



N° d'ordre :  
N° de série :

**REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE**  
**MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE**  
**SCIENTIFIQUE**  
**UNIVERSITE D'EL-OUED**  
**FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE**  
**DEPARTEMENT DE BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLECULAIRE**

**MEMOIRE DE FIN D'ETUDE**

En vue de l'obtention du diplôme de Licence Académique

Filière : Biochimie

Spécialité : Biochimie

**THEME**

**Intérêt techno-fonctionnel des amylases d'origine  
microbienne**

**Présenté par Encadreur**

CHENGUEL Amani

HOMCI Rabia

MECHRI Leila

OUADA Khaoula

ZIDANE Madiha

LAICHE Ammar Touhami (M.A.B)



# Remerciement


Nous remercions ALLAH, le miséricordieux, le tout puissant et le plus clément qui nous aide et nous donne le courage de tout faire.

Mes remerciements les plus sincères s'adressent en premier lieu à mon honorable encadreur LAICHE Ammar Touhami, A pour ses orientations, sa rigueur scientifique et pour la confiance qu'elle nous a accordé tout au long de cette étude. Ce travail est pour notre l'occasion de vous témoigner notre profonde gratitude.

Mes remerciements s'adressent également

A YOUMBAI Yassine et SALHI Abdelmajid Afin de ces grands aides à dans la traduction de certaines parties de la note mémoire.

Enfin, un grand merci à tous qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.



## Résumé

### **Titre : Intérêt techno-fonctionnel des amylases d'origine microbienne**

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

On a considéré que les plantes et les animaux étaient les meilleures sources d'enzymes. Cependant, différents microorganismes ont été intensivement utilisés pour la biosynthèse des enzymes amylolytiques. L'utilisation des microorganismes dans la production d'enzymes amylolytiques est de plus en plus sollicitée à cause de la facilité de leur culture et l'absence de risques pathogènes. L'amylase microbienne s'est avérée plus stable que celle d'origine chimique (de biosynthèse).

Le choix du milieu approprié de fermentation est essentiel pour les microorganismes, aussi bien pour la croissance que pour la production d'enzymes. La production d'enzymes amylolytiques par les microorganismes sera considérablement améliorée par l'addition de différentes sources de carbone et d'azote et des éléments énergétique.

L'utilisation de ces enzymes a été étendue à des secteurs variés, tels que les industries agroalimentaires, pharmaceutique, textile, de la brasserie, et des détergents.

**Mots clé :** Amylases, Bactéries champignons, Fermentation, Valorisation .

### العنوان: الفائدة التقنية و الوظيفية للأميلاز ذات الأصل الجرثومي

الأميلاز جزيئة ضخمة من صنف البروتينات الكروية نمط الأندوغلليكان صف الأنزيمات الحالة للنشاء . كان يعتقد بأن النباتات والحيوانات هي أهم مصادر للأنزيمات . ومع ذلك فقد استعملت كائنات دقيقة (متعضيات مجهرية) في التصنيع الحيوي للأنزيمات الحالة للنشاء . استعمال الكائنات الدقيقة في إنتاج الأنزيمات الحالة للنشاء أكثر فأكثر وذلك لسهولة زراعتها وعدم التعرض للإصابة . لقد ثبت بأن الأميلاز الجرثومي أكثر استقرارا من الأميلاز الكيميائي (من التصنيع الحيوي).

اختيار الوسط الملائم للتخمر بالنسبة للكائنات الدقيقة ذو أهمية من حيث النمو ومن حيث إنتاج الأنزيمات . إنته الأنزيمات الحالة للنشاء من طرف الكائنات الدقيقة يتحسن كثيرا عند إضافة مصادر مختلفة للكربون والأزوت وعناصر طاقة .

استعمال هذه الأنزيمات توسع إلى قطاعات متنوعة كالصناعات الغذائية ، الصيدلانية ، النسيج ، الخمر ، ومواد التنظيف

الكلمات المفتاحية : الأميلا ، بكتيريا ، فطريات ، تخمر ، تثمين.

## SOMMAIRE

<b><u>Introduction</u></b>	
<b><u>CHAPITRE I : Généralités sur les amylases</u></b>	
<b>I.1.Définition.....</b>	<b>01</b>
<b>I.2.Historique.....</b>	<b>01</b>
<b>I.3.Les type des amylases.....</b>	<b>02</b>
I.3.1. L'α amylase.....	02
I.3.2. La β amylase.....	05
I.3.3. La gluco-amylase (gamma amylase).....	06
<b>I.4. L'amidon, substrat naturel des amylases.....</b>	<b>07</b>
I.4.2.Composition et structure moléculaire.....	08
I.4.3.Propriétés d'amidon.....	09
<b>I.5. Fonction des amylases.....</b>	<b>10</b>
I.5.1. Propriétés liées à l'activité amylolytique.....	10
I.5.2. Mécanisme d'action.....	11
I.5.3. Mode d'action.....	12
<b>I.6. Sources des amylases .....</b>	<b>13</b>
I.6.1 Origine animale.....	13
I.6.2. Origine végétale.....	14
I.6.3. Origine microbienne.....	15
<b><u>CHAPITRE II :II. Les amylases microbiennes</u></b>	
<b>II .1 .Microorganismes d'intérêt industriels.....</b>	<b>17</b>
II.1.1. Les champignons.....	17
II.1.1.1. Les moisissures.....	17
II.1.1.2. Les levures.....	20
II.1.2. Les bactéries .....	22
<b>II.2 Les amylases microbiennes.....</b>	<b>26</b>
II.2.1. Les bactéries .....	26
II.2.2. Les champignons .....	27

## **CHAPITRE III : Production et Intérêt des amylases microbiennes**

<b>III.1. Production d'amylase par des moisissures.....</b>	<b>29</b>
III.1.1. Isolement.....	29
III. 1.2. Identification des souches.....	30
III. 1.3. Purification des souches.....	31
III. 1.4. Conservation.....	31
III.1.5. Production des amylases.....	31
III. 1.5.1. Production de l' $\alpha$ -amylase en milieu solide.....	32
III.1.5.2. Production d' $\alpha$ -amylase par fermentation submergée.....	33
III.1.5.3. Cinétique de production de l' $\alpha$ -amylase en Fermenteur.....	35
III.1.6. Purification de l' $\alpha$ -amylase.....	36
III.1.6.1. Précipitation par le sulfate d'ammonium .....	36
III.1.6.2. Dialyse.....	36
III.1.6.4. Chromatographie .....	37
III.1.6.5. Electrophorèse analytique.....	39
III.1.7.Détermination de la masse moléculaire de l' $\alpha$ -amylase.....	39
III.1.8. Caractérisation de l' $\alpha$ -amylase purifiée.....	39
III.1.8.1.Effet du pH.....	40
III.1.8.2. Effet de la température.....	40
III.1.8.3.Stabilité thermique de l' $\alpha$ -amylase.....	40
III.1.8.4.Activité amylasique en fonction de la concentration en substrat.....	40
III.1.9. Détermination des constantes cinétiques de l' $\alpha$ -amylase purifiée.....	40
<b>III.2.Intérêt des amylases microbienne.....</b>	<b>41</b>
III.2.1.thermostabilité des amylases.....	41
III .2.2. Domaine d'utilisation d'amylase.....	42
III .2.2.1. Domaine d'agro-alimentaire.....	42
III .2.2.2. Domaine industriel .....	43
III .2.3. Domaine médical et pharmaceutique.....	44

### **Conclusion**

## LISTE DES FIGURES

<b>Numéro</b>	<b>Titre</b>	<b>Page</b>
<b>Figure 1</b>	Structure tridimensionnelle de l' - amylase	03
<b>Figure 2</b>	Structure tridimensionnelle de L' -amylase	06
<b>Figure 3</b>	Structure des granules d'amidon de blé	08
<b>Figure 4</b>	Structure chimique de l'amylose	08
<b>Figure 5</b>	Amylopectine avec les branchements (1-6)	09
<b>Figure 6</b>	Mécanisme d'hydrolyse acide de l'amidon, cas de la liaison (1-4)	12
<b>Figure 7</b>	l'action du et et amylase sur l'amylose et l'amylopectine	13
<b>Figure 8</b>	Biosynthèse de l' -amylase	15
<b>Figure 9</b>	Quelques moisissures rencontrées dans le grain de blé, observation au microscope optique (X100)	81
<b>Figure 10</b>	Exemples de levures dans le grain de blé observées au microscope optique (x100)	00
<b>Figure 11</b>	Exemple de Bactéries dans le grain de blé	22
<b>Figure 12</b>	Représentation schématiques des produits microbiens d'intérêt industriel	02
<b>Figure 13</b>	L'installation de bio production des amylases	36
<b>Figure 14</b>	Protocole de purification de l'amylase de <i>P.camemberti PL21</i>	38

## LISTE DES TABLEAUX

<b>Numéro</b>	<b>Titre</b>	<b>Page</b>
<b>Tableau I</b>	Différences majeures entre différents types d'amylases	07
<b>Tableau II</b>	Les différentes origines de l' -amylase microbienne	16
<b>Tableau III</b>	Principaux produits issus de la fermentation des bactéries lactiques	25
<b>Tableau IV</b>	Exemples de production de l' -amylase par des microorganismes et leurs propriétés physico-chimiques	28
<b>Tableau V</b>	Composition de gel (Native PAGE et SDS-PAGE)	39

## Liste des abréviations

- **BSA** : albumine de sérum bovin.
- **CYA** : Czapek extrait de levure agar.
- **DEAE** : Di EthylAminoEthyl.
- **KDa** : Kilo Dalton.
- **Km** : constante de Michaelis
- **MA** : Malt Agar.
- **PDA** : Potato Dextrose Agar.
- **PG** : Peptidoglycane.
- **POU** : Protéines d'Organismes Unicellulaires.
- **rpm** : rotation par minute.
- **SCP** : Single Cellprotéins.
- **SDS-PAGE** : Sodium Dodécyle Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis.
- **SmF** : Submerged fermentation
- **sp** : espèce
- **SSF** : Solid State fermentation.
- **U/ml** : Unité par millilitre.

# INTRODUCTION

## Introduction

Les micro-organismes couvrent un groupe hétérogène d'êtres vivants de taille microscopique et pour la plupart, unicellulaires. Les micro-organismes appartiennent à deux principaux groupes : les procaryotes et les eucaryotes (**Terrouche A., 2009**).

Durant les trois dernières décennies, les microorganismes ont apporté une contribution significative dans certains domaines industriels et en particulier agroalimentaires. Diverses industries dépendent en grande partie de leurs métabolites (**Ibukun E., Akindumila F., 1998, Abu E. et al., 2005**). De plus, les microorganismes thermophiles constituent un vaste réservoir de catalyseurs biologiques, actifs et non dénaturés à des températures élevées, résistant à des températures comprises entre 60 et 80°C (**Vieille C., Zeikus J., 2001**). Parmi ces enzymes, on recense les protéases, les cellulases et les amylases thermostables qui sont d'une grande importance en biotechnologie (**Scriban R. et al., 1999**).

Les amylases sont des macromolécules appartenant à la classe des protéines globulaires, de type endoglycanases, de la classe des hydrolases, qui agit sur les liaisons (1- 4) de l'amidon (**Zoubiri L., 2012**). Les amylases, proviennent de différentes sources (plantes, animaux et microorganismes), cependant celles d'origine microbienne sont les plus utilisées industriellement (**Burhan A. et al., 2003**).

