

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA  
RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE M'HAMED BOUGARA BOUMERDES  
DEPARTEMENT DE TECHNOLOGIE ALIMENTAIRE



*En vue de l'obtention du diplôme  
De MASTER en GENIE DES PROCÉDES*

Option :

*Sciences et biotransformations du lait*

## Thème

EXTRACTION, PURIFICATION ET CARACTERISATION  
D'UNE ENZYME AMYLOLYTIQUE ISSUE DE *Bacillus*  
*amyloliquefaciens*

*Soutenu le : 26/06/2016*

*Par : MOUAS Kamelia*

Devant le jury :

Mr SEKOUR B.	MAA (UMBB)	Président
Mme TALANTIKITE S.	MCB (UMBB)	Promotrice
Mme ANNOU S.	MAA (UMBB)	Examinatrice
Mme BENMALEK N.	MAA (UMBB)	Examinatrice

Année universitaire : 2015/2016

# Remerciements

*Je tiens à remercier en premier lieu **Allah** le tout puissant de m'avoir donné courage, santé et patience pour achever ce modeste travail.*

*Mes vifs remerciements et mon grand respect vont à madame **Talantikite** pour son encadrement ; ses efforts, son aide constante et ses précieux conseils.*

*Je tiens également à remercier madame **Benmalek** pour sa collaboration dans l'élaboration de ce mémoire*

*Mes remerciements sont adressés aussi aux membres du jury qui ont accepté de juger ce travail.*

*J'exprime ma profonde gratitude à tous mes enseignants du département technologie alimentaire, en particulier madame **Haderbache**, madame **Yelles**, monsieur **Sekour** et madame **Annou**.*

*Ma reconnaissance et mon grand respect s'adresse à mon époux **Athmane** qui m'a soutenu avec patience et prouvé sa confiance en moi.*



## *Dédicace*

*Je dédie ce travail à :*

*Ma chère maman pour son soutien et pour tous les efforts consentis pour mon éducation, je lui dois tout mon respect en témoignage du courage et d'affection.*

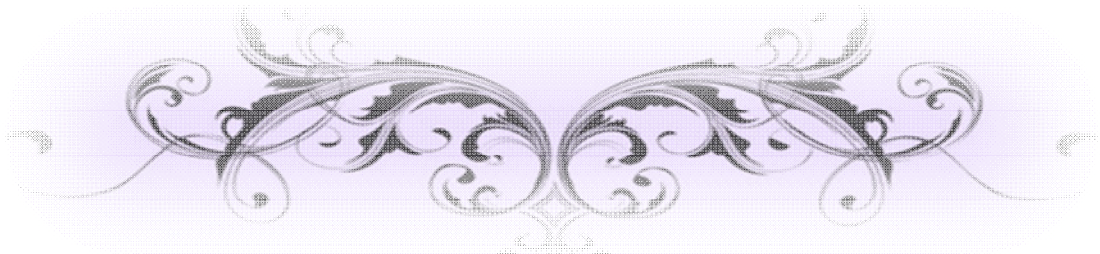
*A mon époux qui m'a soutenu*

*A ma source de bonheur, ma fille Roumaïssa*

*A toute ma famille*

*A tous mes amies en particulier Radia*

*MOUAS KAMILIA épouse CHARABI*



## Résumé

Les amylases sont parmi les enzymes les plus utilisées dans l'industrie. Ces enzymes hydrolysent les molécules d'amidon pour donner des composés d'unités de glucose. Elles ont des applications potentielles dans un grand nombre de procédés industriels. Le présent travail portait sur la production, caractérisation et purification de l'alpha amylase extracellulaire de *Bacillus amyloliquefaciens*.

La production d'enzymes a été obtenue après 24 heures d'incubation dans un milieu de fermentation à 37 ° C pour le milieu solide et sous agitation continue à 100 tours par minute à 37 ° C pour le milieu liquide. Le milieu de fermentation solide a été adapté à une production maximale car il a donné les meilleurs résultats.

La production d'enzymes a été induite par une combinaison de deux variétés de substrats ; le son de blé et les écorces d'orange.

La technique de purification sur gel filtration G 75 a révélé un poids moléculaire proche de 50.000 dal.

Les tests effectués sur l'amylase brut et purifié ont montrés que le pH, température et le temps d'incubation optimales ont été de 6,6, 50 ° C et 30 minutes, respectivement. Environ 80% de l'activité amylasique conservée après chauffage de l'enzyme brut à 60 ° C pendant 30 min.

**Mots - clés:** *Bacillus amyloliquefaciens*, amylase extracellulaires, caractérisation, purification.

## Summary

Amylases are among the most used in industry enzymes. These enzymes hydrolyze the starch molecules to provide compounds of glucose units. They have potential applications in many industrial processes. This work focused on the production, characterization and purification of alpha extracellular amylase from *Bacillus amyloliquefaciens*.

Enzyme production was achieved after 24 hours of incubation in a fermentation medium at 37 ° C for the solid medium and under continuous stirring at 100 rpm at 37 ° C for the liquid medium.

The solid fermentation medium was adapted to maximum production because it gave the best results.

Enzyme production was induced by a combination of two variety of substrates; wheat bran and orange peel.

The purification technique G 75 gel filtration revealed a molecular weight close to 50,000 dal.

The tested performed on crude and purified amylase have shown that the pH, temperature and time optimum incubation were 6.6, 50 ° C and 30 minutes, respectively. About 80% amylase activity retained after heating the crude enzyme at 60 ° C for 30 min.

**Key - words:** *Bacillus amyloliquefaciens*, extracellular amylase, characterization, purification.

## ملخص

الأميلاز هي من بين الأكثر استخداما في الانزيمات الصناعية. هذه الإنزيمات تحلل جزيئات النشا لتوفير مركبات من وحدات الجلوكوز. لديه التطبيقات المحتملة في الكثير من العمليات الصناعية. وركز هذا العمل على إنتاج وتوصيف وتنقية ألفا الأميلاز خارج الخلية من *amyoliquefaciens* العصوية.

وقد تحقق إنتاج هذا الإنزيم بعد 24 ساعة من الحضنة في وسط التخمر عند 37 درجة بالنسبة للوسط الصلب ومع التحريك المستمر في 100 دورة في الدقيقة في 37 درجة مئوية بالنسبة للوسط السائل.

كان إنتاج الإنزيم في وسط التخمر الصلب في الحد الأقصى. وكان إنتاج الإنزيم من خلال مزيج من اثنين من مجموعة متنوعة من ركائ, نخالة القمح وقشور البرتقال.

كشفت تقنية تنقية G 75 هلام الترشيح وزن جزيئي قريب من 50000 الدال. وقد أظهرت الاختبارات على الأميلاز الخام والنقي أن الحموضة, درجة الحرارة وفترة حضنة المثلى كانت 6.6 و 50 درجة مئوية و 30 دقيقة على التوالي. الاحتفاظ نحو 80% من نشاط الأميلاز بعد تسخين إنزيم الخام عند 60 درجة مئوية لمدة 30 دقيقة.

الكلمات الرئيسية : *amyoliquefaciens* العصوية، الأميلاز خارج الخلية، وتوصيف، وتنقية.

# Abréviations

**AFNOR:** Association française de normalisation

**BSA :** sérum albumine bovine

**DNSA:** acide 3,5 di-nitro salicylique

**DE:** équivalent dextrose

**DO:** densité optique

**EEB:** extrait enzymatique brut

**EEP:** extrait enzymatique purifié

**G 75:** gel 75

**PCA:** plate count agar

**Kda :** kilo Dalton

**MST:** matière sèche totale

**μmol :** micro mole.

**μm :** micromètre

**pH :** potentiel d'hydrogène

**ppm :** particule par million

**PM :** poids moléculaire

**rpm :** rotation par minute

# Liste des Figures

<b>Figure n° 01</b> : Observation microscopique de <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> .....	07
<b>Figure n° 02</b> : Structure tridimensionnelle de l' $\alpha$ – amylase.....	12
<b>Figure n° 03</b> : l'action de l' $\alpha$ -amylase sur l'amidon .....	14
<b>Figure n° 04</b> : Structure de l'amylose et l'amylopectine.....	15
<b>Figure n° 05</b> : Schéma général de transformation enzymatique de l'amidon.....	21
<b>Figure n° 06</b> : La souche bactérienne <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> .....	29
<b>Figure n° 07</b> : Plan de travail expérimental.....	29
<b>Figure n° 08</b> : Déchets d'oranges séchés .....	30
<b>Figure n° 09</b> : poudre d'écorces d'oranges.....	30
<b>Figure n° 10</b> : Son de blé.....	30
<b>Figure n° 11</b> : Milieux de fermentation.....	34
<b>Figure n° 12</b> : Extrait enzymatique brut.....	34
<b>Figure n° 13</b> : Réduction du DNS par les sucres réducteurs.....	36
<b>Figure n° 14</b> : chromatographie par exclusion moléculaire.....	37
<b>Figure n° 15</b> : Taux de protéine de l'extrait enzymatique brut.....	43
<b>Figure n° 16</b> : Activité amylasique de l'alpha amylase pour le milieu solide et liquide.....	45
<b>Figure n° 17</b> : Elution de l'extrait enzymatique brut.....	47
<b>Figure n° 18</b> : Elution des protéines marqueurs.....	48
<b>Figure n° 19</b> : Courbe étalonnage des protéines marqueurs.....	48
<b>Figure n° 20</b> : Influence de la température sur l'activité amylasique.....	50

<b>Figure n° 21</b> : Influence du pH sur l'activité amylasique.....	51
<b>Figure n° 22</b> : Effet de la thermo stabilité de l'enzyme.....	52
<b>Figure n° 22</b> : Influence de la durée d'incubation.....	53

# Liste des Tableaux

<b>Tableau n° 01</b> : Applications industrielles des enzymes :.....	10
<b>Tableau n° 02</b> : Résultats des analyses physicochimiques des écorces d'orange :.....	41
<b>Tableau n° 03</b> : résultats des analyses physicochimiques effectuées sur le son de blé :...	42
<b>Tableau n° 04</b> : l'activité amylasique en fonction du volume d'élution :.....	46
<b>Tableau n° 05</b> : les protéines marqueurs et leur poids moléculaires :.....	48



# Sommaire

---

INTRODUCTION :	1
----------------	---

## SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

### CHAPITRE I : LES BACTERIES

I-1) Généralités :	3
I-2) La croissance bactérienne :	4
I-3) Influence des conditions de croissance :	4
I-3-1) La température :	4
I-3-2) Le pH :	5
I-4) Le genre <i>Bacillus</i> :	5
I-4-1) Généralités :	5
I-4-2) Caractéristiques :	6
I-4-3) Morphologie :	6
I-4-4) Culture :	6
I-4-5) Métabolisme :	7
I-5) <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> :	7
I-5-1) Définition :	7
I-5-2) Classification :	7
I-5-3) Intérêt industriel :	8

### CHAPITRE II : LES ENZYMES

II-1) Généralités :	9
II-2) Classification des enzymes :	10
II-3) Application des enzymes :	10
II-4) L'alpha amylase :	11
II-4-1) Définition :	11
II-4-2) Structure :	11
II-4-3) Source de l'alpha amylase :	13
II-4-3-1) Les enzymes amylolytiques végétales :	13
II-4-3-2) L'alpha amylase d'origine microbienne :	13
II-4-4) Mécanisme d'action :	14
II-4-5) Hydrolyse de l'amidon :	14

# Sommaire

---

II-4-5-1) Généralités :.....	14
II-4-5-2) L'hydrolyse enzymatique de l'amidon :.....	16
II-4-6) propriétés de l'alpha amylase :.....	16
II-4-7) Les facteurs influençant la production de l'alpha amylase :.....	18
II-4-7-1) Composition du milieu de culture :.....	18
II-4-7-2) La température :.....	19
II-4-7-3) Le pH :.....	19
II-4-7-4) Le temps d'incubation :.....	19
II-4-7-5) Effet des ions Calcium :.....	19
II-4-8) Applications industrielles de $\alpha$ –amylase :.....	20
II-4-8-1) Hydrolyse de l'amidon :.....	20
II-4-8-2) Boulangerie :.....	21
II-4-8-3) L'industrie de détergent : .....	22
II-2-8-4) Désencollage des textiles.....	22
II-4-8-5) Industrie du papier :.....	22
II-4-8-6) L'industrie de biocarburant :.....	22

## CHAPITRE III : LA FERMENTATION

III-1) Définition :.....	24
III-2) Buts de fermentation :.....	24
III-3) Types de fermentation :.....	24
III-3-1) Fermentation en milieu solide :.....	24
III-3-2) La fermentation en milieu submergé :.....	25
III-4) Technologie de fermentation :.....	26
III-4-1) Généralités .....	26
III-4-2) Production d'enzymes d'origine microbienne:.....	27

## PARTIE EXPERIMENTALE

### MATERIEL ET METHODES

I) Matériel :.....	28
I-1) Matériel non biologique :.....	28
I-2) Matériel biologique .....	29

## Sommaire

---

II) Méthodes :.....	30
II-1) Préparation de la poudre des déchets d'oranges :.....	30
II-2) Analyse physicochimique de la poudre des écorces d'orange.....	30
II-2-1) Détermination du pH :.....	30
II-2-2) Détermination de la matière sèche : .....	31
II-2-3) Détermination des cendres :.....	31
II-3) Analyse physicochimique du son de blé :.....	32
II-3-1) Détermination du pH :.....	32
II-3-2) Détermination de la teneur en humidité .....	32
II-3-3) Détermination du taux de cendre : .....	32
II-4) production de l'alpha amylase :.....	32
II--4-1) Revivification de la souche :.....	32
II-4-2) préparation de l'inoculum :.....	33
II-4-3) vérification du nombre de bactéries qui se trouve dans l'inoculum :.....	33
II-5) Extraction de l' $\alpha$ amylase :.....	34
II-6) Mesure de l'activité amylasique :.....	35
II-7) Dosage des protéines par la méthode de Lowry :.....	36
II-8) Purification :.....	37
II-9) Caractérisation de l'extrait enzymatique brut et purifié .....	39
II-9-1) Effet du pH :.....	39
II-9-2) Effet de la température :.....	39
II-9-3) La thermo stabilité de l'enzyme :.....	40
IV-9-4) Influence de la durée d'incubation sur l'activité enzymatique :.....	40

## RESULTATS ET DISCUSSION

1) Analyses physicochimiques des écorces d'oranges :.....	41
1-1) Le pH.....	41
1-2) La teneur en humidité :.....	41
1-3) Le taux de cendres :.....	42
2) Analyses physicochimiques du son de blé :.....	42
3) Production de l'alpha amylase :.....	43
4) L'activité amylasique : .....	44

## Sommaire

---

5) Purification :.....	45
5-1) Recherche de l'activité amylasique dans les éluats de la colonne :.....	46
5-2) Détermination du poids moléculaire de l'alpha amylase :.....	47
6) Caractérisation de l'extrait enzymatique brut et purifié .....	49
6-1) Effet de la température ;.....	49
6-2) Effet du pH :.....	51
6-3) Effet de la thermo stabilité de l'enzyme :.....	52
6-4) Influence de la durée d'incubation :.....	53
<b>CONCLUSION</b> .....	54
<b>RESUMES</b>	
<b>ANNEXES</b>	
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b>	

**SYNTHESE**  
**BIBLIOGRAPHIQUE**

# INTRODUCTION

# Introduction

---

## Introduction :

L'amidon, fait partie des glucides les plus utilisées par l'homme, il demeure le plus économique. Le riz contient environ 90 % par rapport à la matière sèche. Le maïs, le blé, la pomme de terre en contiennent plus de 70 % par rapport à la matière sèche, ce sont les matières premières agricoles les plus utilisées pour l'extraction de l'amidon. Mais actuellement c'est le maïs qui est la source la plus largement utilisée dans le monde.

L'amidon est aussi considéré comme source de glucides capable de donner par voie chimique ou enzymatique toute une gamme de produits alimentaires intermédiaires utilisés dans les filières de l'industrie agro-alimentaire.

Les amylases sont parmi les enzymes celles qui occupent une place de choix, ce sont les plus importantes et sont d'une grande importance en biotechnologie, ce qui constitue une classe d'enzymes industrielles ayant approximativement 25-30% du marché des enzymes ( **Rajagopalan&Krishnan ; 2008**)

La production industrielle d'enzymes s'est essentiellement orientée vers le processus fermentaire, les enzymes microbiennes présentent de nombreux avantages par rapport à celle d'origine animale et végétale.

Les enzymes microbiennes sont largement utilisées dans les procédés industriels en raison de leur faible coût, grande productivité, protection de l'environnement, la plasticité et la grande disponibilité. (**Burhan et al ; 2003**)

Les espèces de *Bacillus* telles que *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens* et *Bacillus licheniformis* sont très utilisés dans les cultures microbiennes industrielles pour la production d'une variété d'enzymes, ainsi que des substances biochimiques fines pendant des décennies.

Les microorganismes du genre *Bacillus* ont connu un développement considérable pour la production d'enzymes industrielles en raison de leur bonne production de protéines enzymatiques (**Pinches et coll 1985**) et de leur facilité de culture, leurs enzymes sont des hydrolases qui présentent une large application pour le traitement de l'amidon en particulier *B.amyloliquefaciens*.

# Introduction

---

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

Notre travail consiste en la production, l'extraction et la caractérisation d'une enzyme amylolytique issue de *Bacillus amyloliquefaciens*.



# CHAPITRE I

## Les bactéries

**I) Les bactéries****I-1) Généralités :**

Les bactéries sont des microorganismes vivants unicellulaires procaryotes, qui mesurent 0.5 à 15  $\mu\text{m}$  de long ; elles sont ubiquitaire et sont présents dans tous les types de biotopes ; sol, eau, air, sur les végétaux et animaux. **(Perry et al ; 2004)**

La plupart sont inoffensives cependant de nombreuses espèces bactériennes sont pathogènes et responsables de maladies infectieuses.

Selon **(Gaillard ; 1998)** Les bactéries sont classés selon plusieurs critères ;

- **Selon le mode respiratoire :**

- **Aérobie stricte :** Ce sont les bactéries qui ne se développent qu'à présence d'air, leur source principale d'énergie est la respiration.
- **Microaérophyles :** Elles se développent en un milieu où la pression partielle de l' $\text{O}_2$  est inférieure à celle de l'air.
- **Aéroanaérobie facultatifs :** Elles se développent avec ou sans air.
- **Anaérobie stricte :** Elles se développent dans un milieu où l'absence totale de l'air. **(Bernard ; 2004)**

- **Selon la forme :**

- ✓ Bâtonnet ;
- ✓ Sphérique (cocci) ;
- ✓ Courbé (spiralé).

- **Selon la structure des parois :**

- **Gram<sup>+</sup> :** Elle donne une coloration violette, possède une paroi épaisse, elle est d'une structure simple et relativement sensible aux antibiotiques ;
- **Gram<sup>-</sup> :** Elle donne une coloration rose de paroi, moins rigide et de structure plus complexe, toujours pourvues de pilis. **(Perry et al ; 2004)**

Les bactéries sont des organismes vivants devant trouver dans l'environnement l'ensemble des substances nécessaires à leur énergie et à leurs synthèses cellulaires.

