

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

جامعة 8 ماي 1945 قالمة

Université 8 Mai 1945 Guelma

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Sciences de la Terre et de l'univers



Mémoire En Vue de l'obtention du Diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologique

Spécialité/Option : Biochimie Appliqué

Département : Biologie

Thème

Les enzymes à intérêts industriels.

Présenté par :

Allal Wissam

Bourazi Fella Wissem

Djoughri Djouhaina

Devant le jury composé de :

Président : M. Hemici Ahmed

M.C.B-Université de Guelma

Examineur : Mme. Benosmane Sana

M.C.B-Université de Guelma

Encadreur : Mme. Souiki Lynda

Pr-Université de Guelma

Jun 2023

Remerciements

Tout d'abord nous voudrions remercier **Dieu** le tout-puissant de nous avoir donné la force et la persévérance nécessaires pour mener à bien ce travail.

Nous tenons à remercier le président du jury, "**Monsieur Hemic Ahmed**", ainsi que l'examinatrice, Madame "**Benosmane Sana**", pour avoir participé à l'évaluation de notre travail.

Nous sommes très reconnaissante envers notre encadrante, "**Madame Souiki Lynda**", pour l'énorme soutien qu'elle m'a apporté tout au long de ce projet, ainsi que pour ses conseils avisés et son encadrement rigoureux.

Nous souhaitons également exprimer notre gratitude envers tout le personnel du laboratoire de microbiologie et de biochimie, notamment "**Madame Hayat**", "**Madame Wafa**" et "**Madame Ratiba**", pour leur aide en matière d'assistance technique, de réalisation des expériences et de disponibilité en tout temps.

Nous remercions également l'ensemble du corps enseignant de notre université, et en particulier "**Madame Braik**", "**Madame Merabet**", pour leur enseignement tant enrichissant que pour leurs conseils judicieux dans les domaines liés à notre travail. Nous exprimons également notre gratitude à toutes les personnes qui ont contribué, de près ou de loin, à la réalisation de ce mémoire.

Nous sommes conscientes que sans l'aide de toutes ces personnes, ce travail n'aurait jamais pu être achevé. Ainsi, nous tenons à conclure en renouvelant nos remerciements à tous, et en exprimant notre gratitude pour leur aide précieuse tout au long de ce travail.

Dédicace

Je dédie ce modeste travail :

À ma très chère mère : Quoi que je fasse ou dise, je ne pourrai pas te remercier comme je le devrais. Ton affection me couvre, ta bienveillance me guide, et ta présence à mes côtés a toujours été ma source de force pour affronter divers obstacles. Tu es la plus gentille femme au monde, parce que tu m'as soutenu dans mes études et dans ma vie jusqu'à ce jour.

À ma chère père : Ma marque de noblesse toi qui m'as soutenu toute ma vie tu as toujours été à mes côtés tu m'as soutenu et encouragé cet acte reflète ma gratitude et tout mon respect tu es ma quintessence de fierté et d'honneur.

À ma chère sœur : Roufaida merci ma petite fleur pour ton soutien et tes encouragements tout au long de mes études, que Dieu te protège pour moi . Je vous souhaite l'excellence dans vos études.

À mes chères frères : Adem et nouh Vous êtes source de joie et de bonheur. Merci pour votre soutien et vous encouragements, malgré votre jeune âge. Je vous souhaite à tous de réussir dans votre vie et de réussir vos études, chers frères. Ainsi que toute la famille **Djoughri** .

À mes enseignants et mes chères collègues

Dédicace

Je dédie humblement ce travail aux innombrables personnes qui ont contribué à leur manière unique à mon parcours. Votre soutien, vos conseils et vos encouragements indéfectibles ont été pour moi une source de force et je suis reconnaissant de votre présence
.dans ma vie

Je dédie ce travail

À la personne la plus importante dans ma vie, ma mère décédée **Ayadi khadoudja**, que Dieu ait son âme. Elle a été le pilier central de ma vie et son influence a façonné la personne que je suis aujourd'hui. Sa présence me manque chaque jour, mais je sais qu'elle veille sur moi de là-haut. Que Dieu la bénisse et la garde pour l'éternité.

À ma famille, à mon père **Abd elHamid**, à ma sœur **Nada Nihed** et à mon frère **Mohamed Fateh**, ainsi qu'à la personne si chère à mon cœur, **BenHaroun Rafika**, pour leur amour et leur soutien infatigable. Je n'oublierai jamais les conseils judicieux de mes tantes et oncles, en particulier **Ayadi Lila**, **Nacera** et **Zohra**, que Dieu ait leur âme, qui m'ont constamment prodigué leur soutien indéfectible.

À mes amis **Amina**, **Chourouk**, **Djoughaina**, **Ikram**, **Ines**, **khawla**, **Nadra**, **Nour** et **Salma**, pour les moments inestimables que nous avons partagés ensemble, je vous remercie pour votre
.amitié sincère et votre soutien continu

À mes professeurs, qui m'ont guidé et inspiré dans mes recherches et qui ont su me
.transmettre leur passion pour leur domaine d'expertise

À mes collègues, qui m'ont accompagné tout au long de ce parcours et avec qui j'ai
.partagé de nombreux moments de travail et de réflexion

À tous, je souhaite exprimer ma plus grande gratitude et reconnaissance pour m'avoir
.aidé à mener à bien ce travail

: Dédicace

Tout d'abord, je remercie Dieu de m'avoir donné la patience et la force de l'endurance nécessaires pour atteindre et réaliser mon rêve

Je dédie ce travail

À mes parents qui m'ont fait entièrement confiance et qui m'ont fait confiance pour atteindre et réaliser ce que je veux pour leur soutien constant, leur patience, leurs prières et leurs sacrifices, et quoi que je fasse, je ne remplirai pas leur droit

À ma mère, **Mme Boukabou Hanane**, pour sa patience, son dévouement, ses dons illimités et ses sacrifices pour moi Elle m'a appris la patience, la force et la lutte

À mon père, **M. Allal Ahcene**, qui m'a enseigné la sagesse, l'optimisme, la confiance en Dieu et le contentement de ce que j'ai

A mon grand-père, **M. Ahmed Allal**, que Dieu lui fasse miséricorde et le fasse habiter dans ses vastes jardins, il était, est et restera vivant dans nos cœurs

À mon ami, fiancé et soutien, qui deviendra bientôt, si Dieu le veut, mon mari **Aidoud Lotfi**. Je le remercie pour son soutien, sa confiance en moi et en mes capacités, et pour m'avoir aidé de toutes les manières, petites et grandes

À mes tantes et oncles, en particulier les deux dames **Amirouche Salima et Amirouche Akila**, qui m'ont aidé à plusieurs reprises et j'ai pu surmonter beaucoup de choses avec leur aide

À mes petits frères et sœurs, **Amine, Amani, Maria et Abd al-Rahim Dahmoune**, qui m'ont fait ressentir le sens de la fraternité et passé les meilleurs moments de ma vie avec eux

A ma psychologue mon amie et le puits de mes secrets **Mme kerdousi wafa** qui m'a soutenu dans les moments les plus difficiles et m'a aidé à surmonter bien des épreuves et des tourments

A mes professeurs à tous les niveaux d'études de qui j'ai beaucoup appris grâce à leur expérience et leur dévouement au travail

Et enfin, un merci spécial à mes chers amis : **kherakhria Salma, Guelmi Ines, Bourazi Wissem, Chaabani Nour El islem, chaouche Amira, Hind Boudeliou, Frian Hadil, Attab**

Latifa, Boustani Wissem, Ben Ghodban Nour El houda pour leur amour, leur confiance
.en moi et en mes capacités et pour leur soutien total à tout moment et les circonstances

J'espère que vous êtes tous fiers de moi et de ce que j'ai accompli, et j'espère aussi que
j'étais et que je suis toujours proche de vos cœurs

Résumé

Les enzymes sont devenues des outils indispensables dans l'industrie, et leur caractérisation est un domaine de recherche crucial pour optimiser leur utilisation dans différents secteurs. Dans cette optique, nous avons réalisé une étude en utilisant l'amylase comme représentant. Une souche fongique d'*Aspergillus niger* a été choisie parmi celles isolées du sol de Hammam Debeh. Après avoir vérifié son potentiel amylolytique sur un milieu contenant de l'amidon, la souche sélectionnée a été cultivée sur un milieu composé de déchets de carottes. Les extraits bruts obtenus par filtration ont été utilisés pour estimer la concentration en protéines selon la méthode de Biuret et mesurer l'activité amylolytique par la méthode de l'acide dinitrosalicylique (DNS). Ensuite, une caractérisation biochimique des enzymes produites a été réalisée en déterminant la température et le pH optima de la réaction enzymatique. Les résultats ont été montrés que l'amylase obtenu ayant un pH optimum de 6 et une température optimale de 70°C. Enfin, L'amylase obtenue, présentant des caractéristiques thermophiles et acidophiles, offre une large gamme d'applications dans différentes industries.

Mots-clés : Enzymes industrielles, amylase, activité amylolytique, pH optimum, température optimale

Summary

Enzymes are now indispensable in industry, making it crucial to investigate their characterization for enhancing their performance in different sectors. To address this, we focused on amylase and used it as a representative enzyme to study. We selected a fungal strain of *Aspergillus niger* that was isolated from the soil in Hammam Debeh since it had promising amyolytic potential on a starch-containing medium. Our team then cultivated the chosen strain on a carrot waste-based medium to extract crude enzymes, which were filtered and used to estimate protein concentration with the Biuret method and amyolytic activity with the dinitrosalicylic acid (DNS) method. We then biochemically characterized the enzymes by identifying the optimal temperature and pH of the enzymatic reaction. The results demonstrated that the produced amylase had an optimal pH value of 6 and an optimal temperature of 70°C. The amylase obtained had thermophilic and acidophilic properties, making it highly versatile for use in various industries.

Key words: Industrial enzymes, amylase, amyolytic activity, pH optimum, optimal temperature.

ملخص

تعتبر الإنزيمات أدوات أساسية في قطاعات الصناعة، والأبحاث الحديثة تركز على تحسين استخدامها من خلال دراسات توصيف الإنزيمات. تمت دراسة الأملاز كمثل للإنزيمات، باستخدام فطرية *Aspergillus niger* المعزولة من التربة في حمام دباغ، وتحقق من إمكانية فعالية هذه الأملاز على وسط يحتوي على نشاء. زرعت السلالة على وسط مكون من نفايات الجزر وتم استخلاص البروتين وتقدير تركيزه باستخدام طريقة **Biuret**، كما قيست النشاطات الأملازية باستخدام طريقة حمض الدينيتروساليسيليك، كما تم توصيف كيميائي الإنزيمات المنتجة من خلال تحديد درجة الحرارة المثلى ودرجة الحموضة للتفاعل الإنزيمي أظهرت النتائج أن درجة حموضة مثلى للأملاز كانت 6 ودرجة حرارة مثلى كانت 70 درجة مئوية وبفضل خصائصها الحرارية والحمضية، فإن الأملاز تتمتع بتطبيقات واسعة في صناعات عدة

الكلمات الرئيسية: الإنزيمات الصناعية، الأملاز، النشاط الأملازي، درجة الحرارة المثلى، الحموضة المثلى.

Liste des abréviations

		B
BSA	Sérum albumin bovin	
		C
ClO ₂	Dioxyde de chlore	
Cr	Chrome	
		D
DNS	Acide dinitrosalicylique	
Do	Densité optique	
		H
H ₂ O ₂	Peroxyde d'hydrogène	
		G
Glu	Glucose	
		P
PDA	Potato dextrose agar	
		R
Rpm	Rotation par minute	

Liste des figures

Figure 1: Structure 3D d'amylase de <i>Bacillus licheniformis</i> (à gauche) et <i>Alteromonas haplanktitis</i> (à droite).	8
Figure 2: Hammam Debegh, Wilaya de Guelma.	13
Figure 3: Prélèvement des échantillons de sol (région: Hammam El-Dabbagh)	14
Figure 4: Purification d'une souche fongique.	15
Figure 5: La technique du ruban adhésif.	16
Figure 6: Préparation de milieu à base de déchets de carottes.	17
Figure 7: La gamme étalon de SAB.	19
Figure 8 : Courbe d'étalonnage de concentration de SAB.	19
Figure 9: Courbe de labsonance en fonction de températures variés.	22
Figure 10: Courbe de l'absorbance en fonction des pH variés.	22
Figure 11: Croissance d' <i>Aspergillus niger</i> sur la plaque d'agar d'amidon avant l'addition de solution d'iode (a) et après l'addition de solution d'iode (b). Après l'addition d'iode, la compensation entourant la croissance fongique indique l'hydrolyse d'amidon (+).	29
Figure 12: Une représentation visuelle de l'activité de l'amylase d' <i>Aspergillus niger</i> à différentes température.	31
Figure 13: Une représentation visuelle de l'activité spécifique d'amylase d' <i>Aspergillus niger</i> à différentes température.	32
Figure 14: Une représentation visuelle de l'activité de l'amylase d' <i>Aspergillus niger</i> à différentes pH.	34
Figure 15: Une représentation visuelle de l'activité de l'amylase d' <i>Aspergillus niger</i> à différentes pH.	35

Table des matières

Résumé	
Abstract	
ملخص	
Liste des abréviations	
Liste des figures	
Introduction	1
Chapitre I : Généralités sur les enzymes	
I. Rôle et action des enzymes	3
II. Domaine d'applications industrielles des enzymes	4
III. Les enzymes industrielles	4
1. La laccase	5
2. Les estérases	5
3. Les oxygénases	6
4. Les peroxydases	7
5. Les protéases	7
6. Les amylases	7
IV. Marché des enzymes industrielles	11
Chapitre II: Matériel et méthodes	
I. Présentation du site de prélèvement	13
II. Echantillonnage	13
III. Isolement des microorganismes	14
IV. Purification	15
V. Identification	15
VI. La recherche de l'activité amylolytique chez la souche sélectionnée	16
VII. Production d'amylase en utilisant les isolats positifs	17
1. Préparation du milieu de production	17
2. Préparation de l'inoculum et conduite de fermentation	17
VIII. Méthodes analytiques d'extrait brute amylolytique	18
1. Dosage des protéines totales	18
2. Dosage de l'activité amylolytiques	20
IX. Caractérisation biochimique d'amylase	21
1. Détermination la temperature optimale d'activité amylolytique	21

2. Détermination le pH d'activité amylolytique	21
--	-----------

Chapitre III : Résultats et discussion

I. Identification des champignons isolées	25
---	-----------

II. Mise en évidence de l'activité amylolytique	28
---	-----------

IV. Caractérisation de la réaction amylolytique	29
---	-----------

1. Température optimale de la réaction amylolytique	29
---	-----------

2. pH optimum de la réaction amylolytique	33
---	-----------

Conclusion	38
-------------------	-----------

Références bibliographiques	40
------------------------------------	-----------

Annexes	
----------------	--

Introduction

Introduction

L'exploration de l'activité des enzymes dans les micro-organismes est un domaine en plein essor dans la recherche biotechnologique, offrant des opportunités potentiellement importantes pour la production d'enzymes industrielles utiles pour diverses applications. Pour cela, il est nécessaire de développer des systèmes de production fiables et rentables. Le choix de la source de micro-organismes, les conditions de culture et les techniques de purification sont tous des facteurs importants qui doivent être optimisés pour produire des enzymes en quantités commerciales. Après la production des enzymes, il est indispensable d'évaluer leur spécificité et leur activité afin de déterminer leur pertinence dans le cadre d'applications industrielles variées. (Bhatt, 2023)

Parmi les différentes catégories d'enzymes industrielles, les enzymes fongiques occupent une place importante grâce à leur grande efficacité, leur spécificité et leur stabilité dans divers environnements. De plus, les recherches se poursuivant dans ce domaine stimulent la recherche de nouvelles enzymes ouvrant des perspectives prometteuses pour des applications industrielles innovantes qui ont la capacité de transformer les industries et de fournir des avantages tangibles. (Arora *et al.*, 2020)

À la lumière de ces connaissances, nous avons jugé utile de débiter un travail portant sur les enzymes à intérêt industriel, en prenant l'étude de l'activité de l'amylase d'*Aspergillus niger* isolée à partir du sol comme exemple. Pour cela, le choix de milieux de fermentation appropriés est essentiel afin d'assurer une bonne croissance de ces micro-organismes et provoquer la production d'amylases extracellulaires. De plus, les enzymes produites doivent être présentes en quantité suffisante pour pouvoir être caractérisées et que leur masse moléculaire puisse être estimée.

L'objectif de ce travail s'articule autour des points suivants :

- ❖ La réalisation d'une culture de champignons sur un milieu solide à base de substrat spécifique pour l'amylase ;
- ❖ La sélection d'une souche fongique, suivie de la mise en évidence de leur activité amylolytique ;
- ❖ La production d'enzymes par fermentation submergée de la souche retenue ;
- ❖ La détermination de température optimale et pH optimum d'activité amylolytique. .