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

Ce travail s'inscrit dans le cadre des essais de mieux comprendre les différentes techniques utilisées dans la production et l'extraction des amylases d'origine microbienne. La culture des microorganismes amylolytiques, ainsi, la purification des enzymes, sera l'objectif de ce travail.

Cette la présente étude est articulée en trois chapitres :

- Le premier chapitre est consacré à des généralités sur les amylases; où nous avons traité des trois types d'amylase, le mode d'action d'amylase, et leur origine.
- Le deuxième chapitre met en évidence les amylases microbiennes; dans le procédé de ce chapitre nous avons discuté des microorganismes et leurs intérêts, et aussi les amylases d'origine microbiennes.

- Dans le troisième chapitre intitulé: production et intérêt des amylases microbiennes ; nous allons étudier un exemple de la production d'amylase à partir des moisissures, et on va expliquer l'intérêt des amylases microbiennes dans les divers domaines.

# CHAPITRE I

## Généralités sur les amylases

## Généralités sur les amylases

### I.1. Définition

L'α-amylase comme toutes les enzymes est une macromolécule, ubiquitaire, appartenant à la classe des protéines globulaires, de type endoglycanase de la classe des hydrolases (Nouadri T., 2011), dont le rôle biologique est de catalyser l'hydrolyse de l'amidon (Wang T. *et al.*, 1989 ; Scriban R., 1999). Elle est largement représentée chez les animaux, les végétaux et les micro-organismes (Nouadri T., 2011).

### I.2. Historique

L'histoire des amylases a commencé en 1811 lorsque Kirchoff a découvert un composant glutineux (comme il l'a appelé à l'époque) du blé, capable de dégrader l'amidon. Cette découverte a été suivie par plusieurs rapports sur les amylases digestives et les amylases de malt. Plus tard, en 1930, Ohlsson a suggéré la classification des enzymes digérant l'amidon dans le malt en deux catégories, les α- et β-amylases, qui se distinguent par leur site d'hydrolyse et par le type anomérique des sucres produits à la suite de la réaction enzymatique. Les α-amylases sont des endo-amylases qui clivent les liaisons α-(1-4)-D-glycosidiques présentes à l'intérieur des chaînes d'amylose et d'amylopectine, constitutives de l'amidon et du glycogène. Les produits libérés à la suite de l'action des α-amylases sont des oligosaccharides, principalement du α-maltose (2 unités de glucose), et des dextrans limites. Les amylases animales sont généralement connues comme étant des α-amylases (Owen G., 1966). Les β-amylases sont des exo-amylases qui clivent les liaisons β-(1-4)-D-glycosidiques présentes au niveau des extrémités non réductrices des chaînes d'amylose et d'amylopectine. Les liaisons β-(1-6)-D-glycosidiques d'amylopectine sont hydrolysées par des β-(1-6) glucosidases (Prudence M., 2006).

L'α-amylase a suscité beaucoup d'intérêt chez les biologistes, qui ont ainsi caractérisé plusieurs gènes et protéines de cette enzyme chez les animaux, les végétaux et les microbes et qui lui ont découvert de nombreuses applications pharmaceutiques, cliniques et industrielles (Svensson B., 1988 ; Jane ek S., 1994 ; Pandey A. *et al.*, 2000) et qui lui ont découvert de nombreuses applications pharmaceutiques, cliniques et industrielles. En catalysant la première étape d'hydrolyse de l'amidon et du glycogène, non seulement, l'α-amylase assure un rôle majeur dans les processus digestifs, mais également, elle intervient, en amont, dans la production de glucose qui, avec les acides aminés et les stérols, assure la couverture des besoins énergétiques de chaque être vivant. C'est pourquoi, dès 1984, les α-

amylases sont d'une part commercialisées comme médicaments dans le traitement des désordres digestifs. D'autre part, des patients diabétiques ou obèses sont traités avec l'acarbose, un pseudotétracosaccharide isolé de *Streptomyces*, inhibant des  $\alpha$ -amylases et permettant ainsi une réduction du niveau de glucose sanguin postprandial (Muller L. *et al.*, 1980 ; Reaven G. *et al.*, 1990 ; Matsuo T. *et al.*, 1992 ; Chiasson L. *et al.*, 1994 ; Ledermann H., Hoxter G., 1994 ; Noda K. *et al.*, 1997). Les  $\alpha$ -amylases sont aussi utilisées dans la boulangerie, la pâtisserie, la brasserie, le textile, l'industrie du papier et les détergents (Godfrey T., West S., 1996 ; Pandey A. *et al.*, 2000 ; Gupta R. *et al.*, 2003).

### I.3.Types des amylases

Les amylases peuvent être classées en trois types :  $\alpha$ -amylase,  $\beta$ -amylase, et  $\gamma$  amylase. Les trois types diffèrent dans la façon dont ils se décomposent la liaison polysaccharide (tableau I).

#### I.3.1.L' $\alpha$ -amylase

##### I.3.1.1.Définition

L'  $\alpha$ -amylase (  $\alpha$ -1,4- glucane-4-glucanohydrolases, EC 3.2.1.1) est une endoenzyme appartenant à la famille des hydrolases. Elle hydrolyse au hasard, les liaisons osidiques de l'amylose, de l'amylopectine, de l'amidon, du glycogène et d'autres polysaccharides contenant plus de trois liaisons  $\alpha$  (1,4) D-Glucose (Keating L. *et al.*,1998). En effet, elle attaque les chaines de l'amylose en coupant les liaisons  $\alpha$  (1,4) tous les 6 glucoses, maltose et surtout d'  $\alpha$ -dextrines (Franco O. *et al.*, 2000).

##### I.3.1.2. Nomenclature

- Nom commun :  $\alpha$ -amylase.
- Nom codifié : EC 3.2.1.1.
- nom systématique : 1,4 –  $\alpha$ -D-glucane,4glucano hydrolase ).
- Autres nom (s):glycogénase,  $\alpha$ -amylase; endoamylase Taka-amylase (Merabti R., 2006).

##### I.3.1.3. Structure

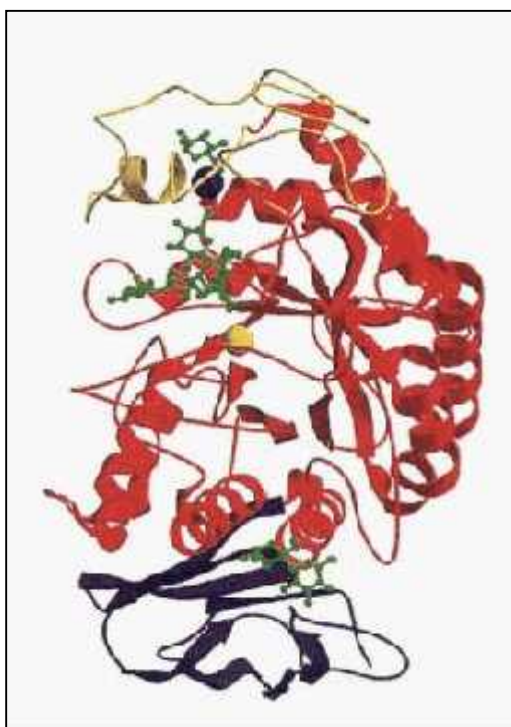
L'  $\alpha$ - amylase est une glycoprotéine, comportant trois domaines globulaires (A, B et C). Elle renferme une partie glucidique, qui est formée principalement, de D-mannose, D-glucose, D-galactose, D-xylose et D-glucosamine (Stefanova M., Emanuilova., 1992) associés

chimiquement à la chaîne polypeptidique constituée de 471 à 483 résidus d'acides aminés, avec 4 ou 5 ponts disulfures (Heslot H., 1996) (figure 01).

Le domaine A, forme un tonneau ( / )<sub>8</sub> et porte le site actif à la partie C-terminale des feuillets . Le domaine B, forme une boucle à partir du milieu du domaine A et constitue une sorte de « couvercle » au-dessus du site actif. Quant au domaine C, il constitue un tonneau de 8 feuillets antiparallèles (Matsuura Y. *et al.*,1984).

En plus de ces trois domaines, certaines -amylases, telles que l' -amylase de streptomycètes limosus, ont un domaine supplémentaire (domaine E) à leur extrémité C-terminale, jouant un rôle dans l'adsorption de l'amidon (Matsuura Y. *et al.*,1984).

En outre, l' -amylase est une métallo-enzyme à calcium. Elle comporte au moins un ion de calcium par molécule. Cet ion joue un grand rôle dans le maintien et la stabilité de la structure tertiaire de l'enzyme ainsi que dans son activité catalytique. Pour certaines -amylases, la présence d'un site de fixation du Cl est également signalée (Boel E. *et al.*,1990).



**Figure 01** :Structure tridimensionnelle de l' – amylase d'après Kraulis (1991) : les trois domaines, ainsi que les ions de calcium et de chlorure, sont représentés : domaine A decouleur rouge, domaine B, jaune et domaine C, pourpre. L'ion de calcium (sphère bleue) et l'ion de chlorure (sphère jaune) (Merabti R., 2006).

### I.3.1.4. Caractéristiques de l' $\alpha$ -amylase

#### ➤ Poids moléculaire

Le poids moléculaire des  $\alpha$ -amylases varie d'une origine à l'autre et d'une espèce à l'autre. Il est compris entre 40.000 et 90.000 daltons. Celui des  $\alpha$ -amylases levuriennes, s'échelonne entre 40.000 et 70.000 daltons (Panchal C., 1990).

#### ➤ Température optimum

Selon l'origine et les espèces, les  $\alpha$ -amylases ont des températures optimales comprises entre 40°C et 90°C (Schamburg D., 1991). En effet, l' $\alpha$ -amylase bactérienne est réputée pour sa grande thermo stabilité, celle de *Bacillus amyloliquefaciens* est caractérisée par un optimum de température qui, selon les applications va de 70°C à 90°C, alors que l' $\alpha$ -amylase fongique est d'une thermostabilité assez faible, son optimum se situe entre 50°C et 55°C (Sicard P., 1982). L' $\alpha$ -amylase levurienne a des optimums de température, allant de 40°C à 60°C et parfois même 70°C pour certaines espèces comme *Lipomyces starkeyi* (Panchal C., 1990).

#### ➤ pH optimum

L' $\alpha$ -amylase est très sensible au pH. Par conséquent, le choix du pH optimum est très essentiel pour la production de cette enzyme. Selon Kindle, (1983), l'optimum d'activité peut être obtenu à des pH compris entre 4 et 8. Les  $\alpha$ -amylases bactériennes, ont un optimum supérieur à la neutralité, alors que les fongiques, ont des pH optimum compris entre 4 et 5 (Larpent G. *et al.*, 1992). Pour les levures, l'enzyme requiert selon les espèces des pH entre 4 et 6 (Panchal C., 1990).

### I.3.1.5. Régulation de la synthèse de l' $\alpha$ -amylase

La répression catabolique de l'expression des gènes est un système de normalisation fondamental et omniprésent, à fin de répondre aux changements de disponibilité nutritive. Des études, ont démontré que la biosynthèse de l' $\alpha$ -amylase est régulée uniquement par répression au cours de la transcription et/ou au cours de la traduction. (Bhella R., Altossar I., 1987).

Chez les micro-organismes, le glucose ou d'autres sources de carbone rapidement métabolisables, répriment l'expression des gènes qui codent pour des enzymes liées au métabolisme d'autres sources de carbone (Chung-An L. *et al.*, 1998).