**I-2) La croissance bactérienne :**

La croissance bactérienne est l'accroissement ordonné de tous les composants de la bactérie. Elle aboutit à l'augmentation du nombre de bactéries. (Prieur et al ; 2001)

Au cours de la croissance, il se produit, d'une part, un appauvrissement du milieu de culture en nutriments et, d'autre part, un enrichissement en sous-produits du métabolisme, éventuellement toxiques. La croissance peut être étudiée en milieu liquide ou solide.

La croissance bactérienne peut être représentée graphiquement comme le logarithme du nombre de cellule en fonction du temps d'incubation.

La courbe résultante est constituée de quatre phases distinctes :

- ✓ Phase de latence,
- ✓ Phase exponentielle,
- ✓ Phase stationnaire
- ✓ Phase de déclin.

**I-3) Influence des conditions de croissance :**

La croissance bactérienne est fortement influencée par la nature physicochimique de l'environnement. Les exigences bactériennes comprennent les sources de nourriture, d'énergie, d'eau, mais aussi une température appropriée ainsi que le pH et une concentration en O<sub>2</sub>

**I-3-1) La température :**

La température est importante car les bactéries sont poïkilothermes. Cette thermo sensibilité va influencer de façon importante leur métabolisme car la température intervient dans la catalyse de nombreuses enzymes. Pour chaque bactérie il existe trois températures importantes, les températures cardinales :

- Température minimale : Température en dessous de laquelle la croissance bactérienne est stoppée ;

- Température maximale : Température au-dessus de laquelle la croissance bactérienne est stoppée ;
- Température optimale : Température pour laquelle la bactérie croît à une vitesse maximale.

La température optimale est toujours plus près de la température maximale que de la minimale. Ces températures cardinales seront plus ou moins proches (ou éloignées) selon l'espèce.

### **I-3-2) Le pH :**

Le pH affecte considérablement la croissance bactérienne. Chaque espèce se développe dans une gamme définie de pH et possède un pH optimum de croissance

La majorité des bactéries sont neutrophile. Une forte variation de pH endommage les bactéries en détruisant leurs membranes plasmiques, en inhibant l'activité des enzymes et en détruisant les protéines membranaires de transport. **(Bernard ; 2004)**

### **I-4) Le genre Bacillus :**

#### **I-4-1) Généralité :**

Les *Bacillus* forment un genre de bactéries à gram positif, appartenant à la famille des *Bacillacées* (*Bacillaceae*), les dimensions de ces bactéries sont variables ; elles peuvent aller de (0.5 × 1.2 µm) à (2.5 × 10 µm). Elles sont aérobies ou aéro-anaérobies facultatives, et tirent leur énergie par respiration ou fermentation.

Ces bactéries sont capables de produire des endospores qui leur permettant de résister à des conditions environnementales défavorables. Celles-ci donneront naissance à de nouvelles bactéries. **(Ait Abdlouahab ; 2008)**

Les *Bacillus* sont hétérotrophes, saprophytes et ubiquitaires. Elles sont fréquemment retrouvées dans le sol où certaines espèces ont un rôle dans le cycle du carbone et de l'azote. On peut aussi les trouver des *Bacillus* dans des denrées alimentaires.

Les bactéries du genre *Bacillus* sont connues comme étant capables de former des inclusions intracellulaires sous des conditions de stress (exemple : déficit d'éléments tels

que le phosphore, l'azote, l'oxygène combiné avec un excès en sources carbonées). (Harly et al ; 2003)

Il en existe un grand nombre d'espèces avec des propriétés physiologiques et des habitats très variés (terre, poussière, etc...). Certaines espèces sont trouvées dans l'eau douce, d'autres dans l'eau de mer.

Il existe des espèces thermophiles, acidophiles, psychrophiles, alcalinophiles. Les espèces saprophytes sont responsables de multiples dégradations des produits alimentaires (caillage du lait, etc.). Certains d'entre eux ont des rôles utiles comme producteurs d'antibiotiques (tyrothricine, polymyxines, bacitracine) ou d'antifongiques (mycosubtiline). (Perry et al ; 2004)

#### **I-4-2) Caractéristiques :**

Les *Bacillus* correspondent à des grands bacilles :

- Gram +
- Sporogènes ;
- Faciles à cultiver ;
- Aérobie stricts ou facultatifs ;
- Possédant une catalase. (Mayer ; 2004)

#### **I-4-3) Morphologie :**

Les *Bacillus* font une Taille de 3 à 9 micromètres et 1 micromètre de large, de forme rectangulaire et mobile. Isolés ou groupés en chaînes, ils peuvent représenter l'aspect en "canne de bambou", de Coloration au Gram variable car ils se décolorent rapidement. On peut donc les voir Gram + et Gram - sur un frottis.

#### **I-4-4) Culture :**

Ils se cultivent bien sur milieux ordinaires dans des larges limites de température (12-45°C) et de pH (6 - 8,5). La plupart se développent plus vite à 30°C qu'à 37°C. Leur culture est abondante en 24h, en bouillon comme en gélose. A l'isolement des colonies volumineuses, de l'ordre de 5 mm de diamètre. (Harly et al ; 2003)

**I-4-5) Métabolisme :**

Ils hydrolysent des macromolécules organiques dont la nature varie suivant leur équipement enzymatique

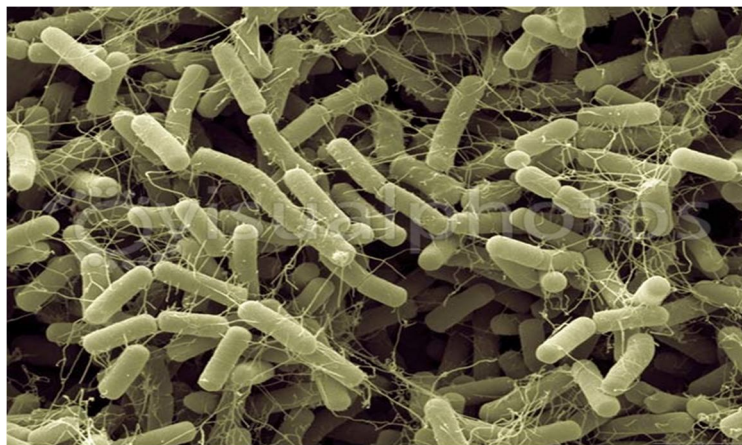
**I-5) Bacillus amyloliquefaciens :****I-5-1) Définition :**

C'est une bactérie gram (+) du genre *Bacillus* ; elle se développe d'une façon optimale de 30 à 40 °C

Elle est de 0.7 à 0.9 µm de diamètre, pourvu d'une ciliature péri triche et cesse à se développer hors de 15 à 50 °C et réduit Le nitrate en nitrite.

Elle produit la subtilisine qui dégrade les protéines et l'alpha amylase pour dégrader l'amidon (Priest et al ; 1987)

Cette bactérie est très connu pour ses activités cataboliques et dégradation des macromolécules complexes notamment les protéines extracellulaires. Elle se trouve dans le sol et la nature.



**Figure 01 :** Observation de *Bacillus amyloliquefaciens* sous microscope électronique

**I-5-2) Classification :**

- Domaine: Bactéries
- Division: Firmicutes
- Classe: *Bacilles*

- Ordre: *Bacillales*
- Famille: *Bacillaceae*
- Genre : *Bacillus*
- Espèces : *Bacillus amyloliquefaciens* :
  - *B. a. subsp. amyloliquefaciens*
  - *B. a. subsp. plantarum*

### **I-5-3) Intérêt industriel :**

*Bacillus amyloliquefaciens* est largement utilisé dans le secteur agricole, pharmaceutique, et les industries alimentaires. Plus précisément, *B. amyloliquefaciens* est utilisé comme un *rhizobacterium* favorisant la croissance végétale en raison de sa capacité à Stimuler la croissance des plantes.

Elle est utilisée pour supprimer les agents pathogènes qui sont transmis par le sol par sa capacité à produire des antifongique et métabolites antibactériens (par exemple, lipopeptides et polycétides). (Fan et al, 2011)

De plus, *B amyloliquefaciens* est utilisé pour la production industrielle d'enzymes, y compris les sérines protéases et les alphas amylases et d'autres produits, tels que les nucléosides puriques et riboflavine.

# CHAPITRE II

# Les enzymes



**II) Les enzymes****II-1) Généralités :**

La plus ancienne référence historique concernant l'utilisation commerciale d'enzymes remonte à une description de fabrication du vin dans l'ancienne Babylone (2100 av JC) ; l'utilisation de microorganismes comme source d'enzymes pour les fermentations était très répandu dans les anciennes civilisations. Les applications d'extraits naturels comprenant des enzymes remontent également à longtemps

L'enzyme est un outil technologique qui permet des transformations dans un milieu défini.

Elle permet la fabrication de composés qui ensuite seront purifiés (fructose, acides aminés) ou qui confèrent au milieu des propriétés nouvelles (présure, lipases) ou qui permettent l'élimination d'un élément de milieu (détergent) ou en fin la formation d'un produit (dosage enzymatique). (**Manson ; 1985**)

Une enzyme est une protéine présentant des propriétés de catalyse spécifiques d'une réaction chimique du métabolisme de l'être vivant qui la produit.

Une enzyme donnée est spécifique d'une réaction, c'est-à-dire qu'elle catalyse toujours la même transformation, se produisant sur les mêmes corps chimiques initiaux.

Les protéines enzymatiques sont synthétisées par des êtres vivants. Cette synthèse est déterminée génétiquement ; sa conservation dans le génome est favorisée par le besoin qu'éprouve cet être vivant de faire cette réaction.

Elles accélèrent des nombreuses réactions métaboliques des matières végétales et animales et rendant ainsi possible la synthèse de nos aliments ; elle sont donc présentes dans la matière première c'est une enzyme dite endogène dont elle influence la saveur, la texture, et la couleur ainsi que les propriétés de conservation ; d'autre part les enzymes sont utilisés comme auxiliaire technique (enzyme dite exogène pour accroître la qualité des produits telle que la qualité organoleptique, nutritive ainsi que les paramètres physicochimiques comme la viscosité ; la texture et la solubilité.

Une enzyme est une protéine qui agit comme catalyseur biochimique, un agent qui change la vitesse d'une réaction mais qui ne change pas avec la réaction.

**II-2) Classification des enzymes :**

Selon les réactions catalysées, les enzymes peuvent être classées en six grandes catégories :

- **Oxydoréductases :** qui catalysent des transferts d'électrons et de protons d'un donneur à un accepteur ;
- **Transférases :** qui catalysent les transferts des groupements ;
- **Hydrolases :** qui catalysent les réactions d'hydrolyse (coupure des liens C-C, C-O, C-N et autres par de l'eau) ;
- **Lyases :** qui catalysent l'addition de groupes à des liens doubles.
- **Isomérases :** qui catalysent le transfert de groupes dans une même molécule pour produire des formes isomères (ex : conversion d'un acide aminé L en acide aminé D) ;
- **Ligases :** qui forment des liens C-C, C-S, C-O et C-N lors de réactions de condensation couplées à l'utilisation d'ATP.

**II-3) Application des enzymes :****Tableau n° 01 : Applications industrielles des enzymes**

<b>Enzyme</b>	<b>Application</b>
Amylases bactérienne et fongique	Hydrolyse de l'amidon en dextrines. maltose et glucose
Protéases bactérienne et fongiques	Attendrissement de la viande et préparation du fromage
Présure fongique	Caillage du lait
Lipase	Activation digestive
Pectinase fongique	Clarification du jus et de vins
Hémicellulose fongique	Hydrolyse des hémicellulose des céréales et légumes
Cellulase fongique	Hydrolyse de la cellulose en glucose
Inulase bactérienne et fongique	Hydrolyse de l'inuline en glucose
Invertase	Production de sucre inverti à partir du saccharose
Glucose isomérase bactérienne	Fabrication du sirop de fructose

**II-4) L'alpha amylase :**

Les amylases représentent 56 % du marché des enzymes dans le monde. (**Van der Maarel et al ; 2002**)

**II-4-1) Définition :**

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 dextrines. (**Janecek ; 1994**)

L'alpha amylase est une macromolécule appartenant à la classe des protéines globulaires de type endoglycanase de la classe des hydrolases.

**II-4-2) Structure :**

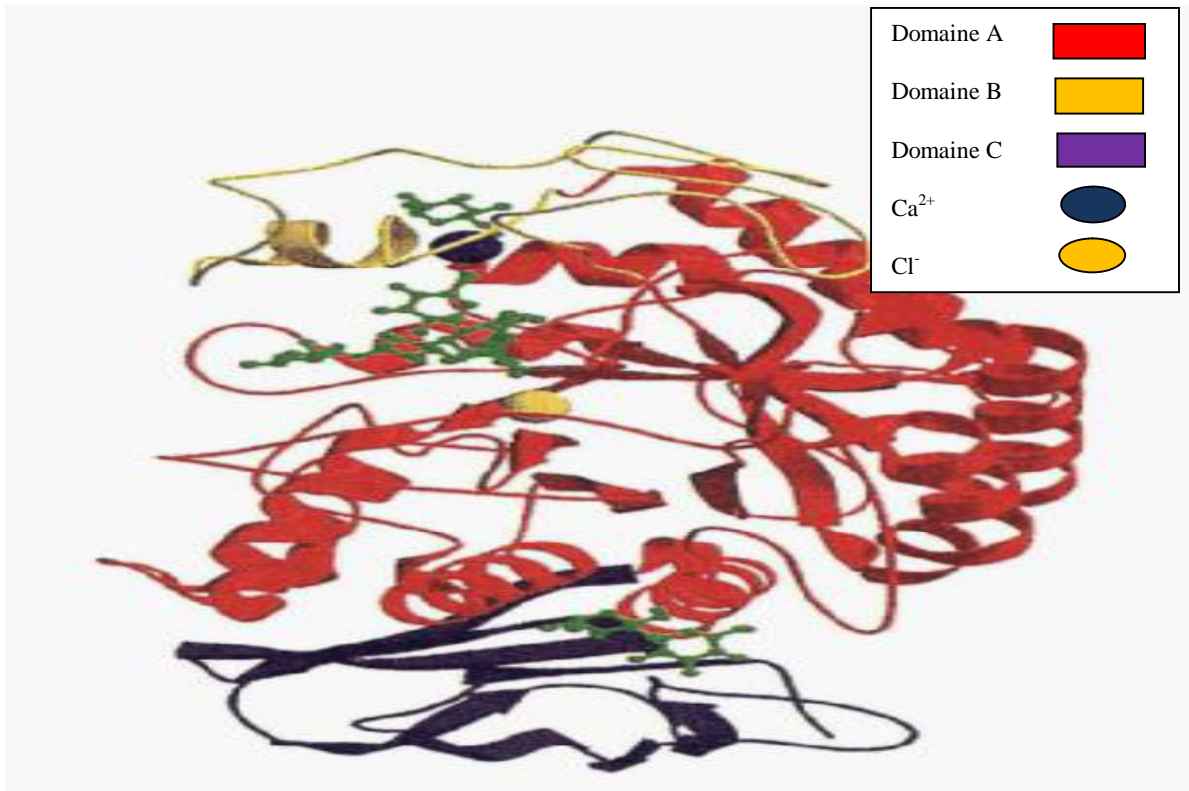
L'alpha amylase a une structure tridimensionnelle capable de se lier au substrat, et par l'action des groupes catalytiques hautement spécifiques, favorise la rupture des liaisons glycosidiques.

Ce sont des glycoprotéines renfermant 478 acides aminés repartis en deux domaines globulaires appelés A (1 à 380 résidus) et B (381 à 478 résidus) ; ces domaines sont associés par une chaîne polypeptidique constituée principalement de résidus hydrophobe.

La partie glucidique est formée essentiellement de mannose, le résidu constituant le site de fixation du substrat.

Ce sont des métallo-enzyme à calcium (un ion calcium par molécule). (**Chiba et al ; 1988**)

Ces ions sont nécessaires à l'activité enzymatique et au maintien de la stabilité de la structure en acides aminés de l'enzyme qui varie d'une souche à l'autre. (**Fogarty et al ; 1980**)



**Figure n° 02 :** Structure tridimensionnelle de l'α – amylase d'après Kraulis (1991)

Le domaine A de couleur rouge est le plus grand, le domaine C de couleur violette.

Le domaine B de couleur jaune.

Le domaine C lié au domaine A par une chaîne de polypeptide simple et semble être un domaine indépendant avec une fonction inconnue.

Le site actif (site de liaison) de l'α-amylase se situe dans une longue fente située entre l'extrémité carboxyle du domaine A et B.

Le calcium (Ca<sup>2+</sup>) est situé entre les domaines A et B (sphère bleue) et peut agir dans la stabilisation de la structure.

Le site de liaison au substrat contient 5 sous-sites avec le site catalytique positionné au sous-site 3. Le substrat peut se lier au premier résidu de glucose dans le sous-site 1 ou 2, ce qui permet au clivage de se produire entre le premier et le deuxième ou le deuxième et le troisième résidu de glucose.

### **II-4-3) Source de l'alpha amylase :**

L'alpha-amylase peut être d'origine animale (salive et du pancréas des mammifères) d'origine végétale, ou d'origine microbienne.

#### **II-4-3-1) Les enzymes amylolytiques végétales :**

Chez certaines plantes, les amylases sont présentes à l'état naturel comme dans le cas des racines de «*Munkoyo*» (espèces : *Eminia et Rynchosia*), des feuilles vertes de *Bosciasenegalensis*, des bulbes frais de *Gladiolusklattianus* et des tubercules de *Curculigopilosa* et de *Pachyrhizuserosus*.

#### **II-4-3-2) L'alpha amylase d'origine microbienne :**

Les amylases fongiques ont été largement utilisées pour la préparation des aliments orientaux. En dépit de la large distribution des amylases, de source microbienne, à savoir les amylases fongiques et bactériennes ; elles sont utilisées pour la production industrielle en raison du coût-efficacité, la cohérence, moins de temps et d'espace requis pour la production et la facilité de l'optimisation. (Burhan et al ; 2008)

Parmi les bactéries amylolytiques on trouve, *Bacillus* qui est largement utilisé pour sa production d'alpha amylase thermostable afin de répondre aux besoins industriels.

*B. subtilis*, *B. stearothermophilus*, *B. licheniformis* et *B. amyloliquefaciens* sont connus pour être de bons producteurs d'une amylase et ceux-ci ont été largement utilisés à des fins commerciales. De même, les champignons filamenteux ont été largement utilisés pour la production des amylases depuis des siècles. Etant donné que ces espèces sont connues pour être des producteurs de protéines extracellulaires, ils sont largement exploités pour la production des enzymes différentes, y compris l'alpha-amylase. (Pandey et al ; 2003)

Les champignons appartenant au genre *Aspergillus* ont été les plus couramment employées pour la production d'alpha-amylase.

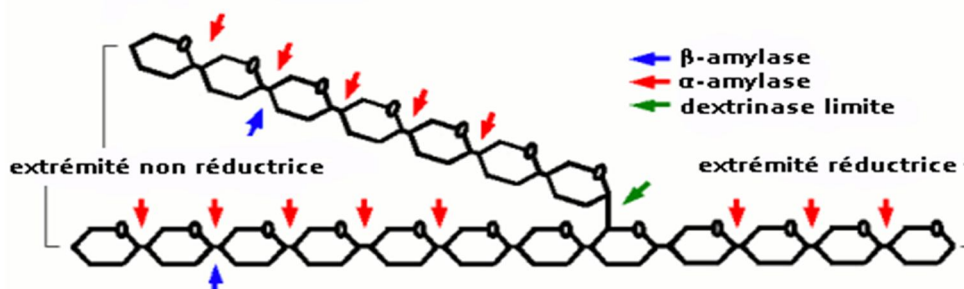
La Production et l'utilisation de ces enzymes par fermentation en milieu solide sont des techniques de productions rentable.