Chapitre I :
Généralités sur
les enzymes

I. Rôle et action des enzymes

Les êtres vivants, qu'ils soient de simples bactéries ou des êtres humains, ont tous besoin d'enzymes, des catalyseurs biologiques faits de micromolécules qui appartiennent à la classe des protéines globulaires. Elles peuvent être des holoprotéines, constituées uniquement d'un enchaînement d'acides aminés, ou des hétéroprotéines, qui ont besoin d'un cofacteur non protéique pour leur activité catalytique lié plus ou moins fortement à la protéine. Certaines enzymes sont excrétées à l'extérieur de la cellule même si toutes les enzymes sont d'abord produites à l'intérieur. Il y a donc deux types d'enzymes, soit les enzymes intracellulaires ou endoenzymes et les enzymes extracellulaires ou exoenzymes. Les exoenzymes sont sécrétées par les cellules et agissent à l'extérieur de celles-ci sur les diverses substances organiques. D'autre part, les endoenzymes synthétisent les divers composants cellulaires et décomposent les nutriments afin de pourvoir aux besoins énergétiques de la cellule. (Palmer and Bonner, 2007)

Plusieurs de ces micromachines à haute masse moléculaire, pesant entre 10 et 100 kDa, contribuent à la synthèse de composés chimiques, tandis que d'autres jouent un rôle dans la décomposition ou la modification de ces mêmes composés. En favorisant la création ou la rupture des liaisons chimiques, les enzymes accélèrent ces réactions d'une manière significative, augmentant leur vitesse jusqu'à des millions de fois plus rapidement que sans leur intervention. Toutefois, leur capacité à accélérer les réactions n'est qu'une des propriétés intéressantes des enzymes; leur caractéristique la plus importante est leur spécificité, qui leur permet de reconnaître et de se lier uniquement à leur substrat, ignorant tout autre composé chimique. Pendant longtemps, les enzymes semblaient mystérieuses parce qu'elles ne pouvaient pas être vues même avec les microscopes les plus puissants mais grâce aux progrès de la technologie scientifique, il est maintenant possible d'examiner les enzymes avec une grande précision et de comprendre leur structure et leur activité en détail. Les enzymes ont une structure qui ressemble à une serrure biologique, tandis que leur substrat est similaire à une clé. Comme pour l'ouverture d'une porte verrouillée, l'action des enzymes ne se produit que lorsque la bonne combinaison de clé (substrat) et de serrure (enzyme) est présente. Cette analogie décrit bien comment les enzymes interagissent avec les substrats pour déclencher des réactions chimiques spécifiques. (Simon and Barry, 2005)

II. Domaine d'applications industrielles des enzymes

Depuis des temps immémoriaux, les enzymes ont été perçues comme un élément essentiel de la vie, bien que les civilisations les aient utilisées sans comprendre leur fonctionnement et leur nature. La science moderne a finalement levé le voile sur ces mystères, permettant une compréhension approfondie de ces substances étonnantes et leur utilisation dans de nombreux secteurs. Grâce à cette compréhension ces substances étonnantes continuent de trouver de nouvelles applications à travers différents secteurs. (Bajpai , 2018)

En présence d'une enzyme appropriée, une réaction chimique se produit à un taux beaucoup plus élevé, mais l'enzyme n'est pas consommée par la réaction. Leur capacité à effectuer des transformations chimiques très spécifiques les rend de plus en plus populaires dans divers domaines, notamment :

- ❖ L'industrie alimentaire : Les enzymes sont utilisées dans la fabrication de nombreux produits alimentaires tels que le fromage, la bière, le vin, le pain, les biscuits, les jus de fruits et les sirops pour améliorer les propriétés physiques et la qualité du produit final.
- ❖ L'industrie pharmaceutique : Elles sont utilisées pour produire des médicaments tels que les antibiotiques, les vitamines, les analgésiques, les médicaments anticoagulants et les enzymes thérapeutiques.
- ❖ L'industrie papetière : Les enzymes sont utilisées pour faciliter la désencrage du papier, pour améliorer la qualité du papier et pour réduire les coûts de production.
- ❖ L'industrie de la bioénergie : Les enzymes sont utilisées dans la production de biocarburants pour accélérer le processus de fermentation et pour augmenter le rendement du produit final.
- ❖ L'industrie du textile : Les enzymes sont utilisées dans le processus de finition du textile pour améliorer la sensation de douceur. Elles sont notamment utilisées pour enlever les poils des fibres, pour blanchir et teindre les tissus.
- ❖ L'industrie cosmétique : Les enzymes sont utilisées pour produire des produits de beauté tels que les produits de soin de la peau et les produits capillaires. Les enzymes sont notamment utilisées pour exfolier la peau, pour réduire les odeurs et pour améliorer la texture des crèmes. (Bhatt, 2023)

III. Les enzymes industrielles

Les enzymes sont des outils polyvalents qui peuvent être utilisés de manière créative dans une grande variété d'industries pour améliorer les processus et les produits, offrant ainsi de

nombreuses possibilités pour des applications innovantes et durables. (Bhatt, 2023). Parmi ces catalyseurs on peut citer :

1. La laccase

La laccase est une enzyme oxydoréductase que l'on trouve chez les micro-organismes et certaines plantes supérieures. Elle est capable d'effectuer des réactions d'oxydation, qui produisent des radicaux libres. Ce dernier peut être responsable de processus tels que la polymérisation, l'hydratation et le disproportionnement. Les secteurs industriels où elles sont couramment utilisées comprennent notamment :

- a. **L'industrie du textile** : Les colorants utilisés dans les procédés industriels présentent souvent une grande résistance à l'eau et à la lumière, ce qui les rend difficilement décolorables. L'enzyme laccase est une solution naturelle efficace pour résoudre ce problème. Elle a la capacité de décolorer les colorants, même les plus résistants, et peut donc être utilisée.
- b. **L'industrie alimentaire** : La laccase est utilisée pour éliminer les composés phénoliques indésirables dans le traitement des jus, pour la bioremédiation des eaux usées et pour la stabilisation des vins. Dans l'industrie brassicole, elle est utilisée pour prolonger la durée de conservation de la bière et renforcer sa stabilité. En effet, la laccase permet l'oxydation des polyphénols afin de supprimer l'excès d'oxygène dans la bière, ce qui améliore sa conservation.
- c. **L'industrie du papier et de la pâte à papier** : La laccase et le chlore sont utilisés comme oxydants pour la dégradation et la séparation de la lignine. Les composants toxiques libérés par l'industrie du papier et de la pâte à papier peuvent être réduits par l'enzyme laccase. La laccase peut également être utilisée comme substrat alternatif pour remplacer ClO_2 . (Bhatt, 2023)

2. Les estérases

Les estérases sont un groupe varié d'hydrolases qui agissent sur les liaisons ester. Elles sont présentes dans une grande variété d'organismes, dont les plantes, les animaux et les micro-organismes, et ont une grande capacité de stéréospécificité. Cette caractéristique en fait des outils de premier choix en biocatalyse pour la production de composés purs utiles dans l'industrie alimentaire. Une particularité intéressante de l'estérase est qu'elle est capable de mener à bien sa réaction sans avoir besoin de cofacteurs. Ces enzymes peuvent être utilisées à diverses fins, y compris dans :

- a. **L'industrie chimique** : L'estérase stérol est couramment utilisée dans l'industrie papetière car elle est très efficace pour décomposer les stérols esters et les triglycérides. Les estérases cholestéryles et stéryles sont essentielles pour prévenir les problèmes d'accumulation de dépôts de résine produits par certaines essences d'arbres, qui peuvent causer des dommages aux machines utilisées dans la production de papier.
- b. **L'industrie alimentaire** : L'estérase aryle est fréquemment employée pour améliorer le goût des aliments et des boissons alcoolisées.
- c. **L'industrie pharmaceutique** : L'estérase d'érythromycine est particulièrement utile pour la dégradation de l'érythromycine, un antibiotique qui peut causer des effets indésirables chez certains patients. (Bhatt, 2023)

3. Les oxygénases

Les oxygénases sont des enzymes qui ont la capacité d'introduire des atomes d'oxygène dans les substrats. Les oxygénases peuvent être classées en deux catégories, à savoir les mono-oxygénases et les dioxygénases, en fonction du nombre d'atomes d'oxygène nécessaires pour l'oxydation. Au cours de ce processus, des intermédiaires oxygénés réactifs sont formés, et leur nature dépend du cofacteur présent dans l'oxygénase. Certains types d'oxygénases obtiennent les électrons nécessaires pour l'activation de l'oxygène à partir du substrat lui-même, tandis que d'autres en sont fournis par des donneurs externes d'électrons. La mono-oxygénase est fréquemment utilisée dans un large éventail d'activités industrielles. Elle est particulièrement courante dans des secteurs tels que :

- a. **La réduction du pollution environnementale** : La mono-oxygénase est largement utilisée dans l'industrie pour réduire la pollution de l'environnement. Grâce à leur régiosélectivité et leur stéréosélectivité élevées, les mono-oxygénases peuvent faciliter la biotransformation et la biodégradation de divers polluants tels que les alcanes, les acides gras et les composés aromatiques. Par exemple, la mono-oxygénase du dibenzothiophène et la mono-oxygénase du sulfone de dibenzothiophène sont efficaces pour convertir le dibenzothiophène en sulfones et sulfoxydes. De la même manière, les nitrophénols toxiques sont éliminés par la voie de la biodégradation aérobie par la mono-oxygénase de 4-nitrophénol.
- b. **L'industrie pharmaceutique** : La 2-hydroxybiphényle 3-monooxygénase, est utilisée dans ce domaine. Cette enzyme catalyse l'hydroxylation ortho du 2-hydroxybiphényle en 2,3-dihydroxybiphényle et la conversion de phénols substitués en position 2 en catéchols substitués en position 3 ou de 3-tert-butylcatéchol. (Bhatt, 2023)

4. Les peroxydases

Les peroxydases sont des oxydoréductases, qui ont la capacité de réduire le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et d'oxyder différents composés inorganiques et organiques. Ces enzymes sont présentes dans de nombreux organismes vivants, tant chez les micro-organismes que chez les animaux. Les applications de ces enzymes sont multiples et variées, elles sont utilisées dans de nombreux domaines industriels tels que l'industrie du textile où certains colorants de rhodamine, de Cr et les colorants azoïques se révèlent résistants à de nombreux traitements de décoloration. Toutefois, les peroxydases ont apportées une solution prometteuse pour leur élimination. (Bhatt, 2023)

5. Les protéases

Les protéases sont des enzymes présentes dans les plantes, les microorganismes et les animaux. Elles sont chargées de l'hydrolyse des liaisons peptidiques des polypeptides et des protéines. Ces enzymes représentent plus de 60 % de toutes les enzymes industrielles vendues dans le monde. Les protéases sont utilisées dans de nombreuses industries, notamment :

- a. **L'industrie alimentaire** : Utilisées dans l'industrie de la boulangerie, les protéases dynamisent la préparation de pain, de biscuits et d'autres produits cuits au four pour améliorer leur goût et leur texture. Elles agissent également sur la force du gluten et la durée de mélange pour une pâte homogène et consistante. En attaquant les liaisons peptidiques des protéines, elle a aussi pour effet de libérer des acides aminés, ce qui optimise la fermentation de la bière. Enfin, les protéases sont utilisées dans l'industrie laitière pour améliorer la saveur du fromage et sa maturation rapide, tout en écartant les risques allergéniques liés aux produits laitiers.
- b. **La réduction du pollution environnementale** : Les protéases sont également impliquées dans la bioremédiation des déchets de crustacés marins. Les protéases déprotéinisent les déchets de crevettes jusqu'à 75%. De plus, les protéases jouent un rôle important dans la transformation des déchets de carapaces de crustacés en composés bénéfiques. (Bhatt, 2023)

6. Les amylases

Les amylases (Fig 1) ont été parmi les premières enzymes découvertes dans les années 1800, Ce sont des enzymes qui catalysent spécifiquement l'hydrolyse de l'amidon. Présentes dans toutes les formes d'organismes, tandis que les amylases extracellulaires de bactéries,

champignons et virus sont actuellement étudiées en raison de leur rentabilité à grande échelle, contrairement aux amylases issues de plantes et d'animaux. Ces enzymes ont une grande importance pour l'industrie. (Arora *et al.*, 2020)

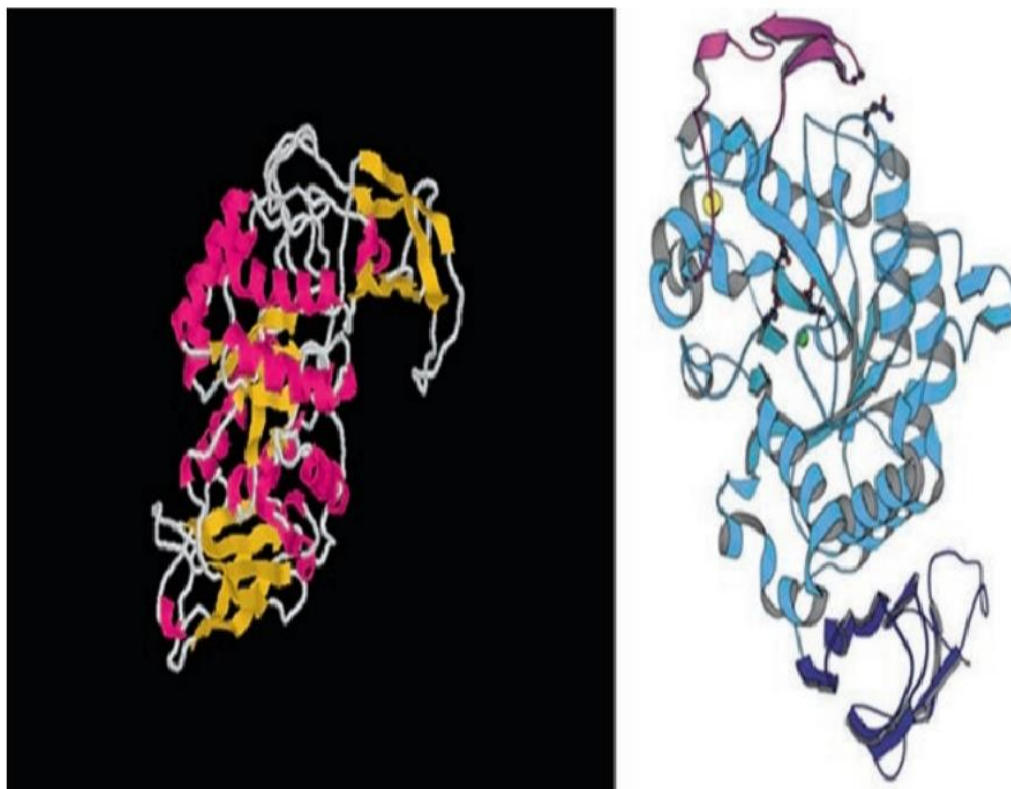


Figure 1 : Structure 3D d'amylase de *Bacillus licheniformis* (à gauche) et *Alteromonas haplanktitis* (à droite). (Naveen, 2020)

Il existe trois types d'amylases connus : l'alpha, la bêta et la gamma. Les trois types ont été trouvés dans différents organismes et catalysent des sites différents de la molécule d'amidon :

- ❖ Alpha-Amylase : Cette enzyme dégrade la liaison α -1, 4-glycosidique de l'amidon et des produits associés de manière endo et produit des oligosaccharides.
- ❖ Bêta-Amylase : La bêta-amylase, une forme alternative d'amylase, est produite par des bactéries, des champignons et des plantes et agit en coupant deux unités de glucose (maltose) à la fois en hydrolysant la deuxième liaison glycosidique α -1,4, en partant de l'extrémité non-réductrice.
- ❖ Gamma-Amylase : Les gamma-amylases se trouvent chez les plantes et les animaux. Outre le fait qu'elles coupent les dernières liaisons glycosidiques α (1-4) à l'extrémité non-réductrice de l'amylose et de l'amylopectine, produisant du glucose, la gamma-

amylase est capable de couper les liaisons glycosidiques α (1-6). Contrairement aux autres types d'amylase, elle est plus efficace dans les environnements acides. (Simair *et al.*, 2017)

L'amylase est une enzyme polyvalente à multiples applications, extrêmement utile dans divers domaines industriels. Parmi ces applications :

- a. **La fabrication d'un mélange d'oligosaccharides** : Pour produire le mélange d'oligosaccharides, l'amidon de maïs est soumis à une digestion enzymatique impliquant l'alpha-amylase, la bêta-amylase et la pullulanase. La poudre de mélange de maltooligomères ainsi obtenue par séchage par pulvérisation est caractérisée par une forte hygroscopicité, ce qui en fait un régulateur d'humidité pratique pour les aliments qui y sont incorporés.