### I.3.2. La amylase

#### I.3.2.1. Définition

La  $\alpha$ -amylase [  $\alpha$ -(1,4)-D-glucane, malto-hydrolase (E.C. 3.2.1.2) ] est une exoenzyme accharifiant. Elle hydrolyse les chaînes d'amylose et d'amylopectine à partir de l'extrémité non réductrice en libérant du  $\alpha$ -maltose. L'hydrolyse de l'amylopectine est bloquée au niveau des points de branchement (1-6), ce qui conduit à la production de 50% à 60% de maltose. Le reste est formé de dextrine limite. Elles ont été caractérisées chez les microorganismes, elles n'ont pas été caractérisées chez l'animal. Les propriétés physico-chimiques de ces dernières les rendent plus aptes pour une utilisation industrielle (stabilité augmentée au pH, à la température). (Vallier P. *et al.*, 1977).

#### I.3.2.2. Nomenclature

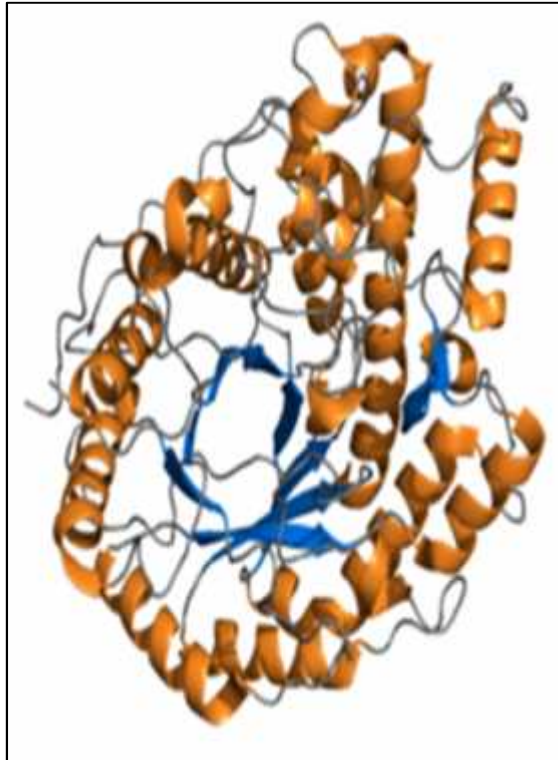
- Nom commun :  $\alpha$ -amylase.
- nom codifié : (E.C.3.2.1.2).
- nom systématique :  $\alpha$ -(1,4)-D-glucane, malto-hydrolase.
- D'autres nom : 4- $\alpha$ -D-glucanemaltohydrolase .saccharogen amylase, glycogenase.

( Mikami B. *et al.*, 1993 ).

#### I.3.2.3. structure

La  $\alpha$ -amylase est composée de quatre sous-unités identiques de 498 acides aminés ayant 222 symétries moléculaires. Chaque sous-unité dispose d'un grand ( $\alpha$  /  $\beta$ )<sub>8</sub> à noyau ,trois longues boucles associées à un sous-domaine , et une boucle étendue de l' extrémité C-terminale . Une Glu conservé, situé à proximité de la base L4 d'une fente entre le domaine de noyau et le plus petit sous-domaine contenant trois boucles longues, est pensée pour fonctionner en catalyse. A Cys conservés à la position 96 semble être impliqué dans l'inactivation de l'activité enzymatique par les réactifs sulfhydriles ; Le site catalytique de l'enzyme de soja se trouve dans un cul-de -sac de la fissure profonde de 18 Å, qui permet l'hydrolyse bout à bout de l'amylose non ramifié et chaînes maltosaccharide ( Mikami B. *et al.*, 1993 ). La petitesse comparative de l'ensemble cul-de -sac contraste avec le site actif de longue fente caractéristique de endoglycanases (**figure 02**).

L'extrémité non réductrice de la chaîne est orientée vers la base de la fente, et deux conservé Glu186, les résidus 380 occupent des positions au-dessus et au-dessous de la chaîne lié polyglucane. ( Mikami B. *et al.*, 1994).



**Figure 02 :** Structure tridimensionnelle de la  $\gamma$ -amylase ( Mikami B. *et al.*, 1993 ).

### I.3.3. La gluco-amylase (gamma amylase)

#### I.3.3.1. Définition

La  $\gamma$ -amylase (glucoamylase) (E.C.3.2.1.3) est une enzyme (1 4) glucaneglucanohydrolase qui hydrolyse complètement l'amylopectine en D glucose et capable également d'hydrolyser les liaisons (1-3) pour former le maltose (Scriban R., 1993).

#### I.3.3.2. Nomenclature

- Nom commun : L'  $\gamma$ -amylase glucoamylase.
- Nom codifié : (E.C.3.2.1.3).
- Nom systématique : 1,4-  $\alpha$ -D-glucanglucohydrolase.
- D'autres nom : amyloglucosidase;  $\gamma$ -amylase; lysosomal  $\alpha$ -glucosidase; acid maltase; exo-1,4-  $\alpha$ -glucosidase; glucose amylase;  $\alpha$ -1,4-glucan glucohydrolase; acid maltase.

(Scriban R., 1993).

Tableau I : Différences majeures entre différents types d'amylases

Enzyme Caractères	-amylase	-amylase	-amylase (glucoamylase)
<b>Origine</b>	Végétaux, Animaux, Bactéries	Végétaux supérieurs	Animaux, Levures, Moisissures, Bactéries,
<b>Liaison rompue</b>	(1 4)	(1 4)	(1 4) ou (1 6)
<b>Type d'action</b>	H, I	H, I	H, IouT, R
<b>Action sur oligo- holosides</b>	+	+	+
<b>Action sur poly- Holosides</b>	+	+	+
<b>Non codifié</b>	E.C .3.2.1.1	E.C .3.2.1.2	E.C .3.2.1.3
<b>Non systématique</b>	-(1-4) D- glucaneglucanohydrolase	-(1,4)-D- glucanemalto- hydrolase	-(1-4) D- glucaneglucanohydrolase

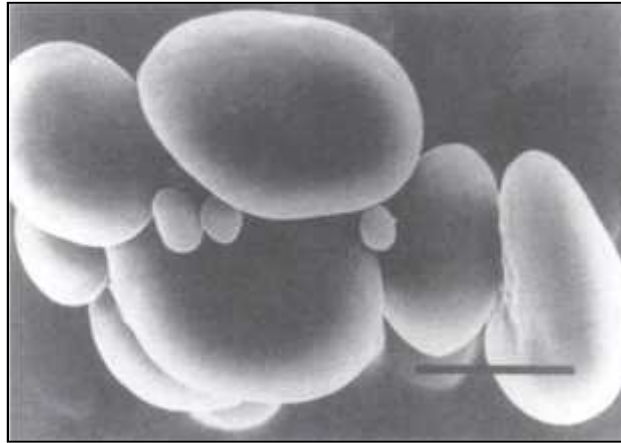
#### I.4. L'amidon, substrat naturel des amylases

##### I.4.1. Définition

L'amidon est un homopolymère de D-glucose. Les unités D-glucosyl (conformation chaise) sont liées majoritairement par des liaisons de type (1,4) (95 – 96 %) et, dans une moindre mesure, par des liaisons de type 1,6 (4 – 5 %). L'amidon est composé de deux polymères de structure primaire différente : l'amylose, molécule linéaire, et l'amylopectine, molécule ramifiée. (KARA SLIMANE A., 2010).

L'amidon se présente sous forme de granules de 1 à 100 µm ; ils varient en taille et en forme selon leur origine botanique (**figure 03**). Des composants mineurs (lipides, protéines, minéraux) sont présents en quantités variables en fonction de l'origine botanique et de la technologie d'extraction (Arvisenet G., 2001 ; Atkin N. *et al.*, 1999).

Les constituants de l'amidon sont essentiellement représentés par des polyholosides (98 à 99%). La fraction non glucidique (1 à 2%) est donc minoritaire. (KARA SLIMANE A., 2010).



**Figure 03** : Structure des granules d'amidon de blé observées au microscope électronique à balayage (**Bushuk w., Rasper V., 1994**).

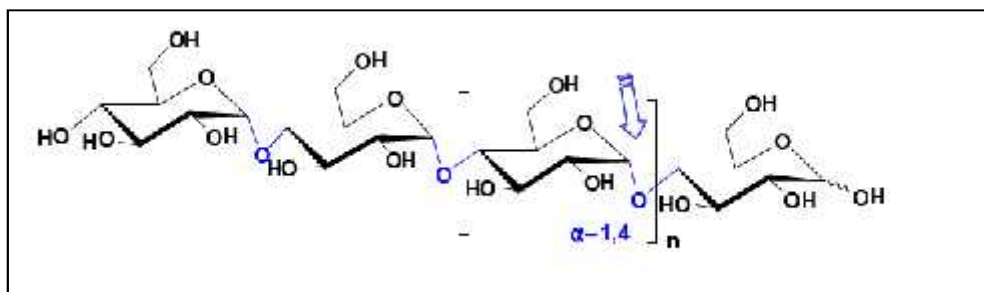
#### I.4.2. Composition et structure moléculaire

L'amidon consiste en deux glucanes structurellement différents : l'amylose, polymère linéaire (non branché) et l'amylopectine, polymère fortement branché.

##### I.4.2.1. L'amylose

L'amylose est l'un des deux polysaccharides constituant l'amidon. Il s'agit d'un polyholoside essentiellement linéaire de glucose puisqu'il possède moins de 1% de branchement (1-6). (**Mostafa Kh., 2002**) (**figure 04**).

Par ailleurs, les chaînes d'amylose ont un Degré de Polymérisation (DP) dépendant de l'origine botanique, qui en moyenne est de 500 (**Hizukuri S. et al., 1981**) mais sous ce nombre se cache une très grande polydispersité avec des chaînes pouvant aller de 300 à 104 unités glucoses (**Suortti T. et al., 1998**). Ainsi, la masse molaire moyenne de l'amylose peut aller de  $3,4 \times 10^5$  g/mol pour un amylose de maïs à  $1,05 \times 10^6$  g/mol pour celui du manioc (**Roger P. et al., 1996**).

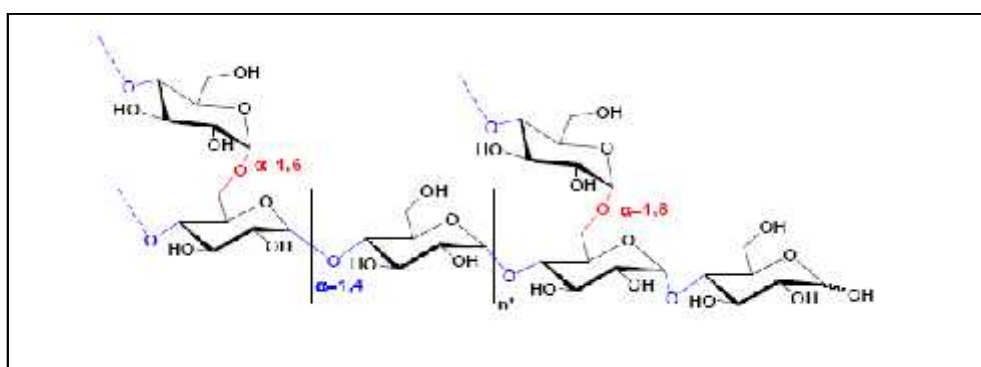


**Figure 04** : Structure chimique de l'amylose. (**Monnet D., 2008**).

### I.4.2.2. L'amylopectine

L'amylopectine est le composant majoritaire de l'amidon puisqu'il représente en moyenne 70 à 80 % de l'amidon sec. Cette macromolécule est, tout comme l'amylose, un homopolymère constitué de glucose majoritairement liés en (1-4) mais comptant 5 à 6 % de liaisons (1-6). (Buléon A., 1998) ce qui lui confère une structure primaire ramifiée (figure 05).