**II-4-4) Mécanisme d'action :**

L'alpha amylase d'origine végétale, animale ou microbien agit sur les polysaccharides (amidon, glycogène).

L'alpha amylase appartient à la famille des endo-amylases qui catalyse l'hydrolyse initiale de l'amidon en oligosaccharides plus courts (résidus glucose terminaux), les liaisons alpha (1,6) ne peuvent être clivées par l'alpha-amylase.

Les alphas amylases présentent la possibilité d'attaquer les chaînes d'amylopectine de deux façons différentes : soit en se fixant sur une chaîne et y effectuer plusieurs cycles de coupures (attaque multienzymatique) c'est le cas de l'amylase pancréatique ; soit en se fixant sur une chaîne pour y effectuer une coupure puis après libération des produits, se détacher de la chaîne pour attaquer une autre chaîne (attaque préférentielle) c'est le cas des amylase de *Bacillus subtilis* ou d'*Aspergillus oryzae*.



**Figure n° 03 :** l'action de l' $\alpha$ -amylase sur l'amidon en rouge

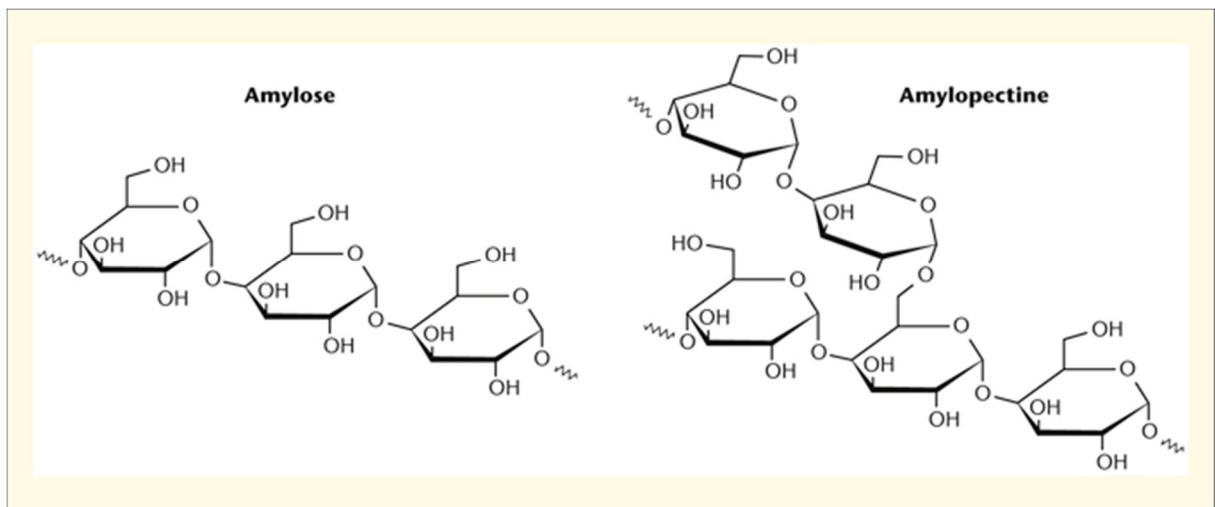
**II-4-5) Hydrolyse de l'amidon :****II-4-5-1) Généralités :**

L'amidon est après la cellulose la principale substance glucidique présente dans le monde végétale, il est synthétisé sous forme de réserve, par les végétaux supérieur à partir de l'énergie solaire, il constitue une source énergétique indispensable à l'alimentation des êtres vivants et de l'homme en particulier.

Il est composé de deux composants principaux ; l'amylose et l'amylopectine dans les proportions 20 et 80%

De sa polyvalence et de sa disponibilité, l'amidon natif ou modifié est probablement le polysaccharide le plus important dans l'industrie alimentaire, il est constitué de petits grains ou granules dont la taille et la forme dépendent de l'origine végétale.

Le grain de l'amidon a une structure macromoléculaire comportant des zones cristallines et des zones amorphe, lorsque le granule d'amidon est visualisé au microscope sous la lumière polarisée, une croix noire est visible, ce phénomène est appelé biréfringence et s'explique par la nature cristalline des granules.



**Figure n° 04 :** Structure de l'amylose et l'amylopectine

L'amylose est une macromolécule linéaire constituée de résidus D glucose reliés entre eux par des liaisons alpha (1-4), une extrémité porte un groupement réducteur, l'autre un groupement non réducteur.

L'amylose est une molécule de haut poids moléculaire ; de 150 - 600 k DA suivant l'origine botanique.

La teneur en amylose de l'amidon varie entre 15 et 30%.

La structure de l'amylose est hélicoïdale et l'intérieur de l'hélice est hydrophobe et lipophile ce qui permet à l'amylose de former des complexes hydrophobes avec d'autres éléments tel que l'iode, dont sa complexation avec l'iode est utilisée pour détecter l'amidon.

L'hélice est formée de 6 résidus et stabilisée par des fortes liaisons hydrogènes intermoléculaires.

L'amylopectine est une macromolécule fortement ramifiée ; il est formé de résidus de D glucose qui sont reliés entre elles par des liaisons alpha (1-4), ces chaînes linéaires sont reliées entre elles par des ramifications alpha (1-6). Son poids moléculaire est de 10000 à 500000.DA

La capacité de fixation de l'iode de l'amylopectine est quasiment nulle.

#### **II-4-5-2) L'hydrolyse enzymatique de l'amidon :**

L'hydrolyse de l'amylose aboutit à la formation du maltose puis ce dernier sera hydrolysé à son tour.

L'hydrolyse de l'amylopectine se déroule en deux étapes ; La formation du glucose, maltose, et alpha dextrine, ces dernières possèdent au minimum 4 molécules de glucose et présentent des liaisons glucoosidiques alpha (1-6) ensuite l'hydrolyse lente des dextrines. **(Fogarty et Kelly, 1980)**

L'hydrolyse enzymatique de l'amidon permet non seulement d'avoir des composés purs mais aussi par un choix judicieux de l'enzyme ; une gamme de produits aux propriétés physicochimiques bien caractérisées.

L'alpha amylase est une endoamylase qui hydrolyse spécifiquement les liaisons glucosidiques alpha (1 – 4) de l'amylose et l'amylopectine, elle n'est pas capable de dégrader les liaisons alpha (1-6) et s'arrête jusqu' où elle rencontre une ramification

Les produits finaux de l'action des  $\alpha$ -amylases sont des oligosaccharides qui constituent un mélange de maltose, et oligosaccharides ramifiées de 6-8 unités de glucose qui contiennent à la fois des liaisons  $\alpha$ -(1,4) et  $\alpha$ -(1-6) **(van der Maarel et al ; 2002)**,

L'action conduit à une diminution de la viscosité de la solution. Elles sont utilisées dans la phase initiale de l'hydrolyse ou liquéfaction.

#### **II-4-6) Propriétés de l'alpha amylase :**

Selon **(Larpen et al ; 1992)** Les alpha amylases d'origine microbienne présente une thermo stabilité de (70°C – 90°C), et une température optimale plus élevée se situant entre (40°C et 70°C).

La température optimale des amylases fongique varie selon leur origine de (30°C à 40°C). **(Park et al ; 1997)**



Le choix du pH optimum est très important pour la production de l'alpha amylase car cette dernière est très sensible au pH.

Le pH optimum des  $\alpha$ -amylases est entre 4 et 8 et celui de l'alpha amylase bactérien est supérieur à la neutralité. (Larpen et al ; 1992)

Le poids moléculaire de la majorité de l'alpha amylases est d'environ 50.000 dalton et il varie d'une espèce à l'autre.

Selon (Boel et al ; 1990) Les ions calciums sont indispensables pour le maintien de leurs stabilités et intégrités structurelle cependant il peut devenir un inhibiteur à une concentration supérieur à 20 mM.

Beaucoup de travaux ont étudié les propriétés des enzymes amylolytiques. Cependant la caractéristique la plus recherchée est la thermostabilité.

Pour l'industrie de transformation de l'amidon, il est souhaitable que les  $\alpha$ -amylases soient actives à des températures élevées de gélatinisation (100-110 °C) et de liquéfaction (80-90 °C). Ces dernières années, beaucoup de recherches ont été faites sur la production d'amylases par les microorganismes thermophiles. (Gomes et al ; 2007)

Les enzymes thermostables isolées à partir d'organismes thermophiles ont trouvé un certain nombre d'applications commerciales en raison de leur stabilité. Comme la liquéfaction enzymatique et la saccharification de l'amidon sont effectuées à des températures élevées

*Bacillus subtilis*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus amyloliquefaciens* sont connus pour être de bons producteurs d'alpha amylase thermostable.

Aujourd'hui, le marché annuel des enzymes thermostables représente environ 250 millions de dollars et les  $\alpha$ -amylases thermostables en occupent une bonne part. (Prakash et al; 2010)

L'hydrolyse de l'amidon est surtout réalisée au niveau industriel par l'utilisation des amylases de *B. amyloliquefasciens* et *B. licheniformis*. Dans ce dernier cas, l'enzyme présente une stabilité plus grande en présence d'empois d'amidon, son activité résiduelle est importante même à 110°C et surtout si le milieu renferme du calcium (20 à 80 ppm) qui stabilise la structure. L'enzyme de *B. licheniformis* est utilisée car elle permet d'obtenir la liquéfaction de l'amidon.

Dans le cas de l'enzyme de *Bacillus amyloliquefaciens* ; on ne peut pas dépasser la température de 95 °C. L'action des amylases se traduit par des hydrolysats qui présentent généralement des DE compris entre 8 à 12 ce qui correspond à la liquéfaction de l'empois d'amidon.

Les enzymes produites par certains micro-organismes halophiles ont une activité optimale à fortes salinités et peuvent donc être utilisés dans de nombreux procédés industriels difficiles où les solutions salines concentrées utilisées autrement pour inhiber de nombreuses conversions enzymatiques. (**Ahlawat et al ; 2009**)

En outre, la plupart des enzymes halo bactérien sont considérablement thermotolérants et restent stables à température ambiante pendant de longues périodes. (**Mohapatra et, Banerjee ; 1998**)

Les amylases halophiles ont été caractérisées à partir de bactéries halophiles telles que *Chromohalobacter sp.* (**Prakash ; 2009**)

#### **II-4-7) Les facteurs influençant la production de l'alpha amylase :**

La Composition des saccharides obtenue après hydrolyse de l'amidon est fortement dépendante de l'effet de la température, les conditions d'hydrolyse ; l'origine de l'enzyme, spécificité, thermo stabilité et le pH.

##### **II-4-7-1) Composition du milieu de culture :**

Le milieu de fermentation pour la production de l'enzyme alpha amylase doit présenter une composition permettant de maximiser le rendement et cela en tenant compte du système de régulation de la synthèse de l'enzyme. (**Ingle et Boyer ; 1972**)

Une source de carbone est indispensable ; elle provient de l'amidon ou d'une autre source telle que le maltose, le lactose. (**Coleman et Elliot ; 1962**)

La production de l'alpha amylase de *Bacillus* peut être réprimée par le glucose et tout autre sucre de faible poids moléculaire cependant cette répression n'est pas observée chez *Bacillus amyloliquefaciens*. (**Colman et Grant ; 1975**)

L'azote est notamment une source importante pour la production de l'alpha amylase et il peut être fourni sous forme de sel d'ammonium ou d'une source organique complexe. (**Elliot ; 1962**)

Il a été rapporté que l'extrait de levure a aussi été une bonne source organique pour la synthèse d'alpha amylase de *Bacillus amyloliquifacien* (Magee et Kosaric ; 1987)

#### **II-4-7-2) La température :**

D'après (Lin et al ; 1998) La croissance microbienne et la production d'enzyme est maximal entre 37 °C et 40 °C notamment pour la souche de *Bacillus amyloliquefaciens*.

Une large gamme de température (35 – 80 °C) a été rapportée pour une croissance optimale et la production d'alpha amylase à partir des bactéries. (Burhan et al .2003 ; Castoro et al .1992) La production d'alpha-amylase était maximale à la température de 37 °C par *Bacillus amyloliquefaciens*. (Haq et al ; 2010)

#### **II-4-7-3) Le pH :**

(Nustrat et Rahman ; 2007) Ont rapporté que la production d'alpha amylase à un ph de 7.0 par *B amyloliquefaciens* est maximale. Une autre étude mené par (El tayeb ; 2007) a montré que la production d'alpha amylase par *Bacillus amyloliquefaciens* en fermenteur était la plus élevé à pH 6,0.

#### **II-4-7-4) Le temps d'incubation :**

(Abate et al ; 1999) Ont rapporté que la production d'alpha-amylase de *Bacillus amyloliquefaciens* commence au début de la phase de croissance exponentielle pour atteindre le niveau maximum après 24 heures et après cela, le niveau d'alpha-amylase diminue de façon drastique ; probablement en raison de l'accumulation d'un niveau élevé de protéase concomitante avec à la fin de la phase de croissance exponentielle.

Des résultats similaires ont été rapportés sur *Bacillus amyloliquefaciens* Par (Burhan et al. 2003 )

#### **II-4-7-5) Effet des ions Calcium :**

Selon (Fogarty et Kelly ; 1980) l'enzyme nécessite au moins quatre ions calcium par molécule, les alpha-amylases hautement purifié sont inactive à une température au-dessus de 50°C et sensible à des pH extrêmes mais la présence d'ions calcium réduit cette inactivation et augmente leur résistance au pH.

### II-4-8) Applications industrielles de $\alpha$ -amylase :

L' $\alpha$ -amylase gagne une attention accrue en raison de ses propriétés d'hydrolyser l'amidon. Ils existent d'autres activités qui peuvent être réalisées grâce à cette propriété. Ces enzymes ont remplacé les méthodes chimiques d'hydrolyse utilisées précédemment dans divers secteurs industriels pour rendre les processus plus facile. (**Prakash et Jaiswal ; 2009**)

Il existe de nombreuses applications potentielles largement utilisées de cette enzyme sur le plan industriel.

#### II-4-8-1) Hydrolyse de l'amidon :

L'amidon est utilisé dans la production de fructose et les sirops de glucose, Ce processus comporte trois étapes: gélatinisation, Liquéfaction et saccharification. La gélatinisation implique la dissolution des granules d'amidon dans l'eau pour former une suspension d'amidon visqueux. L'amylose et l'amylopectine sont dispersées dans l'eau lors de la dissolution.

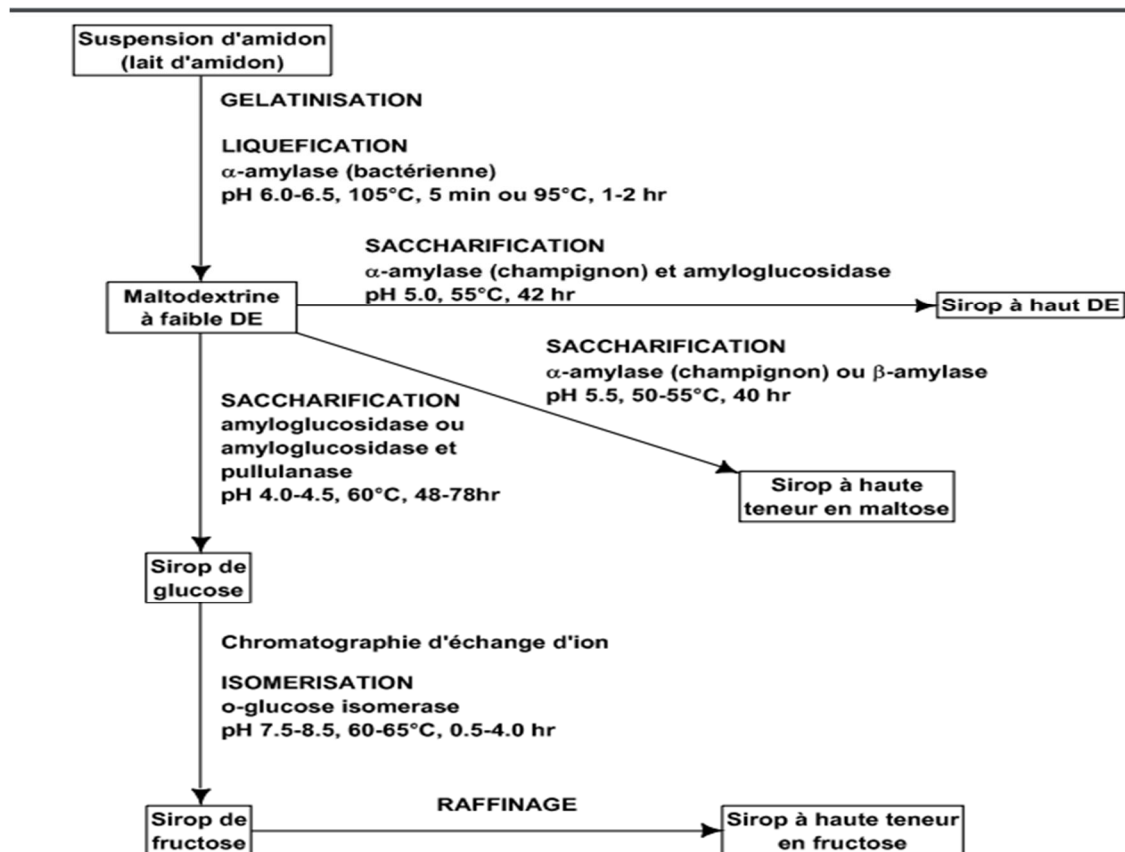
La Liquéfaction de l'amidon est une hydrolyse partielle en petites dextrans dont l' $\alpha$ -amylase entraîne une réduction de la viscosité de la suspension d'amidon.

La Saccharification est la production de glucose et le sirop de fructose par hydrolyse supplémentaire. (**Nielsen et Borchert ; 2000**)

L' $\alpha$ -amylase utilisée dans l'étape de liquéfaction peut être réalisée à partir de diverses sources microbiennes. Les amylases thermostables peuvent être utilisées pour l'hydrolyse à une température élevée. ; *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus licheniformis* et *Pyrococcus furiosus* sont quelques-unes

D'après (**Gupta et al ; 2003**) de nombreuses sources microbiennes utilisées pour produire l' $\alpha$ -amylase utilisé dans la conversion d'amidon.

