).

En effet, les résultats obtenus mettent aussi en évidence la richesse de la composition de nos déchets, la valeur moyenne de la matière sèche est de 91% pour son de blé dur 1 et 90,77% pour son de blé dur 2 ; bien qu'elle varie de 90 à 92 %, elle reste comparable à celle rapportée par les données bibliographiques (**Bourdon et al., 1984 ; AEC, 1987; Munoz, 1991**).

Quant à la teneur moyenne en cendres (3,83%) pour son de blé dur 1 et (3,05%) pour son de blé dur 2, elle est de même ordre de grandeur que celles rapportées par **Bourdon et al (1984)** et **Munoz (1991)**, mais semble être relativement faible par rapport à celles mesurées par **Bensmail (2012)** : 4,75 %, par **Hubbell (1980)** :7,95% et par **Farrell et al (1967)** : 8,82%. De même, DBO<sub>5</sub> et DCO qui sont respectivement  $1650 \pm 0,18$  et  $3000 \pm 0,13$  mg d'O<sub>2</sub>/l avec un rapport DCO/DBO<sub>5</sub> égal à 1,81 pour son de blé dur 1 et  $1587 \pm 0,22$  et  $2955 \pm 0,01$  mg d'O<sub>2</sub>/l avec un rapport DCO/DBO<sub>5</sub> égal à 1,86 indiquant ainsi une moyenne biodégradabilité de ce rejet. Cela signifie aussi que ce déchet alimentaire constitue un facteur de pollution environnemental redoutable. En ce qui concerne le taux de protéines de nos deux types de son de blé dur, sa valeur moyenne de 5,70% pour déchet 1 et 5,77% pour déchet 2 se situe en bas de la gamme de valeurs observées par **Mac Masters et al (1978)** : 11,8 à 14,5% et par **Hosenay (1986)** : 14,50%. En revanche, elle apparaît très faible comparée à celle citée par **Chyr (1987)** :18,46%. Pour ce qui est du taux moyen des matières grasses, il est de 3,65% pour déchet 1 et 3,15% pour déchet 2. Ces résultats se trouvent dans la gamme de valeurs rapportées par **Thomas et Grahn (1978)** : 3,05 à 6,70% et par **Mac Masters et al (1978)** : 3,10 à 4,82 % mais il reste fortement proche à celui observé par **Hosney (1986)** :3,3%.

En effet, par comparaison aux teneurs en amidon rapportées par les tables d'alimentation qui varient entre 23,5 et 25,5 %, il apparaît clairement que les teneurs en amidon de nos déchets sont nettement plus élevées et sont comprises entre 35 % à 41 % avec une valeur moyenne de 36,97% pour son de blé dur 1 et 40,73% pour le son de blé dur 2.Elles sont aussi nettement plus élevées que celle obtenue par **Boudouma (2008)** qui a trouvé une valeur de 20,76%.

La teneur en minéraux des deux types de son de blé dur a été aussi étudiée. Les données ont montré que les principaux minéraux : K, Ca, Mg, P, Zn, Cl et Na sont détectés dans les deux types de son de blé dur.

Cet ensemble de comparaisons montrent que la désignation des sous-produits de meunerie et leurs caractéristiques moyennes prises comme références varient bien comme rapporté par **Benetti et al. (1994)** d'un pays à un autre et d'une usine à une autre.

Sur le plan de la structure chimique, les déchets étudiés se distinguent comparativement à ceux présentés dans les tables d'alimentation consultées, par une concentration en amidon relativement élevée. Telles que indiquées par **Bartnik et Jakubczyk (1989)** et par **Chasseray (1991)**, ces différences peuvent être liées à de nombreux facteurs qui se rapportent aux grains de blé, à la conduite technique de la mouture et aux types de diagramme de mouture des moulins industriels considérés.

### 2. Etude de la production des enzymes $\alpha$ -amylase et glucoamylase par la souche *Aspergillus niger* sur milieu solide.

Les résultats de la production des enzymes  $\alpha$ -amylase et glucoamylase par la souche *Aspergillus niger* sur deux types de son de blé dur sont illustrés dans le tableau 03

**Tableau III- 2: Résultat récapitulatif sur la production d'alpha-amylase et gluco-amylase sur deux types de son de blé dur.**

	Alpha-amylase			Gluco-amylase		
	Activité Amylolytique (UI/ml)	Concentration en protéines (mg/ml)	Activité spécifique « AS » (UI/mg)	Activité Amylolytique (UI/ml)	Concentration en protéines (mg/ml)	Activité spécifique « AS » (UI.mg-1)
Son de blé dur 1	<b>191, 93</b>	<b>0,28</b>	<b>685,46</b>	<b>51,5</b>	<b>0,289</b>	<b>178,2</b>
Son de blé dur 2	<b>114,5</b>	<b>0,14</b>	<b>817,857</b>	<b>84,45</b>	<b>0,14</b>	<b>603,214</b>

Le but de la fermentation sur milieu solide est la production de deux enzymes : l'**alpha amylase** et le **gluco amylase** en utilisant le son de blé dur comme un substrat. Le choix de la fermentation sur milieu solide est fait par rapport aux recherches qui suggèrent que la fermentation solide est une méthode peu coûteuse, facile à utiliser et adaptable aux milieux ruraux (**Mathot, 1996**).

Les résultats de la production des enzymes sont affichés dans le **tableau 1**, pour la production de l'alpha-amylase, on note que le taux de l'activité enzymatique spécifique du **son de blé dur 1** est égal à 685,46 UI/mg. Il est inférieur à celui obtenu sur le **son de blé dur 2** avec une valeur de 817,85 UI/mg. En effet, pour la production de glucoamylase, on observe aussi que le taux de l'activité enzymatique spécifique enregistré sur le **son de blé dur 2** est atteint une valeur de 603,214 UI/mg, il est trois fois supérieur à celui obtenu sur **son de blé dur 1** avec une valeur de 178,2 UI/mg.

Plusieurs champignons secrètent plus de protéines en cultures solides qu'en cultures liquides (**Oda et al., 2006**), ce qui justifie l'utilisation des substrats solides (**son de blé dur**) pour le développement d'*Aspergillus niger*. La variation de la production des enzymes entre les deux types de son de blé dur (1 et 2) peut se justifier par la différence de la composition biochimique des substrats ainsi que la croissance des moisissures en hyphes et leur bonne tolérance d'AW faibles les rendent efficaces et compétitives dans la microflore naturelle pour la bioconversion des substrats solides (**Rahardjo et al., 2006**). En effet, la culture solide est bien adaptée aux processus de développement des moisissures sur des substrats végétaux naturels. En outre, le substrat fermenté après SSF pourrait être utilisé comme source directe d'enzymes dans plusieurs applications technologiques. Par conséquent, nos résultats peuvent être améliorés par l'optimisation des conditions de production des enzymes

### 3. Optimisation de la production de $\alpha$ -amylase et glucoamylase

#### a) Effet de la solution minérale sur la production

Les résultats de la production des enzymes amylolytiques en présence et absence de la solution minérale sont portés sur le tableau 03.

**Tableau III- 3:Résultat récapitulatif sur la production des enzymes amylolytiques en présence et absence de la solution minérale.**

	Activité enzymatique d'alpha-amylase (UI/ml)	Activité enzymatique de gluco-amylase (UI/ml)
Son de blé 1 +SM	197,533	281,7
Son de blé 2 +SM	154,266	95,5
Son de blé 1 sans SM	191,93	51,5
Son de blé 2 sans SM	114,5	84,45

L'influence de la solution minérale sur la production de  $\alpha$ -amylase et de glucoamylase d'*A. niger* a été évaluée par l'utilisation d'un milieu minéral avec la composition suivante :  $(\text{NH}_4)_2 \text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{NaCl}$ . Les résultats obtenus ont montré que la souche *Aspergillus niger* à manifester une excellente production d'amylase lors de l'ajout de la solution minérale sur les deux types de son de blé 1 et 2, avec des taux d'activité enzymatique atteignant respectivement des valeurs de 197,533UI/ml et de 154,266 UI/ml. Ainsi qu'une bonne production de glucoamylase avec des taux d'activité enzymatique prennent respectivement les valeurs de 281,7 UI/ml et de 95,5UI/ml pour le son de blé 1 et 2.

Selon la littérature, les différentes solutions minérales, ainsi que la combinaison des sels ont des effets remarquables et bénéfiques sur les activités métaboliques des microorganismes puisqu'ils augmentent les rendements de production des métabolites et favorisent la croissance microbienne (**Tunga et al., 1998**).