Cette structure, au nombre important de chaînes reliées les unes aux autres par les liaisons (1-6), de 180 à 1800 par molécule (Hanjun T., 2006) engendre des masses molaires moyennes beaucoup plus élevées que celles de l'amylose (Banks W., Greenwood C., 1975).



**Figure 05 :** Amylopectine avec les branchements (1-6) (Monnet D., 2008).

A ce jour, après de nombreux modèles envisagés (Buléon A. *et al.*, 1998), le modèle du cluster (grappe) est considéré comme le modèle le plus représentatif pour la communauté scientifique travaillant sur la détermination structurale de l'amylopectine. Au sein de l'amylopectine, on différencie 3 types distincts de chaînes :

- Des chaînes courtes S (short) de DP moyen 15-20.
- Des chaînes longues L (long) de DP moyen 40-45.
- Des chaînes de DP moyen supérieur à 60. (Monnet D., 2008).

### I.4.3. Propriétés de l'amidon

L'amidon a, comme tout produit, des propriétés physiques qui lui sont propres (Regiant A. *et al.*, 1998).

Influence de la température : l'amidon est insoluble dans l'eau. Il forme, en revanche à chaud (70°C) une solution colloïdale qui épaisse en donnant un gel communément appelé empois.

Température de gélification : la gélification commence graduellement à partir de 50°C mais est effective ensuite à une température dépendante de l'agitation moléculaire, de la grosseur des grains, de la nature de l'amidon, de l'eau employée et de la concentration en amidon.

Effet stabilisant : l'épaississement ayant lieu à une température inférieure à celle de la coagulation du jaune d'œuf, les crèmes aux œufs contenant de l'amidon peuvent être portées à ébullition.

Les amidons sont influencés par trois types d'action : thermique, chimique, enzymatique (**Regiant A. et al., 1998**).

- Actions thermique : elle change la couleur et le goût de l'amidon par dextrinisation.
- Actions chimique et enzymatique : les acides entraînent une hydrolyse partielle de l'amidon qui conduit à la formation de dextrans. Le gel formé est moins épais. Cette hydrolyse est accélérée par une augmentation de température. L'amidon peut subir aussi l'action d'enzymes comme des enzymes végétales, ou animales (amylase) ou microbiennes. (**KARA SLIMANE A., 2010**).

## I.5. Fonction des amylases

### I.5.1. Propriétés liées à l'activité amylolytique

- Spécificités d'action et affinités pour différents substrats :
  - les amylases catalysent toujours le même type de réaction, c'est-à-dire l'hydrolyse des liaisons internes  $\alpha$ -(1-4)-D-glycosidiques constitutives des polysaccharides glucidiques telles que l'amidon et le glycogène (**Prudence M., 2006**).
  - les isozymes de l'amylase ne se comportent pas de la même façon à l'égard de leurs différents substrats (**Zakowski J., Bruns D., 1985**). Vis à vis des amidons solubles, l'amylase salivaire (S) humaine développe une activité supérieure à l'amylase pancréatique (P) humaine, mais, vis à vis des amidons insolubles chromogéniques, c'est l'inverse qui se produit (**Brock A., 1987 ; Stiefel D., Keller P., 1975**). En termes d'affinité, c'est « S » qui a moins d'affinité que « P » pour l'amidon soluble (**Brock A., 1987**). Pour (**Stiefel D., Keller P., 1975**), c'est la nature physique du substrat qui est en cause, et « P » serait une molécule moins compacte que « S ». (**Prudence M., 2006**).

- Activation par les ions  $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{Cl}^-$

Deux ligands non protéiques, les ions  $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{Cl}^-$ , sont d'une importance structurale et fonctionnelle pour les amylases. Les ions  $\text{Ca}^{2+}$  sont connus pour rendre l'amylase résistante à l'attaque protéolytique (**Stein E. et al., 1964**). Plusieurs amylases, dont l'enzyme pancréatique de porc (**Levitzki A., Steer M., 1974**) et l'enzyme de la bactérie *Alteromonas haloplacis* (**Feller G. et al., 1996**) ont recours à l'ion  $\text{Cl}^-$  pour avoir une activité catalytique maximale. Pour ces amylases, l'élimination de l'ion  $\text{Cl}^-$  conduit non seulement à une diminution

significative de leur activité mais aussi à un décalage de leur optimum de pH (**Wakim J. et al., 1969**).

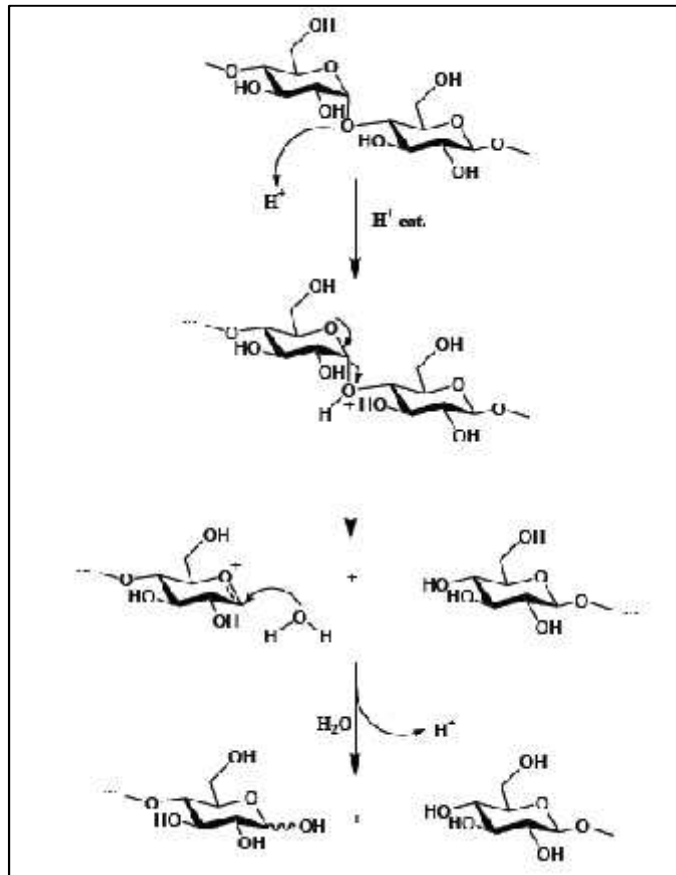
➤ Inhibiteurs

Les amylases sont inhibées par l'EDTA et l'inhibiteur spécifique de l'amylase du grain de blé (*Triticum aestivum*). L'EDTA, agent chélateur, élimine les ions  $\text{Ca}^{2+}$  qui sont nécessaires à l'activité de l'amylase (Fischer et Stein, 1960). L'élimination des ions  $\text{Ca}^{2+}$  déstructure l'amylase et l'expose ainsi à l'attaque protéolytique par d'autres enzymes présentes dans les extraits bruts (**Stein E., Fischer E., 1958**).

### I.5.2. Mécanisme d'action

Le site actif se compose d'un nombre important de groupements chargés, dont trois acides aminés essentiels à l'activité catalytique de l' $\alpha$ -amylase : Asp 231 (nucléophile catalytique), Glu 261 (donneur catalytique de hydrogène) et Asp 328 (l'aide de catalyse) (**McCarter J., Withers., 1996**). En effet la réaction catalytique est réalisée en trois étapes (**Davies G., Henrissat H., 1995**) :

- 1- Protonation de l'oxygène glycosidique par le donneur de proton (Glu 261). Celle-ci, est suivie d'une attaque nucléophile, sur le C1 du résidu du sucre en position 1 par l'Asp 231 et départ de la pièce d'aglycone (**Davies G. et al., 2005**).
- 2- Activation d'une molécule d'eau, vraisemblablement par le maintien du Glu 261 de protonné (**Nielsen J. et al., 2001**).
- 3 - Hydrolyse du lien covalent entre l'oxygène nucléophile de l'Asp 231 et le C1 du résidu du sucre en position 1, permettant l'accomplissement du cycle catalytique (**Nielsen J. et al., 2001**). (figure 06).



**Figure 06 :** Mécanisme d'hydrolyse d'acide de l'amidon, cas de la liaison (1-4), d'après (Bemiller J., 1965).

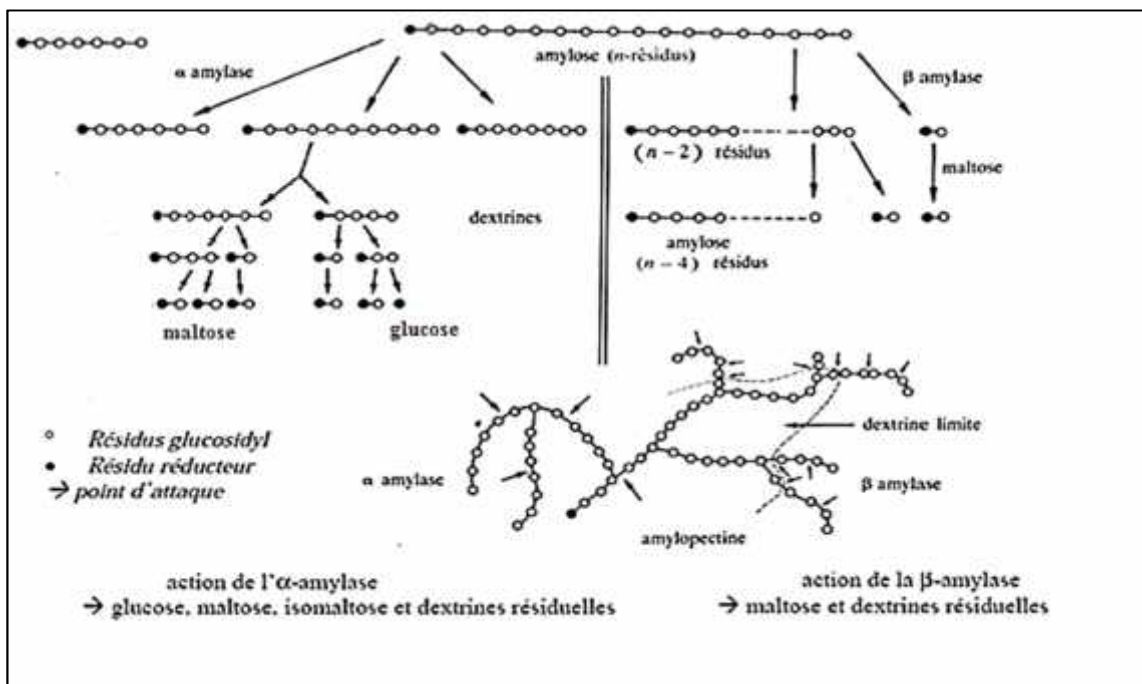
### I.5.3. Mode d'action

En générale, les amylases peuvent agir par différents modes d'action. Selon les conditions (température, pH, taille et structure du substrat), l'enzyme peut utiliser l'un ou l'autre mécanisme et même une combinaison entre plusieurs mécanismes (Mazur A., Nakatani H., 1993).