Dans un premier temps, l' $\alpha$ -amylase de *Bacillus amyloliquefaciens* a été utilisé, mais il a été remplacé par l' $\alpha$ -amylase de *Bacillus stearothermophilus* ou *Bacillus licheniformis*. (**Van der Veen B et al ; 2002**)



**Figure n° 05** : Schéma général de transformation enzymatique de l'amidon

#### II-4-8-2) Boulangerie :

L' $\alpha$ -amylase est ajoutée à la pâte dans un processus de cuisson du pain. Cela provoque l'hydrolyse de l'amidon en petits dextrines qui peuvent encore être fermentés par des levures. Cela augmente la vitesse de fermentation. En outre l'hydrolyse de l'amidon diminue la viscosité de la pâte, ce qui améliore la texture et l'augmentation du volume du pain par l'augmentation de la pâte. (Nielsen et Borchert ; 2000)

Une fois que la cuisson est terminée, l' $\alpha$  amylase est également utilisé en tant qu'agent anti-rassissement pour améliorer la durée de conservation et éviter tout changement au cours du stockage des produits cuits au four. Tous les changements indésirables comme augmentation de la fermeté, la perte de netteté de la croûte, diminution de la teneur en humidité de la mie et la perte de saveur de pain.

**II-4-8-3) L'industrie de détergent :**

L'utilisation d'enzymes dans les détergents a augmenté avec les méthodes changeantes de la vaisselle et la lessive. Les consommateurs préfèrent utiliser de l'eau froide et des conditions douces. Plus tôt les produits chimiques utilisés dans les détergents ont causé des dommages en cas d'ingestion et les conditions de la vaisselle étaient très dures. Cependant les enzymes ont montré à l'industrie un chemin alternatif. Les enzymes sont sûrs et le travail sera dans des conditions douces. (Mitidieri et al ; 2006)

L'alpha-amylase est utilisée pour dégrader l'amidon en plus petits oligosaccharides solubles dans l'eau. Par conséquent, l'élimination de l'amidon est également importante de maintenir la blancheur du linge.

**II-2-8-4) Désencollage des textiles :**

L'amidon est un agent d'encollage préféré car il est facilement disponible, moins coûteux. La couche de l'amidon est soumise à une hydrolyse dans le procédé de désencollage où l' $\alpha$ -amylase est utilisée pour cliver des particules d'amidon au hasard en composants solubles dans l'eau qui peuvent être éliminés par lavage. L'enzyme agit spécifiquement sur les molécules d'amidon seul, en laissant les fibres non affecté (Ahlawat et al ; 2009)

**II-4-8-5) Industrie du papier :**

Le papier est également traité avec des agents d'encollage pour le protéger contre les contraintes mécaniques au cours du traitement. (Bruinenberg et al ; 1996)

Le dimensionnement contribue également à une meilleure qualité du papier en termes de résistance, la douceur, et l'écriture.

L'amidon est couramment utilisé comme agent d'encollage. Le rôle de la  $\alpha$ -amylase dans l'industrie du papier, est l'hydrolyse partielle de l'amidon pour le rendre moins visqueux dans un procédé discontinu ou un procédé continu étant donné que la nature très visqueuse d'amidon naturel le rend impropre pour le revêtement sur le papier. (Fogarty et al ; 1999)

**II-4-8-6) L'industrie de biocarburant :**

L'amidon est un produit de départ économique, il est utilisé pour la production d'éthanol en tant que biocarburant. (Moraes, et al ; 1995)

Ceci est réalisé dans une série d'étapes. Tout d'abord, l'amidon est soumis à une gélatinisation pour former une suspension d'amidon visqueux. Ceci est suivi par le processus de saccharification, où l'amidon est hydrolysé par l' $\alpha$ -amylase pour obtenir les sucres fermentescibles pour produire de l'éthanol. **(Chi et al ; 2009)**

# CHAPITRE III

## La fermentation



**III) La fermentation :**

Les procédés biotechnologiques de transformation des aliments mettent en œuvre des microorganismes vivants dont l'activité métabolique permet des transformations biochimiques.

**III-1) Définition :**

La fermentation est le processus qui permet la décomposition de la matière organique par des microorganismes divers (bactéries, levures, et moisissure).

En microbiologie industrielle, le terme fermentation désigne l'opération unitaire qui permet de produire de la biomasse ou de produits de bioconversions par la culture de microorganismes. (Marie Claire Frédéric ; 2016)

**III-2) Buts de fermentation :**

Les procédés de fermentation industrielle tend vers les buts suivants :

- ❖ Obtention de la biomasse pour la production des protéines ou des autres constituants cellulaires.
- ❖ Obtention des métabolites par des microorganismes comme les antibiotiques ; les vitamines ou les acides aminés (Simon et Meunier ; 1970)

**III-3) Types de fermentation :**

Bien que la plupart des procédés biotechnologiques soient menés selon le mêmes schéma général ; notamment la préparation des milieux de cultures, microorganismes utilisés etc., chaque bioprocédé possède ses particularités ; de point de vue technologique on distingue principalement les procédés de fermentation en milieu solide et le procédés en milieu submergé.

**III-3-1) Fermentation en milieu solide :**

Selon (Gervais et al ; 2003) la fermentation sur milieu solide est défini comme une culture microbienne sur des particules solides humides en absence d'eau libre.

La formation des produits se déroule à la surface des particules avec une haute concentration en biomasse présente.

Cette technique apparait comme la technique la plus adaptée pour les souches fongiques.

Elle est décrite comme un procédé microbiologique se déroulant sur une surface de matière solide pouvant absorber ou contenir l'eau avec ou sans éléments nutritifs solubles.

D'après (Werner ; 2010) la faible teneur en eau favorise la croissance de champignons filamenteux ; bien que dans de nombreux cas des interactions complexes entre bactéries, champignons et levures peuvent se produire et influencer les propriétés organoleptiques d'aliments aussi fermentés.

Selon (Assamoi et al ; 2008) ce type de fermentation est simple à mettre en œuvre et ne nécessitant pas obligatoirement une stérilisation énergétique du substrat de culture et requièrent un faible espace.

L'inoculation du milieu de culture se fait le plus souvent à partir d'une suspension de spores. (Malhot ; 1996)

L'aération des cultures solides assure le maintien des conditions d'aérobie et l'élimination du CO<sub>2</sub>.

La régulation de température de culture et la régulation de la teneur en eau est nécessaire.

La fermentation en milieu solide est utilisée pour divers buts notamment la production d'enzymes (amylases, cellulases...) et de métabolites spécifiques (éthanol, acides organiques...) ; dans l'alimentation humaine (fromage, production de champignons)

### **III-3-2) La fermentation en milieu submergé :**

C'est la fermentation en milieu liquide agité qui a été utilisée en premier, elle a été traditionnellement utilisée pour la production industrielle des enzymes en raison de la facilité du contrôle des différents paramètres comme le pH, la température ; l'aération et l'humidité.

Ces procédés aussi sont bien aérobie que anaérobie.

La fermentation nécessite des conditions aseptiques strictes. La culture en milieu liquide s'effectue dans des récipients agités, et le plus souvent dans des Erlen-Meyer, placés sur des appareils d'agitation qui favorisent la diffusion de l'air à travers les tampons de coton servant à les boucher.

L'agitation est nécessaire pour homogénéiser les milieux de cultures.

La fermentation en culture submergé comprend les étapes suivantes :

- ❖ préparation des milieux de cultures (prétraitement et stérilisation) ;
- ❖ Inoculation et fermentation proprement dite.
- ❖ Séparation, purification et le séchage des produits.

La fermentation sur milieu liquide est particulièrement bien adaptée aux cultures de microorganismes unicellulaires comme les bactéries.

### **III-4) Technologie de fermentation :**

#### **III-4-1) Généralités :**

La fermentation consiste à utiliser des microorganismes comme moyens de fabrication dans un processus industriel ; pour cela il faut réaliser des cultures de microorganismes en très grandes quantités dans des récipients adaptés aux différents types de fabrication nommé fermenteurs dont le volume peut atteindre plusieurs centaines de litres.

Un bioréacteur, appelé également fermenteur ou propagateur, est un appareil dans lequel on multiplie des microorganismes (levures, bactéries, champignons microscopiques, algues, cellules animale et végétales) pour la production de biomasse, ou pour la production d'un métabolite. (**Larpent ; 1992**)

Contrairement aux systèmes plus simples utilisés pour faire pousser des microorganismes, comme par exemple les fioles, le bioréacteur permet de contrôler les conditions de culture (température, pH, aération, etc.), et de ce fait, il permet de récolter des informations de plus grande fiabilité.

Un fermenteur est construit en général sur le modèle d'un bioréacteur sans toutefois du système d'aération. Dans le domaine de la biotechnologie, le terme de fermenteur est parfois utilisé pour une distinction par rapport à celui de bioréacteur.

Il est nécessaire que les cultures soient pures ; c'est-à-dire ne soient pas contaminées par des organismes étrangers. (**Katz ; 2012**)

Des conditions d'asepsie rigoureuses sont nécessaires en production d'enzymes d'une part pour obtenir un bon rendement et d'autre part pour ne pas risquer la sécrétion de substances toxiques par des contaminants. (**Scriban ; 1999**)

**III-4-2) Production d'enzymes d'origine microbienne:**

Les microorganismes utilisés pour la production d'enzymes peuvent être des eucaryotes tels que les levures et moisissures ou des procaryotes tels que les bactéries

La production d'enzymes microbiennes se fait soit par fermentation liquide ou par fermentation solide. Ces méthodes de production ont beaucoup été étudiées.

Traditionnellement, la production se faisait par fermentation liquide en raison de la facilité de contrôle de différents paramètres (pH, température, aération, transfert d'oxygène et d'humidité). Mais elle est exigeante, coûteuse et pas bien adaptée pour les organismes fongiques.

Les innovations biotechnologiques dans le domaine des enzymes et des technologies de fermentation, ont ouvert de nombreuses voies pour l'application de la fermentation solide. Celle-ci détient un énorme potentiel pour la production d'enzymes, elle est d'un intérêt particulier dans les procédés où le produit brut fermenté peut être utilisé directement comme source d'enzymes

En plus des avantages liés à ce type de production (faible cout, productivité supérieure, besoins en énergie réduits et absence de contrôle rigoureux) ; des résidus agro-industriels sont considérés comme les meilleurs substrats pour la production d'enzymes dans la fermentation solide.

**Choix des souches :**

Les caractéristiques recherchées dans une souche produisant une enzyme industrielle sont :

- Le taux de croissance ;
- Importante productivité en enzymes ;
- Importante activité spécifique de l'enzyme élevée ;
- Régulation réduite ;
- Résistance à la répression catabolique ;
- Peu de produits secondaires ;
- Sporulation limitée ;
- Enzymes extra cellulaires ;

**PARTIE**  
**EXPERIMENTALE**

# Matériel et méthodes

**I) Matériel :**

Notre travail expérimental a été réalisé dans les laboratoires de microbiologie et de biochimie du département technologie alimentaire à la faculté des sciences de l'ingénieur (UMBB)

**1-1) Matériel non biologique :**

1) Verrerie	2) Réactifs et produits	3) Appareillage
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Erlenmeyers ;</li> <li>- Bêchers ;</li> <li>- Entonnoirs ;</li> <li>- Tubes à essai ;</li> <li>- Pipettes graduées ;</li> <li>- Fioles jaugées ;</li> <li>- Éprouvettes ;</li> <li>- Tube à vis stériles.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Eau distillée ;</li> <li>- Sulfate d'ammonium (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ;</li> <li>- Acide acétique CH<sub>3</sub>COOH ;</li> <li>- Hydroxyde de sodium (NaOH) ;</li> <li>- Milieu de culture PCA ;</li> <li>- Ecorces d'orange ;</li> <li>- Son de blé ;</li> <li>- Extrait de levure ;</li> <li>- Amidon soluble ;</li> <li>- Chlorure de calcium(CaCl<sub>2</sub>) ;</li> <li>- Tartrate double de sodium et de calcium ;</li> <li>- Glucose ;</li> <li>- BSA (sérum bovine albumine) ;</li> <li>- DNSA (acide dinitro 3.5 salicylique) ;</li> <li>- Chlorure de sodium (NaCl) ;</li> <li>- Acétate de sodium tri hydraté ;</li> <li>- Sulfate de cuivre (CuSO<sub>4</sub>- 5H<sub>2</sub>O) ;</li> <li>- Carbonate de sodium (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) ;</li> <li>- Acide citrique ;</li> <li>- Acide chlorhydrique HCl ;</li> <li>- Phosphate de potassium (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) ;</li> <li>- Chlorure de potassium (KCl).</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Bain Marie MEMERT ;</li> <li>- Autoclave TRADE RAYPA ,STEAM STERILIZER;</li> <li>- Agitateur magnétique (plaque chauffante) « Hot Stinner Medline limited MS 300;</li> <li>- Centrifugeuse à basse température « HERMLE / Z-323K ;</li> <li>- Vortex Advanced vortex mixer « VELP SCIENTIFICA Z x 3 ».</li> <li>- Balance analytique ;</li> <li>- Étuve d'incubation, MEMERT ;</li> <li>- Bec bunsen ;</li> <li>- pH-mètre ;</li> <li>- Spectrophotomètre : J<sup>^</sup>SCO V.530 UV/VIS ;</li> <li>- Chromatographie d'exclusion moléculaire ;</li> <li>- Four à moufle</li> <li>- Capsule en porcelaine</li> </ul>

**I-2) Matériels biologique :**

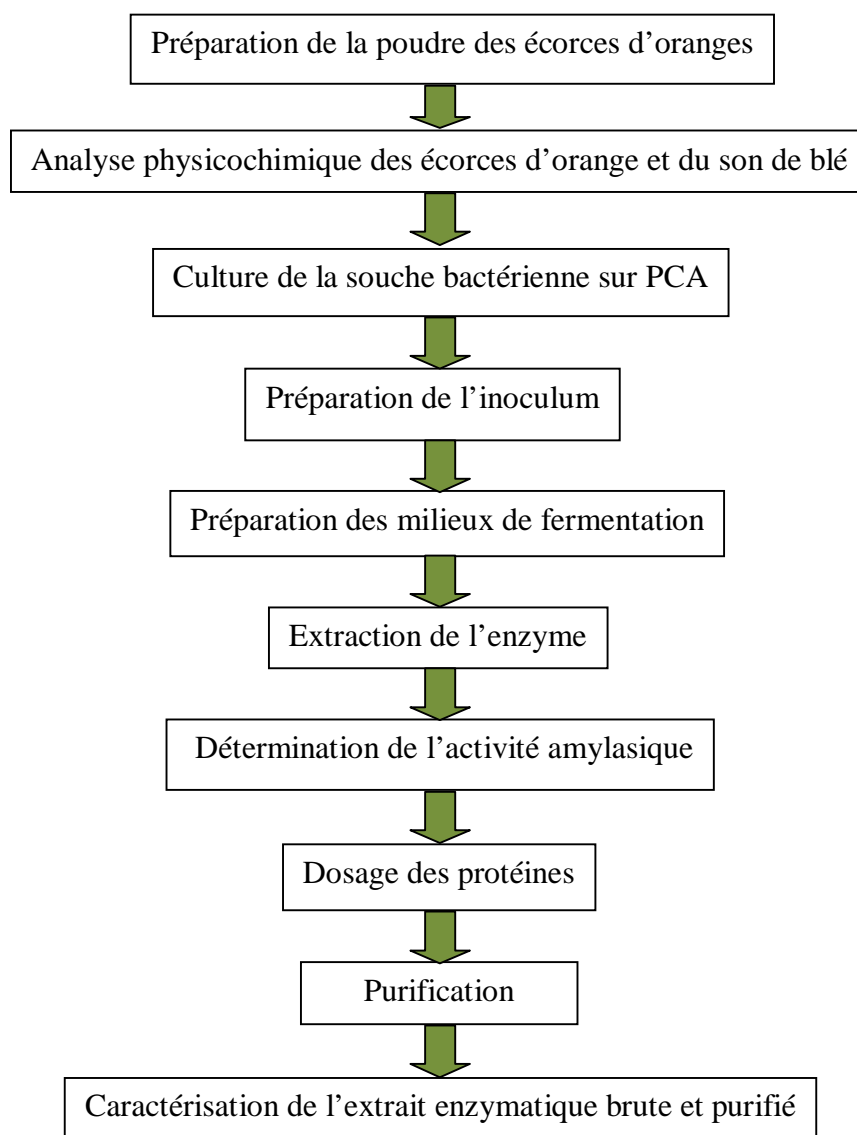
La souche bactérienne *Bacillus amyloliquefaciens* a été isolée à partir du sol puis identifiée par biologie moléculaire par Mme Talantikite.



**Figure n° 06 :** Aspect microscopique de La souche bactérienne *Bacillus amyloliquefaciens*

### **II) Méthodes :**

Notre travail expérimental consiste à la production d'une enzyme amylolique à partir d'une souche bactérienne de *Bacillus amyloliquefaciens* selon les étapes suivantes :



**Figure n° 07 :** Plan de travail expérimental



## **II-1) Préparation de la poudre des déchets d'oranges :**

La préparation de l'échantillon débute par un séchage à l'air libre puis un broyage et enfin un tamisage (de façon à réduire les déchets d'oranges secs en fines particules et avoir une masse homogène de même calibre).

La poudre est conservée dans des boîtes dans un endroit frais et sec.



**Figure n° 08: Déchets d'oranges séchés**

**Figure n°09 : poudre d'écorces d'oranges**

## **II-2) Analyse physicochimique de la poudre des écorces d'orange :**

Les analyses effectuées sur les écorces d'orange sont :

- ✓ Détermination du pH
- ✓ La teneur en humidité
- ✓ Taux de cendres

### **II- 2-1) Détermination du pH : (AFNOR 1986)**

#### **❖ Principe :**

Le pH permet de mesurer la quantité des ions hydrogène dans le milieu.

#### **❖ Mode opératoire**

- ✓ Mettre l'échantillon dans un bécher et y ajouter trois fois son volume avec d'eau distillée ;
- ✓ Chauffer au bain-marie pendant 30 mn en remuant de temps en temps avec une baguette en verre ;
- ✓ Filtrer ensuite le mélange obtenu et plonger l'électrode dans la solution et lire la valeur du pH affiché sur l'écran.

### **II-2-2) Détermination de la matière sèche : (AFNOR, 1986)**

#### **❖ Principe :**

La matière sèche est déterminée par un séchage de 2g de l'échantillon pendant 3 heures dans une étuve à 105°C jusqu'à l'obtention d'un poids constant.

#### **❖ Mode opératoire :**

Dans des capsules vides séchées à l'étuve durant 15 mn à 103 ± 2 °C, on pèse dans chacune 2 g des écorce d'orange broyé et on les place dans l'étuve réglée à 105 ± 2 °C pendant 3 heures ; jusqu'à l'obtention d'un poids constant.

#### **❖ Expression des résultats**

MST (%) =  $[(m_2 - m_0) / (m_1 - m_0)] * 100\%$  dont :

- (m<sub>0</sub>) est la masse (g) de la capsule vide ;
- (m<sub>1</sub>) est la masse (g) de la capsule contenant l'échantillon avant séchage
- (m<sub>2</sub>) est la masse (g) du creuset après séchage.

### **II-2-3) Détermination des cendres : (AFNOR ; 1986)**

#### **❖ Principe :**

Les cendres totaux ont été déterminées par calcination d'un échantillon sec dans un four à moufle à une température de 550°C pendant 5 heures, en atmosphère oxydante, jusqu'à l'obtention d'un résidu blanchâtre de poids constant.

#### **❖ Mode opératoire**

- ✓ Dans des capsules en porcelaine, on pèse 2g de la poudre d'écorce d'orange ;
- ✓ On place les capsules dans un four à moufle réglé à 550 ± 15 °C, pendant 5 heures jusqu'à obtention d'une couleur grise, claire ou blanchâtre ;
- ✓ On retire les capsules du four et on les met à refroidir dans le dessiccateur et puis, on les pèse.