Le mélange de maltooligomères se caractérise par un goût modérément sucré, moins prononcé que celui du saccharose. De même, sa faible teneur en glucose confère une viscosité plus faible que celle du sirop de maïs. En conséquence, ce mélange est souvent utilisé comme substitut du saccharose et d'autres sucres. Par ailleurs, il a la capacité d'empêcher la cristallisation du saccharose dans les produits alimentaires.

- b. **L'élimination de l'amidon des textiles** : Dans l'industrie textile, une pâte d'amidon est utilisée pour renforcer les fils d'un tissu pendant l'ourdissage et éviter la perte de fils due à la friction et à la coupure. Cependant, il faut enlever l'amidon après le tissage du tissu pour le laver et le teindre. On utilise alors l'alpha-amylase pour dissoudre et enlever l'amidon du tissu, permettant ainsi d'obtenir un produit fini plus rigide. L'amidon peut être plié sur les tissus pour faciliter leur calandrage, mais doit être retiré par désencollage avant le traitement de blanchiment et de teinture. De nombreux vêtements, comme les jeans, subissent également un désencollage après la mise en forme. Le tissu est ensuite lavé et rincé pour obtenir le résultat souhaité. (Ritu, 2017)
- c. **La liquéfaction** : La liquéfaction est un processus qui consiste à mélanger de l'amidon insoluble avec de l'eau et à le chauffer pour le rendre plus fluide. Ce procédé implique plusieurs étapes, notamment la décomposition partielle de l'amidon par l'enzyme amylase thermostable, ce qui réduit la viscosité de la solution et facilite le traitement. Cette étape est importante dans l'industrie alimentaire pour faciliter la transformation des produits à base d'amidon, tels que le pain ou la bière.
- d. **La fermentation directe de l'amidon en éthanol** : Les amylases sont couramment utilisées dans les industries de la production d'alcool et de la brasserie en raison de leur

action enzymatique uniforme dans les malts, ce qui peut améliorer le taux de saccharification, le rendement d'alcool et la croissance de la levure.

- e. **L'industrie chocolatière** : Les amylases sont utilisées dans l'industrie chocolatière pour dégrader l'amidon présent dans le cacao en dextrines, évitant ainsi que le sirop ne devienne trop épais.
- f. **L'industrie du papier** : Lorsqu'on emploie la pâte de fécule comme adhésif pour assembler du papier en ajoutant des additifs tels que de la colle de protéines ou de l'alun, cela peut causer des dommages et rendre le papier cassant. Cependant, on peut facilement retirer la fécule en utilisant des enzymes digestives telles que l'alpha-amylase, qu'on peut appliquer sous forme de trempage ou de gel.
- g. **La production de biocarburants** : La production de biocarburants est devenue un enjeu important ces dernières années en raison de la pollution générée par les combustibles fossiles et de leur coût élevé. Les biocarburants, notamment l'éthanol, sont une alternative particulièrement intéressante car ils peuvent être obtenus à partir de ressources renouvelables telles que les déchets agricoles et leurs sous-produits. Pour produire de l'éthanol, il est nécessaire d'utiliser des enzymes telles que l'alpha-amylase, la glucoamylase et la cellulase qui permettent de convertir les sucres fermentescibles en éthanol.
- h. **Industrie du pain et du chappattis** : Dans ce domaine, les amylases occupent une place centrale, elles ont la capacité de dégrader l'amidon et de produire des dextrines, qui servent de substrat pour la levure. L'alpha-amylase, par exemple, dégrade l'amidon abîmé présent dans la farine de blé en dextrines, ce qui permet à la levure de continuer à travailler pendant la fermentation de la pâte, la mise en forme et les premières étapes de la cuisson. Cette transformation favorise l'amélioration du volume du pain et de la texture de sa mie. Par ailleurs, les petites molécules d'oligosaccharides et les sucres tels que le glucose et le maltose, produits par ces enzymes, ont pour effet d'intensifier les réactions de Maillard, qui sont à l'origine de la couleur brune de la croûte et du développement d'un goût de grillé apprécié.
- i. **Élimination des taches d'amidon** : L'amylase de la pomme en combinaison avec le détergent a permis une élimination efficace des taches de nourriture pour bébé et de chocolat. Cette enzyme représente ainsi une solution prometteuse pour l'élimination des taches d'amidon sur les tissus. (Ritu, 2017)

IV. Marché des enzymes industrielles

En 2022, le marché mondial des enzymes industrielles s'est établi à 6,95 milliards de dollars et il est prévu qu'il enregistre un taux de croissance annuel composé de 6,4 % de 2023 à 2030; Le secteur des carbohydrases qui a enregistré la part de revenus la plus élevée avec 48,2 %. Cette forte performance est due à l'augmentation de l'utilisation de ces enzymes dans plusieurs secteurs, tels que l'alimentation animale, les produits pharmaceutiques, ainsi que l'industrie des produits alimentaires et de boissons, entre autres. Le secteur de l'alimentation et des boissons qui a généré la plus grande part de revenus, représentant 20,9 % du marché. Cette dynamique s'explique par la croissance de l'utilisation des enzymes dans la fabrication des produits alimentaires et de boissons. Le segment de source de microorganismes a dominé le marché avec la part de revenus la plus élevée, soit 85,4 %. Les enzymes à base de champignons sont très demandées en raison de leur utilisation croissante dans une large gamme d'industries de fin d'utilisation. Cela est dû au faible coût de production et à la disponibilité facile des microorganismes pour les fabricants d'enzymes. (Shashi, 2022)

La croissance du marché mondial est stimulée par l'importance croissante des enzymes industrielles dans de nouveaux domaines d'application, la demande croissante en nourriture due à la croissance des populations, la demande croissante en énergie due à la consommation croissante d'énergie et la tendance croissante vers des produits durables et respectueux de l'environnement. (Bajpai , 2018)

Chapitre II :

Matériel et

méthodes

La partie expérimentale a été réalisée au niveau du laboratoire de recherche de biochimie analytique, de l'université 8 Mai 1945, Guelma.

I. Présentation du site de prélèvement

Situé à une vingtaine de kilomètres au Sud du Chef-lieu de la Wilaya de Guelma, Algérie ; Hammam Debegh (Fig 2) s'élève à 320 mètres d'altitude et abrite neuf sources d'eau hyperthermale. Il s'agit des sources les plus chaudes que l'on puisse trouver en Algérie, avec une température pouvant atteindre 98°C. L'eau présente une composition saline, bicarbonatée calcique et chlorurée sodique, libérant également de l'hydrogène sulfuré. Ces sources sont exploitées par les stations thermales environnantes. (Boughlali, 2003)



Figure 2 : Hammam Debegh, Wilaya de Guelma.

II. Echantillonnage

Trois prélèvements de sol ont été effectués le 13 février 2023 à une profondeur d'environ 15 cm, à des endroits proches, moyens et éloignés de la source d'eau chaude dans la région de Hammam Debegh (Fig 3). Cette méthode a permis d'obtenir des échantillons représentatifs de la diversité spatiale du sol. Avant le prélèvement, la surface a été soigneusement nettoyée. Les échantillons ont ensuite été mélangés et filtrés pour éliminer les gros débris. Seul le sol exempt

de ces débris a été recueilli et placé dans des bouteilles en verre étiquetées, puis transporté au laboratoire pour analyse ultérieure. (Arora *et al.*, 2020)

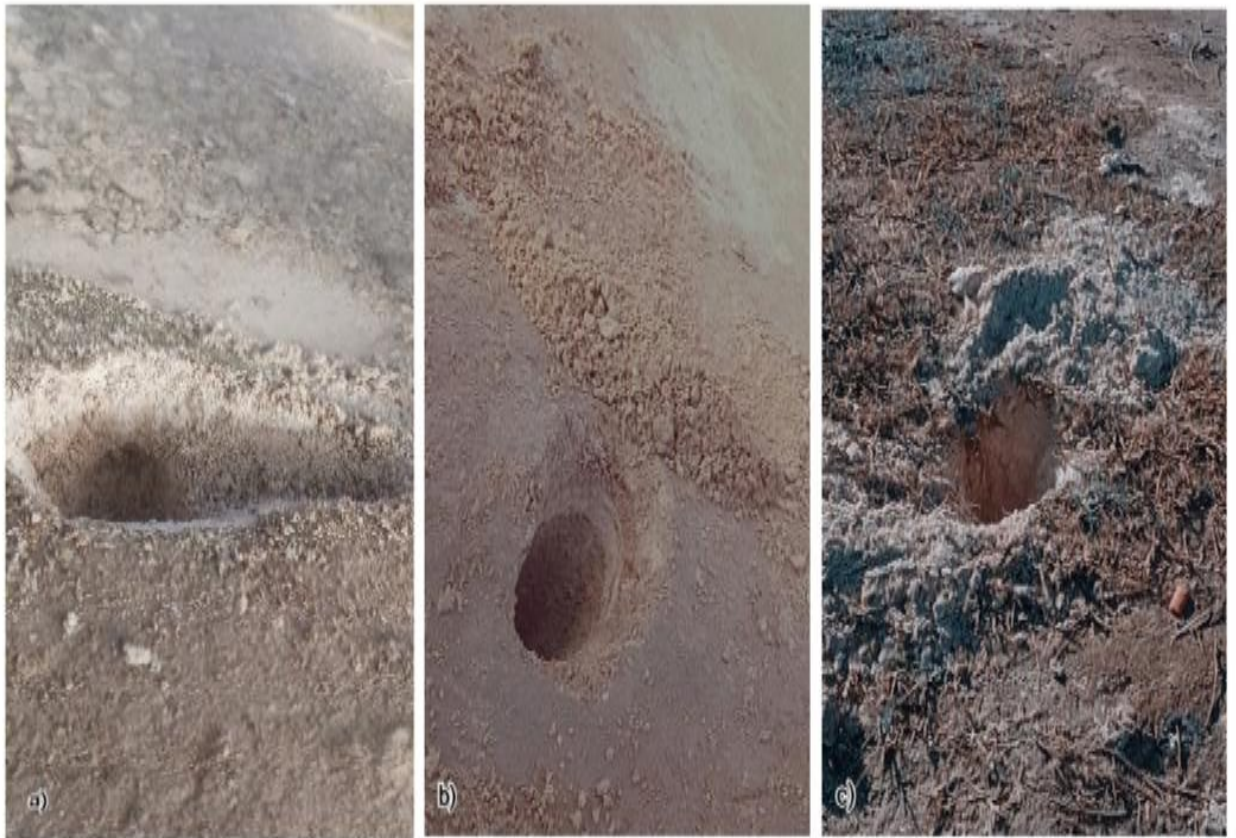


Figure 3 : Prélèvement des échantillons de sol (région : Hammam Debeh)

a) au niveau proximal, b) niveau moyen, c) niveau éloigné de la source d'eau chaude.

III. Isolement des microorganismes

Pour isoler les colonies distinctives, une quantité de 1 g de l'échantillon prélevé a été placée dans 9 ml d'eau distillée stérile pour obtenir une solution mère, dont plusieurs dilutions ont été préparées à des concentrations croissantes, allant jusqu'à 10^{-5} , dans des conditions aseptiques. (Elechi *et al.*, 2022)

Parallèlement, un milieu PDA (Voir l'annexe) d'un pH 3,5 a été préparé. Le milieu a ensuite été autoclavé, versé dans des boîtes de Pétri stériles et solidifié. Chaque dilution a été ensemencée sur des boîtes de Pétri individuelles contenant le milieu préparé, en stries transversales entre deux becs Bunsen, à l'aide d'une anse stérile. Les boîtes de Pétri ont été incubées à 28°C et observées quotidiennement pendant 7 jours. (Luang-In *et al.*, 2019)

IV. Purification

Après incubation, une microflore variée s'est développée. Afin de purifier les souches ; des fragments des colonies ont été déposés aseptiquement au centre d'une nouvelle boîte de Pétri étiquetée contenant le milieu de culture (Fig 4) utilisé pour l'isolement en évitant le contact avec les autres colonies et incubés pendant cinq jours à 30°C. Ce processus a été répété jusqu'à l'obtention d'une souche unique. (Elechi *et al.*, 2022)

V. Identification

L'identification a été faite suivant les critères morphologiques et cultureux des différentes souches. Toutes les souches pures obtenues ont été soumises à une identification morphologique réalisée par observation au microscope. L'observation a été faite par la technique du ruban adhésif (fig 5) qui consiste à adhérer à partir d'une culture jeune une fraction mycélienne à l'aide d'un bout de ruban adhésif et de la coller sur une lame contenant quelques gouttes de lactophénol-bleu, L'observation microscopique a été faite aux grossissements 40. (Fifendy *et al.*, 2020)

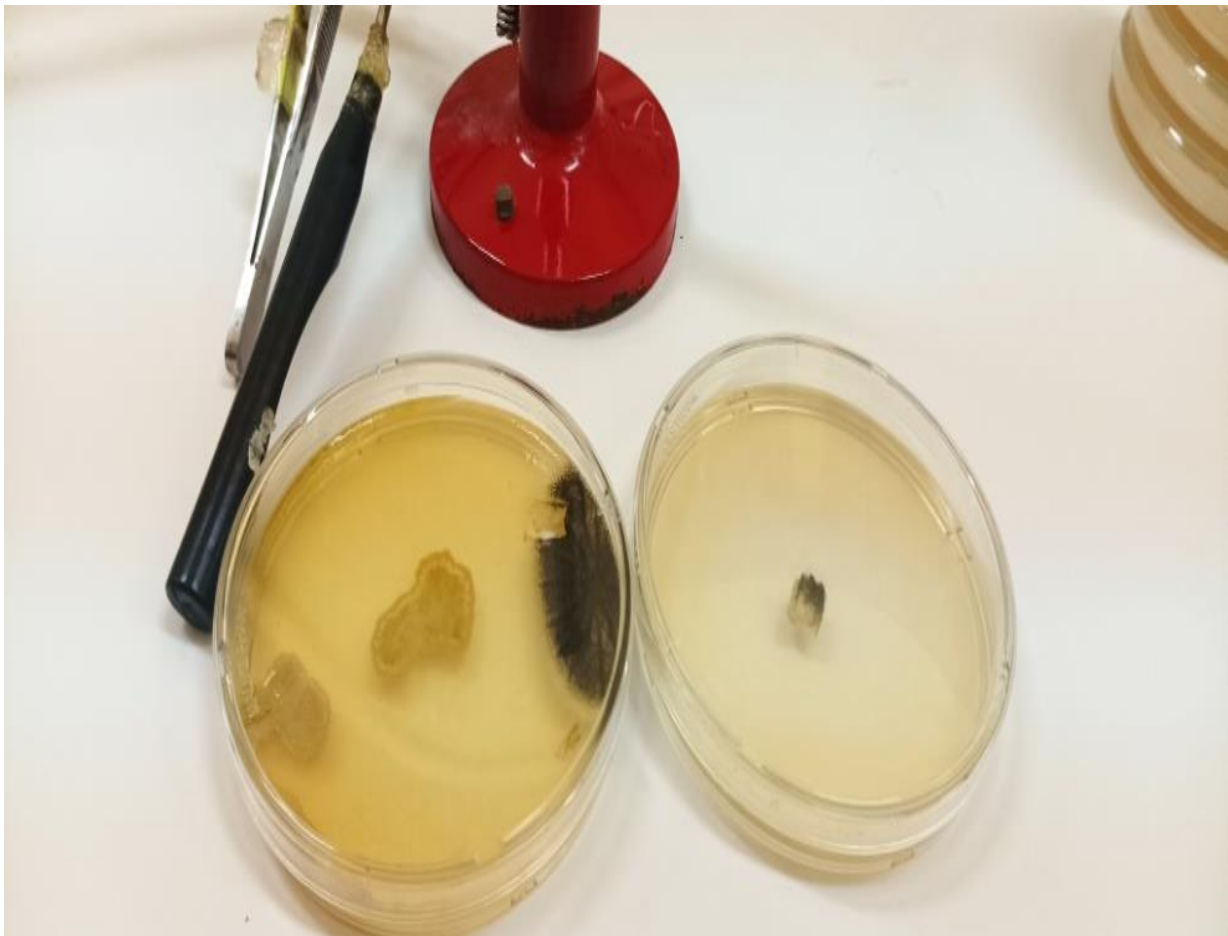


Figure 4: Purification d'une souche fongique.