- Attaque aléatoire : l' $\alpha$ -amylase hydrolyse aléatoirement les liaisons glucosidiques, libérant deux fragments qui seront séparément attaqués.
- Attaque préférée : l' $\alpha$ -amylase montre une préférence pour certaines liaisons dans le substrat.
- Attaque répétitive ou multiple : elle implique le déplacement de l'enzyme tout au long de la chaîne du substrat, pour hydrolyser les liaisons glucosidiques sans se dissocier du substrat (Berry D., Paterson A., 1990).

L'attaque aléatoire de l' $\alpha$ -amylase sur l'amylose conduit à une dégradation rapide du substrat en maltose et en maltotriose, avec une absence de coloration iodique de l'amylase (Nouadri T., 2011) (figure 07).

- La bêta amylase : elle libère surtout du maltose par rupture des liaisons 1-4 : hydrolyse saccharifiant, son action est stoppée au niveau des ramifications (1-6) de l'amylopectine.
- L'amylo 1-4 glucuronidase : utilisé dans la fabrication du dextrose: elle libère du glucose (dextrose) par rupture des liaisons (1-4).(Multon J., 1992).



**Figure 07 :** l'action du  $\alpha$  et  $\beta$  amylase sur l'amylose et l'amylopectine (Anonyme)

## I.6. Sources des amylases

L'  $\alpha$ -amylase est une enzyme produite par des plantes, des animaux et des micro-organismes. Cependant, les sources microbiennes sont les plus préférées pour la production à grande échelle (Zoubiri L., 2012).

### I.6.1 Origine animale

Les amylases d'origine animale sont généralement extraites à partir de la salive et du pancréas des mammifères (French D. et al., 1975).

Les  $\beta$ -amylases animales sont incapables d'hydrolyser la liaison (1-6) de l'amylopectine ou du glycosyl oligosaccharides, l'hydrolyse complète de l'amylose et de l'amylopectine par les  $\alpha$ -amylases animales donne respectivement du maltose et du D-glucose pour l'amylose et du glucose, maltose et des dextrines limites pour l'amylopectine (Coolbear T. et al., 1992).

Cependant, la difficulté réside dans l'approvisionnement de la matière première (organe difficile à collecter) et le cout de l'extraction (**Bertheau Y. et al., 1985**).

Chez l'homme, l'amylase est largement présente dans les sécrétions salivaires (amylase S) et pancréatiques (amylase P). Les amylases humaines S et P sont codées par les gènes Amy 1 et Amy 2A, respectivement, qui sont situés sur le chromosome 1 (**Nishide T. et al., 1986 ; Horii A. et al., 1987 ; Tricoli J., Shows T., 1984**).

Chez les insectes, l'amylase est produite dans le tube digestif moyen (**Sakai T. et al., 2004**). Chez les crustacés, l'amylase est synthétisée dans l'hépatopancréas (**Dall W., Moriarty D., 1983 ; Gibson R., Barker P., 1979**).

### **I.6.2. Origine végétale :**

L'amylase joue chez les plantes un rôle important dans le métabolisme glucidique, où elle participe à l'hydrolyse de l'amidon en produisant des sucres réducteurs (glucose et maltose) directement assimilables (**Badot R., Merlin D., 1984**). Cette enzyme végétale est généralement obtenue par extraction à partir des céréales, notamment le blé, l'orge, le son ou le riz (**Srinivasa M. et al., 2004**).

Elles sont synthétisées par un mécanisme cellulaire compliqué (**Figure 08**), au cours de la germination des graines qui requiert une activité enzymatique très importante pour la mobilisation des réserves et le développement de l'embryon (**Brawn S., Kelly R., 1993**).

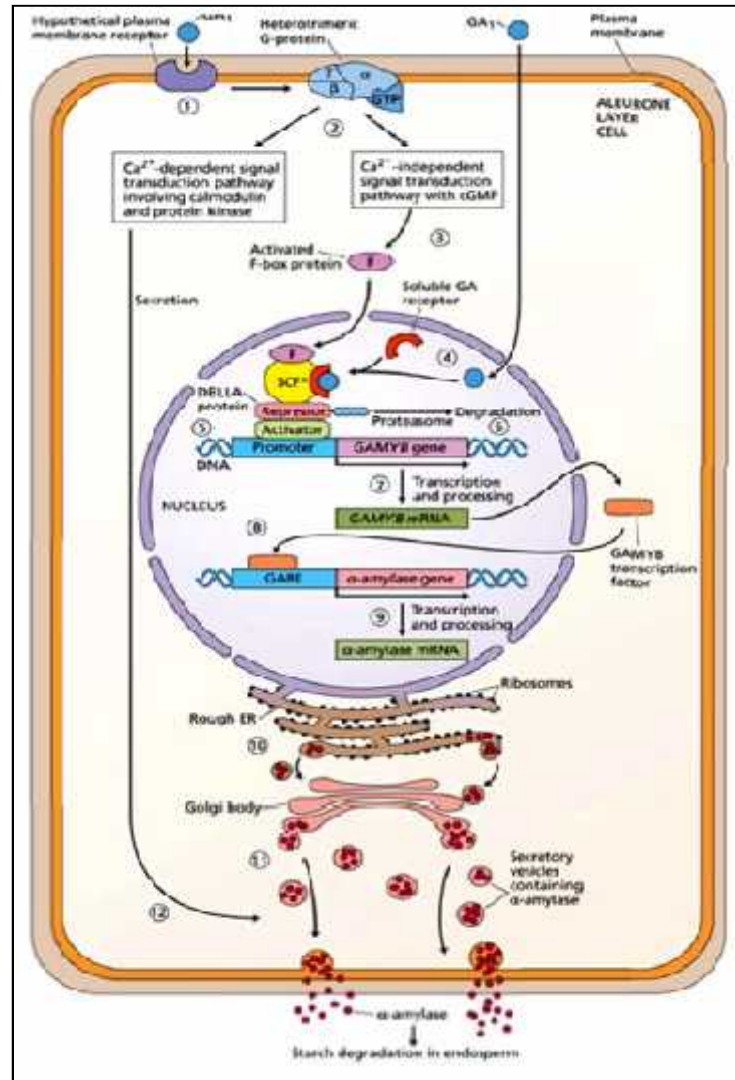


Figure 08 : Biosynthèse de l'  $\alpha$ -amylase végétale (Brawn S., Kelly R., 1993).

### I.6.3. Origine microbienne

On distingue les amylases fongiques et bactériennes, les amylases fongiques différentes des amylases bactériennes par une inactivation par la température, un pouvoir élevé de saccharification et un pH optimal faible (4-5) (Costes C., 1982).

Les amylases des espèces fongiques *A. niger* et *A. oryzae* sont saccharifiantes et forment une grande quantité de maltose et maltohexose, alors que celles des bactéries (*B. licheniformis* et *B. stearothermophilus*) sont liquéfiantes, produisant un mélange de sucres du glucose jusqu'au maltohexose (Sicard P., 1982) (tableau II).

Par ailleurs, les levures participent également à la production de l'  $\alpha$ -amylase (Bouix M., Leveau J., 1999). Leur capacité à assimiler une grande variété de substrat (les hexoses, les pentoses et les polysaccharides), est à l'origine de plusieurs investigations menées sur

elles, dans le but de produire des acides organiques, des enzymes et en particulier les amylase (Benaouida K., 2008).

Tableau II : Différentes origines de l' -amylase microbienne (Saci A., 2012).

		Microorganismes
<b>Bactéries</b>		<i>Bacillus licheniformis</i> , <i>Bacillus steorothermophilus</i> <i>Bacills circulans</i> , <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> <i>Bacills coagulans</i> , <i>Thermomonospora fuska</i> <i>Alteromonas haloplinktis</i> , <i>Termusfiliformis</i> <i>Streptomyces rimosus</i>
<b>Champignons</b>	<b>Moisissures</b>	<i>Aspergillus oryzae</i> , <i>Aspergillus niger</i> . <i>Aspergillus flavus</i> , <i>Aspergillus sojae</i> . <i>Rhizopus oryzae</i> , <i>Rhizopus sp.</i> <i>Penicillium griseoroseum</i> .
	<b>Levures</b>	<i>Saccharmyces cerevisiae</i> , <i>Canadida</i> . <i>Pichia</i> , <i>Endomycopsis</i> , <i>Lipomyces</i> .

## CHAPITRE II

### Les amylases microbiennes

## Les amylases microbiennes

Un grand nombre de micro-organismes (bactéries, levures, moisissures) sont utilisés pour différentes productions dites « par voie microbiologique » : alcool, acides organiques, vitamines, hormones de croissance, antibiotiques, aliments.

Bien entendu, ces micro-organismes sont sélectionnés pour leurs qualités et leur rendement.

Ces micro-organismes sont utiles, ils sont ajoutés en grand nombre et peuvent être ingérés. (Favet M, 2013).

### II .1.Microorganismes d'intérêt industriel

#### II.1.1. Les champignons

##### II.1.1.1.Les moisissures

###### II.1.1.1.1.Définition

Les moisissures sont des champignons microscopiques, qui ont des actions bénéfiques, mais aussi néfastes pour l'homme. Ce sont des eucaryotes, hétérotrophes, donc obligés de puiser dans le milieu de développement les substances nutritives nécessaires à leur métabolisme (Dao H., 2005).

Certaines moisissures vivent en symbiose avec des végétaux, d'autres sont des parasites de végétaux ou d'animaux, d'autres sont des saprophytes, se développant aux dépens de substrats inertes ou en voie de décomposition (Bourgeois C. *et al.*, 1989 ; Leveau J., Bouix M., 1993).

Les moisissures possèdent un appareil végétatif constitué par un thalle filamenteux : le mycélium, dont les filaments s'appellent des hyphes. Le mycélium peut différencier des organes forts variés selon les groupes, spécialisés dans la multiplication et la dissémination, auxquels est accordée la dénomination globale de spores (Bourgeois C. *et al.*, 1989).

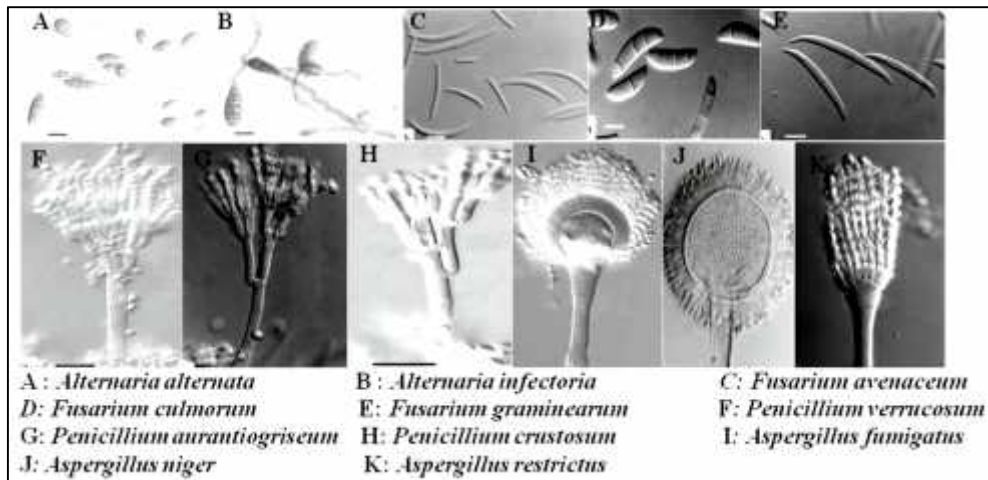
###### II.1.1.1.2.Caractéristiques générales

###### ➤ Structure :

Les moisissures sont des eucaryotes non photosynthétiques et immobiles (à cause de la rigidité de leur paroi). Elles possèdent un appareil végétatif dépourvu de tiges, de racines et de feuilles appelé thalle (Botton B. *et al.*, 1990) (figure 09).