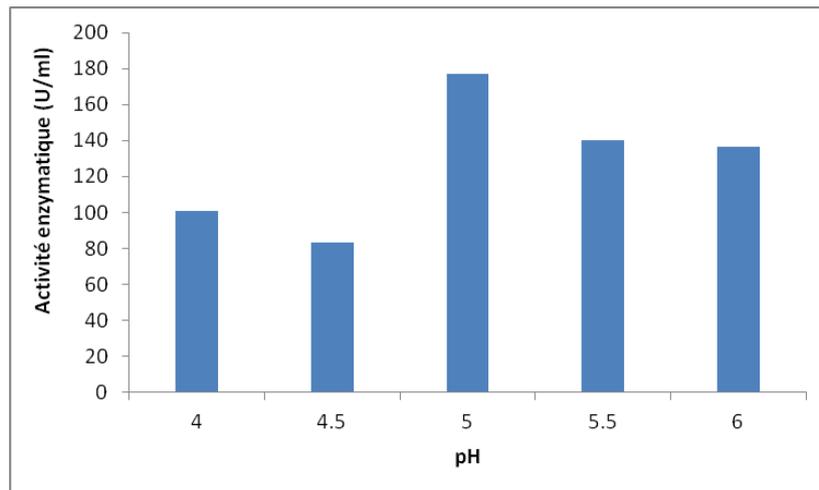
### **b) Effet du Ph sur la production des enzymes amylolytiques**

Afin d'étudier l'influence du pH sur la production de l' $\alpha$ -amylase et de glucoamylase par *A. niger*, des fermentations sont conduites à différents pH variant de 4 à 6 pendant 5 jours. Parmi les paramètres physico-chimiques du milieu de culture, le pH joue un rôle important sur la croissance, le développement et la physiologie des champignons (**Lagzouli et al, 2007**). La plupart des champignons se développent normalement à pH compris entre 3 et 8 (**Boiron, 1996**). Selon **Banerjee et al (2016)**, le pH du milieu joue un rôle sur la production d'enzymes en affectant leur biosynthèse par la stimulation de processus enzymatiques et le transport de composants à travers la membrane cellulaire.

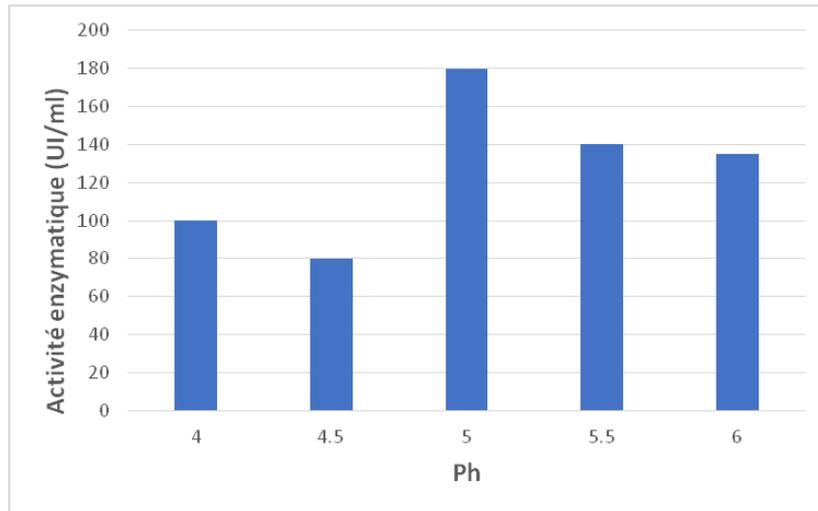
### ➤ Ph optimum de la production de l' $\alpha$ -amylase

L'évolution de la production de  $\alpha$ -amylase par *Aspergillus niger* en fonction du pH est représentée dans la figure 3 pour son de blé dur 1 et dans la figure 4 pour le son de blé dur 2.

Les figures 3 et 4 montrent que la production de l' $\alpha$ -amylase d' *A. niger* est maximale au pH 5 pour les deux types de son de blé dur où nous enregistrons des valeurs de 177,233 UI/ml et de 180 UI/ml. Une baisse de la productivité en enzyme est observée si le niveau du pH est supérieur ou inférieur par rapport à cette valeur. L'activité enzymatique à faible activité est observée au pH 4,5 pour les deux types de son de blé 1 et 2 avec les valeurs qui sont respectivement 83,56 UI/ml et 80 UI/ml. **Sharma et Satyanarayana (2013)** ont démontré l'existence d' $\alpha$ - amylases acides produites à des valeurs du pH comprise entre 3 et 5,5. Ceci peut expliquer le fait que le pH optimum de la production maximale de notre enzyme est au pH 5. Par contre, Il a été rapporté par **Dali et Hamame (2016)** que le pH 6 est le pH optimum pour la plupart des amylases fongique.



**Figure III - 1: Production d' $\alpha$ -amylase aux différents Ph sur son de blé dur 1**

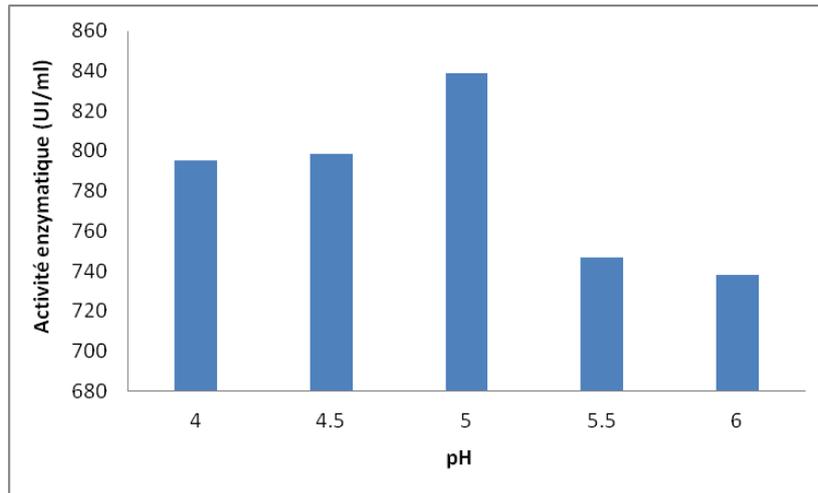


**Figure III - 2: Production d'alpha-amylase aux différents Ph sur le son de blé dur 2**

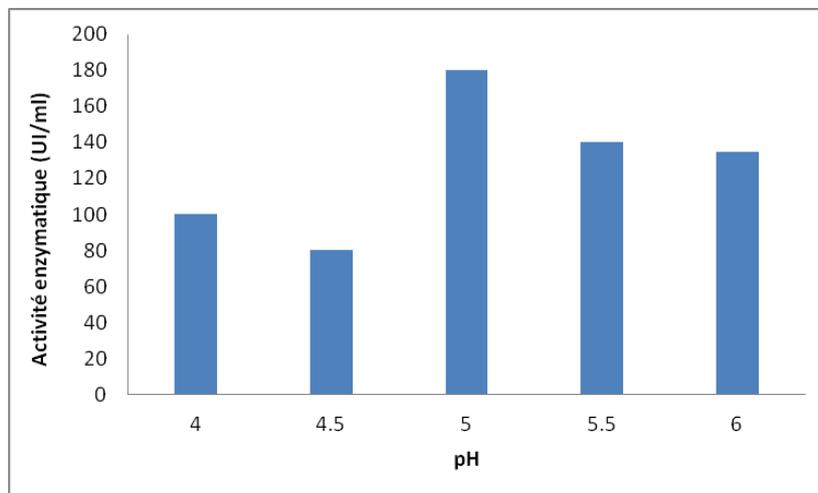
➤ **pH optimum de la production de glucoamylase**

La production des glucoamylases est présentée par les figures 5 et 6, On observe une augmentation progressive de la production où la moisissure a atteint une activité maximale au pH 5 en enregistrant une valeur de 839,1 U/ml pour le son de blé dur 1 et une valeur de 880,2 U/ml pour le son de blé dur 2. Puis, une diminution progressive de part et d'autre de cette valeur du pH. Nos résultats sont similaires à ceux signalés par de nombreux chercheurs, notamment **Norouzian et al (2006)**, **Pavezzi et al (2008)** et **Adefisoye et al (2018)** qui ont noté que le pH optimum utilisé pour la production maximale de glucoamylase se trouve entre 5 et 6.

En effet, les activités métaboliques des microorganismes sont très sensibles à la variation de pH, car il influe fortement sur des nombreux processus enzymatiques ainsi que le transport de différents éléments nutritifs à travers la membrane cellulaire assurant la croissance et la production des métabolites (**Sandhya et al. , 2005; Lazim et al., 2009; Paranthaman et al., 2009**). Ces activités métaboliques conduisent inévitablement à un changement dans l'équilibre des ions hydrogène et donc du pH du milieu de culture (**Elibol et Moreira, 2005**).