#### **❖ Expression des résultats**

Le taux de cendre exprimé en pourcentage est donné par la formule suivante :

Cendres (%) =  $(m_2 - m_0) / (m_1 - m_0) * 100\%$  dont :

- (m<sub>0</sub>) est la masse (g) De la capsule vide ;

- $(m_1)$  est la masse (g) de la capsule contenant l'échantillon avant incinération
- $(m_2)$  est la masse (g) de la capsule après incinération

**Le taux de matière organique MO = MST- CENDRES**

### **II-3) Analyse physicochimique du son de blé :**



**Figure n° 10 : Son de blé**

Les analyses effectuées sur le son de blé sont :

- ✓ Détermination du pH
- ✓ La teneur en humidité
- ✓ Taux de cendre

**II-3-1) Détermination du pH :** (AFNOR ; 1986) voir analyse physicochimique des écorces d'orange.

**II-3-2) Détermination de la teneur en humidité :** (AFNOR ; 1986) Voir analyse physicochimique des écorces d'orange.

**II-3-3) Détermination du taux de cendre :** (AFNOR ; 1986) Voir analyse physicochimiques des écorces d'orange.

### **II-4) Production de l'alpha amylase :**

#### **II-4-1) Revivification de la souche :**

A partir de la gélose de conservation ; prélever quelques colonies ; étaler sur la gélose PCA coulée et refroidie ensuite les incuber à 30 °C pendant 24 heures.

### **II-4-2) Préparation de l'inoculum :**

Prélever des colonies à l'aide d'une anse de platine stérile plusieurs fois et les disposer dans des tubes à vis stériles contenant 5 ml d'eau distillée stérilisée, agiter jusqu'à l'obtention d'une turbidité semblable à celle du tube de MAC FARLAND 5 qui représente environ  $15 \cdot 10^8$  cellules par ml (voir annexe 06)

#### **❖ Vérification du nombre de bactéries qui se trouvent dans l'inoculum :**

Préparer les dilutions décimales allant de  $10^{-1}$  jusqu'au  $10^{-7}$  par l'incorporation de 1 ml de l'inoculum dans 9 ml de l'eau physiologique qui sera la dilution  $10^{-1}$  ensuite ; à partir de cette dilution prendre 1 ml et la mettre dans un autre tube contenant 9 ml de l'eau physiologique qui sera la dilution  $10^{-2}$  et ainsi de suite.

A partir des dilutions décimales ; porter aseptiquement 1 ml de chaque tube et le mettre dans des boîtes de pétrie ; ensuite verser la gélose PCA fondue et refroidie à  $45^\circ\text{C}$

Faire les mouvements de 8 pour mélanger

Incuber à  $30^\circ\text{C}$  pendant 24 h

Compter les colonies et le nombre trouvé doit être multiplié par le facteur de dilution.

### **II-4-3) Préparations du milieu de fermentation :**

#### **❖ Fermentation sur milieu solide :**

La préparation du milieu de fermentation solide se fait sur la base de travaux antérieurs publiés.

Préparer dans des Erlenmeyers de 250 ml un milieu de fermentation solide de la composition suivante : 2g d'amidon, 0.25 g d'extrait de levure ; 10 g de la poudre d'écorces d'orange, 10g de son de blé et 60 ml de sulfate d'ammonium.. (Dakhmouche ; 2006)

- Boucher avec du coton cardé couvert avec du papier aluminium ;
- Stériliser à  $120^\circ\text{C}$  pendant 15 minutes ;
- Refroidir.

- Enlever le coton cardé dans la zone stérile ensuite Ensemencer avec 2 ml de l'inoculum d'environ  $30 \cdot 10^8$  cellule par ml ce qui est confirmé par le MAC FARLAND 5 et agiter ;
- Incuber à  $30^\circ\text{C}$  pendant 24 h.
- ❖ **Préparation du milieu de fermentation liquide :**

Dans des Erlenmeyers de 250 ml, mettre 5g d'écorces d'orange ,2.5 g de son de blé, 0.25 d'extrait de levure et 2 g de l'amidon, 30 ml de sulfate d'ammonium et 25 ml d'eau distillée.

- Stériliser à  $120^\circ\text{C}$  pendant 20 minutes.
- Après refroidissement, ensemer avec 2 ml de l'inoculum de  $30 \cdot 10^8$  cellules/ml ;
- Agiter à  $30^\circ\text{C}$  à 100 rpm pendant 24 h dans une étuve rotative.



**Figure n° 11 : Milieux de fermentation**

### **II-5) Extraction de l' $\alpha$ amylase :**

Ajouter environ 70 ml de l'eau distillé pour le milieu solide et environ 30 ml pour le milieu liquide.

Remuer, filtrer et centrifuger à  $4^\circ\text{C}$  à 5000 tours pendant 20 minutes.

Le surnageant constitue l'extrait enzymatique brut.



**Figure n° 12 : Extrait enzymatique brut**

### **II-6) Mesure de l'activité amylasique :**

L'activité amylasique a été estimée selon la méthode de **(Bernfeld ; 1955)**, en utilisant le filtrat obtenu après filtration de moût de fermentation.

Le principe de cette méthode est basé sur la mesure du pouvoir réducteur du glucose libéré lors de l'hydrolyse enzymatique de l'amidon.

La réaction est colorimétrique et l'intensité de la coloration est proportionnelle à la quantité du glucose libérée. **(Bernfeld ; 1955)**

L'activité enzymatique est exprimée par unité internationale ( $\mu\text{mol/ml}$ ), correspondant à une  $\mu$  mole du glucose libéré par millilitre du milieu à 40°C et à pH 6.5.

#### **❖ Protocole expérimental :**

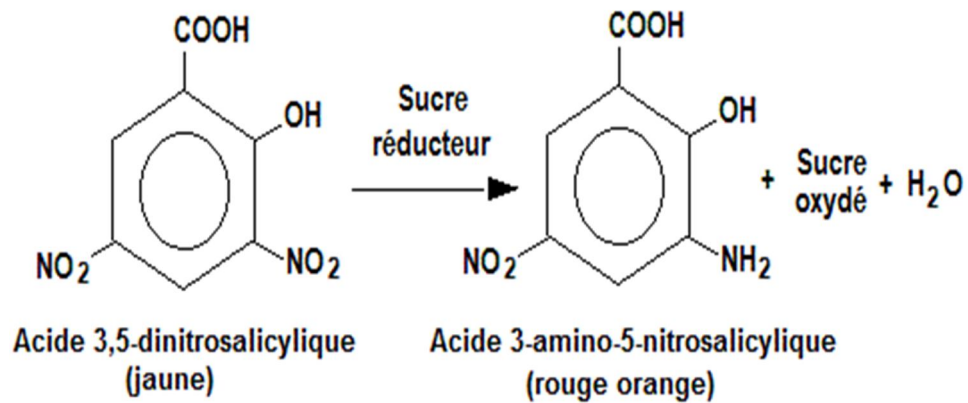
0.5ml de l'extrait enzymatique est ajouté à 0.5ml de la solution du substrat, après agitation le mélange est incubé à 40°C pendant 30 minutes avec un tube témoin représenté par le blanc.

La réaction est arrêtée par l'addition de 1 ml d'acide 3,5 dinitrosalicylique (DNSA), suivie d'un chauffage à 100°C pendant 10 minutes pour le développement de la couleur. Après refroidissement dans un bain de glace, 10 ml d'eau distillée sont ajoutés.

L'absorbance est déterminé à 540 nm contre le blanc.

La concentration des sucre réducteur correspondant est déterminée à partir d'une courbe étalon établie avec des concentrations du glucose variant de 10 à 100 mg/100 ml (voir annexe 02)

La préparation des réactifs utilisés ; (DNSA, solution du substrat) est détaillée en annexe 02.



**Figure n° 13 :** Réduction du DNS par les sucres réducteurs

### **II-7) Dosage des protéines par la méthode de Lowry :**

Le dosage des protéines des extraits enzymatiques a été réalisé selon la méthode de (Lowry et al ; 1951), c'est une méthode colorimétrique qui permet la détermination des concentrations d'une solution protéique

#### **❖ Principe :**

Le principe repose sur le développement d'une coloration bleue foncée suite à l'addition d'un sel de cuivre en milieu alcalin puis du réactif de folin ciocalteu.

La coloration résulte de la réaction du cuivre avec les liaisons peptidiques et la réduction de l'acide phosphore tungstomolybdique par la tyrosine et la cystéine.

La concentration en protéines de l'échantillon analysé est déterminée en se référant à une courbe d'étalonnage établie en employant de l'albumine sérique bovine (BSA) (voir annexe03)

#### **❖ Mode opératoire :**

- **Préparation de la solution réactive :** mélanger juste avant l'emploi dans l'ordre en respectant l'addition des réactifs
  - 0.5 ml de la solution C (CuSO<sub>4</sub>)
  - 0.5 ml de la solution B tartrate double de sodium et de potassium)
  - 50 ml de la solution A (NaOH, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>)

La préparation des solutions A ;B ;C est détaillée en annexe 03

- **Préparation de la gamme étalon** : préparer la solution mère de la BSA (sérum de l'albumine bovine) à 200 $\mu$ g/ml de BSA et les solutions filles (voir annexe 03)
- **Préparation de l'échantillon à analyser** : Prendre 1ml de EEB et ajouter 9ml de l'eau distillée.
  - Ajouter 5ml de la solution réactive ;
  - Agiter ;
  - Attendre 10Min ;
  - Ajouter 0,5ml de réactif de folin (dilué 3 fois) ;
  - Agiter et Laisser reposer 30min à l'obscurité.

Lire la DO à 660nm.

### **II-8) Purification :**

#### **❖ Principe :**

Les gels sont formés de dextrans modifiés et se présentent sous forme de perles qui gonflent considérablement dans l'eau, les plus utilisés sont les séphadex, les molécules dont la taille est supérieure à celle des plus gros du gel c'est-à-dire supérieure à la limite d'exclusion de ce gel ne peuvent y pénétrer, migrent dans la phase aqueuse qui entourent les grains du gel et quittent les premières le lit du gel placé préalablement dans une colonne à chromatographie.

Par contre les plus petites molécules pénètrent dans le gel et leur migration est ainsi retardée les molécules quittent donc le gel séphadex placé dans une colonne de verre dans l'ordre de masse moléculaire décroissante, la colonne peut être réutilisée lorsque les molécules de petites taille quittent le gel.



**Figure n° 14 : chromatographie par exclusion moléculaire.**



Les caractéristiques de l'appareil sont :

- Pompe : DESAGA HEIDELBERG.
- Collecteur de fraction : SPECTRUM LABS.COM
  - Spedra /chrom Fraction collector CF-2 ;
- Colonne en verre : Spectra/chrom, LC column.
  - Dimension: (d=1,5 cm; H=30 cm ).

❖ **Mode opératoire :**

➤ **Choix du gel :**

La série des gels "Sephadex (G-25, G-50, G-75, ...) est très largement employée en chromatographie de filtration sur gel. Les indices G-25, G-50, G-75, ... indiquent la granulométrie des billes du gel, c'est-à-dire leur volume. Le type de gel est choisi en fonction du domaine de fractionnement dans lequel se trouvent les molécules à séparer. Le gel le mieux adapté pour la séparation de protéines de masse moléculaire :  $2000 \text{ Da} < PM < 70000 \text{ Da}$  est le gel de filtration « Superdex G-75 »

➤ **Préparation du gel séphadex G 75 :**

Le gel séphadex G 75 est gonflé en quantité suffisante dans l'eau distillée pendant 24 heures à température ambiante, ensuite On fait couler le gel dans la colonne en verre, le gel doit être homogène.

➤ **Dépôt de l'échantillon :**

Injecter doucement à la surface du gel à l'aide d'une seringue un volume de 0.5 ml de l'extrait enzymatique brut.

➤ **Elution :**

Les éluât sont recueillis dans un collecteur de fraction à raison de 2ml par tube

Le débit d'élution des extraits enzymatiques purifié est de 0.5 ml par minute.

La lecture de l'absorbance se fait à 280 nm de longueur d'onde et mesurer l'activité amylasique pour les tubes présentant des pics considérables.

➤ **Détermination du poids moléculaire des enzymes :**

✓ **Dépôt de protéines marqueurs :**

Injecter un volume de 0.5 ml d'un mélange de quatre protéines (1mg/ml) de poids moléculaire connus :

- Anydrase carbonique de 30 KDA
- Ovalbumine de 43 KDA
- BSA de 67 KDA
- Trypsine inhibitor de 20 KDA

L'élution des protéines marqueurs à un débit de 0.5 ml par minute.

Les éluât sont recueilli dans le collecteur de fraction à raison de 2 ml par tube.

Lire l'absorbance à 280 nm.

### **II--9) Caractérisation de l'extrait enzymatique brut et purifié :**

#### **II--9-1) Effet du pH : (Promita et al ;2016)**

Pour la détermination du pH optimum, préparer des tubes Contenant un mélange réactionnel constitué de 0.5 ml de l'extrait enzymatique et 0.5 ml d'une solution d'amidon à 1% dans du tampon phosphate à pH 5, 6.6, et 8, dans du tampon (KCl ; HCl) à pH 2, et dans du tampon citrate à pH 4.

Les incuber pendant 30 min à une température de 45 °C

L'activité amyliasique des extraits enzymatiques est alors mesurée .

La préparation des solutions tampon est décrite en annexe 04

#### **II-9-2) Effet de la température : (Promita et al ; 2016)**

Pour la détermination de la température optimale de l'enzyme, des tubes contenant un mélange de 0.5ml d'enzyme avec 0.5ml d'une solution d'amidon à 1% dans du tampon phosphate à pH6.6 sont préparés et incubés pendant 30 min à des températures allant de 30C° à 80°C avec un intervalle de 10C°

L'activité amyliasique des extraits enzymatiques est mesurée.

### **II-9-3) La thermo stabilité de l'enzyme : (Promita et al ; 2016)**

Pour estimer la thermo stabilité de l'enzyme, préparer une série de tube contenant 0.5 ml de l'extrait enzymatique et les incuber à des températures allant de 60 à 90°C avec un intervalle de 10°C puis ajouter 0.5 ml de la solution de l'extrait enzymatique ensuite mesurer l'activité amylasique résiduelle.

### **II-9-4) Influence de la durée d'incubation :( Promita et al ;2016)**

Pour étudier la durée de réaction optimale de la solution d'enzyme ,0.5 ml de l'extrait enzymatique et 0.5 ml de la solution substrat de l'amidon sont incubés dans un bain Marie à différents intervalles de temps (10 à 50 minutes avec un intervalle de 5 minutes) et l'activité amylasique est alors mesurée.

# Résultats et discussion

### 1) Analyses physicochimiques des écorces d'oranges :

Les résultats trouvés lors des analyses physicochimiques effectués sur la poudre des écorces d'orange sont illustrés dans le tableau n° 02 :

<b>pH</b>	<b>Humidité(%)</b>	<b>Matière sèche totale(%)</b>	<b>Matières organiques(%) /MS</b>	<b>Cendres(%) /MS</b>
<b>4.66</b>	<b>6.27</b>	<b>93.73</b>	<b>90.59</b>	<b>3.14</b>

Tableau n° 02 : Résultats des analyses physicochimiques des écorces d'orange

#### 1-1) Le pH :

Le pH nous renseigne sur la concentration des ions hydrogène dans le milieu ; Les écorces d'orange utilisés comme substrat de fermentation présente un pH de 4.66 qui est une valeur supérieure à celle trouvé par **(Greenman ; 1998)** de 3.93.

Le pH est influencé par la présence de diverses substances notamment les acides organiques intervenants dans le processus métaboliques ; qui sont affectés par divers facteurs à savoir ; la saison, l'origine géographique, le type de sol, la fertilisation, les conditions de stockage, le temps d'exposition au soleil et la période de récolte.

#### 1-2) La teneur en humidité :

Les écorces d'orange présentent une teneur en humidité de 6.27 % Ce qui leur confère une stabilité vis-à-vis la prolifération des microorganismes et une longue conservation pendant son stockage à température ambiante.

D'après **(Multon ; 1991)** les aliments ayant une humidité inférieure à 40 % sont des aliments stables.

Cette valeur de l'humidité trouvée indique la richesse des écorces d'orange en matière sèche totale (93.73%) qui reste légèrement inférieure à celle trouvé par **(Dakhmouche et al ; 2005)**, ceci est due aux divers facteurs comme les variétés d'orange ; les conditions pédologique et climatique. **(Gerenman ; 1998)**

Nous pouvons dire que cette poudre d'écorces d'orange est un excellent substrat susceptible d'être exploité par *Bacillus amyloliquefaciens*.

### **1-3) Le taux de cendres :**

La quantité en sels minéraux que renferment les écorces d'orange est de 3.17 pour cent ; cette valeur est proche de celle trouvée par **(Dakhmouche et al ; 2005)** de 3.46 %.

Cette teneur montre que les écorces d'orange sont des sous-produits agricoles très riches en minéraux comparativement à d'autres déchets.

Cette valeur nous indique que cette poudre d'écorces d'orange renferme 90.59 % de matière organique qui reste comparable à la quantité trouvée par **(Dakhmouche et al 2005)** ; Ce qui est due à une influence climatique qui modifie la biosynthèse de différentes molécules organiques ; cette dernière peut être un très bon milieu de fermentation pour *Bacillus amyloliquefaciens* qui va produire notre alpha amylase notamment les glucides qui sont facilement métabolisables ; par conséquent une excellente source de carbone et d'énergie.

### **2) Analyses physicochimiques du son de blé :**

Les résultats obtenus du son de blé sont illustrés dans le tableau n°03 :

pH	humidité (%)	matière sèche(%)	cendres (%) /MS	matière organique/MS
<b>6.60</b>	<b>13.30</b>	<b>86.70</b>	<b>4.99</b>	<b>81.9</b>

**Tableau n° 03 : résultats des analyses physicochimiques effectuées sur le son de blé**

La valeur moyenne de la matière sèche est de 86,70 % qui est légèrement inférieure à celle rapportée par **(Bourdon et al ; 1984)** de 87 %.

Selon **(Chasseray ; 1991)**, ces différences peuvent être liées à de nombreux facteurs qui se rapportent aux grains de blé dont la variabilité de la composition chimique, la conduite technique de la mouture **(Gutiérrez-Alamo et al ; 2008)**, aux conditions agro

climatiques au cours du remplissage du grain de blé et au génotype du grain (**Triboi ; 1990**)

En ce qui concerne la teneur moyenne des cendres, elle est de l'ordre de 4,99 % et apparaît légèrement supérieure à celle rapportée par (**Bourdon et al ; 1984**).

Celui-ci révèle une forte variabilité du potentiel minéral des sons de blé ; ce qui est due aux conditions environnementales. (**Peterson et al ; 1986**) et aux conditions d'extraction. (**Mac Master et al ; 1978**)

Il est bon de noter que le son de blé est très riche en sucres totaux notamment l'amidon à 23.05 % ce qui montre que le son de blé est un excellent substrat de fermentation pour la production de divers enzymes entre autres l'alpha amylase.