Les cellules de moisissures forment des filaments (hyphes) où chacun montre une croissance apicale. La ramification des hyphes au cours de leur croissance sur un substrat donne le mycélium ; un mycélium et ses spores forment le thalle, détectable à l'œil nu (Guiraud J., 1998 ; Perry J. *et al.*, 2004 ; Walker G., White N., 2005). Dans la majorité des cas, la cellule végétative d'un hyphe contient plus d'un noyau, parfois de centaines. La paroi

de la plupart des moisissures est chitineuse ; la chitine est un polymère formé d'unité de N-acétyl glucosamine (Madigan M., Martinko J., 2007).



**Figure 09 :** Quelques moisissures rencontrées dans le grain de blé, observation au microscope optique (x100) (Kerchime M., 2013).

#### ➤ **Habitat :**

Lorsque les conditions environnementales sont favorables (humidité, température et substrats organiques disponibles), les moisissures se développent. Beaucoup d'espèces se produisent dans les habitats froids, périodiquement arides ou autres, apparemment inhospitaliers (Isaac S. *et al.*, 1993). Il est important de souligner que les conditions optimales pour la croissance et la reproduction des moisissures changent considérablement d'une espèce fongique à une autre, d'où une biodiversité de mycètes qui tend à augmenter dans les régions tropicales, certains sont spécifiques à des endroits étroitement limités (Swann E. *et al.*, 1999).

#### **II.1.1.1.3. Intérêts des moisissures**

##### ➤ **Intérêt industrielle :**

Actuellement, les moisissures jouent un rôle primordial dans divers domaines d'applications ; elles sont utilisées dans les industries alimentaires, chimiques, la biolixiviation et la biotransformation, etc. Cependant l'industrie n'exploite commercialement qu'un petit nombre de métabolites de quelques espèces seulement (Boiron P., 1996). Leur intérêt économique repose sur leur activité biologique dans la production d'une grande diversité de molécules produites au cours des métabolismes primaires et secondaires, exploitées en particulier par l'industrie pharmaceutique et en médecine (Larpend-Gourgaud M., Sanglier J., 1992).

➤ **Intérêt alimentaire :**

Les champignons filamenteux sont des producteurs importants d'acides organiques, tels que l'acide gluconique, l'acide malique, l'acide acétique et l'acide citrique (**Leveau J., Bouix M., 1993 ; Boiron P., 1996**). Ce dernier est notamment produit par *Aspergillus niger*, où 60% de sa production est destinée au secteur alimentaire (**Botton B. et al., 1990**).

➤ **Intérêt chimique :**

Il s'agit essentiellement de l'utilisation des protéases alcalines d'*Aspergillus oryzae* et *Stachybotrys chartarum* dans les détergents (**Miller J., 2002**).

La production de cellulase par *Aspergillus niger* et *Trichoderma harzianum* présente une diversité d'applications industrielles, où 48% de sa production par ces deux espèces fongiques et le genre *Penicillium* est utilisée pour l'industrialisation des papiers et les textiles (**Delgado-Jarana J. et al., 2002**).

En biotransformation, les moisissures ont une zone étroite d'application. Un exemple remarquable est l'hydrolyse enzymatique de la pénicilline par *Penicillium chrysogenum* et *Fusarium* entraînant la formation d'acide amino-6-pénicillanique qui est un intermédiaire important de la production de pénicillines semi synthétiques telles que l'ampicilline et l'amoxicilline (**Durand G., Monson P., 1982**).

➤ **Intérêt sanitaire :**

La diversité d'action des moisissures est remarquable dans le domaine de la santé. Elle se manifeste notamment dans la fabrication d'antibiotique (la pénicilline de *penicillium notatum*), de vitamines, d'hormones et de nombreuses substances pharmacologiquement actives (**Leveau J., Bouix M., 1993 ; Ellaiah P. et al., 2003**).

➤ **Intérêt médical :**

Les premiers produits d'origine fongique en médecine sont les alcaloïdes de l'ergot de seigle (ergotamine), utilisés en gynécologie et pour diverses autres indications (**Boiron P., 1996; Botton B. et al., 1999**). La découverte de la cyclosporine, puissant agent immunodépresseur, puis la mise en évidence de corrélation entre l'activité de certaines enzymes et diverses pathologies ont permis de donner un grand essor aux sciences médicales et pharmaceutiques (**Botton B. et al., 1999 ; Richard K., 2005**).

### II.1.1.2 Les levures

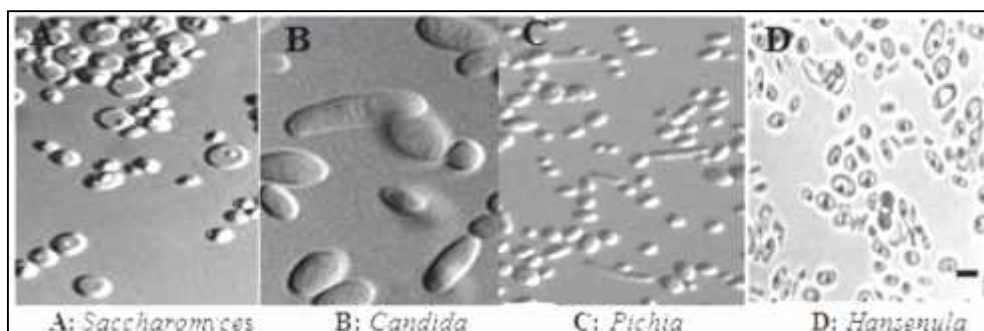
#### II.1.1.2.1. Définition

Les levures sont des champignons unicellulaires sur une partie ou sur l'ensemble de leur cycle végétatif. Certaines peuvent former des associations cellulaires, ou se présenter sous forme filamenteuse à certains stades de leur vie (Bouix M., Leveau J., 1991). Elles se reproduisent par bourgeonnement ou par fission binaire (Kreger-Van N., 1984). Leurs cellules sont généralement ovoïdes et leur taille varie de quelques microns à 30 microns (Bouix M., Leveau J., 1991). Les levures se différencient nettement des bactéries par leur structure cellulaire eucaryote, le cytoplasme contient les organites habituels des eucaryotes. (Guiraud J., 1998).

#### II.1.1.2.2. Caractéristiques générales

##### ➤ Structure :

Les levures sont des cellules eucaryotes. Elles présentent une structure plus complexe que celle des bactéries notamment par la présence d'un noyau, de mitochondrie, d'un appareil de Golgi et de plus d'un chromosome (*saccharomyces cerevisiae* à 16 chromosomes) (Labrecque M., 2003). Les cellules végétatives sont généralement ovoïdes ou sphériques, mais il existe d'autres formes spécifiques : triangulaires, ogivales, en forme de citron ou même en forme de bouteille (figure 10). Leur taille cellulaire varie de quelques microns jusqu'à 25 à 30 microns. Les colonies sont, en général, blanches (très rarement roses ou rouges) et régulières (Guiraud J., 1998).



**Figure 10 :** Exemples de levures dans le grain de blé observées au microscope optique (x100) (Kerchime M., 2013).

##### ➤ Habitat

Dans la nature, les levures se trouvent principalement sur les végétaux riches en sucres directement assimilables (Bouix M., Leveau J., 1991). D'autres, se développent au niveau des eaux douces et profondes associées au plancton (Van-Uden N., Fell J., 1968 ; Ahearn D.,

1973). Par ailleurs, une large variété de levures vit dans le sol, plus ou moins représentative de la flore levurienne associée aux plantes, champignons et animaux vivants à la surface. Néanmoins, pour d'autres espèces, le sol demeure leur seul habitat (Phaff H., Starmer W., 1987).

#### II.1.1.2.3. Intérêt industriels :

Par un métabolisme diversifié, les levures occupent une place essentielle dans l'industrie alimentaire. Elles participent à l'élaboration de nombreux produits alimentaires (panification, fromagerie, brasserie,...) et dans la production des enzymes (l'invertase, lactase, lipase et les amylases...) (Simon P., Meunier R., 1970), du glycérol ainsi que certaines vitamines et solvants, mais aussi à la revalorisation de déchets agricoles, industriels et à la production des protéines (Scriban R., 1984 ; Leclerc H. *et al.*, 1995). Les biotechnologies et la recherche biomédicale exploitent ainsi largement ces microorganismes, pour la production de molécules d'intérêt médical (ex : production de protéines hétérologues, comme le vaccin de l'hépatite B) (Mercier C., 1997 ; Blin C., 2002).

##### ➤ Production de protéines :

Les levures constituent une source précieuse de protéines car elles sont le siège d'une biosynthèse protéique très active. Elles sont utilisées à la production de "protéines d'organismes unicellulaires" (POU) ou "single cellprotéins" (SCP), qui sont souvent incorporées à l'alimentation animale et humaine. Cette production peut s'effectuer sur des substrats considérés comme des déchets tels que le lactosérum et les résidus de pâte à papier. (Pol D., 1996).

##### ➤ Panification :

Une autre utilisation, connue depuis l'antiquité, est la fabrication du pain : Le dégagement de gaz carbonique, qui accompagne la fermentation, permet de faire lever la pâte en lui conférant une texture légère. On utilise également *Saccharomyces cerevisiae* (levure de boulangerie) (Simon P., Meunier R., 1970 ; Cofalec N., 2006).

##### ➤ Production d'alcools industriels :

Depuis quelques temps, une nouvelle utilisation des levures est apparue. Les levures, essentiellement des souches du genre *Saccharomyces*, grâce à leur haute capacité fermentaire, peuvent assurer la bioconversion de nombreux substrats saccharosés(jus de betteraves, sirop, mélasse de sucrerie) en bioéthanol (Leveau J., Bouix M., 1993).

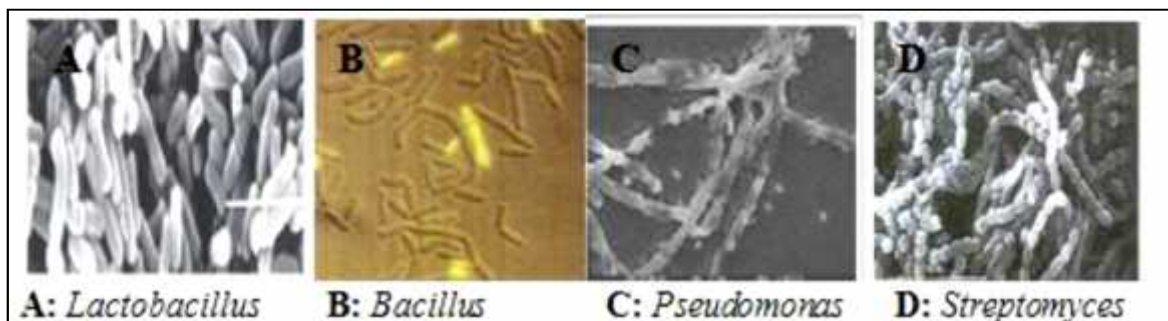
## II.1.2. Les bactéries

### II.1.2.1. Définition

Les bactéries sont des organismes vivants unicellulaires procaryotes ; dont la structure cellulaire ne comporte pas de noyau, de taille microscopique (Leur taille varie de 1 à 10 microns ( $\mu\text{m}$ ) visibles uniquement à l'aide d'un microscope. Antoine van Leeuwenhoek fut le premier à observer des bactéries, grâce à un microscope de sa fabrication, en 1668. Il les appela « animalcules » et publia ses observations dans une série de lettres qu'il envoya à la Royal Society. Le mot « bactérie » apparaît pour la première fois avec le microbiologiste allemand Christian Gottfried Ehrenberg en 1828. Les bactéries sont ubiquitaires et sont présentes dans tous les types d'écosystèmes mais également dans les êtres vivants (Desaunay A., 2011).