**Figure III - 3: Production de la glucoamylase aux différents Ph sur le son de blé dur 1.**



**Figure III - 4: Production de la glucoamylase aux différents Ph sur le son de blé dur 2.**

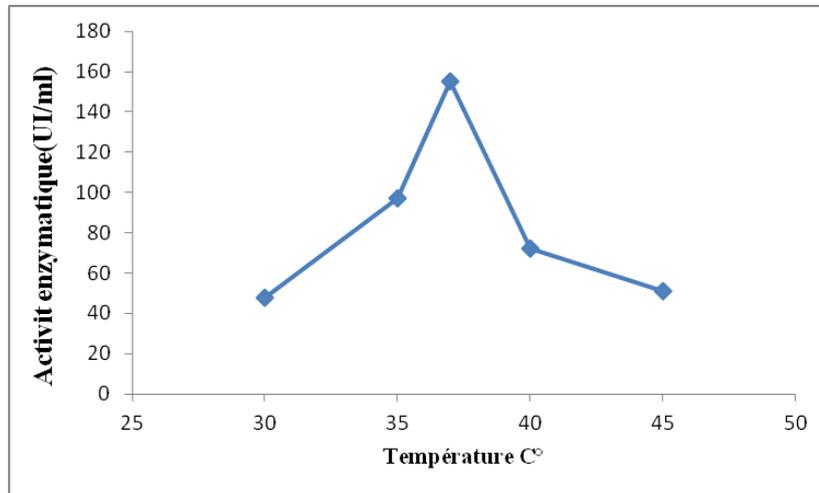
### c) Effet de la température de la production des enzymes amylolytiques

La température est un paramètre physico-chimique critique pour la croissance des champignons, ainsi que pour la production de métabolites y compris les enzymes. *Aspergillus niger* a été incubé à cinq différentes températures (30, 35, 37,40 et 45°C), afin de déterminer sa température de production optimale.

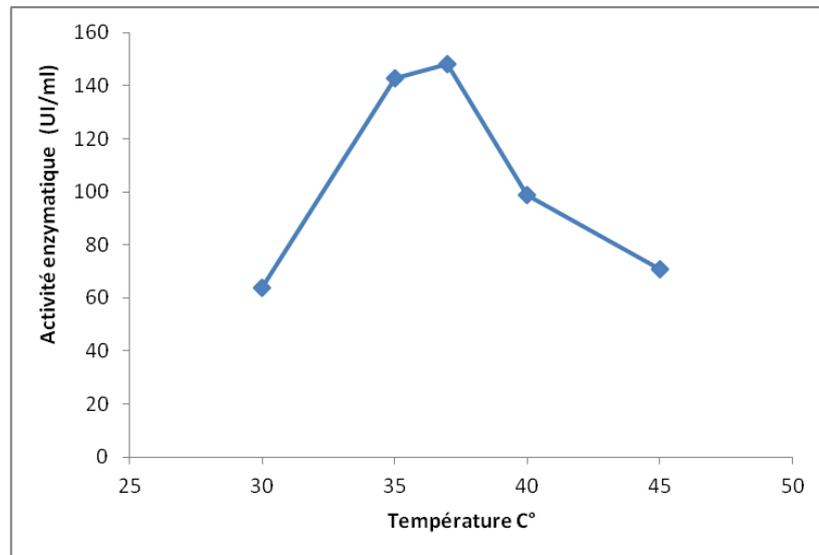
#### ➤ Température optimale de production de $\alpha$ -amylase

L'effet de la variation de la température d'incubation sur la production de  $\alpha$ -amylase d'*A. niger* pour les deux types de son de blé dur est représenté dans les figures 07 et 08. La fermentation réalisée à 37°C représente l'optimum de la production d'enzyme avec une activité enzymatique de 155,03UI/ml pour le son de blé dur 1 et 148,06 UI/ml pour le son de blé dur 2. Une production plus faible a été observée à des températures plus basses et plus

élevées pour les deux déchets. Cette température optimale est différente de celle rapportée par **Khan et Yadav (2011)** où ils ont trouvé la température optimale de l'ordre de 28°C pour la production d'alpha amylase par *Aspergillus niger* tandis qu'elle est similaire à celle décrite par **Wang et al (2006)**.



**Figure III - 5: Influence de la température d'incubation sur la production de l'alpha-amylase par *A. niger* sur son de blé dur 1.**



**Figure III - 6: Influence de la température d'incubation sur la production de l'alpha-amylase par *A. niger* sur son de blé dur 2.**

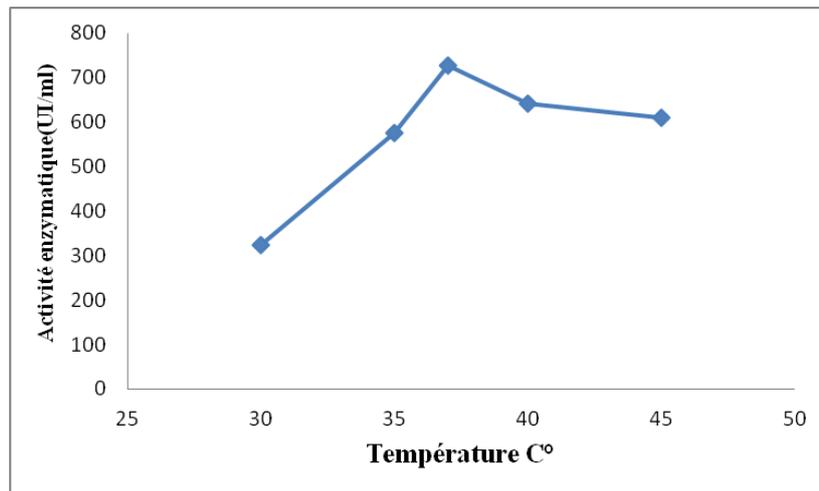
### ➤ Température optimale de production de glucoamylase

L'évolution de l'activité glucoamylolytique en fonction des températures d'incubation est représentée dans les figures 09 et 10 pour les deux types de son de blé dur. En effet, pour les deux déchets, *Aspergillus niger* présente une meilleure production de glucoamylase à 37°C.

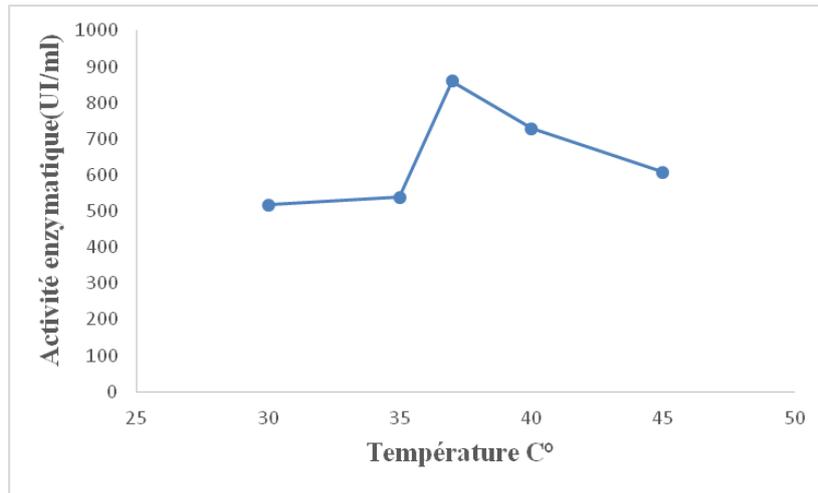
qui est donc considérée comme une température optimale. De part et d'autre de cette valeur, la production diminue considérablement. L'activité enzymatique maximale est de 726,3UI/ml et de 859,8UI/ml pour le son de blé dur 1 et 2 respectivement.

En effet, la température d'incubation affecte les performances de la fermentation sur milieu solide ; en raison de son importance dans la croissance des microorganismes et la production des métabolites (accélère la vitesse de toutes les réactions enzymatiques).