### 3) Production de l'alpha amylase :

L'alpha amylase de *Bacillus amyloliquefaciens* a été produit dans deux types de milieu de fermentation ; les résultats trouvés du taux de protéines pour chaque type de milieu sont représentés dans la figure n°15

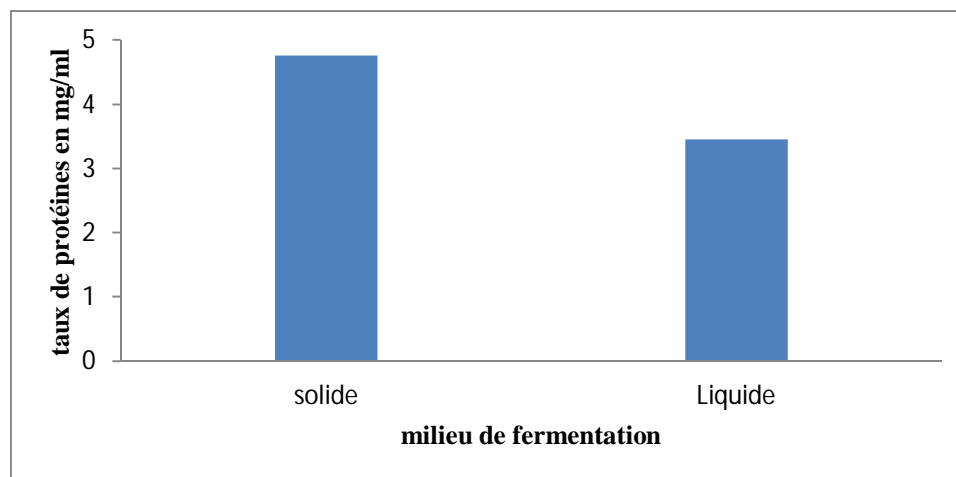


Figure n° 15 : Taux de protéines de l'extrait enzymatique brut.

La teneur en protéines trouvée de 3.46 mg par ml pour l'extrait enzymatique brut issu du milieu de fermentation liquide est similaire à la teneur trouvée de celle de *Bacillus Subtilis* par (**Asgher et al ; 2007**) cependant celle de l'alpha amylase produite à partir de milieu solide arrive à 4.76 mg par ml qui est supérieure à celle trouvée par (**Asgher et al ; 2007**) et comparable avec. (**Ramachandran et al ; 2016**)

Ce qui indique que l'humidité est un facteur critique pour la production d'enzymes. En général le milieu de culture submergé est souvent employé pour la production d'enzyme à partir des bactéries car celles-ci demandent une activité d'eau élevée pour leur croissance ; cependant dans un milieu de fermentation solide ; l'humidité est absorbée au sein de la matrice solide ; ce qui est susceptible d'être plus avantageux pour la croissance en raison de l'efficacité du Procédé de transfert d'oxygène. **(Kunamneni, et Singh ; 2005)**

De même, le taux d'humidité plus élevé diminue la porosité, la structure des particules change ce qui favorise le développement d'adhésivité, réduit le volume de gaz et diminue la diffusion, qui se traduit par un transfert d'oxygène réduit. **(Ramesh ; 1990)**

Il est à noter que la nature particulière de la combinaison du substrat des écorces d'orange et de son de blé a contribué à conserver l'humidité sans produire d'eau libre dans le milieu, de sorte que l'ensemble du système est restée à l'état solide qui a conduit à l'augmentation du taux de protéines.

D'après **(Dakhmouche et al ; 2005)**, ces déchets sont une excellente source de carbone nécessaire à la croissance des microorganismes et la production d'enzyme extracellulaire.

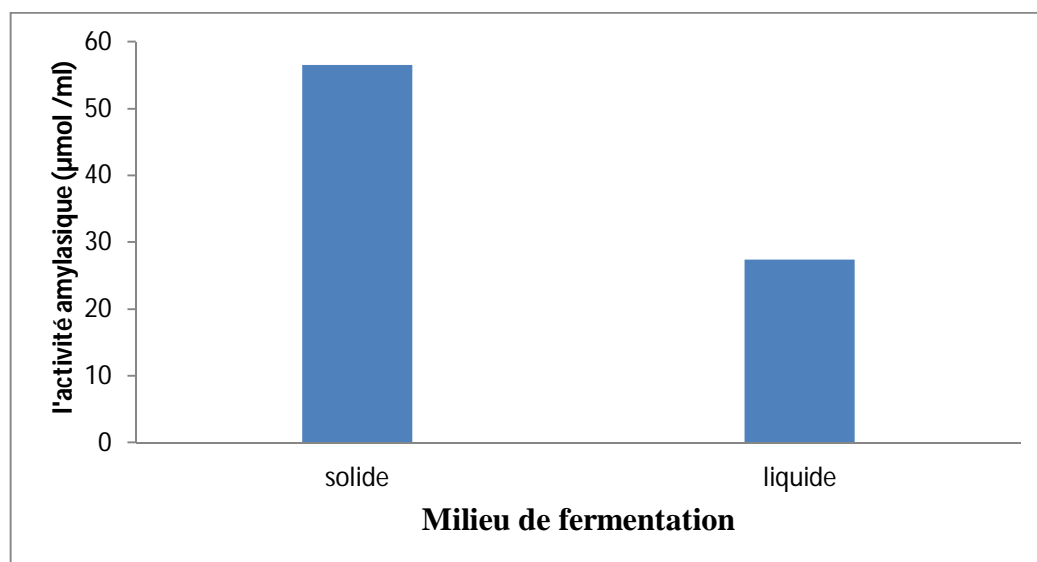
**(Gupta et al ; 2003)** Ont constaté que la production d' $\alpha$ -amylase est maximale lorsque l'amidon est utilisé comme source de carbone.

Cependant La biosynthèse de l'enzyme a eu lieu non seulement en présence d'amidon, mais aussi avec d'autres sources de carbone. Des études antérieures ont rapporté que des substrats complexes induisent une plus grande production d'amylase. **(Sexana et al ; 2007)**

#### **4) L'activité amyliasique :**

La figure n°16 représente les résultats trouvés de l'activité amyliasique de l'enzyme produite à partir des deux milieux de fermentation.





**Figure n° 16 :** L'activité amyliasique de l'alpha amyliase pour le milieu solide et liquide

L'activité amyliasique maximale de 56.54 µ mol par ml a été trouvée pour l'alpha amyliase extraite du milieu de fermentation solide, une nette différence existe entre les deux types de milieux de fermentation.

L'activité amyliasique de l'alpha amyliase produite par notre souche de *Bacillus amylioliquefasciens* est tout à fait considérable ce qui révèle l'induction efficace et disponible des sources de carbone dans le milieu de culture.

Il est bon de noter que les écorces d'orange ont servis de matière première économique et facilement disponible pour la production des enzymes utiles comme l'alpha amyliase.

Le son de blé est aussi une source considérable d'amidon et c'est un bon substrat qui présente un effet inducteur et simulateur sur les alphas amyliases.

Sur le plan qualitatif la pulpe des déchets d'orange est riche en calcium 1.2 % (**Dakhmouche et al ; 2005**) qui favorise l'activité de l'enzyme par le maintien de la conformation spatiale de celle-ci.

### **5) Purification :**

La purification de l'extrait enzymatique brut a été assurée par chromatographie d'exclusion moléculaire en utilisant un gel séphadex pour pouvoir éliminer toute les protéines contaminantes.

La phase stationnaire constituée de billes de polysaccharide du type séphadex G 75 et la phase mobile qui va transporter les protéines est la solution tampon (0.1 M – ph 6.6).

Le volume injecté de l'extrait enzymatique brut dans la colonne est de 0.5 ml.

Les éluats sont recueillis dans un collecteur de fractions à raison de 2 ml par tube pour un débit de l'ordre de 0.5 ml par minute.

La lecture des absorbances pour chaque tube à 280 nm nous a permis de tracer le profil chromatographique.

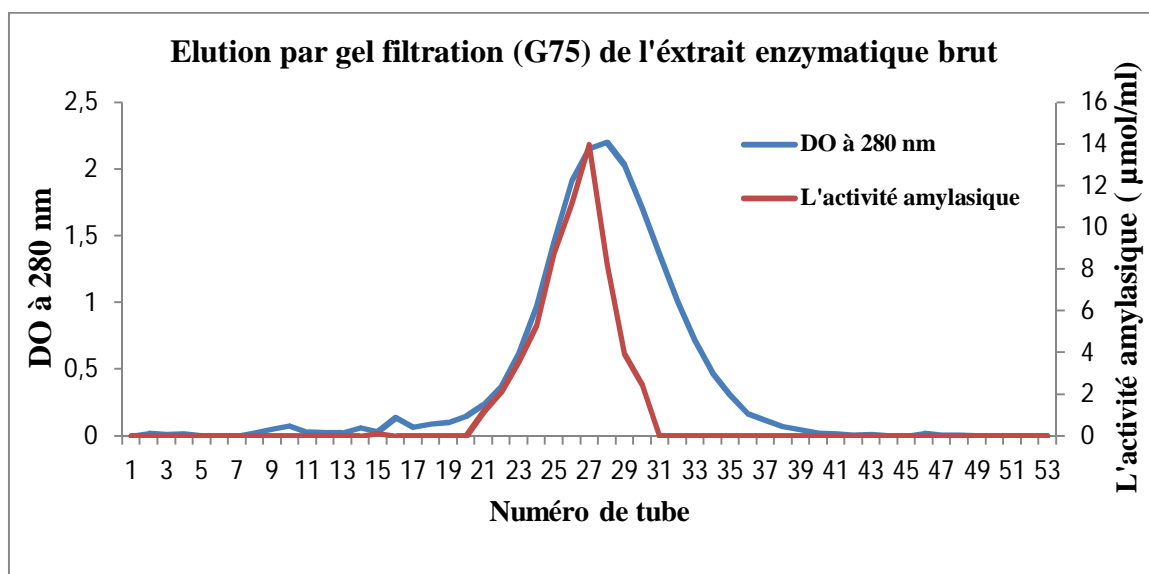
### **5-1) Recherche de l'activité amylasique dans les éluats de la colonne :**

Les résultats de l'activité amylasique trouvés en fonction du volume d'éluat sont représentés dans le tableau n°04 :

n° de tube	volume d'éluat (ml)	activité amylasique ( $\mu$ / mol/ml)
16	32	2.45
22	44	1.15
23	46	2.12
24	48	6.5
25	50	7.44
26	52	10.23
27	54	11.15
28	56	13.99
29	58	8.27
30	60	3.96
31	62	2.46

**Tableau 04 : l'activité amylasique en fonction du volume d'éluat**

Le profil chromatographique ainsi que l'activité amylasique sont représentés dans la figure n°16 :



**Figure n° 17 :** élution de l'extrait enzymatique brut

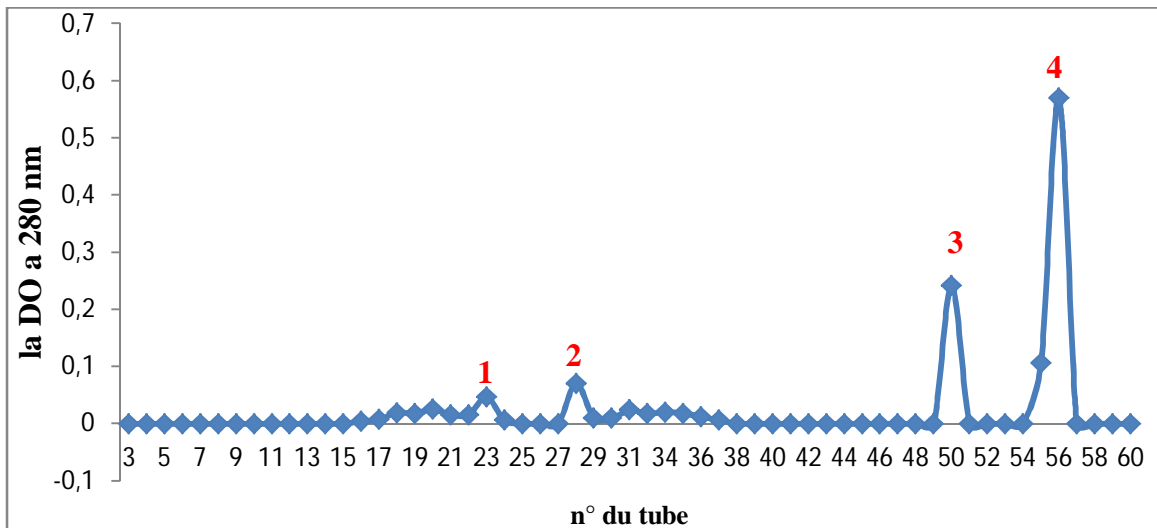
Le profil chromatographique d'exclusion moléculaire sur séphadex G75 de l'extrait enzymatique révèle un seul pic d'élution,

La plus grande valeur enregistrée de l'activité amylasique de 13.99 µmol / ml a été trouvée pour le tube 28 qui représente le grand pic et les autres fractions présentent une activité amylasique très faible. ce qui explique que notre alpha amylase se trouve dans le tube 28 après 56 ml du volume d'élution.

### **5-2) Détermination du poids moléculaire de l'alpha amylase :**

Après l'injection de 0.5 ml du mélange de 4 protéines marqueurs à une concentration de 1 mg/ml ; de poids moléculaire connu ; carbonic anhydrase de 30 Kda ; l'ovalbumine de 43 Kda, la BSA de 67Kda et de trypsine inhibitor de 20 Kda.

Le profile est représenté sur la figure n°18.



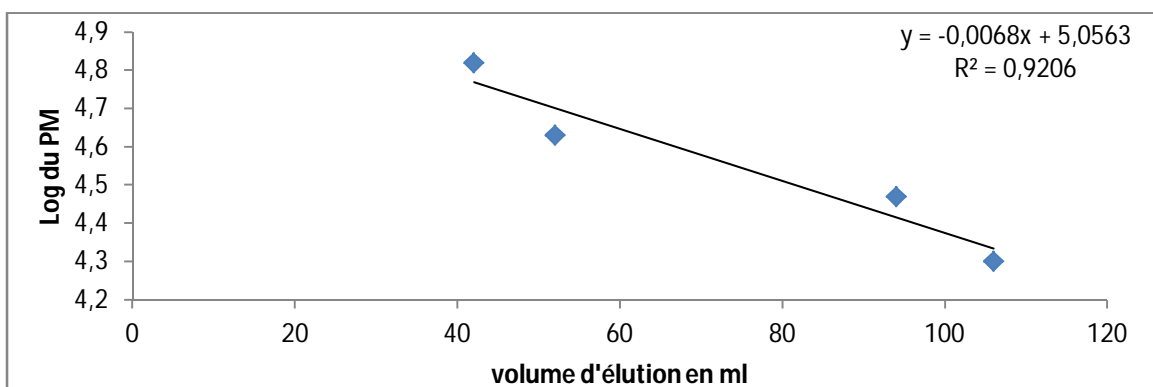
**Figure n°18** : élution des protéines marqueurs

Les poids moléculaires des protéines marqueurs sont représentés dans le tableau n° 05 :

Protéines marqueurs	PM (dalton)	log PM	Volume d'élution
BSA	67000	4.82	42 ml
Ovalbumine	43000	4.63	52 ml
Carbonic anydrase	30000	4.47	94ml
Trypsine inhibitor	20000	5.30	106ml

**Tableau n° 05**: Les protéines marqueurs et leur poids moléculaires

La courbe étalon des protéines marqueurs est représenté dans la figure n°19 :



**Figure n°19** : Courbe étalonnage des protéines marqueurs

D'après la courbe d'étalonnage des protéines marqueurs (log de PM en fonction du volume d'élution), nous déduisons le poids moléculaire de l'alpha amylase purifié dans les mêmes conditions d'injection des protéines marqueurs.

Etant donné le volume d'élution de l'alpha amylase purifiée est de 56 ml. Le poids moléculaire de l'alpha amylase de *Bacillus amyloliquefaciens* par exclusion moléculaire sur gel séphadex G 75 est d'environ 50 000 daltons.

### **6) Caractérisation de l'extrait enzymatique et purifié :**

Toute production d'un métabolite microbien est influencée par des paramètres : Environnementaux : les conditions physiques ; température ; pH ; agitation ; la composition du milieu, concentration et nature du substrat. (Scriban ; 1999)

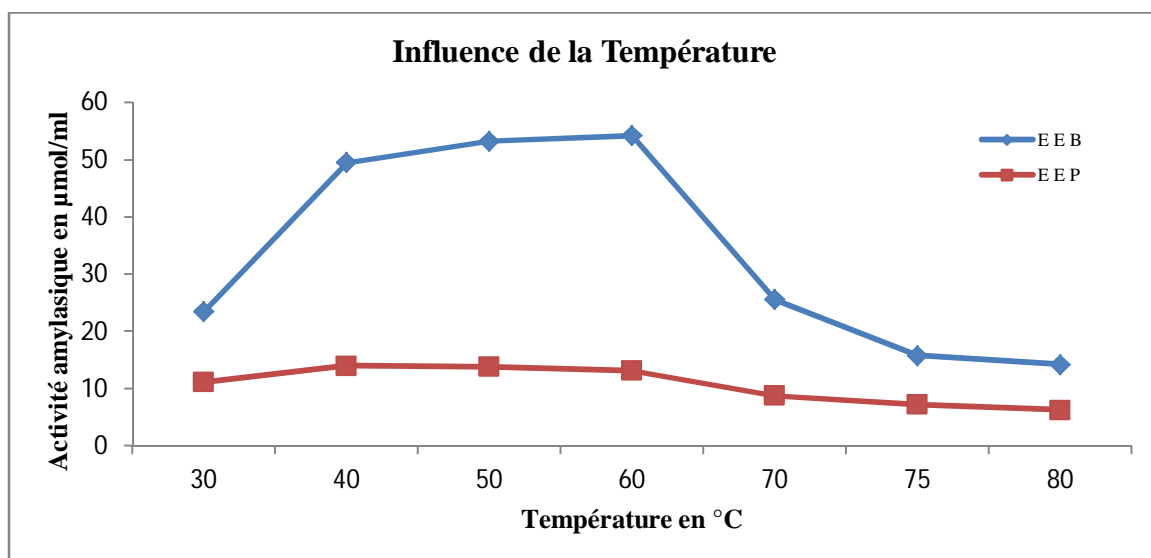
Dans ce travail ; nous avons étudié l'effet de la température ; le pH, la thermo stabilité et la durée d'incubation sur l'activité amylasique de notre alpha amylase.

#### **6-1) Effet de la température ;**

L'effet de la température sur l'activité amylasique nous renseigne sur la stabilité de la protéine enzymatique (Neilsen et al ; 2003)

L'influence de la température sur l'activité amylasique a été testée dans une gamme de 30 à 80 °C à un intervalle de 10°C pendant 30 minutes

Pour l'extrait enzymatique brut, L'activité amylasique maximale de 54.25 µmol a été observé à une température de 60 °C et à partir de là, elle diminue jusqu'à atteindre sa valeur minimale de 14.21 µmol à une température de 80 °C comme le montre la figure n°20 :



**Figure n° 20** : influence de la température sur l'activité amylasique

Ce profil est similaire à celui de **(Ramachandran ; 2016)** quoi que les valeurs de l'activité amylasique sont légèrement supérieures et cette différence est due probablement à l'origine des espèces et aux conditions environnementales qui font que les souches développent des mécanismes spécifiques à leur niche écologique.