### II.1.2.2. Structure et morphologie des bactéries

On trouve de nombreuses espèces bactériennes qui se distinguent les unes des autres par leur morphologie, leur composition chimique, leur mode de vie et de nombreux autres facteurs, comme leur fonction dans un écosystème. Les morphologies bactériennes peuvent être très variées. Les cellules peuvent être courtes, pratiquement sphériques (cocci ou coques) ou allongées (bacilles). Les bacilles sont essentiellement des cylindres à extrémités hémisphériques mais on en connaît aussi à extrémités fines, pointues (formes en fuseau) ou au contraire planes (bacilles dits « à bouts carrés »). Certains corps bacillaires sont incurvés ou spiralés. Afin de se protéger des variations de l'environnement (pression osmotique, température, teneur en oxygène, eau...), les bactéries sont enveloppées par une paroi cellulaire particulière. La paroi est une structure rigide et résistante qui entoure le cytoplasme et sa membrane et lui donne sa forme (Desaunay A., 2011) (figure 11).



**Figure 11:** Exemple de Bactéries dans le grain de blé observées au microscope optique (x100) (Kerchime M., 2013).

Malgré les variations structurales, la paroi des bactéries contient une molécule originale, le peptidoglycane. Celui-ci constitue une structure très rigide autour de la cellule,

c'est un véritable exosquelette responsable de la forme des bactéries. La densité du réseau de peptidoglycane (PG) permet de distinguer deux types de bactéries : les bactéries à Gram positif et les bactéries à Gram négatif (**Desaunay A., 2011**).

#### ➤ **Besoins nutritionnels des bactéries**

Les bactéries utilisent pour se nourrir divers sucres et hydrates de carbone, des acides aminés, des stérols, des alcools, des sels inorganiques et du dioxyde de carbone. Cependant, individuellement aucune bactérie ne peut utiliser tous ces composés car elle ne dispose pas de toutes les enzymes requises et son enveloppe cellulaire ne contient pas les systèmes d'absorption nécessaires. Certaines bactéries satisferont tous leurs besoins nutritifs avec des simples sels inorganiques et des substances comme le dioxyde de carbone et l'ammoniaque. D'autres requièrent à divers degrés des composés organiques plus au moins complexes, provenant d'autres organismes (**Baudry Ch., Brezellec H., 2006**).

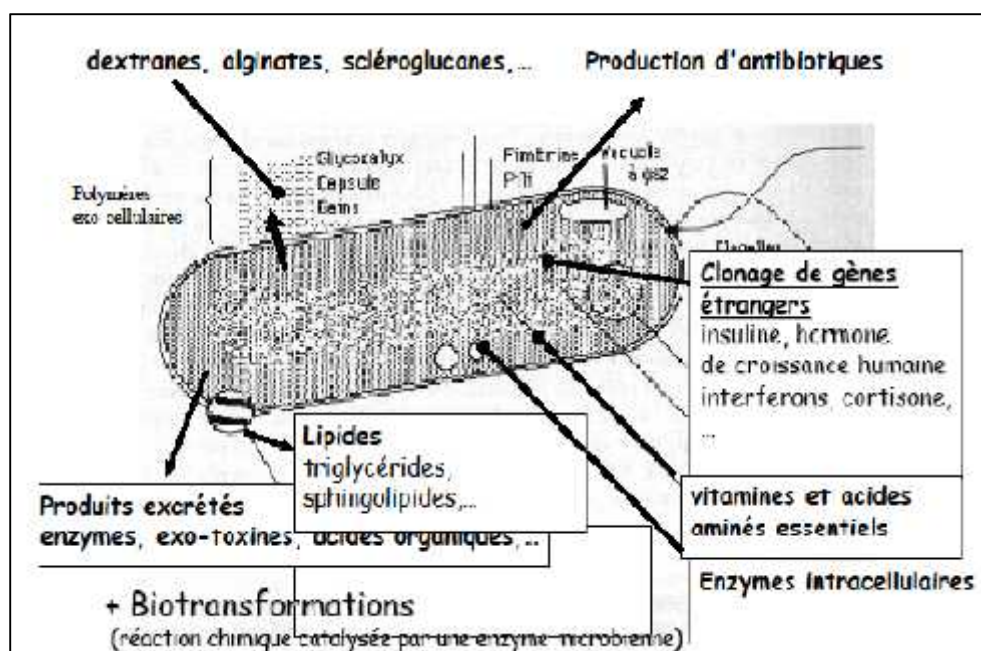
Les bactéries sont classées en trois catégories selon la température de croissance (mésophiles : 20°C ; psychrotrophes : <20°C ; psychrophiles : 0°C ; thermophiles : >40°C). Les bactéries aérobies strictes ne se développent qu'en présence d'oxygène, les bactéries microaérophiles se développent mieux ou exclusivement lorsque la pression partielle d'oxygène est inférieure à celle de l'air, les bactéries aéroanaérobies facultatives se développent avec ou sans air et les bactéries anaérobies strictes ne se développent qu'en absence totale, ou presque, d'oxygène, qui est le plus souvent toxique (**Branger A. et al., 2007**).

L'humidité est primordiale, car l'eau est l'élément indispensable au développement des bactéries ( $A_w$  de 0,95 à 0,98) (**Roquebert M., 2002**). Le pH optimal de croissance de la plupart des bactéries se situe aux alentours de la neutralité, certaines bactéries se développent en milieu acide ; bactéries acidophiles : pH <7, alors que d'autres prolifèrent à un pH basique ; basophiles : > 9 (**Baudry Ch., Brezellec H., 2006**).

#### **II.1.2.3. Intérêt industriel**

Les bactéries ont une importance considérable dans les cycles biogéochimiques comme par exemple le cycle du carbone et la fixation de l'azote de l'atmosphère. La très grande majorité des bactéries sont inoffensives ou bénéfiques pour l'organisme. Il existe cependant des espèces pathogènes à l'origine de beaucoup de maladies infectieuses (le choléra, la syphilis, la peste, l'anthrax, la tuberculose). De plus les bactéries présentent des propriétés biotechnologiques intéressantes. Elles sont notamment utilisées dans l'agroalimentaire lors de la fabrication des yaourts ou du fromage et dans la production

industrielle de nombreux composés chimiques. Plus récemment les industriels et scientifiques se sont intéressés aux capacités des microorganismes pour décontaminer les sols et eaux polluées ( **figure 12**). (Desaunay A., 2011).



**Figure 12 :** Représentation schématiques des produits microbiens d'intérêt industriel (Goudjal M., 2005).

### ➤ Intérêt alimentaire

Dans l'industrie alimentaire ces microorganismes permettent la conversion d'une grande variété de matières premières, conduisant ainsi à de nombreux produits : les saucissons, les laits fermentés, les fromages, les olives fermentés et certains vins. Parmi ces applications, l'industrie laitière est, sans doute, le plus grand utilisateur de ferments lactiques commerciaux (Axelsson L., 2004 ; Streit F. *et al.*, 2007). (tableau III).

### ➤ Intérêt chimique et médical

Les bactéries lactiques sont également utilisées dans l'industrie chimique (production d'acide lactique), dans le domaine médical (notamment pour le traitement de dysfonctionnements intestinaux) et dans l'industrie des additifs alimentaires (production d'exopolysaccharides). (Rodriguez J. *et al.*, 2003).

**Tableau III : Principaux produits issu de la fermentation des bactéries lactiques (Penaud S., 2006) :**

Genres	Substrat	Exemple de produits
<i>Bifidobacterium</i>	lait	Laits fermentés
<i>Lactobacillus</i>	lait	Yaourts, laits fermentés, Kéfir, fromages
	viande	Saucissons secs, jambons
	végétaux	Choucroute, olives, "yaourts" au lait de soja
	céréales	Pain au levain, bières
<i>Lactococcus</i>	lait	Fromages, Kéfir
<i>Leuconostoc</i>	végétaux	Choucroute, olives, vin
<i>Pediococcus</i>	végétaux	Choucroute
	viande	Saucisses semi-séchées
<i>Oenococcus</i>	végétaux	Vin
<i>Streptococcus</i>	Lait	Lait yaourts, laits fermentés, fromages

➤ **Industrie pharmaceutique**

Elles sont utilisées pour l'obtention des produits pharmacologiques actifs (Alcaloïdes, Analgésiques, Anti inflammatoires, Anti -tumoraux...) et de certains pesticides : nématocides, fongicides, insecticides (protoxine par *Bacillus, thuringiensis*). (Goudjal M ; 2006).

➤ **Biosynthèse des substances d'intérêt**

L'utilisation de micro-organismes transformés permet de produire des substances thérapeutiques jusqu'alors impossibles à synthétiser :

- ❖ Hormone de croissance humaine ou bovine par *E.coli*.
- ❖ Insuline humaine par *E.coli*.
- ❖ Leptine (hormone protéique associée à l'obésité) par *E.coli*. (Goudjal M., 2006).

➤ **Production des enzymes :**

Elles sont produites par la majorité des actinomycètes, les plus intéressantes sont celles produites par les espèces thermophiles comme *Thermoactinomyces vulgaris*, *Thermomonospora curvata*, *Saccharomonospora viridis* et les espèces du genre *Streptomyces* (Demain A., Solomon N., 1985).

## II.2. Amylases microbiennes

Dès que le développement de la microbiologie a permis de mieux comprendre les systèmes qui président à la synthèse des enzymes chez les micro-organismes, la production d'enzymes s'est orientée vers les processus fermentaires. En effet, pour les applications nouvelles, le potentiel génétique des micro-organismes permet la flexibilité nécessaire à la maîtrise des procédés. De plus, il a été possible d'intégrer, dans les méthodes de développement et de production, les importantes acquisitions des connaissances concernant la physiologie microbienne, la technologie des fermentations, ainsi que les techniques de séparation des macromolécules biologiques (Joyeaux A., 1982 ; Bouix M., Leveau J., 1999).

Les principaux avantages des enzymes de fermentation par rapport aux enzymes d'extraction sont les suivants :

- Une production indépendante des contraintes saisonnières et géographique.
- Une possibilité d'utilisation de matière bon marché.
- Un rendement de production pouvant être augmenté de façon importante par l'amélioration des souches microbiennes et l'optimisation de conditions de fermentations.

Par ailleurs, les enzymes d'origine microbienne présentent des propriétés et des spécificités diverses (Bouix M., Leveau J., 1999). Les micro-organismes utilisés dans la production de l'  $\alpha$ -amylase sont (tableau IV) :

### II.2.1. Les bactéries

L'amylase peut être produite par différentes espèces bactériennes, l'amylase est principalement dérivée du genre *Bacillus* : *Bacillus licheniformis*, *Bacillus stearothermophilus*, et *Bacillus amylolique-faciens*. Ces amylases trouvent des applications potentielles dans un certain nombre de procédés industriels tels que de la nourriture, de la fermentation, industries textiles et du papier (Konsoula Z. et al., 2007 ; Pandey A., 2000).