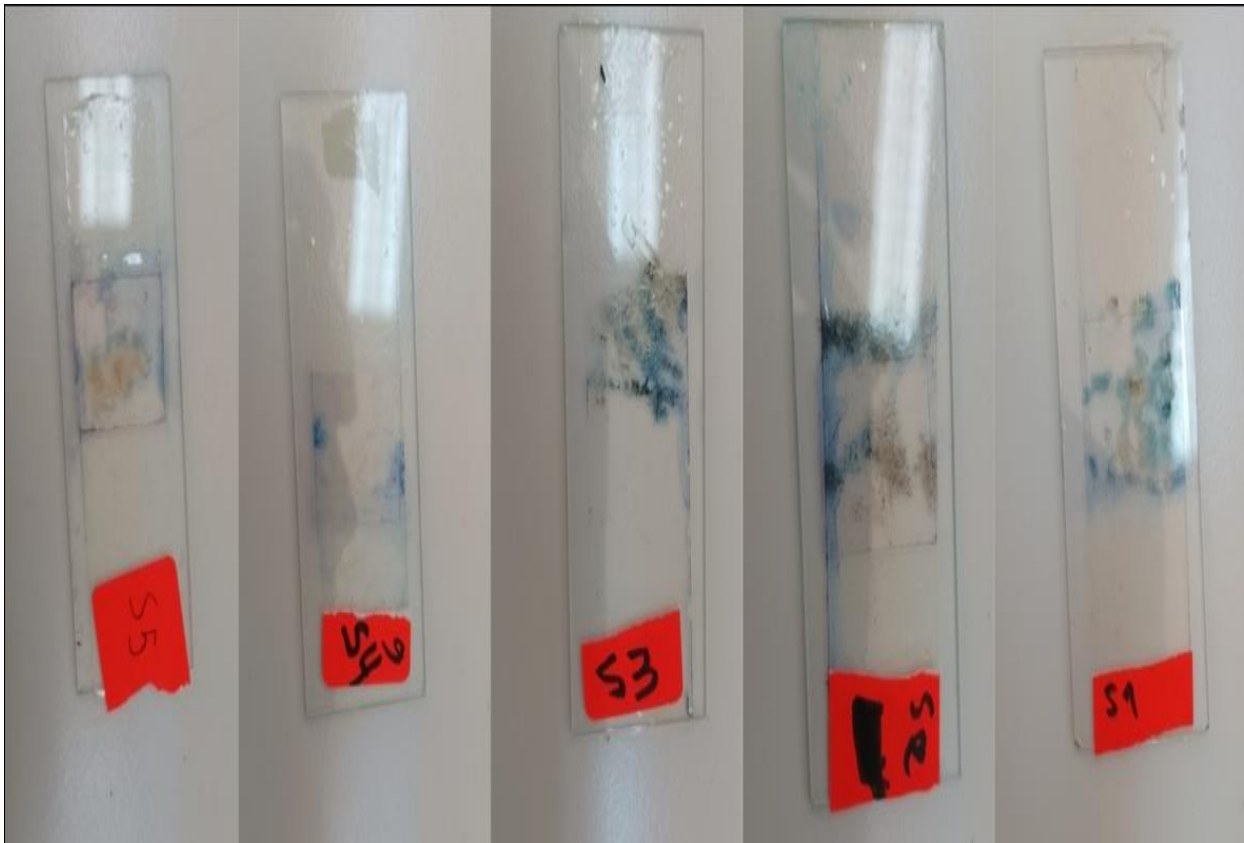


Figure 5: La technique du ruban adhésif.

VI. La recherche de l'activité amylolytique chez la souche sélectionnée

Une souche d'*Aspergillus niger* a été choisie afin de tester leur capacité à produire l'exoenzyme "amylase" la sélection de souche a été basée sur des études précédentes. Pour essayer la capacité de production d'exoenzyme amylase, le champignon isolé a été cultivé sur milieu amidon agar (Voir l'annexe) et puis incubé pendant 3 jours à 30. Après l'incubation, inonder la surface de l'agar avec la solution d'iode (Voir l'annexe).

Les résultats sont immédiates, l'apparence d'une zone claire entourant la croissance Fongique indique l'hydrolyse d'amidon (+) et l'absence d'une zone claire entourant la croissance indique que l'amidon est présent et n'a pas été hydrolysé (-). (Lal and Cheeptham, 2012 ; Yassin *et al.*, 2021)

VII. Production d'amylase en utilisant les isolats positifs

1. Préparation du milieu de production

Le milieu de fermentation (Voir l'annexe) utilisé pour la culture positive a été préparé à partir de déchets de carotte (Fig 6). Après l'ajustement de PH à 6.5, le milieu a été stérilisé pour 15min à 12°C. (Oguche *et al.*, 2021)

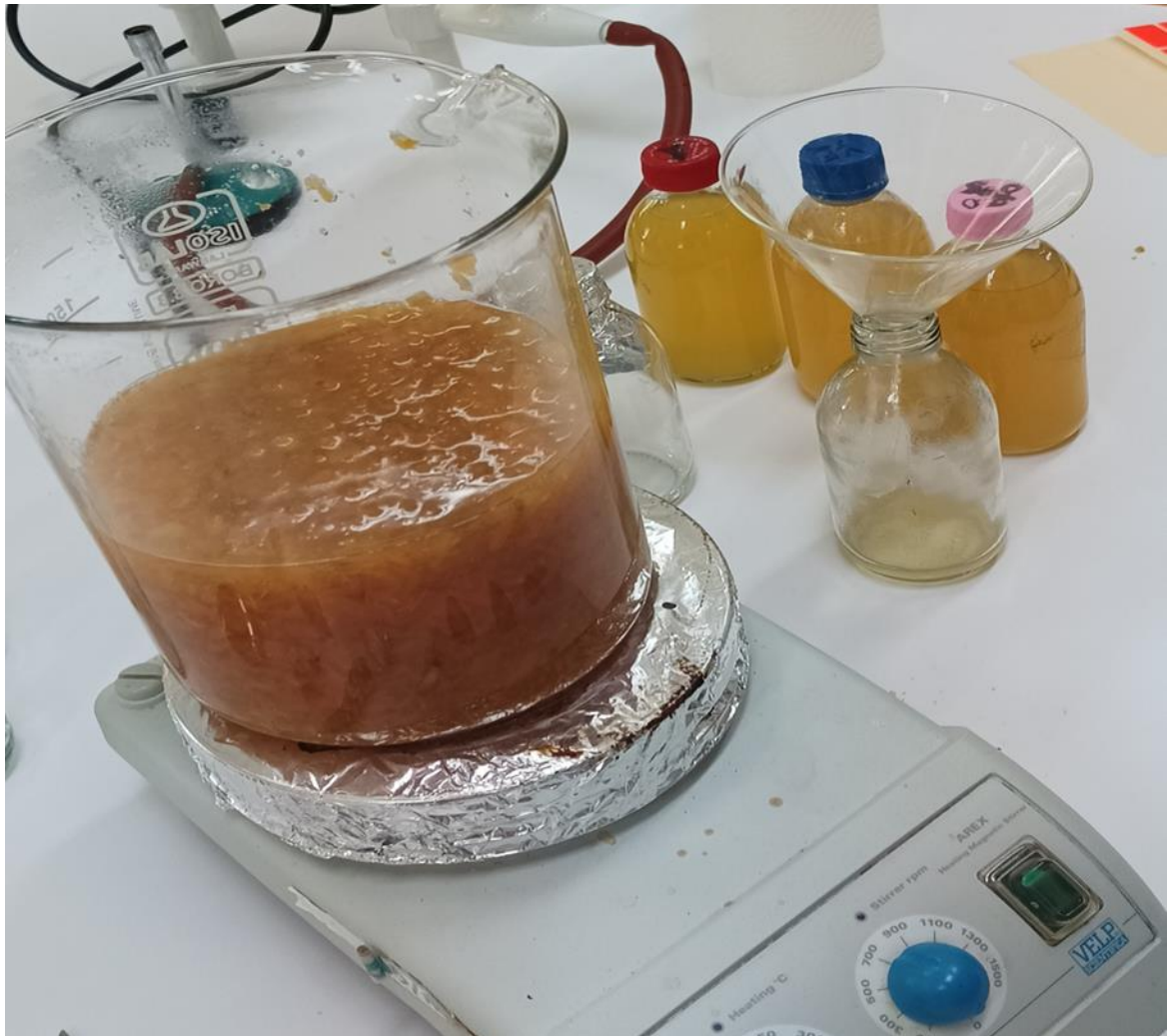


Figure 6: Préparation de milieu à base de déchets de carottes.

2. Préparation de l'inoculum et condition de fermentation

La préparation de la suspension de spores a été effectuée en ajoutant 15 ml d'eau distillée aux souches fongiques cultivées sur milieu PDA pendant 7 jours dans un boîte de Pétri. Les spores ont été récupérées à la surface de la culture à l'aide d'un râteau sous des conditions aseptiques, puis filtrées à travers un papier filtre stérile. Ensuite, la concentration de la

suspension sporale a été déterminée (Voir l'annexe) en comptant les spores sur une cellule de Malassez sous microscope photonique au grossissement x40. (Ire *et al.*, 2020)

La suspension de spores a ensuite été utilisée pour inoculer le milieu de fermentation; chaque erlenmeyer contient 50 ml de bouillon de fermentation qui a été inoculé avec 1 ml de la suspension de spores (8.8×10^6 spores/ml). Les erlenmeyers ont ensuite été incubés à 30°C pendant 5 jours pour la fermentation. À la fin de la durée spécifiée, le milieu de culture a été centrifugé à 4500 tours par minute pendant 10 minutes pour collecter l'extrait brut, qui a été utilisé comme source d'enzyme pour les études analytiques. (Aehle, 2007)

VIII. Méthodes analytiques d'extrait brute amylolytique

1. Dosage des protéines totales

La méthode de Biuret est une technique couramment utilisée pour mesurer la quantité de protéines dans les échantillons biologiques. Cette méthode met en jeu une réaction entre les protéines et le réactif de Biuret. Le réactif de Biuret contient des ions cuivre qui vont se lier aux groupes amine des protéines, ce qui va engendrer une variation de l'absorbance de la solution. Cette variation d'absorbance est mesurée à une longueur d'onde de 540 nm à l'aide d'un spectrophotomètre. (Keppy *et al.*, 2009)

Pour mesurer la quantité de protéines dans un extrait brut enzymatique et estimer la concentration de l'amylase, une série de solutions contenant des concentrations connues de SAB (Fig 7) et une concentration inconnue d'échantillon ont été préparées. L'absorbance de ces solutions ont été mesurées et une courbe d'étalonnage a été construite (Fig 8) pour établir la relation entre la concentration de protéines et la mesure d'absorbance. En se basant sur cette courbe, la quantité de protéines dans les échantillons peut être déterminée. (Fumex, 2021)

La concentration obtenue a été utilisé pour calculer l'activité spécifique par la formule suivante : $A = Z / C$, avec A : Activité spécifique (U / mg) et Z : Activité amylolytique (U) et C : Concentration d'amylase (mg). (Ire *et al.*, 2020)

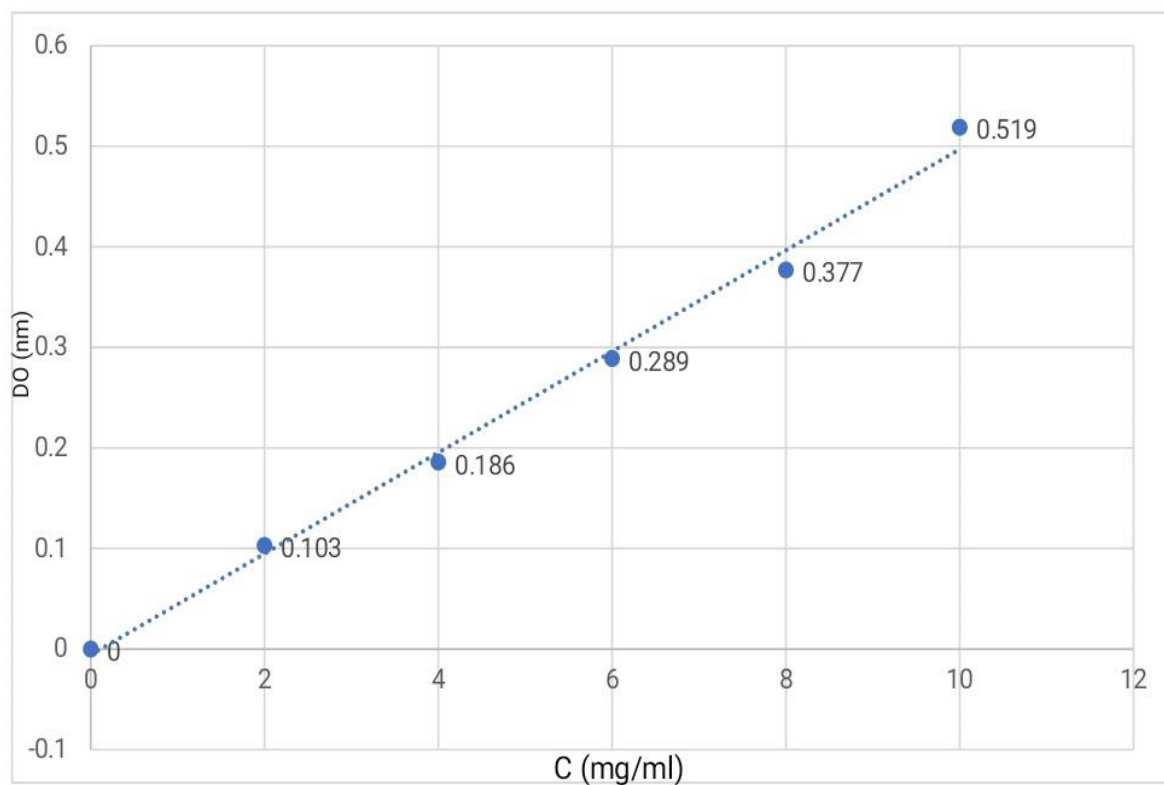


Figure 7: La gamme étalon de SAB .

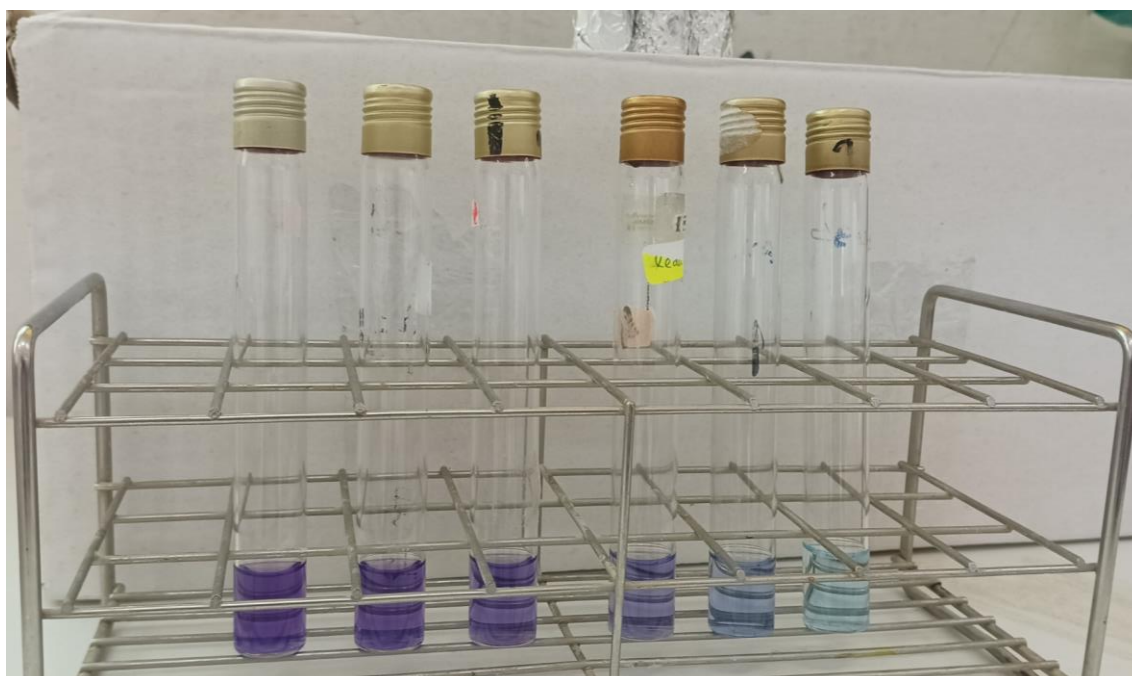


Figure 8 : Courbe d'étalonnage de concentration de SAB.