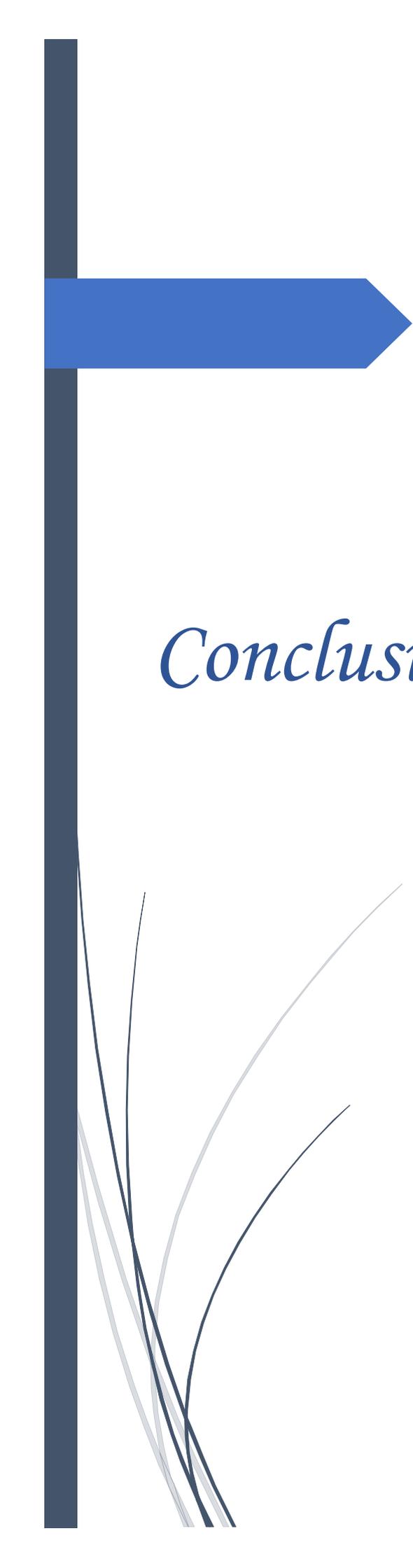
**Selon Dalal Bedan et al (2014)**, la température basse diminue l'activité car elle ne convient pas à la croissance des microorganismes, ce qui réduit la production d'enzyme. L'élévation de la température dans la masse fermentable due à un dégagement de la chaleur métabolique, provoque un assèchement de la culture, une baisse de l'activité de l'eau (AW) et de la disponibilité des éléments nutritifs ce qui limite l'aération et induit une croissance limitée voire impossible.



**Figure III - 7: Influence de la température d'incubation sur la production de la glucoamylase par *A. niger* sur son de blé dur 1.**



**Figure III - 8:Influence de la température d'incubation sur la production de la glucoamylase par *A. niger* sur son de blé dur**



# *Conclusion et perspectives*

### Conclusion et perspectives

Les enzymes amylolytiques contiennent un intérêt majeur grâce à leur utilisation potentielle dans de nombreux secteurs industriels. Ces enzymes sont d'une grande importance en biotechnologie et trouvent des applications dans de nombreux domaines tels que l'agroalimentaire, médicale, détergeant, textile...etc. Grâce à leur diversité d'exploitation, ces enzymes contribuent avec un apport de 30% du marché mondial de la commercialisation des enzymes industrielles.

Dans notre étude portant sur la production d'alpha-amylase et de glucoamylase par une souche locale de moisissure *Aspergillus niger* cultivée sur milieu à base de son de blé, nous avons réussi à obtenir une meilleure production enzymatique avec des conditions expérimentales différentes.

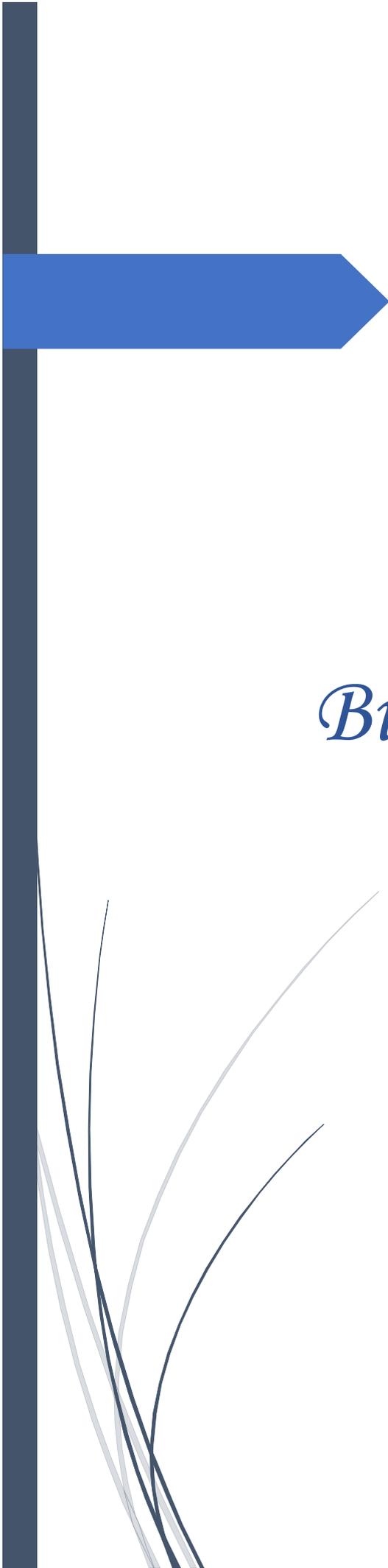
Le son de blé (matière primaire) est une source considérable d'amidon et c'est un bon substrat qui présente un effet inducteur et simulateur pour produire des enzymes amylolytiques.

Nous avons utilisé le son de blé comme substrat naturel pour la croissance de la moisissure et la production de l'amylase et la gluco-amylase, ce qui permet sa valorisation et la préparation des milieux à moindre coût telle qu'exige la production d'enzymes industrielles.

Durant l'expérimentation, nous avons essayé d'optimiser la température et le pH et l'addition de la solution minérale pour la production des enzymes amylolytiques. Les résultats obtenus montrent que l'activité amylolytique est très élevée en présence de la solution minérale et quand la température et le pH d'incubation sont égales respectivement à 37 C° et 5.

Cette étude de la production des enzymes amylolytiques par une souche fongique a donné des résultats très encourageants qui devront être complétés par les perspectives suivantes :

- Identifications de l'espèce *Aspergillus niger* par biologie moléculaire ;
- Optimisation d'autres paramètres opératoire de production des enzymes tels que la taille de l'inoculum, la vitesse d'agitation, la durée d'incubation ...ect.
- Purification des enzymes amylolytiques et leur caractérisation.



*Références*  
*Bibliographiques*

### Références bibliographiques

- AFNOR., 1980. Lait et produits laitiers, méthodes d'analyse, Recueil de normes Françaises , 2<sup>ème</sup> Edition, 286 p.
- AFNOR., 1986. Contrôle microbiologique en agro-alimentaire. Recueil de normes françaises 3<sup>ème</sup> Edition, 376 p.
- Akbache N et Bariout S, 2007. Utilisation de planification expérimentale pour l'optimisation d'un milieu de culture à base de farine de dattes déclassées pour la production d' $\alpha$ -amylase de *Rhizopus oryzae*. Mémoire d'ingénieur, INATAA, université Mentouri, Constantine, 42 p.
- Akin, H., 2008. Evolution du pH pendant la fermentation alcoolique de moûts de raisins : Modélisation et interprétation métabolique. Thèse doctorat, Institut National Polytechnique de Toulouse, France, 121 p.
- Aunstrup K, Anderseq O, Falch E.A and Nielsen T.K., 1979. Economics of fermentation process. Dans : Microbial Technolgt, Fermentation Technology, Vol. 2. Pepler H.J. et D. Perlman (eds), Academic Press, New York, NY, États-Unis
- AOAC. 1980. Official method of analysis, 23 Ed., Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC.
- Bakri Y., Jacques PH and Thonart PH, 2003. Xylanase production by *Penicillium canescens* 10-10c in solid state fermentation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 108; 737-748.
- Banerjee S, Maiti T.K an and Roy R.N, 2016. Identification and product optimization of amylolytic *Rhodococcus opacus* GAA 31.1 isolated from gut of *Gryllotalpa Africana*. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 14: 133-141.
- Bataillon T.M, David J.L and Schoen D.J, 1996. Neutral genetic markers and conservation genetics: simulated germplasm collections. *Genetics*, 144: 409-41
- Bellon-Maurel V, Orliac O and Christen P ,2003. Sensors and measurements in solid- state fermentation: areview. *Process Biochemistry*. 38: 881-896.
- Bennett J.W, 1998. Mycotechnology: the role of fungi in biotechnology. *Journal of Biotechnology*, 66: 101-107.
- Bensmail S, 2012. Optimisation de la production de la protéase acide par *Aspergillus niger* sur milieu solide : purification et caractérisation. Mémoire de Magister, Université M'Hamed Bougara, Boumerdès, Algérie, 105 P.
- Ben Thabet I, Hamadi A, Besbes S, Deroanne C, Francis F, Drira N.E and Christophe B., 2007. Physicochemical and Functional Properties of Typical Tunisian Drink: Date Palm Sap (*Phoenix dactylifera* L.). *Journal of Food Biophysics*, 2:76–82.