**(Werner ; 2010)** observent que les amylases bactériens sont plus thermostables que les amylases fongiques.

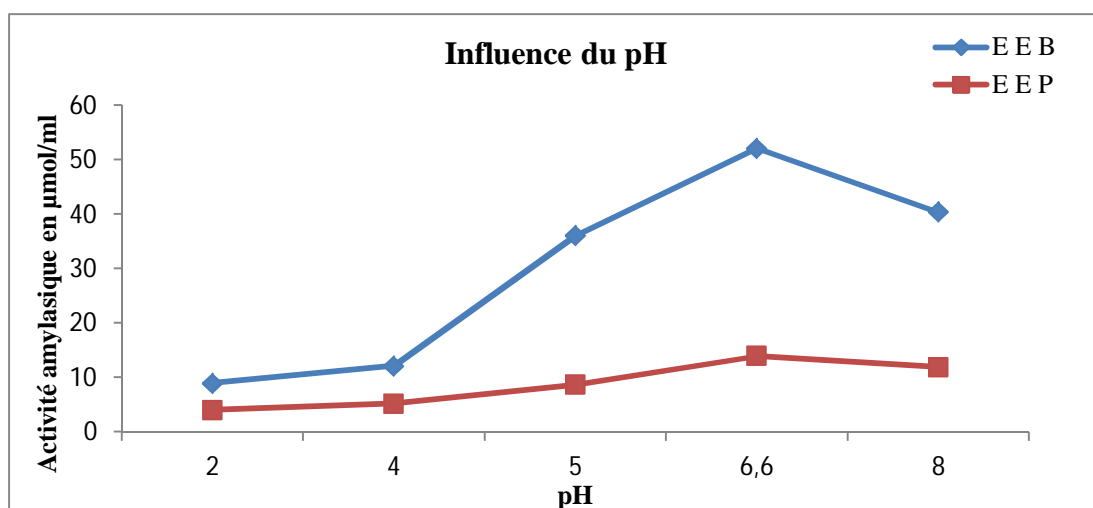
L'amidon est un substrat stabilisant de l'enzyme à l'égard de la dénaturation thermique car son remplacement par d'autres éléments comme le glucose et le lactose n'a pas cet effet.

En ce qui concerne les valeurs obtenues pour l'extrait enzymatique purifié, nous constatons qu'elle présente des activités beaucoup plus faibles notamment à des températures plus élevées.

Selon **(Fogarty ; 1980)** l'enzyme nécessite au moins quatre ions calcium par molécule, les  $\alpha$ -amylases hautement purifiées sont inactives à une température au-dessus de 50 °C

### 6-2) Effet du pH :

L'alpha amylase de *Bacillus amyloliquefaciens* est très sensible aux variations de pH. Une très faible activité observée à pH 2 et 4 pour l'extrait enzymatique brut comme le montre la figure n°21



**Figure n°21 : influence du pH sur l'activité amylasique**

L'activité amylasique est affectée considérablement à pH acide suite à la dénaturation de l'enzyme.

(Castro et al ; 1993) ont trouvé que l'amylase d'origine bactérienne est inactive à pH acide.

Le pH influe sur le degré d'ionisation du substrat et de la molécule enzymatique dont cet effet dépend des groupements ionisables participant à la fixation du substrat et au maintien des structures secondaire et tertiaires de la protéine

D'après la figure n°21 ; l'activité amylasique commence à évoluer à pH 5 jusqu'à atteindre l'activité maximale de 52.14 µmol /ml à pH 6.6 et diminue pour atteindre 40.4 µmol /ml à pH 8 ; cependant cette valeur à ce pH ne peut être négligé ce qui montre que l'alpha amylase de *Bacillus amyloliquefaciens* supporte les pH supérieurs à la neutralité.

Des études antérieures par (Gupta et al ; 2003) sur les alphas amylases d'origine microbienne ont montré une activité amylasique considérable à pH 9.

Nous constatons aussi que l'extrait enzymatique purifié a été beaucoup plus affecté à pH 2 et 4

D'après (Kelly ; 1980) les amylases hautement purifiés sont sensible à des pH extrêmes..

### 6-3) Effet de la thermo stabilité de l'enzyme :

La thermo stabilité de notre enzyme est testé à quatre températures différentes (50, 60, 70, 80 C°) pendant 30 minutes et les résultats sont représentés sur la figure n° 22 :

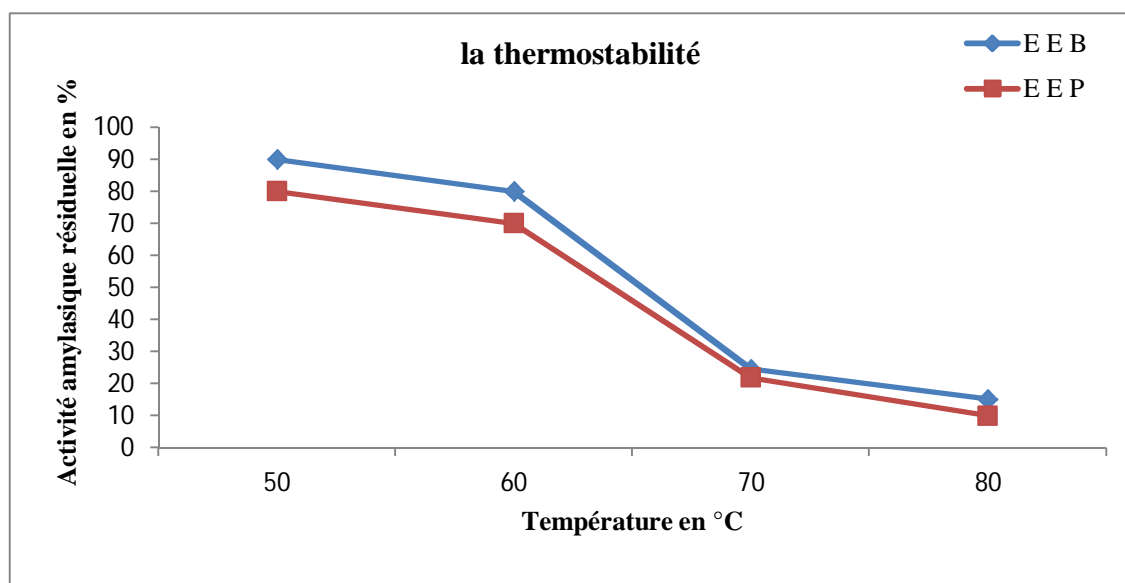


Figure n° 22 : Effet de la thermo stabilité de l'enzyme

D'après la courbe nous constatons que *Bacillus amyloliquefaciens* possède des capacités à produire des enzymes thermostables.

100 pour cent de l'activité amylosique résiduelle correspond à 56.54  $\mu\text{mol} / \text{ml}$  pour l'extrait enzymatique brut et 13.99  $\mu\text{mol} / \text{ml}$  pour l'extrait enzymatique purifié.

L'enzyme perd environ 20 % de son activité à 60 °C et presque la totalité de son activité à une température de 70 °C et 80 °C suite à la dénaturation de la protéine enzymatique. (Ramachandran ; 2016) a présenté un profil comparable avec des valeurs un peu différentes. ce qui fait que notre souche produit une alpha amylase thermostable dont cette thermo stabilité est due à la présence de certains groupements de chaînes latérales des acides aminés et à leur séquences et un certain nombre de facteurs qui interviennent dans la stabilité tels que l'hydrophobicité (Dill et al ; 1990), les liaisons



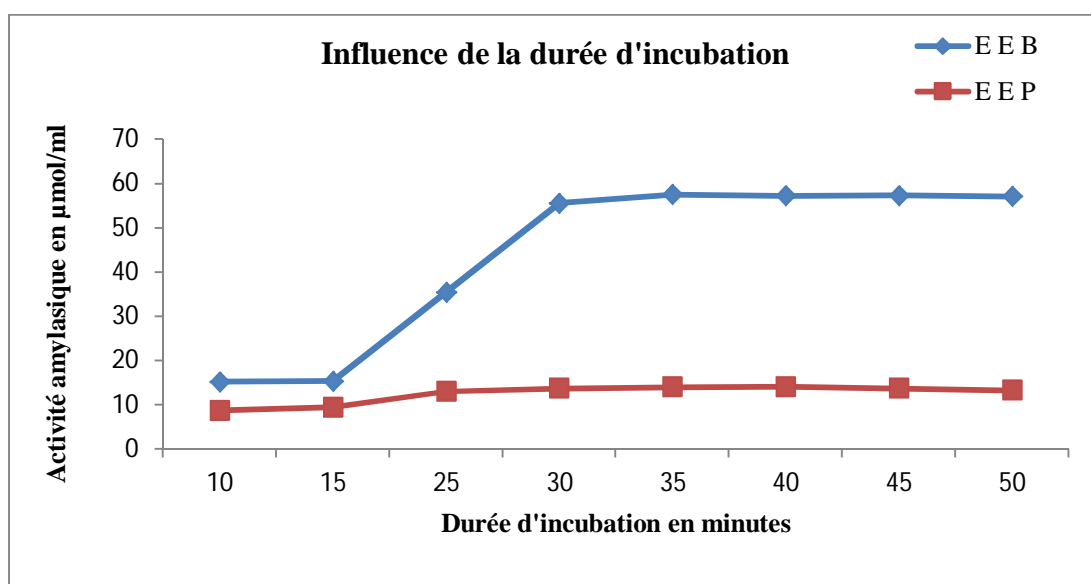
métalliques ,la création de paires d'ions ; les Ponts S-S (Matsumura et al ; 1989) et les liaisons hydrogène.(Boel et al ; 1990)

Les sels minéraux influent également la stabilité de l'enzyme tel que le calcium. (Vieille et Zeikus ; 2001)

En vue de ces performances thermiques, l' $\alpha$ -amylase de *Bacillus amyloliquefaciens* peut être qualifiée d'enzyme thermostable.

### **6-4) Influence de la durée d'incubation :**

Pour étudier la durée optimale de l'extrait enzymatique, la réaction a été effectuée en utilisant l'enzyme avec son substrat à une température de 40 ° C dans un bain marie à différents intervalles de temps et l'activité enzymatique a ensuite été mesurée. Les résultats sont présentés sur la figure n°23 :



**Figure n° 23 : influence de la durée d'incubation**

D'après la courbe nous constatons une faible activité amyliasique à 10 et 15 minutes et à partir de là elle augmente pour atteindre sa valeur maximale de 55,55 µmol à 30 minute ensuite elle reste stable durant 35. 40. 45 et 50 minutes.

Cette courbe présente la même tendance que celle de (Ramachandran ; 2016)

**CONCLUSION**

### Conclusion :

Notre travail a consisté à produire une enzyme amylolytique d'origine bactérienne.

Dans la première partie de cette étude, nous avons revivifié puis purifié la souche bactérienne, préparé deux milieux de culture à base de son de blé et d'écorce d'orange, un milieu liquide (5g d'écorces d'orange 2.5 g de son de blé, 0.25 d'extrait de levure et 2 g de l'amidon, 30 ml de sulfate d'ammonium et 25 ml d'eau distillé) et l'autre solide (2g d'amidon, 0.25 g d'extrait de levure ; 10 g de la poudre d'écorces d'orange, 10g de son de blé et 60 ml de sulfate d'ammonium). Nous avons ensuite procédé à l'extraction, la purification et enfin à la caractérisation de l'extrait enzymatique obtenu.

Après avoir déterminé les activités enzymatiques nous avons remarqué que la plus forte activité amylasique de 56,5  $\mu\text{mol/ml}$  a été enregistrée pour l'alpha amylase extraite à partir du milieu solide, alors que le milieu liquide nous a donné 27.47  $\mu\text{mol/ml}$ .

Nous pouvons conclure que le milieu solide constitue une intéressante alternative

La technique de gel filtration nous a permis de purifier notre extrait enzymatique brut et de recueillir la fraction d'alpha amylase dont le poids moléculaire est proche de 50000 dal Ce résultat est en concordance avec ceux rapportés par la majorité des études effectuées.

Au terme de ce travail nous avons pu montrer que l'alpha amylase est résistante à 70°C pendant 30 minutes et que la production optimale de l'enzyme a été observée à 50°C et 60 °C, ce qui pourrait rendre l'enzyme de *B. Amyloliquefaciens* plus appropriée pour une utilisation future dans diverses industries qui nécessitent des hautes températures.

La cinétique d'incubation en fonction du pH montre que le pH optimal de l'alpha amylase de *Bacillus amyloliquefaciens* est de 6.6, nous constatons qu'elle est très stable à des valeurs de pH élevé.

Nous pouvons conclure que, *B. Amyloliquefaciens* peut être un producteur potentiel d'amylase extracellulaire qui pourrait trouver des applications diverses

Il est souhaitable que ce travail puisse être poursuivi par une optimisation du milieu de culture et d'étudier l'influence de chacun de ses composants.

# **Références Bibliographiques**

Références bibliographiques

- **AFNOR ; 1986.** Les dossiers de la normalisation ISSN, (2), 8297,4827.
- **Ait Abdelouahab Naoual,** livre de microbiologie alimentaire 2008 .Edition .1.04.4.302. ISBN 97899.6100.7547
- **Asgher M., Asad M.J., Rahman S.U., Legge R.L. A; 2007** thermostable  $\alpha$ -amylase from a moderately thermophilic *Bacillus subtilis* strain for starch processing. J Food Process Eng. ; 79 : 950–955
- **Abate CM, Castro NGR, Sineriz F, Callieri DAS.; 1999** Production of amylolytic enzymes by *Bacillus amyloliquefaciens* in pure culture and in co-culture with *Zymomonas mobilis*. Biotechnol Lett.; 21: 249–252. Doi : 10.1023/A : 1005477505683.
- **Ahlawat, S .; Dhiman, SS; Battan, B .; Mandhan, RP; Sharma ,J 2009**
- **Assamoi Allah Antoine, Jacqueline Destain, Philippe Thonar 2008 t ., 2.** Aspects microbiologiques de la production des protéases par fermentation solide des endo- $\beta$ -1,4-xylanases de moisissures : le cas de *Penicillium canescens*
- **Bruinenberg P.M., Hulst A.C., Faber A., Voogd R.H. A 1996** process for surface sizing or coating of paper. In: European Patent Application.
- **Burhan A., Unaldi N., Coral G., Colak O., Aygan A., Gulnaz 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.
- **Burhan A., Colak O., Aygan A., Gzalnu O. (2008).** Highly thermostable, thermophilic, alkaline, SDS and chelator resistant amylase from a *thermophilic Bacillus sp.* isolate A3-15, Bioresource Technology. (99):3071-3076.
- **Bernard Alin José Diena Alphonso meyer 2004**cours de microbiologie générale et exercice corrigé.
- **Boel E ., Brady L ., Brzozwski A ., Derewenda Z ., Dodson G ., Jensen V.,**
- **Bernfeld P., 1955.** Amylase. In. Clowck S.P and Kaplan N.O.(Ed): Methods in enzymology. Volume 1. Academic press. New York, pp.149-157.
- **Bourdon D, Perez JM, Lebas F, Leclercq B, Lessire M et Sauveur B 1984** L'alimentation des animaux monogastriques porc, lapin, volailles: INRA édition. Paris. INRA. 282p.

- **Chiba S ; 1988** Amyloglycosidase. In: Handbook of Amylases and related enzymes (The Amylase Research Society of Japan, éd.). Pergamum Press, Oxford, U.K. pp 104-116
- **Chi M., Chen Y., Wu T., Lo H., Lin L;2005** Engineering of a truncated  $\alpha$ -amylase of *Bacillus* sp. strain TS-23 for the simultaneous improvement of thermal and oxidative stabilities. J. Biosci. Bioeng.
- **Castro PML, Hayter PM, Ison AP, Bull AT; 1993.** Application of statistical design to the optimization of culture medium for recombinant interferon-gamma production by Chinese hamsterovary cells. Appl Microbiol Biotechnol. ;38(1):84–90. doi: 10.1007/BF00169424
- **Colman et Elliot W.H 1962** studies on alpha amylase formation by bacillus subtilis biochim .J.83 : 256- 263
- **Colman G and Grand ; M.A 1966** characteridtic of alpha amylase formation by bacillus subtilis nature london .211 : 306-307
- **Chasseray P 1991**Caractéristiques physiques des grains et de leurs dérivés. In: Godon B Willm C éditeur. Les industries de première transformation des céréales. Techniques et Documentations- Lavoisier, Londres- New York. 694p.
- **Djekrif-Dakhmouche S., Gheribi – Aoulmi Z., Merihi Eraihz , Bennamoun L. (2005).** Application of a statistical design to the optimization of culture medium for a-amylase production by *Aspergillus niger ATCC 16404* grown on orange waste powder. J. Food Eng. (73):190-197
- **Dill K A. 1990.** Dominant forces in protein folding. Biochemistry 29, p:7133-7155
- **Elliot W.H 1962** studies on alpha amylase formation by bacillus subtilis biochim .J.83 : 256- 263
- **El Tayeb O, Mohammed F, Hashem A, Abdullah M.; 2007** Optimization of the industrial production of bacterial alpha amyalse in Egypt. IV. Fermentor production and characterization of the enzyme of two strains of Bacillus subtilis and Bacillus amyloliquefaciens. Afr J Biotechnol. ;7(24):4521–4536.
- **Fogarty W.M., Kelly C.T. 1980** Amylase, amyloglucosidase and related glucanases. In Rose (A.H.) Ed. *Economic microbiology, microbial enzymes and bioconversion*. London: Academic Press.5, p : 115-170.268.