2. Dosage de l'activité amylolytiques

La méthode de Brenfeld (1955), également connue sous le nom de méthode de dosage des sucres réducteurs à l'acide dinitrosalicylique (DNS), a été utilisée pour estimer l'activité amylolytique. Le principe de cette méthode repose sur les propriétés réductrices des sucres libérés lors de l'hydrolyse enzymatique de l'amidon, notamment du maltose. En effet, en présence de chaleur et d'un milieu alcalin, l'acide 3,5-dinitrosalicylique, qui agit comme oxydant, est réduit par le glucose. Cette réaction de réduction entraîne la formation d'un composé coloré rouge, l'acide 3-amino-2-hydroxy-5-nitrosalicylique. La réaction est de type colorimétrique et l'intensité de la coloration est proportionnelle à la quantité de glucose libérée. (Yadav and Prakash, 2011)

❖ Protocole expérimentale

L'activité de l'amylase a été analysée en fonction de la détermination des sucres réducteurs selon la méthode décrite ailleurs. En bref, un mélange réactionnel à pH neutre "7" contenant 0,2 ml d'amylase et 0,5 ml d'amidon 1% a été préparé. Le mélange a été incubé à 37°C pendant 15 minutes avec un tube témoin représentant le blanc _ Ce tube a été préparé en modifiant l'ordre d'ajout du réactif et de l'enzyme, où le DNS a été ajouté en premier_. Au bout de 10 min, la réaction a été interrompue par l'ajout de 1 ml de réactif DNS. Après avoir refroidi l'échantillon dans un bain de glace, 10 ml d'eau distillée sont ajoutés. L'absorbance à 540 nm est ensuite mesurée par rapport au blanc. (Yadav and Prakash, 2011)

Dans les conditions de l'essai, une unité (U) d'activité a été définie comme la quantité d'enzyme nécessaire pour la production de 1 μ mole de glucose par minute, et on peut déterminer la concentration du glucose libéré suite à l'hydrolyse de l'amidon en utilisant la courbe d'étalonnage $DO = f(C)$ préalablement établie avec différentes concentrations connues de glucose.

Donc la formule qui a été utilisé pour calculer l'activité amylolytiques est :

$$Z = (\Delta C \times V_t \times 1000) / (M_{glu} \times t \times V_M)$$

Avec : Z : Activité amylolytique (U), ΔC : Concentration de glucose libéré (ug), V_t : Volume total (ml), M_{glu} : Masse moléculaire de glucose, t : Temps d'incubation et V_M : Volume de milieu réactionnel. (Saini *et al.*, 2017)

Le mode opératoire pour préparer la gamme étalon de glucose, le réactif DNS et le tampon phosphate à pH neutre est décrit en détail dans l'annexe .

IX. Caractérisation biochimique d'amylase

Pour caractériser les enzymes amylolytiques produites par les souches fongiques, différentes méthodes sont couramment employées, y compris les tests de changement de pH et de température, qui permettent d'identifier les valeurs optimales d'activité enzymatique. Ces valeurs sont déterminées par dosage de l'activité enzymatique.

1. Détermination de la température optimale

La détermination de la température optimale pour l'activité de l'enzyme a été réalisée par incubation de la fraction brute Pendant 2 min à pH neutre. Les températures de 20°C jusqu'à 100°C ont été testées (Fig 9 ; Moges *et al.*, 2019)

2. Détermination du pH optimum

En fixant la température de la réaction à 37°C, nous avons étudié l'influence du pH sur l'activité enzymatique en variant le pH des substrats de 2 à 7 pour déterminer le pH optimum (Fig 10). Huit solutions tampon phosphate-citrate sont utilisées pour la préparation des solutions de substrats à différents pH (Voir l'annexe) (Abdulaal, 2018)

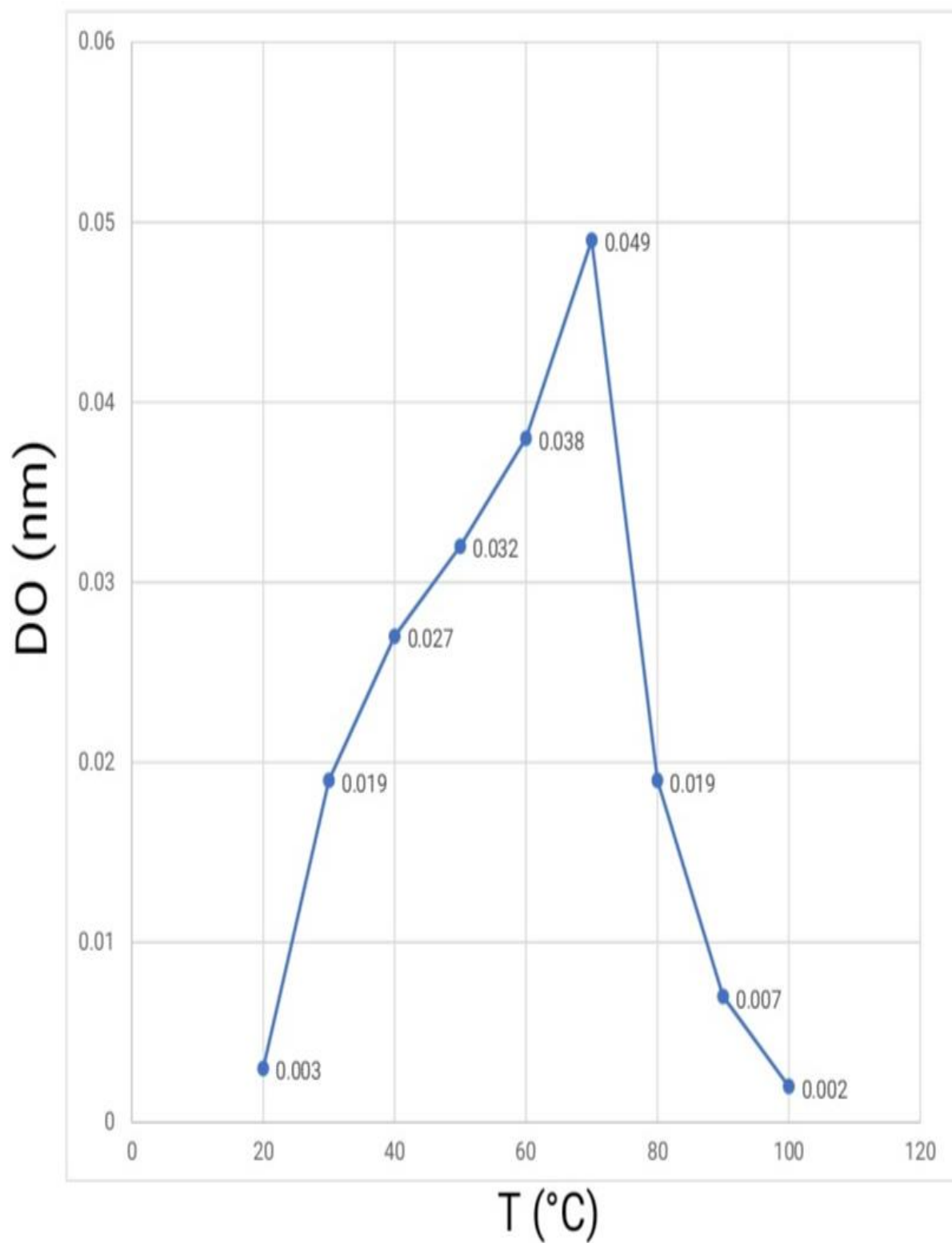


Figure 9: Courbe de l'absorbance en fonction de températures variées.

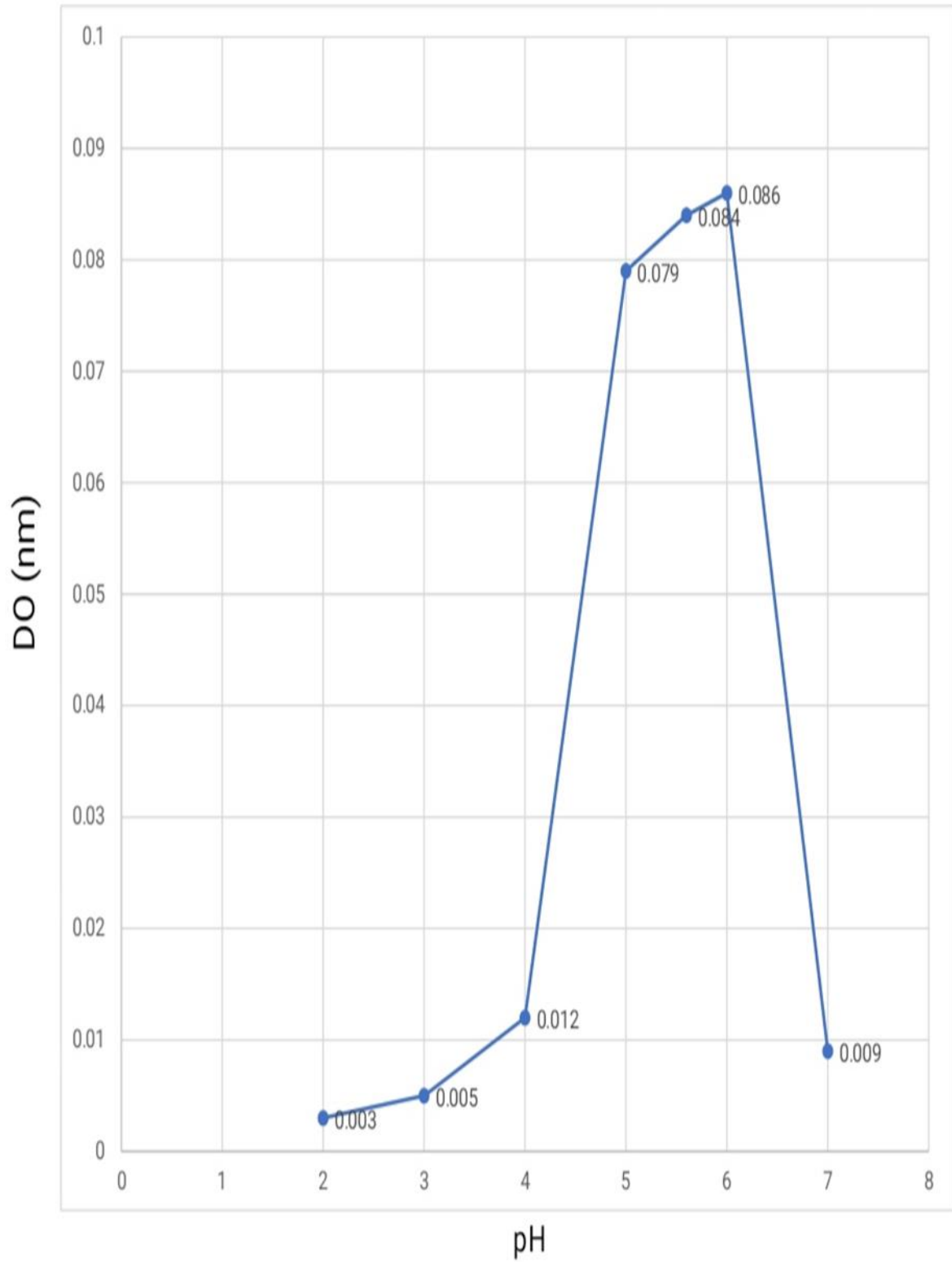


Figure 10: Courbe de l'absorbance en fonction des pH variés.

Chapitre III :





Résultats et

discussion

I. Identification des champignons isolés

Cinq isolats fongiques ont été obtenus à partir des échantillons de sol récoltés représentant des différents genres. Les espèces fongique et leurs aspects macro et microscopique sont présentés dans le tableau 1 et 2 respectivement.

Tableau 1: Les caractères macroscopique des souches purifiées.

Les sou-ches	Aspects macroscopiques	Les colonies	
		Recto	Verso
S1	Croissance rapide, une texture poudreuse, mycélium vert à contour blanc irrégulier, la plaque inverse est pâle vers jaunâtre.		
S2	Une Colonie ronde initialement blanc, devenant rapidement noir, l'inverse est jaune pâle, une texture poudreuse.		

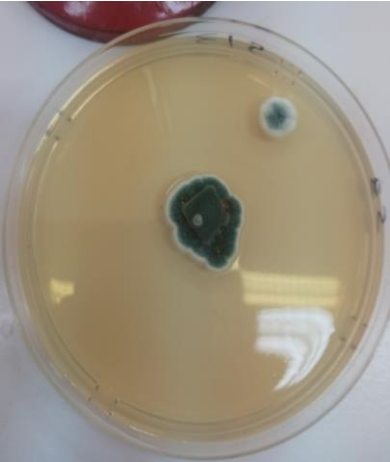
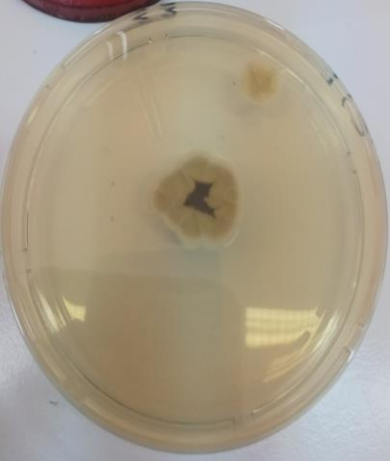

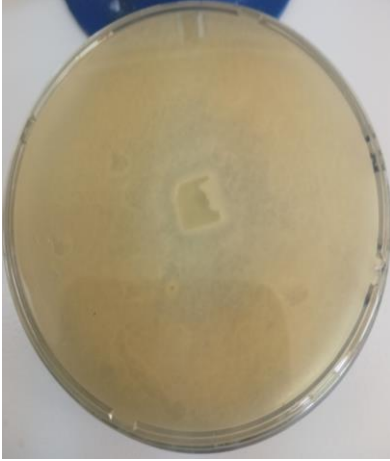
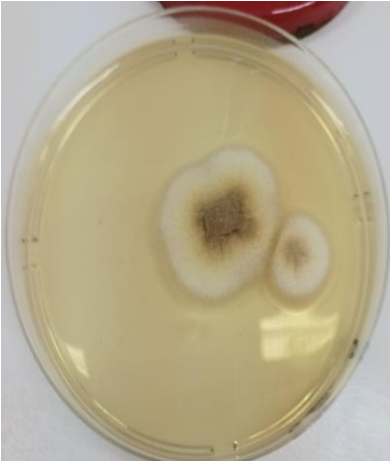
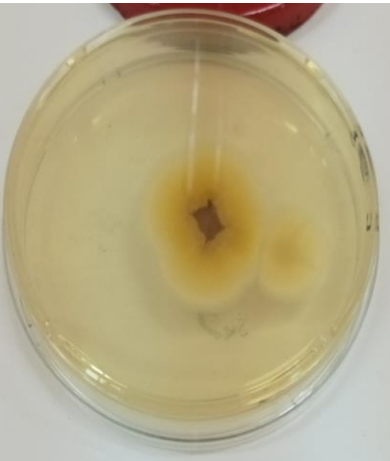
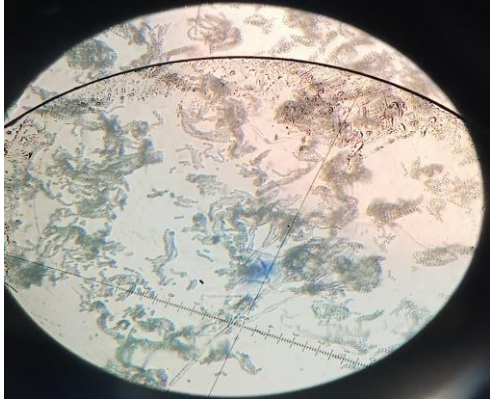
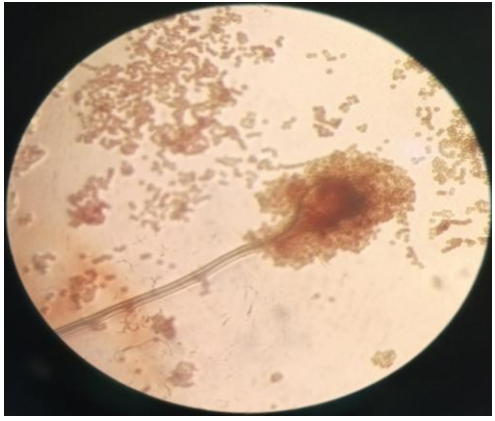
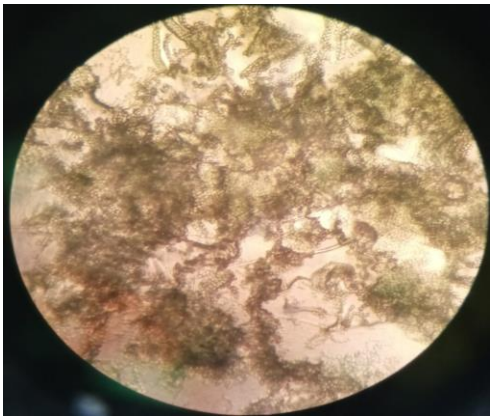
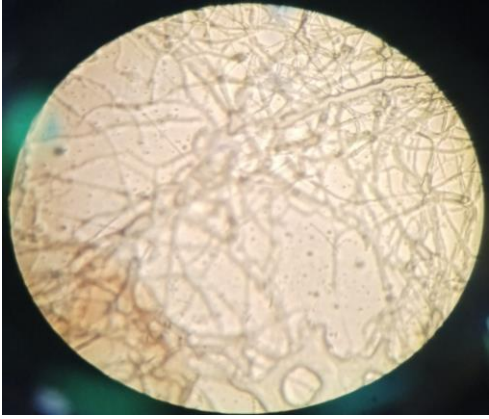
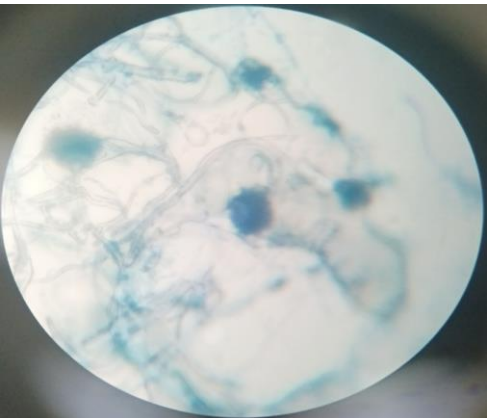
<p>S3</p>	<p>Une Colonie banche au début puis vert- foncé, l'inverse est jaune pâle, une texture poudreuse.</p>		
<p>S4</p>	<p>Une colonie laineuse, banche au début puis brun, l'inverse est incolore.</p>		
<p>S5</p>	<p>Une colonie poudreuse, blanche au début puis jaun, l'inverse est jaune.</p>		