Berry D.R and Paterson A, 1990. Enzymes in food industry; in: « Enzymes chemistry impact and application ». Chapman H. ed., London.

Boiron P, 1996. Organisation et Biologie des Champignons. Edition Nathan, Paris

Botton B, Breton A, Fèvre M, Gauthier S, Guy P, Larpent J.P, Reymond P, Sanglier J.J, Vayssier Yet Veau P., 1990. Moisissures utiles et nuisibles, Importance Industrielle, Ed. Masson, Paris.

Bourdon, D., Perez, J.M., Lebas,F., Leclercq,B., Lessire,M., Saveur,B.1984.

In.L'alimentation des animaux monogastriques, porcs, lapins, volailles, INRA édition164-251

Boudouma D, 2008 .Valorisation du son de blé en alimentation des volailles. Thèse d'état en sciences agronomiques, ENSA, Alger.

Bousseboua H, 2002. Eléments de Microbiologie Générale. Programmes de graduation. Editions de l'Université Mentouri.Constantine Algérie,230-231.

Bradford M. M, 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Annals of Biochemistry*, 72:248-254.

Burhan A., Unaldi N., Coral G., Colak O., Aygan A and Guilnaz O,2003. Enzymatic properties of a novel thermostable, thermophilic,alkaline and chelator resistant amylase from an alkaliphilic *Bacillus* sp. isolate ANT-6. *Process Biochemistry*, 38; 1397-1403.

Celik E and Calik P, 2004. Bioprocess parameters and oxygen transfer characteristics in beta-lactamase production by *Bacillus* species. *Biotechnology Progress* ,20: 491–499.

Colombié V, 2005. Description de la production de spiramycine par *Streptomyces* ambofaciens. Modélisation métabolique, simulation et capteur logiciel. Thèse de doctorat, Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse, France, 163p.

Desoubeaux G et Chandener J, 2010. *Aspergillus* et maladies aspergillaires. *Feuillets de Biologie*, 51(293) : 53-63.

Dicko M.H,1999. Purification et Propriétés Physico-chimiques des Enzymes de *Curculigo pilosa*, *Gladiolus klattianus* et *Boscia senegalensis* Catalysant l'hydrolyse des Polysaccharides (Amidon et  $\beta$ -glucanes). Thèse de Doctorat, Université d'Ouagadougou, Burkina Faso.

Djekrif-Dakhmoche S., Gheribi-Aoulini Z., Meraihi Z and Bennamoun L,2006.Application of statistical design to the optimization of culture medium for  $\alpha$ -amylase production by *Aspergillus niger* ATCC 16404 grown on orange waste powder. *Journal of Food Engineering*, 73: 190-197.

- Durand A, 2003. Bioreactor designs for solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, 13: 113-125.
- Ertan F and Balkan B, 2007. Production of  $\alpha$ -Amylase from *Penicillium chrysogenum* under Solid-State Fermentation by Using Some Agricultural By-Products. *Food Technol. Biotechnol.* 45 (4): 439-442.
- Fulki T., Pelayo E and Palabay R. B, 1994. Sugar composition of varietals juices produces from fresh and stored apples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* , 42:1266.
- Fyeche L, 2014. Suivi de la qualité physico-chimique et bactériologique des eaux usées d'Ouargla au cours de leur traitement. Mémoire de master en hydraulique. Université d'Ouargla.
- Gervais P and Molin P, 2003. The role of water in solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, , 13 : 85-101.
- Guiraud J. P, 1998. Microbiologie alimentaire. Donod. Paris. 7-330.
- Gupta A, Gupta VK, Modi DR and Yadava LP, 2008. Production and characterization of  $\alpha$ -amylase from *Aspergillus niger*. *Biotechnology*, 7 (3) : 551-556.
- Haq I.U., Rani S., Ashraf H and Qadeer M.A, 2002. Biosynthesis of alpha amylase by chemically treated mutant of *Bacillus subtilis*. *Journal of Biological Science*, 2(2): 73-75.
- Hemery Y, Rouau X, Dragan, C, Bilici M, Beleca R and Dascalecu L, 2009. Electrostatic properties of wheat bran and its constitutive layers: Influence of particle size, composition, and moisture content. *Journal of Food Engineering*, 93(1):114-124.
- Heslot H and Menez A, 1996. L'ingénierie des protéines et ses applications. Lavoisier Tec et Doc, 424-432.
- Igarashi K., Hatada Y., Hagihara H., Takaiwa M., Eumura T., Ara K., Ozaki K., Kawai M., Kobayashi T and Ito S, 1998. Enzymatic properties of a novel liquefying  $\alpha$ -amylase from an alkaliphilic *Bacillus* isolate and entire nucleotide and amino acid sequences. *Applied and Environmental Microbiology*, 64 (9): 3382-3389.
- Kabel, MA., Van Der M, Marc J.E.C., Klip, G, Voragen, Alphons G.J and Schols, Henk A, 2006. Standard assays do not predict the efficiency of commercial cellulase preparations towards plant materials. *Biotechnology and Bioengineering*, 93(1) : 56-63.
- Keer RW, 1950. Chemistry and industry of starch. Academic press, inc New York. 659- 672.
- Khalil, K.E., Abd-El-Bari, M. S., Hafiz, N. E and Entsar, Y. A., 2002. Production, evaluation and utilization of date syrup concentrate (Debis). *Egyptian Journal of Food Science*, 30 (2):179-203.

Khan J. A and Yadav S. K, 2011. Production of alpha amylases by *Aspergillus Niger* using cheaper substrates employing solid state fermentation. *International Journal of Plant, Animal and Environmental Sciences*, 1:100-108.

Leo, 2012 .Wheat bran: its composition and benefits to health, a European perspective.

Leveau, I. V et bouix, M, 1993. Microbiologie industrielle : les micro-organismes d'intérêt industriel. Paris : Edition Techniques et documentation-Lavoisier.

Little, A. D, 2004. Comité Biotechnologies de LEEM.

Mathlouthi, M and Reiser P,1995. Le saccharose. Propriétés et applications.Ed. Polytechnica, 179-183.

Mathot P, 1996. Modélisation d'un réacteur simplifié pour la fermentation solide de produits et sous-produits agricoles. Valorisation de l'aliment fermenté par le porc. Thèse de doctorat : Faculté universitaire des Sciences agronomiques de Gembloux (Belgique).

Mc Tighe, Kelly C.T., Doyle E.M and Fogarty W.M., 1995. The alkaline amylase of the alkalophilic *Bacillus sp.* IMD 370. *Enzyme and Microbial Technology*. (17):570-573.

Miller G L, 1959.Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 31: 426-428.

Nielson JE., Borchert TV and Vriend G, 2001. Protein Engineering: the determinant of  $\alpha$ -amylase pH-activity profiles. *Oxford University Press*, 14 (7):505-512.

Oh Y. S., Shih I. L., Tzeng Y. M. and Wang S. L, 2000. Protease produced by *Pseudomonas aeruginosa* K-187 and its application in the deproteinization of shrimp and crab shell wastes. *Enzyme and Microbial Technology*, 27: 3-10.

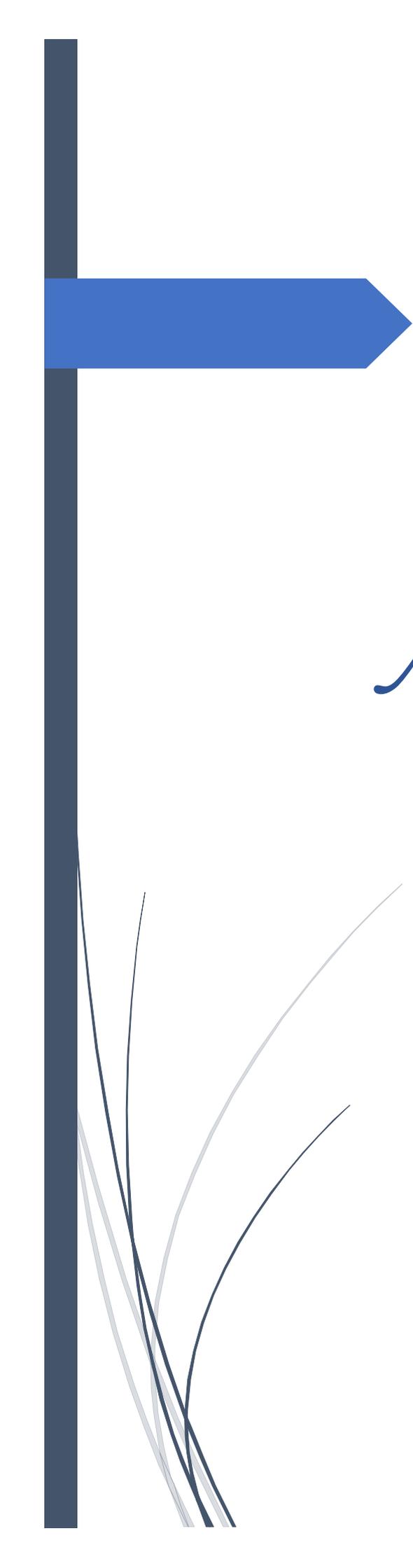
Park C.S., Chang C.C., Kim J.Y., Ogrydziak D.M and Ryui D.D.Y,1997. Expression, secretion, and processing of rice Alpha-amylase in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Journal of Biology and Chemistry*, 272 (11) : 6876-6881.