- **Fogarty W. M. and Kelly, C. T. 1999** Microbial Enzymes and Biotechnology .Applied Science, London, New York. (43):71-132.
- **Fan Zhu et. Al ; 2011** Carbohydrate Research, 346 (9), 1112 – 1121.  
Sweetpotato amylopectin was subjected to partial hydrolysis by  $\alpha$ -amylase from *Bacillus amyloliquefaciens* to release the clusters.
- **Frederic Marie-claire, 2014** *Ni cru ni cuit. Histoire et civilisation de l'aliment fermenté*, Alma Editeur, , 360 p
- **Greenman J., Scragg A.I.I. (1998)**. Orange and potato peel extracts. Analysis and use as substrat for the production of extracellular enzymes in continuous culture from *Bacillus*. *Enzyme and Microbial Technology*.22 (2): 130-377
- **Gupta R., Gigras P., Mohapatra H., Goswami I V.K., Chauhan B. 2003**. Microbial  $\alpha$ -amylases: a biotechnological perspective, *Process Biochemistry*. 38(1):599-616.
- **Gaillard jean louis Michel .Sinom et Henri Leclex 1998** microbiologie générale la bactérie et le monde microbien. 1 décembre.
- **Gutiérrez-Alamo A, Perez De Ayala P, Verstegen M W A, Den Hartog L A and Villamide M J 2008** Variability in wheat: factors affecting its nutritional value. *World Poultry Science Journal* 64: 20-39
- **Gomes I., Gomes J., Steiner W ;2003** Highly thermostable amylase and pullulanase of the extreme thermophilic eubacterium *Rhodothermus marinus*: production and partial characterization. *Bioresour Technol.* ; 90:207–214.
- **.Gervais , P. Molin,** The role of water in solid-state fermentation
- **Haq I.U., Rani S., Ashraf H. et Qadeer M.A., 2010**. Biosynthesis of alpha amylase by chemically treated mutant of *Bacillus subtilis*. *J.Biol. Sci.* 2 (2),
- **Harly. John P .Prescott .Donald .A. Klein ;2003** Lansing M livre de microbiologie
- **Hamilton Amilton L.M., Kelly C.T., Fogarty W.M. 1999** Production and properties of the raw starch-digesting alpha-amylase of *Bacillus sp. IMD 435*. *Process Biochemistry*. (35):27-31.
- **Ingle M.B and Bayer ; E.W 1972** production of industrial enzymes by bacillus species.*Devlopments industrial microbiologie* 13 : 420 - 426

- **Janecek S. 1994.** Sequence similarities and evolutionary relationships of microbial, plant and animal  $\alpha$ -amylases. *Eur. J. Biochem.* 224, p: 519–524
- **Kamoun P. 1977.** Appareils et méthodes en biochimie 2ed. Flammarion Médecine sciences. Paris; P : 110-115
- **Kunamneni A., Permaul K., Singh S; 2005** Amylase production in solid state fermentation by the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus*. *J Biosci Bioeng.* ; 100:168–171.
- **Kraulis P. J. 1991.** *J. Appl. Cryst.* 24, p : 946-950.
- **Kelly C.T. 1980.** Amylase, amyloglucosidase and related glucanases. In Rose (A.H.) Ed. *Economic microbiology, microbial enzymes and bioconversion*. London: Academic Press.5
- **Lin L. L., Hsu W. H and Chu W. S. 1998.** A gene encoding for an  $\alpha$ -amylase from thermophilic *Bacillus* sp. strain TS-23 and its expression in *Escherichia coli*. *J Appl Microbiol.*82,
- **Lowry O. H., Rosebroughi N. J., Farr A.L and Randall R. J; 1951.** Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193 (1), p: 265-275
- **Larpent G .M and Sanglier J. J. (1992).** *Biotechnologies. Principes et méthodes.* P : 574-581
- **Monson .P ; 1985** les enzymes biofutur n° 35 : 25 - 28
- **Multon ; 1991** technique d'analyse et de contrôle dans les industries agroalimentaire vol – ed Lavoisier tec et doc p 121 127
- **Mitidieri, S .; Souza Martinelli, AH; Schrank, A .; Vainstein, MH ;2006**
- **Moraes L.M.P., Filho S.A., Ulhoa C.J.; 1997** Purification and some properties of an  $\alpha$ -amylase glucoamylase fusion protein from *Saccharomyces cerevisiae*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* ; 15:561–564 .
- **Mayer Alphonson, Bernard Alin José Diena ;2004** cours de microbiologie générale et exercice corrigé .
- **Matsumura M .G., and Matthews B. W.;1989** Substantial increase of protein stability by multiple disulphide bonds. *Nature.* 342, p : 291-293.
- **Mohapatra B.R., Banerjee U.C., Bapuji M; 1998.** Characterization of a fungal amylase from *Mucor* sp. Associated with the marine sponge *Spirastrella* sp. *J. Biotechnol.* ; 60:113–117..



- **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).
- **Magee RJ, Kosaric N; 1987** The microbial production of 2,3-butanediol. *Adv Appl Microbiol.* ; 32:89 – 161. doi: 10.1016/S0065-2164(08)70079-0.
- **Mac Masters C C, Hinton J J C and Bradbury D ; 1978** Microscopic structure and composition of the wheat kernel. In: Pomeranz Y, editor. *Wheat chemistry and Technology*, St Paul, MN, (USA). American Association of Cereal Chemists. 514p.
- **Nustrat A, Rahman SR; 2007.** Comparative studies on the production of extracellular  $\alpha$ -amylase by three mesophilic *Bacillus* isolates. *Bangladesh J Microbiol.* 2007 ; 24 (2) : 129 – 132.
- **Nielsen J. E and Borchet T. V. 2000.** *Biochim. Biophys. Acta.* 1543, p: 253-274.
- **Park C.S., Chang C.C., Kim J.Y., Ogrydziak D.M., Ryui D.D.Y. ;1997** Expression, secretion, and processing of rice Alpha-amylase in the yeast *Yarrowia lipolytica*. - *J. Biol. Chem.*, 272(11):6876-6881.
- **Petersen S., Swift H., Thim L and Woldike., H. 1990.** Calcium binding in  $\alpha$ -amylases: an X- ray diffraction study at 2.1-Å resolution of two enzymes from *Aspergillus*. *Biochemistry*; 29, p :6244–6249.
- **Prakash B., Vidyasagar M., Madhukumar M.S., Muralikrishna G., Sreeramulu K;2010** Production, purification, and characterization of two extremely halotolerant, thermostable, and alkali-stable  $\alpha$ -amylases from *Chromohalobacter* sp. TVSP 101. *Process Biochem.* ; 44:210–215.
- **Peterson C J, Johnson V A and Mattern P J; 1986** Influence of cultivar and environment on mineral and protein concentrations of wheat flour, bran and grain. *Cereal Chemistry* 3: 183-186.
- **Perry Jerome Derry James Staly Stephen Lory** 19 out 2004 microbiologie cours et question de révision.
- **Prieur, Geslin , Payan** 2001 mini manuel cours et qcm / 4 ROC.
- **Priest, M. Goodfellow, L. A. Shute et R. C. W. Berkeley; 1987,** « *Bacillus amyloliquefaciens* sp. nov., nom. rev. », *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, vol. 37, n° 1, janvier.

- **Prieurs Geslin Payan ; 2003** mini manuel de microbiologie cours et qcm  
*Biochem. Eng. J.* 13 85–101.
- **Petersen S., Swift H., Thim L and Woldike., H; 1990.** Calcium binding in  $\alpha$ -amylases: an X- ray diffraction study at 2.1-Å resolution of two enzymes from *Aspergillus*. *Biochemistry*; 29, p :6244–6249.
- **Pinches; A; , Louw. M.E and Watson ; T ; G; 1985** Growth plasmid stability and alpha amylase production in batch biotechnologie letters ; Z 621- 626.
- **Pandey A.** Solid-state fermentation. *Biochem. Eng. J.* 2003;13:81–84.
- **Ramachandran S., Patel A. K., Nampoothiri K. M., Chandran S., Szakacs G., Soccol C;2016** solid culturing of *Bacillus amyloliquefaciens* for alpha amylase production, article in food technologie and biotechnologie.
- **Pandey A.; 2004.** Alpha amylase from a fungal culture grown on oil cakes and its properties. *Braz. arch. biol. technol.* 47 (2).
- **Promita D ,Saimon Ahmad T,Kaniz M, Palash Kumar and SM Abu saym;2013** ;Production and partial characterization of extracellular amylase enzyme from *Bacillus amyloliquefaciens*.
- **Rajagopalan G., Krishnan C;2008.** Alpha-amylase production from catabolite derepressed *Bacillus subtilis* KCC103 utilizing sugarcane bagasse hydrolysate. *Bioresour Technol.* ;99:3044–3050.
- **Ramesh M.V, B.K. Lonsane; 1990** Critical importance of moisture content of the medium in alpha amylase production by *Bacillus licheniformis* M27 in a solid state fermentation medium, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 33 (1990) 501–505.
- **Scriban R. ; 1999.** *Biotechnologie. 5ème édition. Techniques et Documentation – Lavoisier (éd.).* p : 401-409.
- **Sexana R.K., Dutt K., Agarwal L., Nayyar P A; 2007** highly thermostable and alkaline amylase from a *Bacillus* sp. PN5. *Bioresour Technol.*;98: 260–265.
- **Sandor Ellix Katz; 2012** *The Art of Fermentation: An In-Depth Exploration of Essential Concepts and Processes from around the World*, Chelsea Green Publishing , 528 p.
- **Simon P., Meunier R., 1970.** *Microbiologie industrielle et génie biochimique.* Ed Masson Et Cie. Paris. PP 567.
- **Schwimmer S and Balls A.K.; 1949.** Isolation and properties of crystalline  $\alpha$ -amylase from germinated barley. *J. Biol. Chem.* 179, p : 1063-1074.

## Références bibliographiques

---

- **Triboi E 1990** Modèle d'élaboration du poids du grain chez le blé tendre (*Triticum aestivum* Thell.). *Agronomie* 10: 191-200.
- **Van Der Maarel MJ, Van der Veen B., Uitdehaag J.C.M., Leemhuis H. et Dijkhuizen L. ;, 2002.** Properties and applications of starch converting enzymes of alpha amylase family. *Biotechnol*; 94.
- **Vieille C and Zeikus J.G; 2001** Hyperthermophilic Enzymes: Sources, Uses, and Molecular Mechanisms for Thermostability .*Microbiology and Molecular BiologyReviews* . 65(1), p : 1-43.
- **Werner, J bauer et Rphael badoud .Entournand ;2010** science et technologie des aliments 2010.ISBN 978.288.074754.p

# **Annexes**

## Annexe 01

### Composition du milieu PCA :

- Tryptone .....5g
- Extrait de levure.....2.5 g
- Glucose .....1.0 g
- Agar .....15 g

pH = 7

## Annexe 02

### Dosage de l'activité amylasique :

#### 1) Préparation des réactifs

- **DNSA :**

Dissoudre 1g de DNSA dans 20 ml de NaOH (2 N) et 50 ml d'eau distillée. Ajouter 30g de tartrate double de sodium et de potassium, compléter à 100 ml avec de l'eau distillée.

Filtrer et conserver à l'abri de la lumière.

- **Solution du substrat :**

Dissoudre 1g d'amidon dans 100 ml de tampon phosphate 0,1 M à pH 6.6.

#### 2) Courbe étalon du glucose :

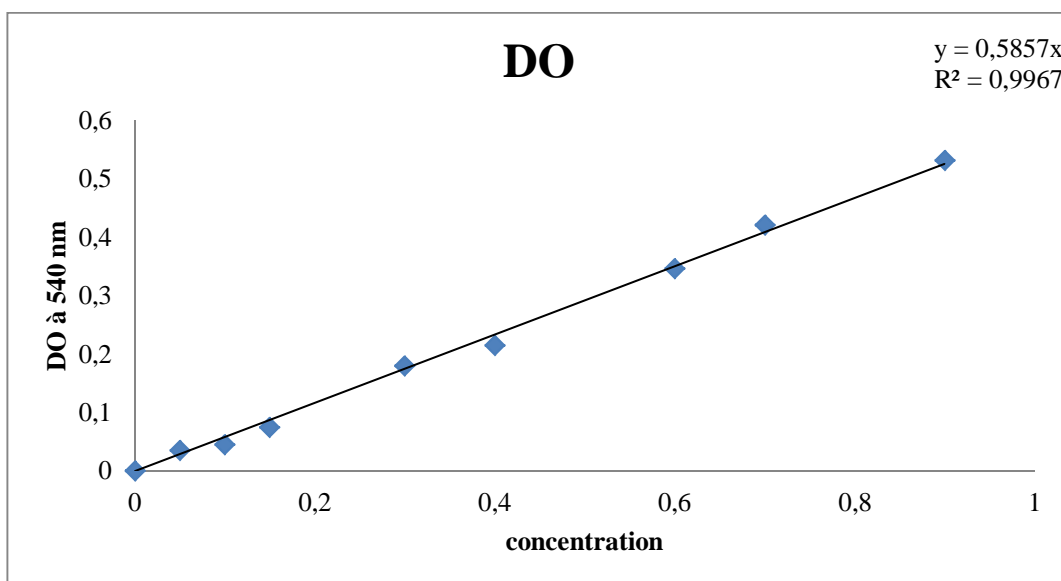
Préparer la solution mère du glucose à 1g/l :

- ✓ Dissoudre 1g du glucose dans 1 litre d'eau distillée ;
- ✓ Préparer les dilutions : 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 et 90 ml de solution Mère et compléter à 100 ml avec de l'eau distillée ;

n° de tube	1	2	3	4	5	6	7	8
le volume prélevé	5	10	15	30	40	60	70	90
le volume total	100	100	100	100	100	100	100	100
concentrations	0.0005	0.1	0.15	0.3	0.4	0.06	0.7	0.9

Dans des tubes à essai, prendre 1 ml de chaque dilution et 3 ml du réactif DNSA.

- ✓ Faire bouillir pendant 5 min dans un Bain-marie à 90 °C ;
- ✓ Refroidir les tubes avec l'eau de robinet pendant 3 min ;
- ✓ Mesurer l'absorbance à 540 nm en utilisant un spectrophotomètre ;
- ✓ Tracer la courbe d'étalonnage.



**Courbe d'étalonnage du glucose**

## Annexe 03

### Dosage des protéines (Lowry 1951) :

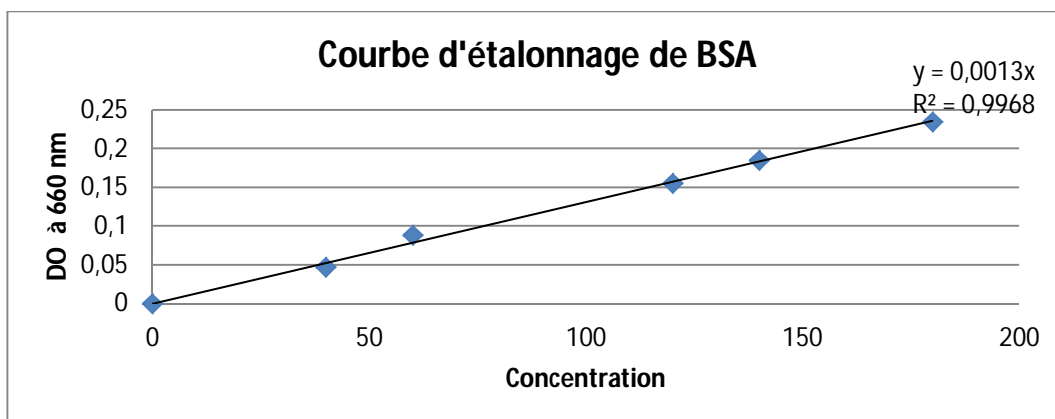
#### 1) Préparation des solutions A, B et C

- Solution A : dissoudre 2g NaOH et 10 g de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> dans 500ml d'eau distillée ;
- Solution B : dissoudre 2 g de tartrate double de Na et de K dans 100ml d'eau distillé ;
- Solution C : dissoudre 1 g sulfate de cuivre CuSO<sub>4</sub>· 5H<sub>2</sub>O dans 100 ml d'eau distillé.

#### Préparation des solutions filles :

Tubes N°	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Solution mère	0ml	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1
H <sub>2</sub> O	1ml	0,9	0,8	0,7	0,6	0,5	0,4	0,3	0,2	0,1	0
Concentration En BSA (µg/ml)	0	20	40	60	80	100	120	140	160	180	200
Solution réactive	5ml	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5

- ✓ Agiter, attendre 10min, ajouter le réactif de Folin, agiter, laisser 30min à l'obscurité)
- ✓ lire la DO à 660 nm





## Annexe 04

### Préparation des solutions tampon : KAMOUN P. (1977)

#### 1) Tampon phosphate

##### La solution A :

- ✓ Dissoudre 9.073 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  dans un litre de l'eau distillé

##### La solution B :

- ✓ Dissoudre 11.87 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  dans un litre de l'eau distillé
- ✓ Mélanger 65.3 ml de A et 34.7 ml de B et ça constitue la solution tampon phosphate à pH 6.6
- ✓ Mélanger 99.2 de A et 0.8 ml pour obtenir la solution tampon phosphate à PH5
- ✓ Mélanger 3.7 de A et 96.3 de B pour la solution tampon phosphate à pH 8

#### 2) Le tampon (KCL. HCL) à pH 2

##### La solution A :

Dissoudre 14.91g de KCL dans un litre d'eau distillé

##### La solution B :

- ✓ HCL à 0.2 N
- ✓ Mélanger 25 ml de A et 5.9 de B et compléter à 100 ml de l'eau distillé

#### 3) Solution tampon citrate a ph 4 :

##### La solution A :

- ✓ Dissoudre 21.01 g dans un litre d'eau distillé
- ✓ Dissoudre 35.60 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  dans un litre d'eau distillé
- ✓ Mélanger 62.0 ml de A et 38 ml de B

## Annexe 05

### **Composition Du son utilisé :**

Origine Moulin 'Algérie' Blida

- Humidité: 14.5 %
- Matières minérales : 5.6 %
- Protides (N X 5.7) : 15.7%
- Protides (N X 6.25) : 17.2%
- Lipides : 7.25%
- Amidon : 23.05%
- Acidité (g H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>): 0.375
- Sucres réducteurs exprimés en glucose au % de matière sèche : 0.465 %

## Annexe 06:

### **Echelle de Mc Farland :**

In microbiology, McFarland standards are used as a reference to adjust the turbidity of bacterial suspensions so that the number of bacteria will be within a given range to standardize microbial testing. An example of such testing is antibiotic susceptibility testing by measurement of minimum inhibitory concentration which is routinely used in medical microbiology and research. If a suspension used is too heavy or too dilute, an erroneous result (either falsely resistant or falsely susceptible) for any given anti-microbial agent could occur.

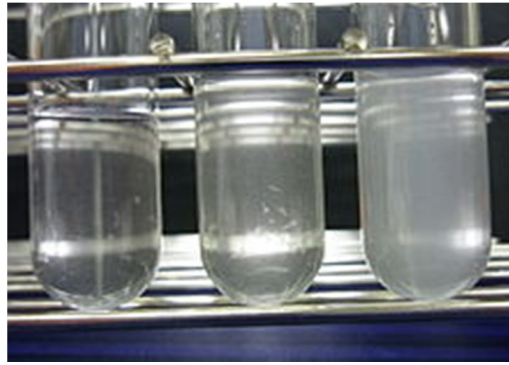
Original McFarland standards were mixing specified amounts of barium chloride and sulfuric acid together. Mixing the two compounds forms a barium sulfate precipitate, which causes turbidity in the solution. A 0.5 McFarland standard is prepared by mixing 0.05 mL of 1.175% barium chloride dihydrate ( $\text{BaCl} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ), with 9.95 mL of 1% sulfuric acid ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ).

Now there are McFarland standards prepared from suspensions of Latex particles, which lengthens the shelf life and stability of the suspensions. The standard can be compared visually to a suspension of bacteria in sterile saline or nutrient broth. If the bacterial suspension is too turbid, it can be diluted with more diluent. If the suspension is not turbid enough, more bacteria can be added.

### **McFarland Nephelometer Standards:**

McFarland Standard No	0.5	1	2	3	4	5
1.0% Barium chloride (ml)	0.05	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5
1.0% sulfuric acid (ml)	9.95	9.9	9.8	9.7	9.6	9.5
Approx. cell density ( $1 \times 10^8$ CFU/ml)	1.5	3.0	6.0	9.0	12.0	15.0
% Transmittance*	74.3	55.6	35.6	26.4	21.5	
Absorbance*	0.08-0.1	0.257	0.451	0.582	0.669	

**\*at wavelength of 600nm**



**Mc Farland standards. No 0.5, 1 and 2.**

**Annexe 07**



**Autoclave**



**Centrifugeuse réfrigérée**



**Capsules**



**Dessiccateur**



**pH-mètre**



**Balance analytique**