Tableau 2: Les caractères microscopique des souches purifiées

Les sou-ches	Aspects microscopiques	Les observations X40
S1	<p>Hyphe septé, conidiophore isolés, pénicilles constitues de phialides branchés directement à l'extrémité du conidiophore, phialides en forme de verticilles, présence de métule.</p>	
S2	<p>Conidiophore lisse, très long, phialides insérées sur la vésicule par l'intermédiaire de métules disposées surtout le pourteur de la vésicule, conidies globuleuses, brun, tête aspergillaire bisériée radiée, noire à maturité.</p>	
S3	<p>Filament septé, conidiophore court, lisse et incolore, phialides directement portées par la vésicule, dressée, densément groupées, conidies globuleuse, vertes, échenillées, petites, tête aspergillaire unisériée en colonne compacte, assez grande</p>	

<p>S4</p>	<p>Filament large non septé, pas de stolons ni rhizoïdes, sporocystophore portant un sporocyste globuleux, dépourvu d'apophyse, spore rondes.</p>	
<p>S5</p>	<p>Filament septé, conidiophore court, lisse et incolore, phialides directement portées par la vésicule, dressée, densément groupées, conidies globuleuse, vertes, échenillées, petites, tête aspergillaire unisériée en colonne compacte, assez grande.</p>	

Pour l'identification morphologique des 5 isolats cultivés sur milieu PDA , l' observation visuelle et microscopique du S1 correspondait aux caractéristiques de *Penicillium sp* et la du S2 correspondait aux caractéristiques d'*Aspergillus niger*, alors que S3 et S5 ont été identifiés comme *Aspergillus sp* et S4 comme *Mucor sp*. (Chabasse *et al.*, 2002 ; Salvamani and Nawawi, 2014 ; Antonio and Lopez, 1998)

II. Mise en évidence de l'activité amylolytique

Le résultat du test de la mise en évidence de l'activité amylolytique, réalisé en boîte de pétri sur un milieu solide à base de l'amidon, est représenté dans la figure 11. La moisissure a été bien développée sur le milieu de l'amidon, l'apparition d'une zone claire entourant la croissance fongique indique l'hydrolyse d'amidon (+) par l'organisme due à sa production des enzymes extracellulaires. Cela démontre sa capacité à produire l'amylase. (Lal and Cheeptham, 2012)

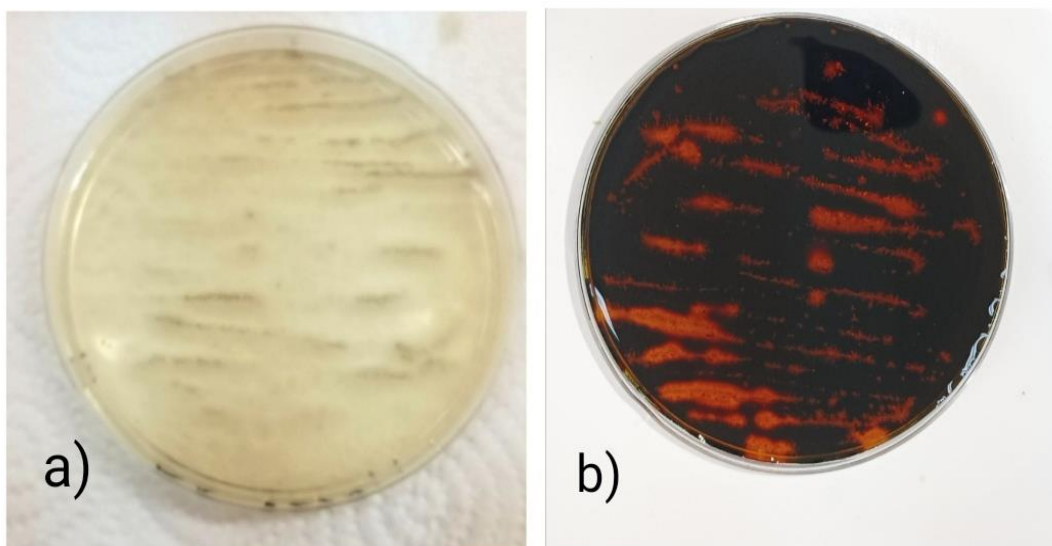


Figure 11: Croissance d'*Aspergillus niger* sur la plaque d'agar d'amidon avant l'addition de solution d'iode (a) et après l'addition de solution d'iode (b). Après l'addition d'iode, la compensation entourant la croissance fongique indique l'hydrolyse d'amidon (+).

III. Caractérisation de la réaction amyolytique

Après avoir confirmé la présence de l'enzyme, une série de tests supplémentaires a été menée pour déterminer les conditions optimales de fonctionnement. Plus précisément, l'étude s'est concentrée sur le pH optimum et la température optimale.

1. Température optimale de la réaction amyolytique

Une expérience a été menée pour mesurer l'activité de l'amylase à différentes températures allant de 20°C à 100°C, avec un pH neutre "7" et une durée d'incubation de 2 minutes. Les résultats (Fig 12; Fig 13) ont indiqué que l'enzyme amylase n'avait pas de résistance aux températures inférieures à 30°C ou supérieures à 80°C, et elle a une activité élevée à 50°C et 60°C, mais la température optimale a été observé autour de 70°C (0.738 U et 0.581 U/mg).

Ces résultats sont les même que ceux rapporté pour l'amylase produit d'*Aspergillus niger* présentant une température optimale de 70°C (Nyarko et al.,2019) et concordent avec Shaw et al. (1995) pour l'a-amylase produit a partir *Thermus sp* , ainsi que Simair *et al.*(2017) qui ont travaillé sur *Bacillus sp*.

Les résultats de l'expérience montrent que la température a un effet significatif sur l'activité de l'amylase. À des températures basses, l'activité de l'enzyme diminue rapidement. Cela peut s'expliquer par le fait que les températures basses ne fournissent pas suffisamment d'énergie

pour la catalyse enzymatique. À des températures basses, les molécules ont moins d'énergie cinétique et se déplacent plus lentement, ce qui réduit la fréquence de collisions entre les molécules d'enzyme et les molécules de substrat. L'activité de l'enzyme diminue rapidement parce qu'elle a besoin d'une certaine quantité d'énergie pour permettre aux molécules d'enzyme et de substrat de se lier et de réagir pour catalyser la réaction biochimique. (Bajpai, 2018)

Ensuite, l'activité de l'enzyme augmente progressivement à des températures comprises entre 40°C et 60°C, ceci peut s'expliquer par le fait que l'énergie cinétique des molécules de l'enzyme augmente ce qui favorise la réaction enzymatique. De plus, à la température optimale, la structure fonctionnelle de l'enzyme est maintenue, ce qui permet une interaction optimale entre l'enzyme et son substrat. Par conséquent, l'enzyme peut catalyser la réaction à son maximum de capacité. Ainsi, lorsque la température augmente au-dessus de la plage de températures optimale 70°C pour cet enzyme, les liaisons hydrogène entre les acides aminés de l'enzyme deviennent plus agitées et instables, en raison de l'énergie thermique supplémentaire présente dans le système. Cela conduit à une texture moléculaire désordonnée, ce qui peut affecter la capacité de l'enzyme à se lier au substrat à laquelle elle doit réagir, et diminuer son activité globale. (Luang-In *et al.*, 2019)

Et cela indique que cette amylase pourrait fonctionner à haute température, ce qui la rend utile dans différents domaines industriels qui impliquent la transformation de l'amidon, car la plupart des processus industriels nécessitent des températures élevées. L'amylase thermophile peut être utilisée pour la production d'aliments tels que la bière et le pain, ainsi que pour la production de biocarburants et de produits chimiques tels que les acides organiques. En outre, grâce à sa capacité à fonctionner à haute température, l'amylase thermophile peut offrir des avantages économiques en réduisant les coûts liés au refroidissement et à la régulation de la température dans les processus industriels, et en plus, elle peut améliorer la durée de vie des catalyseurs enzymatiques. (Yassin *et al.*, 2021)

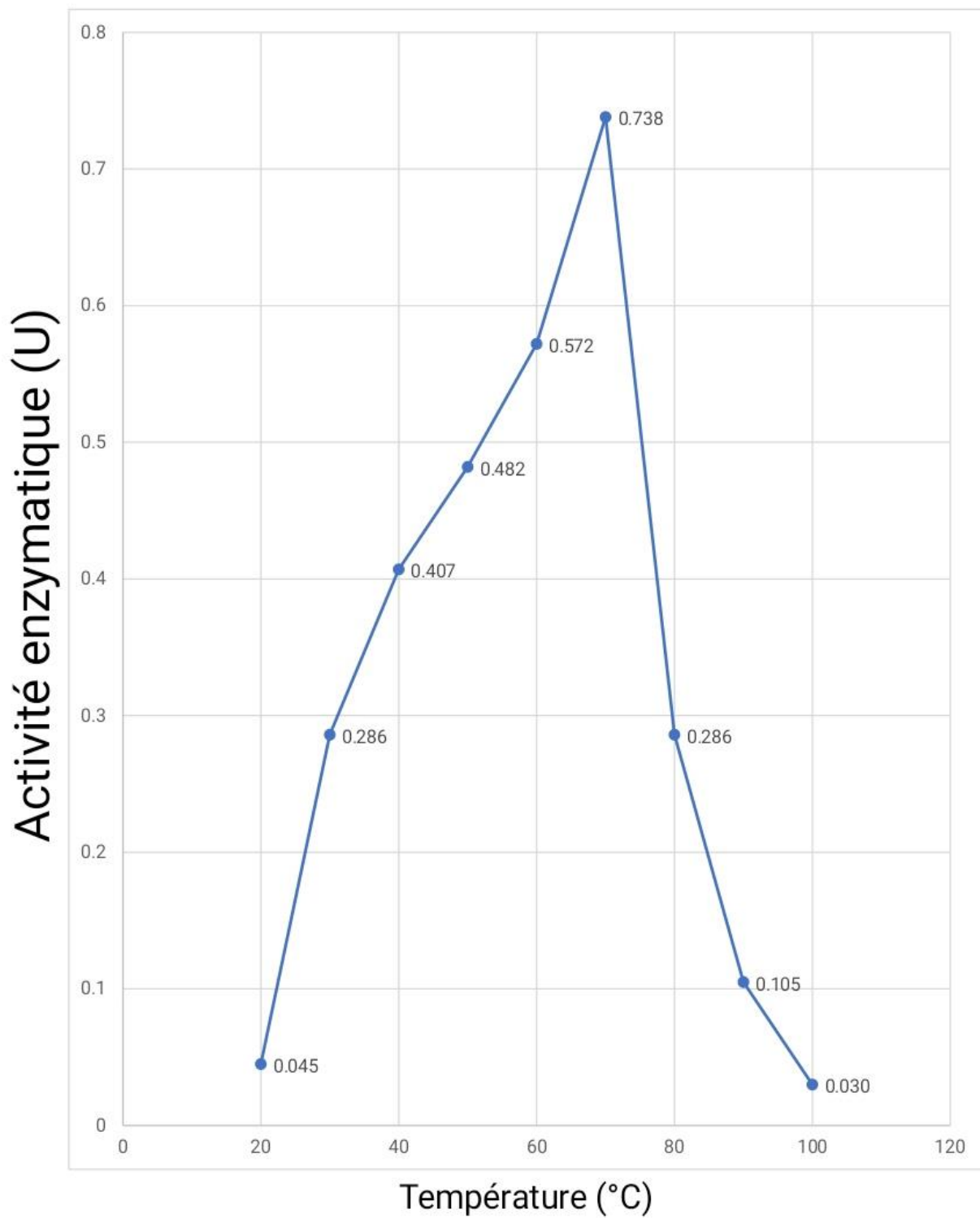


Figure 12: Une représentation visuelle de l'activité d'amylase à différentes température.

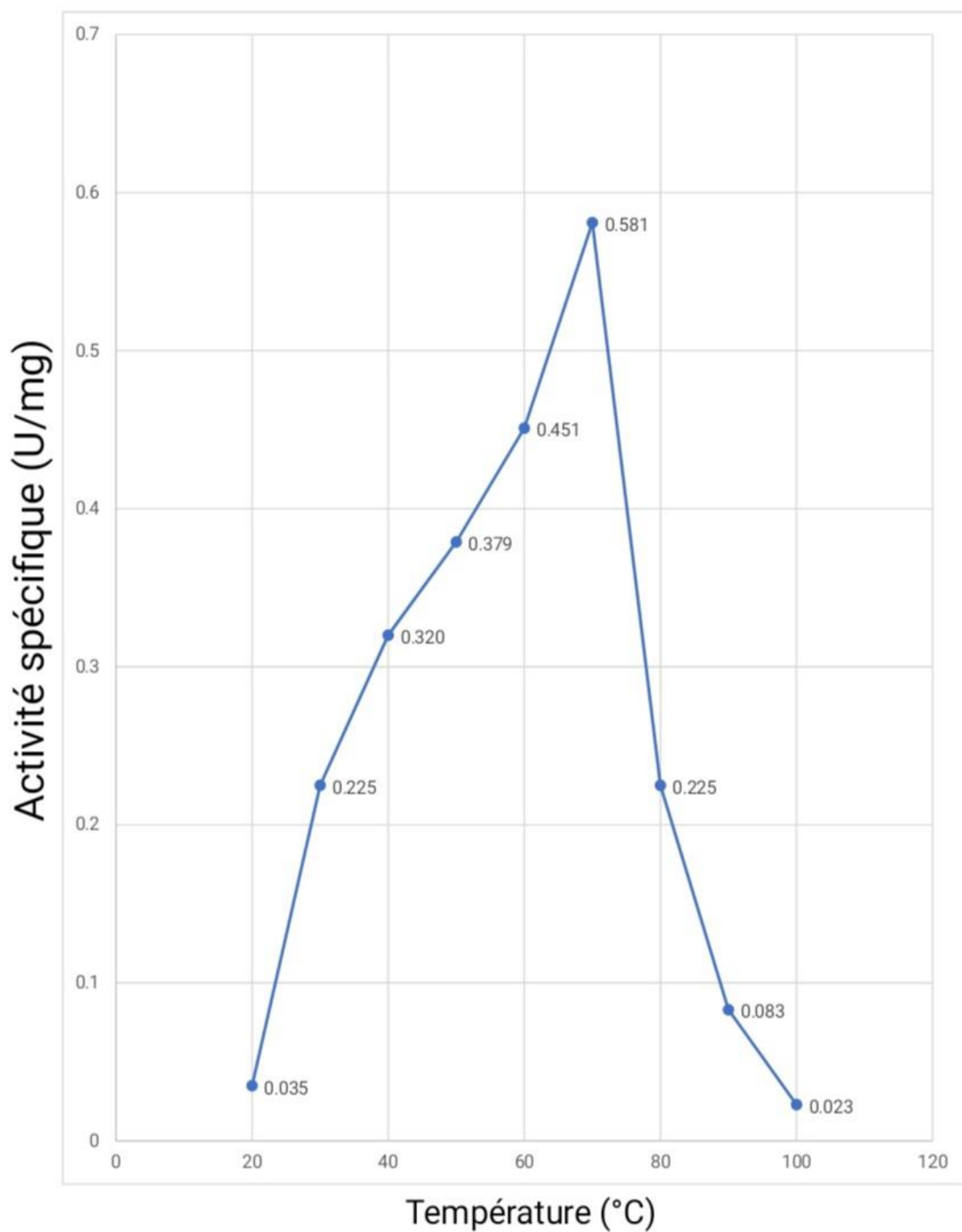


Figure 13: Une représentation visuelle d'activité spécifique d'amylase à différentes température.