Philippe M, 2001. Analyse des principaux facteurs impliqués dans le fractionnement combiné de pailles et de sons de blé en extrudeur bi-vis : obtention d'agro-matériaux, Thèse de doctorat en Sciences des procédés, sciences des agroressources, Toulouse, INPT, France

Rahardjo Y.S.P., Tramper J and Rinzema A, 2006. Modeling conversion and transport phenomena in solid-state fermentation: a review and perspectives. *Biotechnology Advances* , 24(2):161-179.

Rao YK., Lu SC., Liu B.Land Tzeng YM. 2006. Enhanced production of an extracellular protease from *Beauveria bassiana* by optimization of cultivation processes. *Biochemical Engineering Journal*, 28: 57-66.

- Rodier J, 1997. L'analyse de l'eau, eau naturelles, eau résiduaires, eau de mer. Ed.Dunod, 8<sup>ème</sup> édition, 57-65.
- Rodier, J., Legube, B et Merlet, N., 2009. L'analyse de l'eau. 9<sup>ème</sup> édition, Dunod, Paris, 1579 p.
- Roe S, 2001. Protein purification and applications: a practical approach. 2<sup>ème</sup> Ed Oxford University Press, USA, 262 p.
- Rosanne RI, 1996.Procédé de fractionnement des sons de blé. Extraction et étude des propriétés fonctionnelles des arabinoxylanes Thèse de doctorat en Sciences des agroressources,Toulouse, INPT, France.
- Sandhya C., Nampoothiri K.M and Pandey A,2005. Microbial proteases.*Biotechnology*, 17 :165-179.
- Scriban R, 1993. Biotechnologie. Technique et Documentation, 4<sup>ème</sup> édition,Lavoisier, Paris.
- Bouquelet S .Université des Sciences et Technologies de Lille
- Sundarram and murthy, 2014:  $\alpha$ -Amylase Production and Applications.
- Suregt A and Barron C, 2005. Histologie du grain de blé. Industries des Céréales, 145 : 3-7.
- Talamond P., Desseaux V., Moreau Y., Santimone M.,Arseillemouren G,2002. Isolation, characterization and inhibition by acarbose of the alpha-amylase from *Lactobacillus* fermentation: comparison with *Lb.Manihotivorans* and *Lb.Plantarum* amylases. *Comparative Biochemistry and Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*, 133 (3):351-360.
- Walker J. M, 2002.The protein protocols handbook. 2<sup>ème</sup> Ed Humana Press (USA),1146 p.
- Walsh G and Headon D, 1997. Protein Biotechnology. Ed John Wiley and Sons, 363p.



# *Annexes*

**Annexes**

**Annexe A : Matériels**

1. Balance (DSAE-001)
2. Etuve
3. Autoclave
4. Four à moufle
5. Incubateur-agitateur
6. Centrifugeuse
7. Bain-marie
8. Spectrophotomètre UV/VIS
9. Plaque agitatrice
10. Spectroscopie infrarouge FTIR (Perkin Elmer Spectrum One)

## Annexe B : Composition des milieux de culture et des solutions

### 1. Milieu PDA (*Potato Dextrose Agar*)

Pomme de terre .....	200 g
Agar .....	15 g
Glucose .....	20 g
Eau distillée .....	1000 ml
pH final.....	5,6 ± 0,2

### 2. Solution minérale (SM) (% p/v) (Sumantha *et al.*, 2005; Sumantha *et al.*, 2006; Paranthman *et al.*, 2009)

NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> .....	0,5 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	0,2 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O .....	0,1 g
NaCl.....	0,1 g
Eau distillée.....	100 ml

### 3. Tampon Citrate de Sodium (0,1M; pH 5,2)

**Solution A:** acide citrique 21,01 g/l (0,1M), (C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub>.H<sub>2</sub>O)

**Solution B:** le dissodique 35,6 g/l (0,2M), (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O)

Pour avoir une solution tampon à pH 5,2 mélanger: 46,9 ml de la solution A et (100 - 46,9) ml de la solution B.

### 4. Solution tween 80 (0.1 % de solution)

Tween .....	0.1 g
Eau distillée.....	100 ml

**5. DNSA**

NaOH.....1.6 g  
DNS.....1 g  
Tartarate double Na/K.....30 g  
Eau distillée.....100 ml

**6. Solution d'amidon**

2 g amidon .....100 ml Eau distillée

## Annexe C : Dosage des protéines (Bradford, 1976)

### 1. Composition du réactif de Bradford

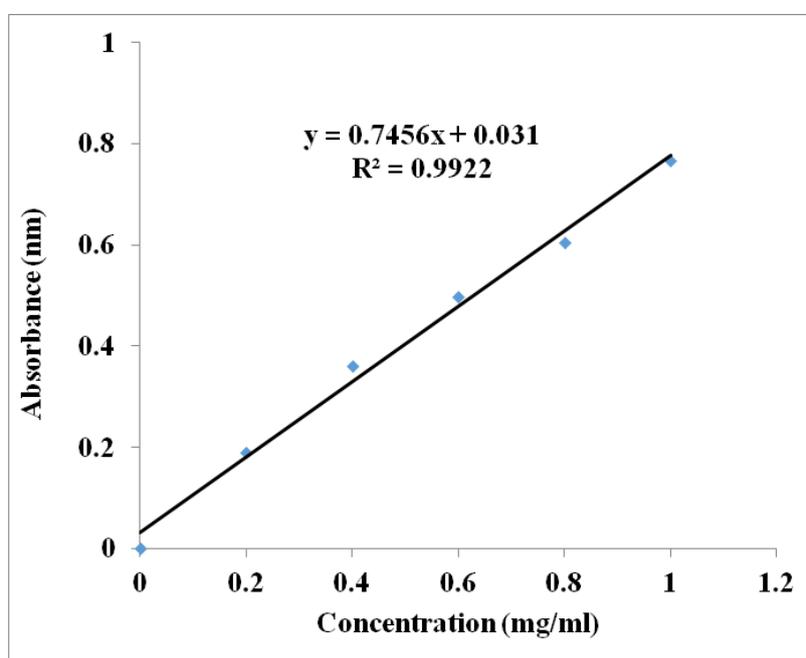
BBC G-250.....100 mg.

Ethanol absolu .....50 ml.

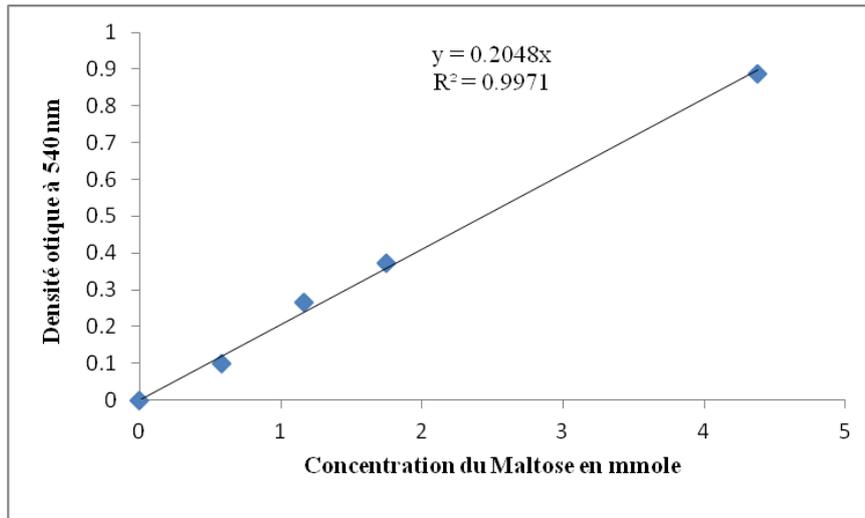
Acide phosphorique à 85%.....100 ml.

Compléter à 1000 ml avec l'eau distillée.

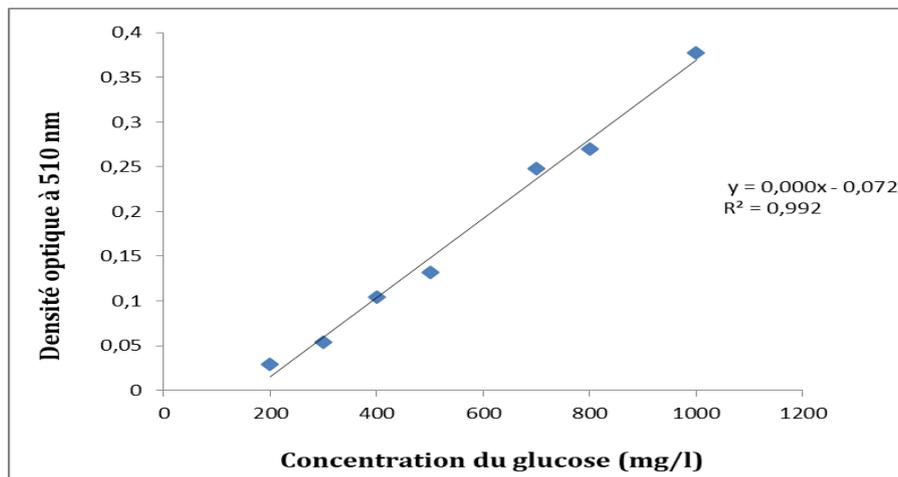
Conservation pendant 3 semaines à 4 °C et à l'abri de la lumière.



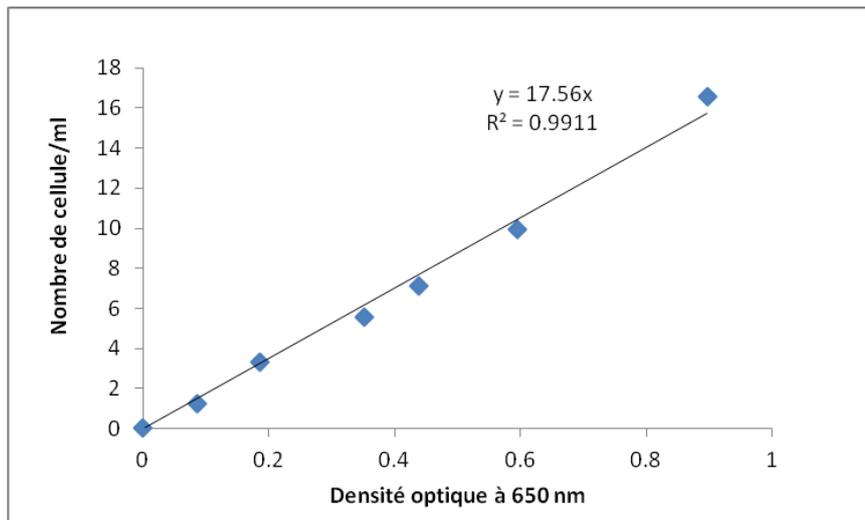
**Figure c.1:** Courbe d'étalonnage de la solution de BSA (1mg/ml).



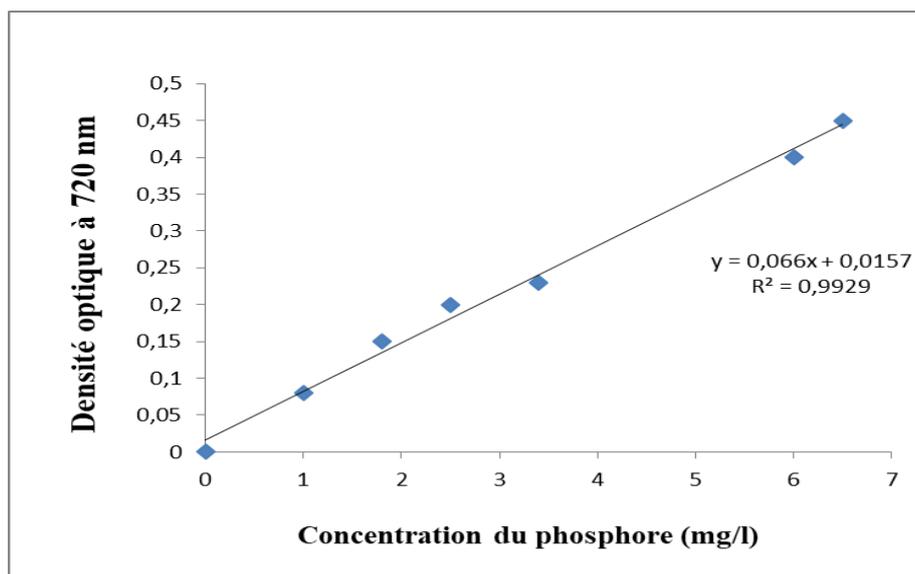
**Figure c.2:** Courbe d'étalonnage de l'activité amylasique.



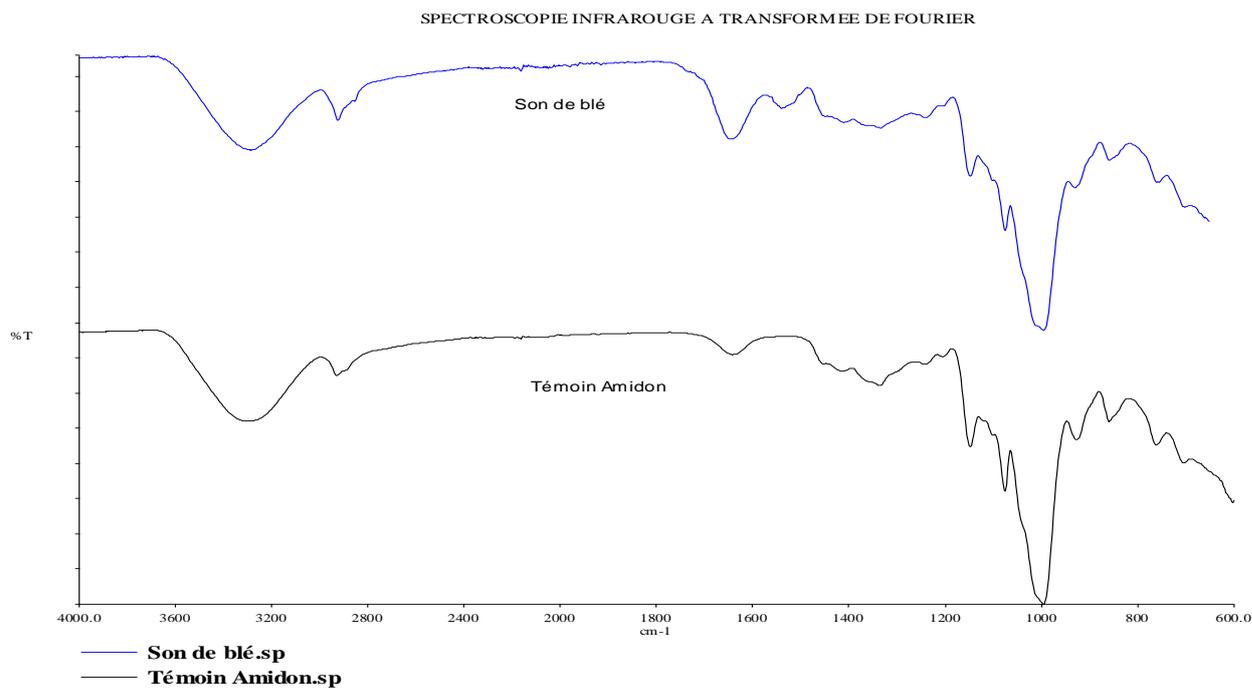
**Figure c.3:** Courbe d'étalonnage de l'activité amylasique .