2. pH optimum de la réaction amylolytique

Pour évaluer les propriétés de l'extrait brut d'enzymes, cette étude a procédé à des tests à différents niveaux de pH allant de 2 à 7. Les résultats (Fig 14; Fig 15) ont révélé une relation positive entre le pH et l'activité de l'amylase, atteignant son apogée entre pH 5 et 6. Plus spécifiquement, l'activité la plus élevée de l'amylase a été observée à pH 6, et toute hausse supplémentaire de la valeur a conduit à une diminution de l'activité de l'amylase, cette observation peut s'expliquer en considérant la structure complexe de l'enzyme qui contient des résidus d'acides aminés avec des charges électriques différentes. Ces charges ioniques ont une influence sur l'interaction entre l'enzyme et son substrat, ce qui peut entraîner une diminution de l'activité enzymatique à des pH différents de celui de l'optimum. (Yon-Kahn and Herve , 2010)

Autrement, les enzymes sont des protéines dotées d'une structure tridimensionnelle complexe. Cette structure est essentielle pour leur activité enzymatique car elle permet aux sites actifs de l'enzyme d'interagir avec les substrats de manière spécifique. La conformation de cette structure dépend en grande partie de l'environnement. Dans le cas de l'amylase, les charges électriques des acides aminés qui composent sa structure peuvent changer en fonction du pH de l'environnement environnant. Si le pH varie, cela peut entraîner un changement de la conformation de l'enzyme, ce qui peut affecter la configuration spatiale des groupes fonctionnels de l'enzyme et perturber l'interaction entre l'enzyme et son substrat. Cela peut empêcher la réaction enzymatique de se produire efficacement si les charges ioniques diffèrent de celles de l'optimum. (Bajpai , 2018 ; Yassin et al., 2021)

Ces résultats, sont similaires aux travaux d'Angelia *et al.* (2019) sur alpha-Amylase d'*Aspergillus niger* qui ont un maximum d'activité au pH [5 à 6] ; et ceux rapportés par Obafemi *et al.* (2018) pour l'amylase produit par la même espèce qui a un pH optimum de 6. Il a aussi été rapporté que le pH 6 est le pH optimum pour L'amylase de *Penicillium camemberti* (Nouadri *et al.*, 2018).

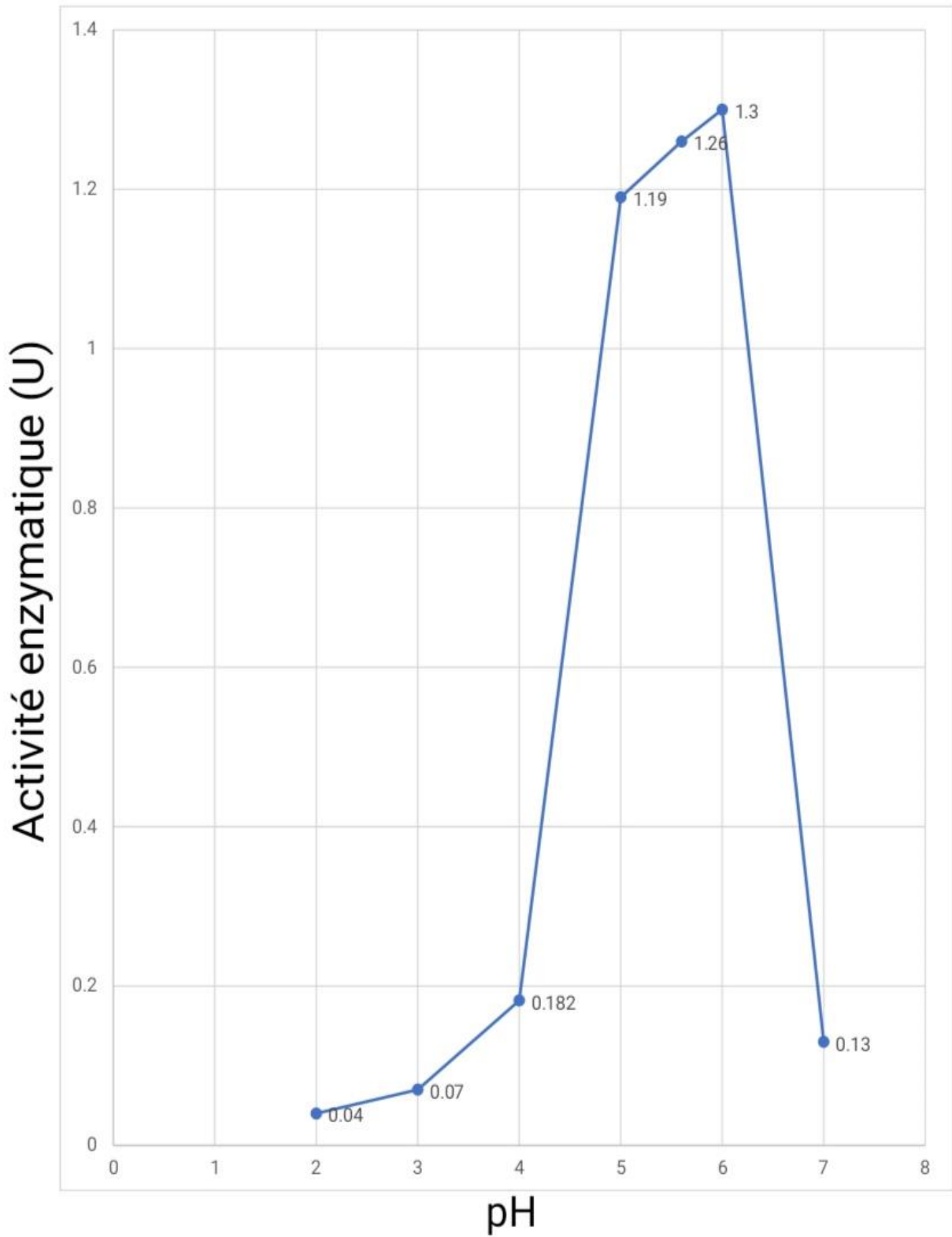


Figure 14: Une représentation visuelle de l'activité de l'amylase à différentes pH.

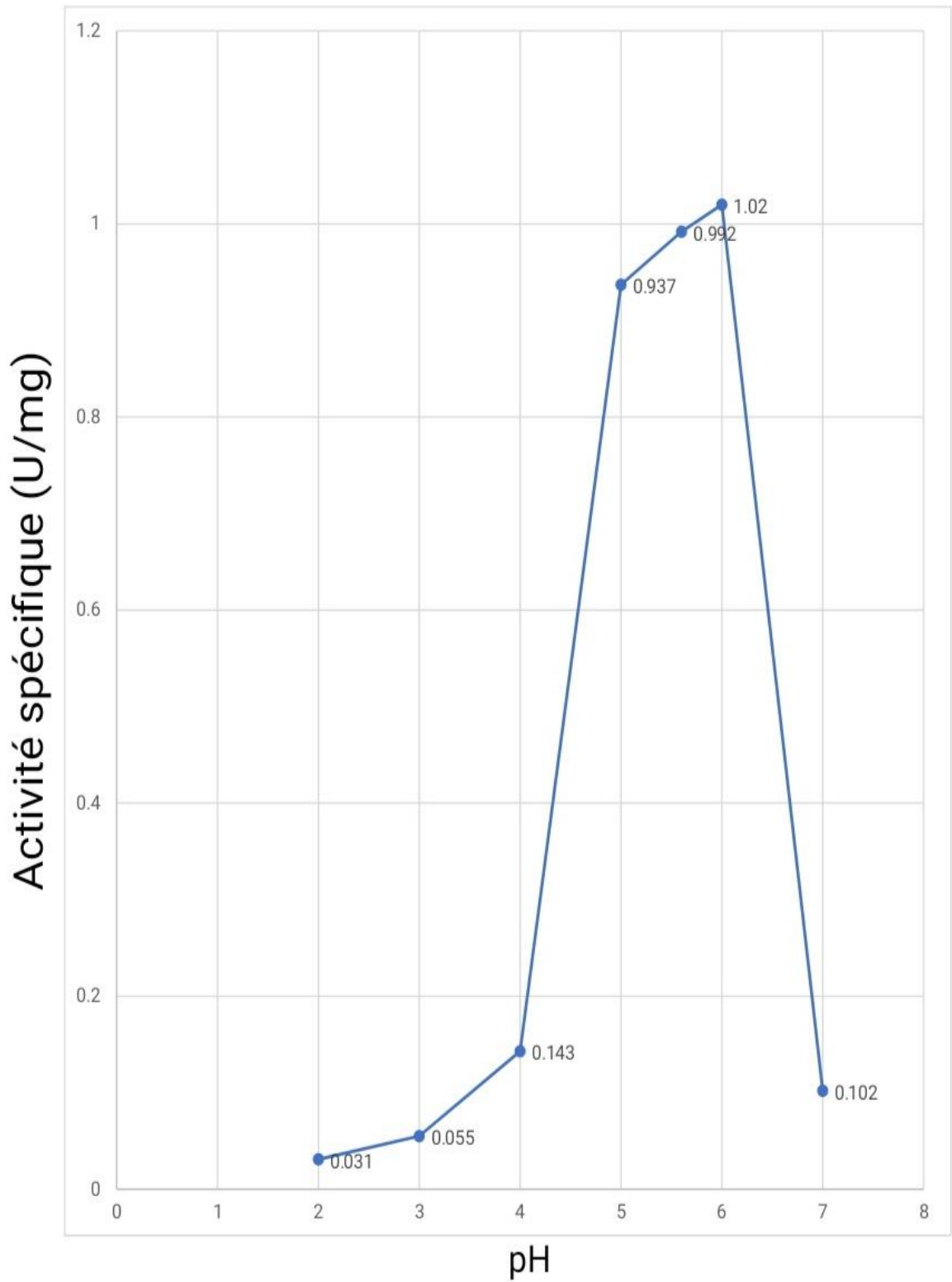


Figure 15: Une représentation visuelle d'activité spécifique d'amylase à différentes pH.

Les processus industriels qui utilisent des enzymes sont fortement influencés par la température et le pH, qui peuvent impacter la structure et l'activité enzymatique. De ce fait, une mauvaise régulation de ces paramètres peut entraîner une diminution d'efficacité de ces enzymes. Par conséquent, un contrôle scrupuleux et adéquat de la température et du pH est crucial pour maintenir une efficacité optimale des enzymes dans les processus industriels. (Bajpai , 2018)

Conclusion

Conclusion

En conclusion, les résultats de nos recherches sur les caractères d'amylase ont révélé plusieurs points importants concernant la production et l'activité de l'amylase qui représentent une avancée importante dans la compréhension et l'utilisation de l'amylase, une enzyme essentielle pour de nombreuses applications industrielles.

Nous avons pu confirmer que l'activité maximale de l'amylase était observée à une température de 70 °C et à un pH de 6. Ces données sont utiles pour mieux comprendre les caractéristiques de l'amylase et pour développer de nouvelles stratégies de production et d'utilisation de cette enzyme dans divers domaines industriels. En somme, ces résultats représentent une avancée importante dans la compréhension et l'utilisation de l'amylase, une enzyme essentielle pour de nombreuses applications industrielles.

En perspectives de ce travail pour mieux caractériser les enzymes il serait intéressant :

- D'améliorer la production enzymatique en analysant l'impact de différents facteurs tels que la composition des milieux de fermentation (sels minéraux, sources de carbone et d'azote), la durée d'incubation et la vitesse d'agitation. Cette démarche permettra d'identifier les meilleurs paramètres pour une production enzymatique optimale ;
- De suivre les cinétiques enzymatiques afin de déterminer les paramètres cinétiques de chaque enzyme, tels que la constante de Michaelis (K_m) et la vitesse maximale (V_{max}), ainsi que d'étudier la stabilité des enzymes en vue de possibles applications industrielles ;
- De purifier ces dernières en utilisant la précipitation au sulfate d'ammonium et la dialyse, ou bien des techniques plus avancées telles que les chromatographies (telles que la chromatographie d'échange d'ions, la chromatographie d'interaction hydrophobe et la chromatographie sur gel de filtration).

Références bibliographique

Références bibliographiques

A

- ❖ **Abdulaal, W.H., 2018.** Purification and characterization of α -amylase from *Trichoderma pseudokoningii*. BMC Biochem 19, 4. <https://doi.org/10.1186/s12858-018-0094-8>.
- ❖ **Aehle, W. (Ed.), 2007.** Enzymes in industry: production and applications, 3rd, completely rev. ed ed. Wiley-VCH, Weinheim.
- ❖ **Angelia, C., Sanjaya, A., Aida, A., Tanudjaja, E., Victor, H., Cahyani, A.D., Tan, T.J., Pinontoan, R., 2019.** Characterization of alpha-amylase from *Aspergillus niger* aggregate F isolated from a fermented cassava gatot grown in potato peel waste medium. Microbiology and biotechnology letters 47, 368_370. <https://doi.org/10.4014/mbl.1811.11011>.
- ❖ **Antonio, J., Lopez, C., 1998.** Isolement , identification et physiologie des champignons thermophiles en vue de la production de lipases par fermentation en milieu solide. CRSTOM, 37_164
- ❖ **Arora, N.K., Mishra, J., Mishra, V. (Eds.), 2020.** Microbial enzymes: roles and applications in industries, Microorganisms for sustainability. Springer, Singapore.

B

- ❖ **Bajpai , P., 2018.** Industrial enzymes an update , 1st ed. Bookboon , India.
- ❖ **Bhatt, P. (Ed.), 2023.** Industrial applications of microbial enzymes, First edition. ed. CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton.
- ❖ **Boughlali, M., 2003.** Thermalisme et thalassothérapie en Algérie. Société française d'hydrologie et de climatologie médicales 146_163.

C

- ❖ **Chabasse, D., Bouchara, J.-P., Gentile, L. de, Brun, S., Cimon, B., Penn, P., 2002.** les moisissures d'intérêt médical et description of médical fungi. Bioforma 66–79.

E

- ❖ **Elechi, D.P., Jason, O.C., Onyewuchi, A., Akuma, O., Elechi, D.P., Jason, O.C., Onyewuchi, A., Akuma, O., 2022.** Isolation and identification of amylase-producing

microorganisms. GSC Biological and pharmaceutical sciences 20, 077–079.
[https://doi.org/10.30574/gscbps.2022.20.1.0304\(2021\)](https://doi.org/10.30574/gscbps.2022.20.1.0304(2021)).

F

- ❖ **Fifendy, M., Periadnadi, Indriati, G., Osnita, S., Annisa, L., 2020.** Isolation and activity of amylase enzyme in isolates of fungi from black rice lemang (*Oryza sativa* Siarang), in: proceedings of the international conference on biology, Sciences and education (ICoBioSE 2019). Atlantis Press, Padang, Indonesia.
<https://doi.org/10.2991/absr.k.200807.011>.
- ❖ **Fumex, M., 2021.** Les différentes méthodes d'analyse quantitative des protéines dans le domaine pharmaceutique : description, comparaison et nouvelles perspectives. HAL open science 158_160. <https://doi.org/10.4000/terminal.3847>.

I

- ❖ **Ire, F., Wokoma, S.I., Okoli, A., 2020.** Isolation, screening and time course study of amylase-producing fungi from garri processing environment. JLBSR 1, 67_70.
<https://doi.org/10.38094/jlbsr1325>.

K

- ❖ **Keppy, N.K., Allen, M.W., WI, M., 2009.** The Biuret method for the determination of total protein using an evolution array 8-Position cell changer. Thermo fisher scientific Inc. 1_2.

L

- ❖ **Lal, A., Cheeptham, N., 2012.** Starch agar protocol. American society for microbiology.
- ❖ **Luang-In, V., Yotchaisarn, M., Saengha, W., Udomwong, P., Deeseenthum, S., Maneewan, K., 2019.** Isolation and Identification of amylase-producing bacteria from soil in Nasinuan community forest, Maha Sarakham, Thailand. Biomed. Pharmacol. J. 12, 1062. <https://doi.org/10.13005/bpj/1735>.

M

- ❖ **Moges, M., Bussa2, N.F., Abdisa, M., Muthuswamy1, M., 2019.** Isolation and characterization of amylase enzyme from selected fungal strains of Wof Washa Forest

of North Shoa, Ethiopia SJBLs 1, 4_6.
<https://doi.org/10.33552/SJBLs.2019.01.000506>.

N

- ❖ **Nouadri, T., Meraihi, Z., Djekrif-Dakhmouche, S., Bennamoun, L., 2018.** Purification and characterization of the α -amylase isolated from *Penicillium camemberti* PL21. Advanced journal of microbiology research 5.
- ❖ **Nyarko , C., Mills, J.A., Afortud, J.K., Kizzie , N., Agbale , C.M., Nyarko , C.B., 2019.** Effect of pH stability on alpha amylase extracted from *Aspergillus niger* on starch from local rice . Asian journal of microbiology and biotechnology 27_28.