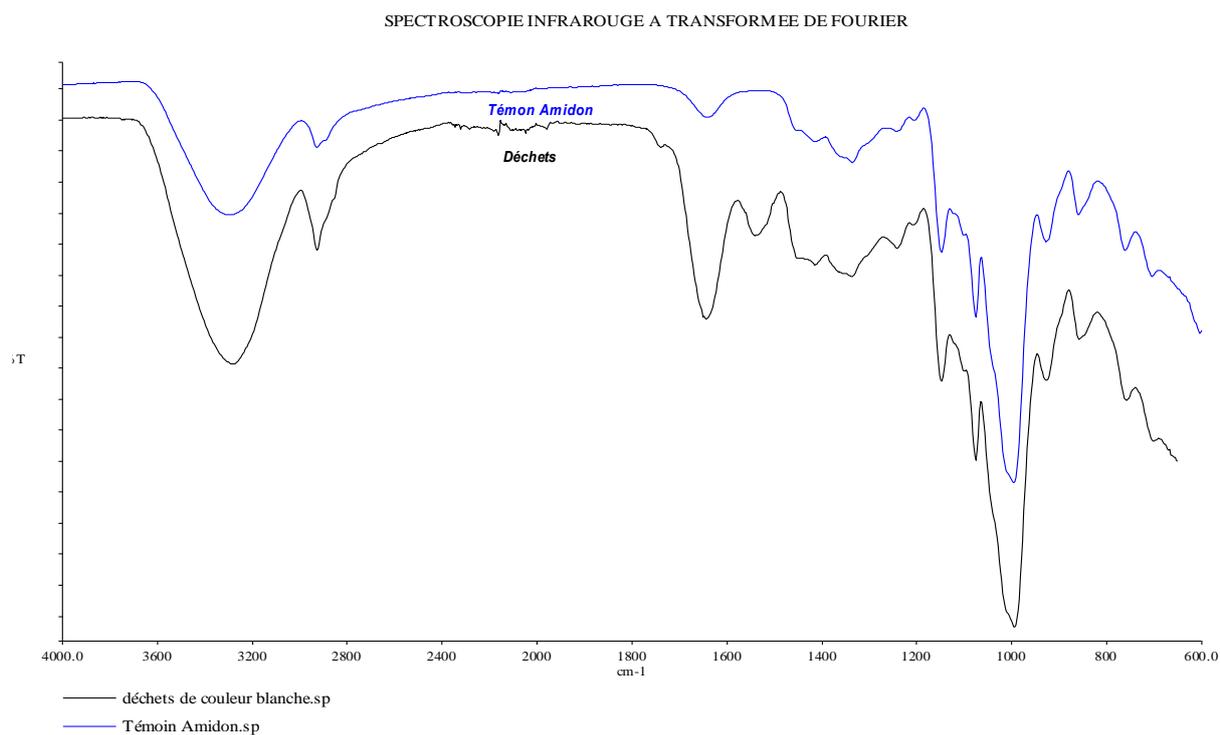
**Figure c.3:** Courbe d'étalonnage de dénombrement cellulaire



**Figure c.4:** Courbe d'étalonnage de dosage de phosphore



**Figure c.5:** Spectre FTIR son de blé 1



**Figure c.6 :** Spectre FTIR son de blé 2



**Préparer solution d'amidon**



**Peser le son de blé dur**



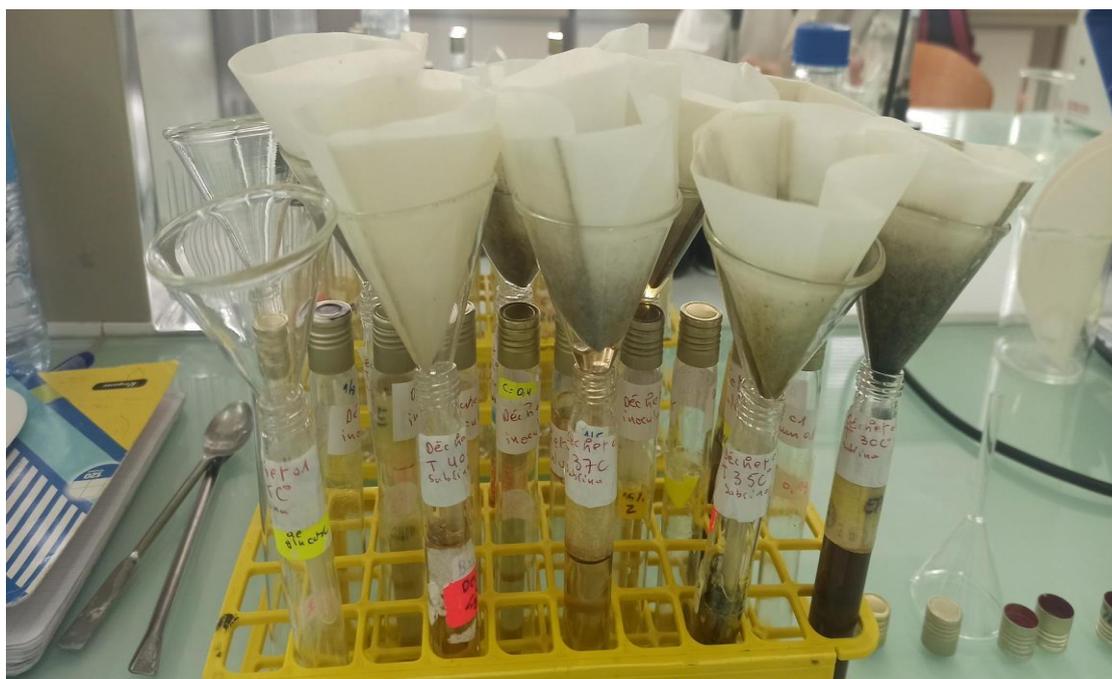
**Extracteur de Soxhlet**



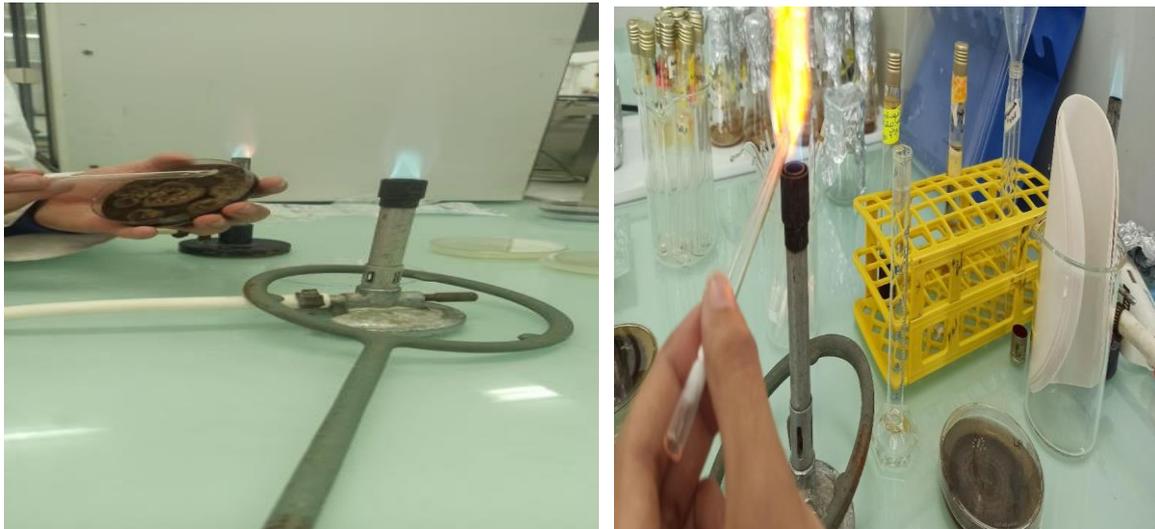
**Préparer les cendres**



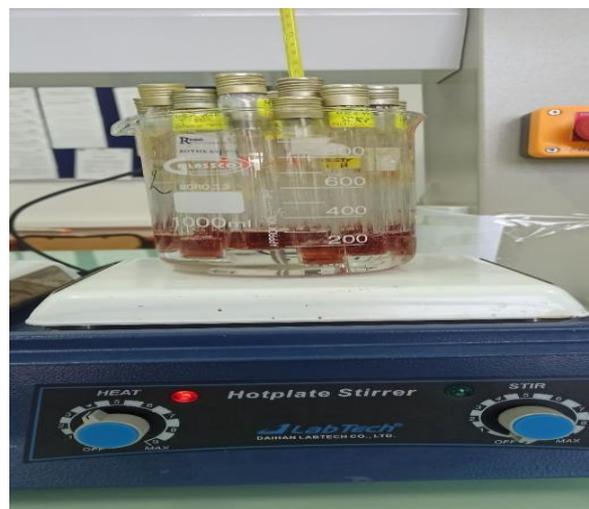
**Son de blé dur 1 et 2 +solution minérale**



**Filtration**



**Préparation de l'inoculum**



**Dosage de l'activité amylolytique**



**Conduite à la fermentation**



**Dosage de protéine**



**Spectroscopie infrarouge FTIR**