O

- ❖ **Obafemi, Y.D., Ajayi, A.A., Olasehinde, G.I., Atolagbe, O.M., Onibokun, E.A., 2017.** Screening and partial purification of amylase from *Aspergillus Niger* isolated from deteriorated tomato (*Lycopersicon Esculentum* mill.) fruits. Af J Clin exp micro 19, 47. <https://doi.org/10.4314/ajcem.v19i1.7>.
- ❖ **Oguche, S.O., Iliyasu , M.Y., Ahmad , A., Abba , M., Karamba , K.I., Haruna , U.S., Na'Allah, A.J., Agbo, E.B., 2021.** Screening of fungi from disposed maize cobs for amylase production. OAJMB 6, 1_3. <https://doi.org/10.23880/oajmb-16000207>.

P

- ❖ **Palmer, T., Bonner, P.L.R., 2007.** Enzymes: biochemistry, biotechnology and clinical chemistry, 2nd ed. ed. Horwood, Chichester.
- ❖ **Piyarathne, S., Weerasooriya, M., 2019.** Production of extracellular amylase by *Aspergillus niger* under submerged fermentation using jack fruit rag as the carbon source. IJTK 19, 158_160. <https://doi.org/10.56042/ijtk.v19i1.30857>.

S

- ❖ **Saini, R., Saini, H.S., Anjali , D., 2017.** Amylases: Characteristics and industrial applications. Critical Reviews in Microbiology 22, 1864_1869.
- ❖ **Salvamani, S., Nawawi, N.M., 2014.** Macroscopic And microscopic approaches for identification of fungi from plant soil Of Cameron Highlands. Bioremed Sci Technol Res 2, 17. <https://doi.org/10.54987/bstr.v2i1.68>.

- ❖ **Shaw , J.-F., Lin, F.-P., Chen, S.-C., Hsing-Chen, C., 1995.** Purification and properties of an extracellular α -amylase from *Thermus sp.* Botanical Bulletin of Academia Sinica 4_6.
- ❖ **Shashi K., 2022.** Marché des enzymes industrielles - Croissance, Tendence, Impact du Covid-19 et prévisions. Grand view research, 1_36
- ❖ **Simair, A., Khushk, I., Qureshi, A., Bhutto, M., Chaudhry, H., Ansari, K., Lu, C., 2017.** Amylase Production from Thermophilic *Bacillus sp.* BCC 021-50 Isolated from a Marine Environment. Fermentation 3, 8_10.
<https://doi.org/10.3390/fermentation3020025>.
- ❖ **Simon, J., Barry, V., 2005.** Les enzymes applications industrielles et analytiques. Extrait de la revue des enologues, 1

Y

- ❖ **Yadav, J.K., Prakash, V., 2011.** Stabilization of α -Amylase, the key enzyme in carbohydrates properties alterations, at Low pH. International journal of food properties 14, 1184–1193. <https://doi.org/10.1080/10942911003592795>.
- ❖ **Yassin, S.N., Jiru, T.M., Indracanti, M., 2021.** Screening and characterization of thermostable amylase-producing bacteria isolated from soil samples of Afdera, Afar Region, and molecular detection of amylase-Coding gene. International journal of microbiology 2021, 1–14. <https://doi.org/10.1155/2021/5592885>.

Annexes

Annexes

Milieu PDA à pH= 3.5:

Suspendre 39 grammes de poudre "PDA" dans 1,0 L d'eau distillée. Bien mélanger. Chauffer avec agitation fréquente. Faire bouillir pour dissoudre complètement la poudre. Autoclave à 121°C pendant 15 minutes.. Au moment de couler les plaques, ajuster le pH à 3,5 comme suit : ajouter de manière aseptique environ 14 mL d'acide tartrique stérile 10% pour chaque litre de milieu fondu. Ne pas réchauffer le milieu après addition du acide tartrique.

Milieu d'amidon agar

C:omposition de la gélose à l'amidon (g/litre)

Extrait de viande 3 g

Amidon soluble 10 g

Agar 12 g

Eau distillée 1 litre

Suspendre les trois premiers ingrédients dans 1 litre d'eau distillée. Mélanger soigneusement. Chauffer en agitant fréquemment et amener avec précaution à juste ébullition. Ne pas laisser bouillir car une ébullition excessive peut hydrolyser le amidon (5). Autoclave à C pendant 15 min à 15 psi. pH final du le milieu devrait être environ de 7,5 . Après °121 stérilisation, versez le milieu dans des boîtes de pétri stérilisées et laissez-le se solidifier .avant utilisation

Solution d'iode

Dissoudre 10 g d'iodure de potassium (KI) dans environ 30 ml d'eau distillée. Ajouter 5 g d'iode et chauffer doucement en mélangeant constamment jusqu'à ce que l'iode soit dissous. Diluer à 100 ml avec de l'eau distillée. Conserver dans un flacon à bouchon de verre ambré à l'abri de la lumière.

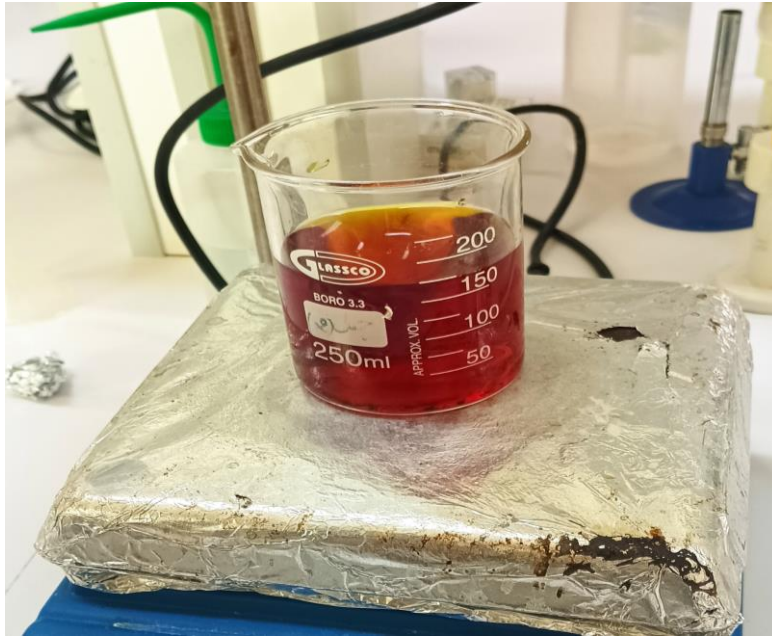


Figure : Solution d'iode

Milieu de fermentation à base de déchets de carottes

Couper les carottes en cubes

Peser 500g de cubes de carottes

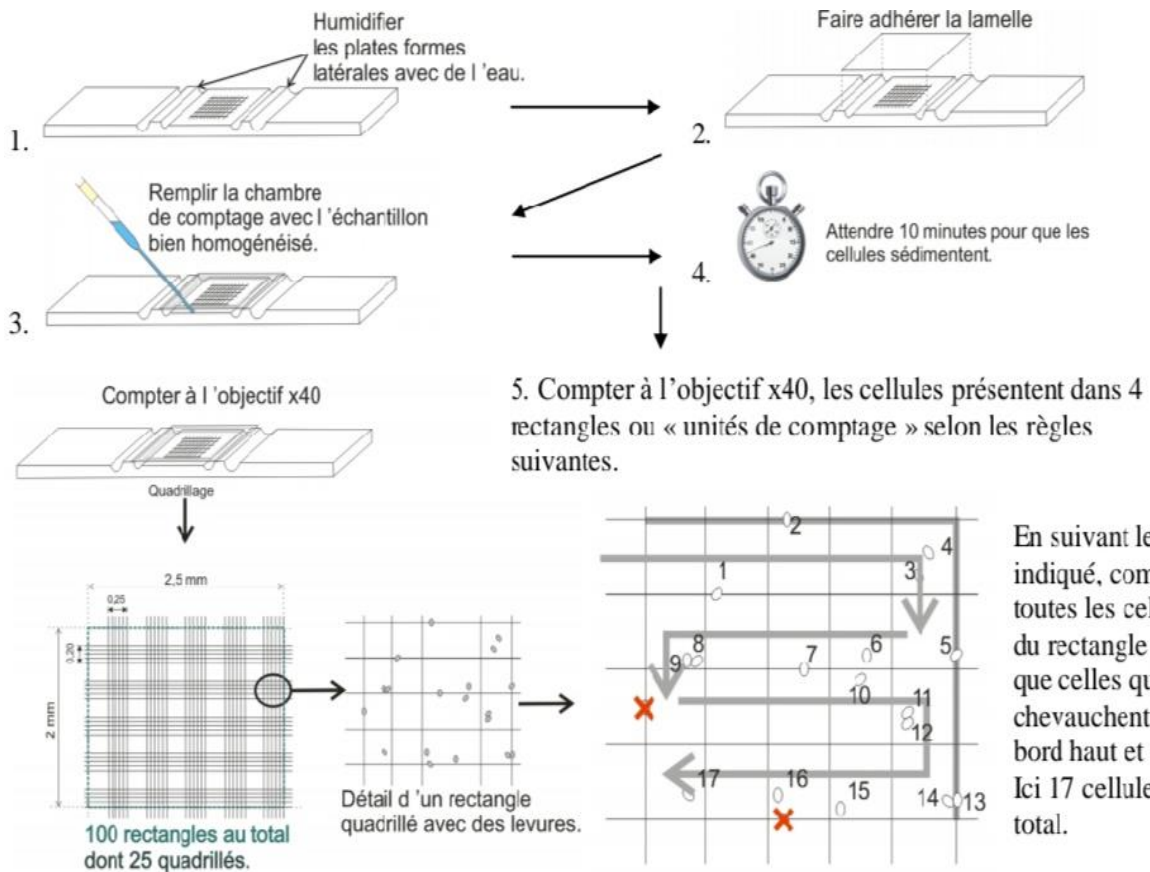
Verser environ 1.1 L d'eau distillée

Faire bouillir les cubes de carottes pendant 30 minutes jusqu'à ce qu'ils soient tendres

filtrer pour obtenir son extrait

Ajouter l'eau distillé jusqu'à un volume total de 1L

Mode opératoire de dénombrement des spores



La formule utilisée dans la dénombrement des spores

Formule à appliquer :

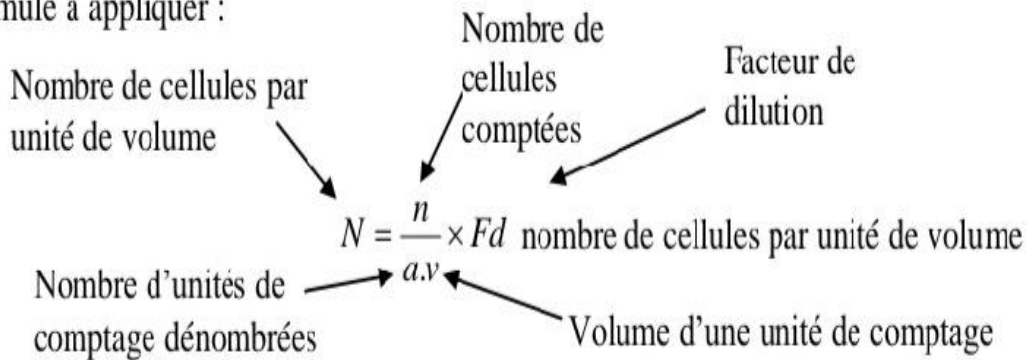
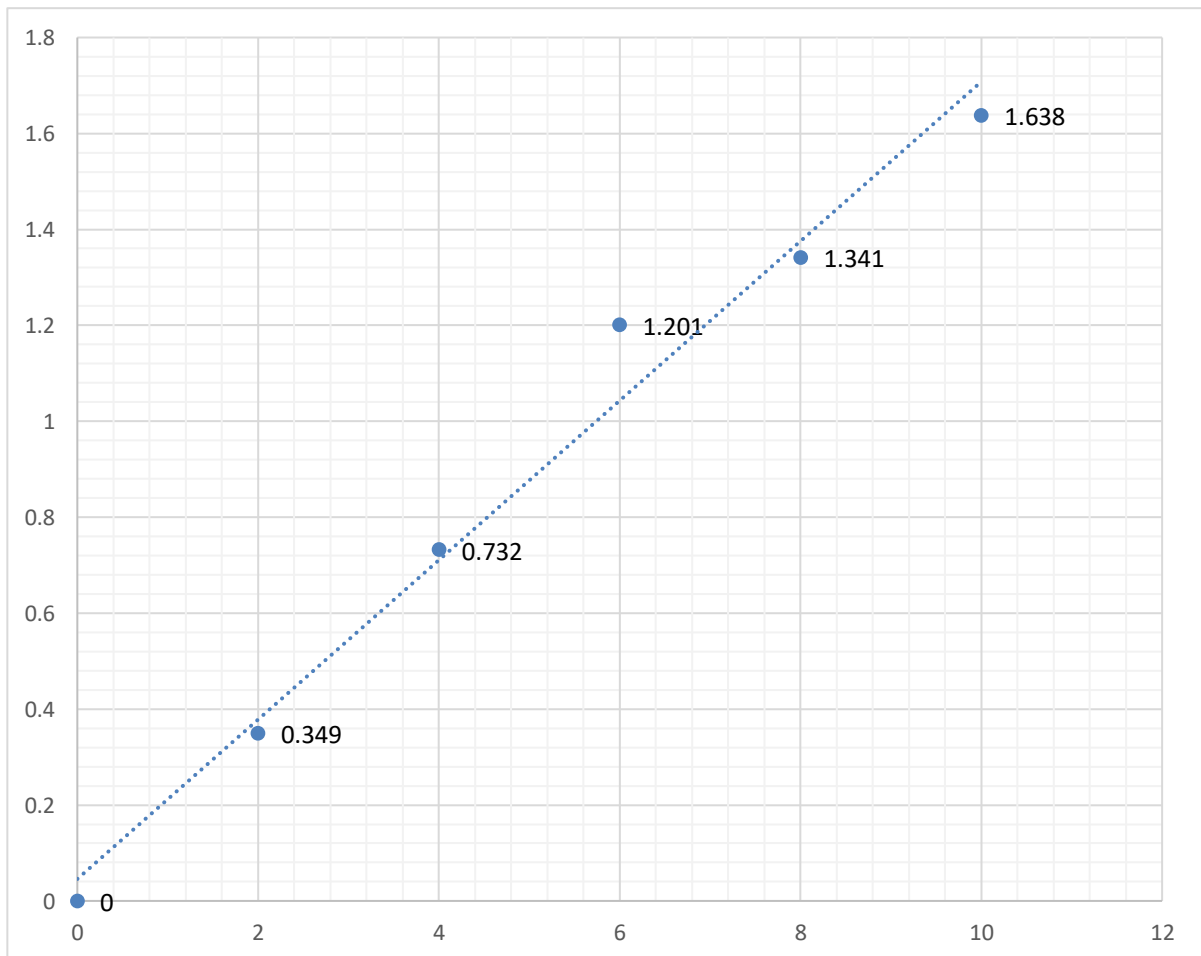


Figure de centrifugation et l'extrait brut obtenu**La courbe d'étalonnage DO = f(C) de glucose**

Préparation de la solution de DNS

Deux (2) g de DNS et 3,2 g de soude ont été dissous dans 70 ml d'eau distillée. Ensuite, 60 g de tartrate double de sodium-potassium ont été progressivement ajoutés à ce mélange sous chauffage et agitation. Le volume de ce mélange a été complété à 100 ml avec de l'eau distillée.

Solution tampon phosphate-citrate à pH= 7

Préparer un solution tampon phosphate-citrate à pH= 7 en mélangeant 32.94 ml de solution phosphate de sodium dibasique (Na_2HPO_4) à 0,5 M et 3.53 ml d'acide citrique ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$) à 0,5 M.

Solutions tampon à différents pH

Préparer le stock de phosphate de sodium dibasique (Na_2HPO_4) à 0,5 M en dissolvant 17,5 g de phosphate de sodium dibasique dans un volume final de 250 mL d'eau distillée.

Préparer le stock d'acide citrique ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$) à 0,5 M en dissolvant 24 g d'acide citrique dans un volume final de 250 mL d'eau distillée.

Préparer 7 solutions tampon phosphate-citrate en mélangeant les 2 composants selon les proportions indiquées ci-dessous :

pH	Na_2HPO_4 à 0.5M	$\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ à 0.5M
2	0.8 ml	19.6 ml
3	8,22 ml	15.89 ml
4	15.42 ml	12.29 ml
5	20.6 ml	9.7 ml
5.6	23.20 ml	8.4 ml
6	25.26 ml	7.37 ml
7	32.94 ml	3.53 ml