L'amylase peut être produit par différents types de microorganisme, mais pour des usages commerciales, l'amylase est essentiellement dérivé du genre *bacille stearo thermophile* et la *bacille amylolique-faciens* sont potentiellement utilisées dans nombre de

processus industrielles comme dans la nourriture, la fermentation des textiles et dans l'industrie du papier (**Pandey A., 2000**).

La thermo-stabilité est une caractéristique désirée pour la plupart des enzymes isolés des organismes thermostables. Des organismes thermophiles ont trouvé un nombre d'usage commercial à cause de leur stabilité. Tant que la liquéfaction enzymatique et la saccharification de l'amidon sont faites sous hautes températures (100-110 C), les enzymes amylolytiques sont de nos jours utilisés pour l'amélioration des processus industriels de la dégradation de l'amidon ainsi qu'ils sont d'un grand intérêt pour la production de produits de valeur comme le glucose, le dextrose cristallin, le dextrose sirop le maltose et les maltodextrines. *Bacillus subtilis*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus licheniformis* et *Bacillus amyloliquefaciens* sont connues pour leur bonne production d'amylase thermostable ainsi qu'elles ont été largement utilisées pour la production commerciale de l'enzyme pour des applications diverses. Les amylases thermostables ont été produites à partir de plusieurs souches bactériennes ainsi qu'ils sont produits en utilisant le SmF et le SSF. Cependant, l'usage du SSF s'est avéré plus avantageux que le SmF ainsi qu'il permet une production moins chère des enzymes. La production de l'amylase par le SSF est limitée au gène Bacille, *B.subtilis*, *B. polymyxa*, *B. mesentericus*, *B. vulgaris*, *B. megaterium* et la *Bacillus licheniformis* a été utilisée pour la production de l'amylase dans le SSF (**Souza P., 2010**).

Actuellement, les amylases thermostables de la *Bacillus stearothermophilus* ou la *Bacillus licheniformis* sont utilisées dans les industries à base d'amidon (**Gomes I. et al., 2003**). Les enzymes produits par quelques microorganismes halophiles ont une activité optimale dans une haute salinité et peuvent alors être utilisés dans plusieurs processus industriels durs où les solutions, salées concentrées, utilisées, peuvent d'autre part inhiber plusieurs conversions enzymatiques. En outre, la plupart des enzymes des bactéries halophiles sont considérablement thermotolérantes et restent stables dans une température ambiante pendant de longues périodes. Les amylases halophiles se distinguent des bactéries halophiles comme la *chromohalobactersp*, *halobacillesp*, *haloarculahispanica*, *halomonasmeridiana* et les *Bacillus dispsosauri*. (**Deutch C., 2002**).

### II.2.2. Les champignons

La plupart des rapports concernant les champignons qui produisent l'amylase ont été limités à quelques types de champignons mésophiles ; et des essais ont été élaborés pour trouver les conditions culturelles et pour choisir des souches supérieures des champignons

afin de les commercialiser. Les sources de champignons sont limitées aux isolants terrestres surtout à l'*Aspergillus* et au *penicillium* (Kathiresan K., Manivannan S., 2006).

La souche *Aspergillus* produit une large variété d'enzymes extracellulaire et les amylases sont les plus industrialisées. Les champignons filamenteux tel que l'*Aspergillus oryzae* et l'*Aspergillus niger* produisent des quantités considérables d'enzymes utilisés principalement dans l'industrie. L'*Aspergillus oryzae* a attiré une grande attention comme un hôte favorable pour la production des protéines hétérologues car ils sont aptes de sécréter une quantité considérable de protéine de haute valeur et d'enzyme industriels, exemple : l'amylase.

L'*Aspergillus oryzae* est utilisée largement pour la production de nourritures comme la sauce de soja, l'acide organique tel que les acides acétiques, et les enzymes commerciales y compris l'amylase. L'*Aspergillus niger* à des capacités hydrolytiques importantes dans la production d'amylase et grâce à sa tolérance à l'acidité (pH < 3), il permet la production de la contamination bactérienne. Les champignons filamenteux sont des microorganismes convenables pour la fermentation à l'état solide (SSF), notamment car leur morphologie les permet de coloniser et de pénétrer le substrat solide. Les amylases des champignons sont préférées autour d'autres sources microbiennes grâce à leur statut GRAS (Généralement Reconnu comme protégé) plus accepté. Les champignons thermophiles tels que *Thermomyces lanuginosus*, est un excellent producteur d'amylase. (Souza P., 2010).

**Tableau IV : Exemples de production de l' -amylase par des microorganismes et leurs propriétés physico-chimiques (Nouadri T., 2011).**

	Microorganisme	T° OPT	pH OPT	P.M. (DALTON)	PI
Bactéries	<i>Bacillus sp</i>	60	11-12	96.000	-
	<i>Bacillus Subtilis</i>	-	-	59.000	-
Moisissures	<i>Aspergillus awamori</i>	50	4.8-5.0	54.000	4.2
	<i>Aspergillus flavus</i>	55	6.0	52.500	-
	<i>Aspergillus fumigatus</i>	40	5.5	65.000	-
	<i>Aspergillus oryzae</i>	50	4.5-5.0	59.000	-
	<i>Penicillium xpansum</i>	60	4.5	64.000	-
	<i>Rhizopus sp</i>	60-65	4.0-5.6	64.000	-
Levures	<i>Saccharomycopsis Cerevisiae</i>	60	60	-	-

## **Chapitre III**

Production et intérêt des  
amylases microbiennes

### ***Production et Intérêt des amylases microbiennes***

La production des amylases, malgré les progrès technologiques, reste à la moindre échelle et ne dépasse que rarement les expérimentations. La diversité des microorganismes producteurs des amylases (bactéries, levures et champignons), ainsi le besoin à des équipements sophistiqués de culture, de production et d'extraction de ces enzymes ; diminue leur production à l'échelle industrielle. Dans cette partie, on essaye de mettre en relief les techniques utilisées, ainsi les protocoles expérimentaux adoptés pour aboutir à une meilleure production des amylases microbiennes. Les microorganismes producteurs des amylases, les plus utilisés sont les champignons ; c'est la raison pour laquelle, qu'on a pris un exemple de la production d'amylase à partir des moisissures.

#### **III.1. Production d'amylase par les moisissures**

##### **III.1.1. Isolement**

La plupart des milieux naturels air, sol, eau et matières premières alimentaires peuvent servir de matériel de départ pour l'isolement des moisissures (**Clark H. et al., 1985 ; Karam H., Karam N., 2000 ; Julien R., 2002**), ces échantillons naturels contiennent aussi plusieurs espèces bactériennes et des levures. L'élimination de ces microorganismes pour l'isolement sélectif des champignons filamenteux est réalisé en le combinant traitement des milieux de cultures par un antibiotique avec le choix et le contrôle des conditions de culture. Il est important de choisir un échantillon aussi important que le permet la mise en évidence du microorganisme désiré (**Ulacio D. et al., 1997**).

##### **III.1.1.1. Choix d'échantillons naturels**

Le choix de l'échantillon naturel est déterminant pour la mise en évidence du microorganisme recherché. Initialement, les souches microbiennes ont souvent été isolées du sol ou d'éléments naturels (**Julien R., 2002**). Généralement les microorganismes producteurs des hydrolases sont localisés là où ces substances sont abondantes (**Dendouga W., 2006**).

##### **III.1.1.2. Addition des antibiotiques**

L'isolement des moisissures est réalisé le plus souvent à partir de produits contenant également des bactéries et des levures, donc il est nécessaire d'employer des inhibiteurs spécifiques pour les détruire. L'addition d'antibiotiques aux milieux de cultures est utilisée pour empêcher le développement des bactéries. Les antibiotiques utilisés sont : le chloramphénicol 0,5 mg/ml, l'oxytétracycline 0,1 mg/ml, la streptomycine 30 à 40 µg/ml, la

colistine 0,08 mg/ml, la novobiocine 0,1mg/ml ou des colorants (rose Bengale 35 à 67mg/l, cristal violet 10mg/l) (Guiraud J., 1998). En raison de leur stabilité, la gentamycine et la chloramphénicol peuvent être stérilisés avec le milieu; leurs larges spectres d'action en font des antibiotiques très utilisés (Botton B. et al., 1999).

Lorsque les levures sont très abondantes dans le milieu, il est parfois possible d'utiliser de l'actidione mais à faible concentration de façon à ne pas inhiber la croissance des champignons filamenteux recherchés (concentration à 2 mg/l) (Guiraud J., 1998 ; Waller J., 2004).

### III.1.1.3. Choix des milieux de cultures sélectifs

Le choix des milieux de cultures est également déterminant dans l'isolement des moisissures (Harrigan W., McCance M., 1976). Les milieux de cultures solides utilisés pour l'isolement des moisissures sont: Malt Agar (MA), Potato Dextrose Agar (PDA) et Sabouraud commercialisé (Zoubiri L., 2012). Les milieux d'isolement de base (et de numération des spores) sont souvent communs à ceux décrits pour les levures tels que Czapek, le milieu malté (Chakraborty R. et al., 1995 ; Biezen C. et al., 1977) ou le milieu de Mossel (Botton B. et al., 1999). Lors des isollements, ce dernier inhibe la prolifération des bactéries en raison de leur acidité (Dendouga W., 2006).

### III.1.1.4. Conditions d'isolement

Pour permettre l'expression la plus complète possible des microorganismes recherchés, il convient de retenir au laboratoire les facteurs et paramètres de l'environnement naturel qui ont pu favoriser l'implantation d'une flore particulière. La plupart des moisissures requièrent pour leur développement de l'oxygène et croissent bien en l'absence de lumière. Leur tolérance à l'égard du pH est souvent étendue mais avec généralement une préférence pour les pH légèrement acides. Concernant la température, leur gamme compatible avec la croissance est très large et diffère selon les espèces (Botton B. et al., 1999 ; Julien R., 2002 ; Coulibaly L., Agathos S., 2003).

### III.1.2. Identification des souches

L'identification fait essentiellement appel aux caractères cultureux et morphologiques des moisissures isolées à l'état pure (Botton B. et al., 1990).

### III.1.2.1. Caractères cultureux

Ce sont les critères macroscopiques tels que la vitesse de croissance, texture et couleur du thalle, couleur du revers de la culture, odeur de l'exsudat et présence ou absence d'un pigment diffusible (Gacem M., 2012).

### III.1.2.2. Caractères morphologiques

C'est l'étude microscopique du mycélium, nature des organes différenciés et l'étude biométrique (Gacem M., 2012).

L'identification des moisissures dépend d'une part, de l'examen macroscopique effectué sur un milieu PDA (Potato Dextrose Agar)(préparé au laboratoire) coulé en boîtes de Pétri dont l'aspect extérieur de la culture reste un indice très important pour prévoir le genre, et de l'examen microscopique effectué sur une préparation à l'état frais, après fixation au lactophénol, d'autre part (Zoubiri L., 2012).

### III.1.3. Purification des souches

La purification des souches contaminées s'effectue par prélèvement d'un hyphes terminal qui sera cultivée sur un milieu PDA neuf. La souche est ensemencée au centre de la boîte grâce à une anse de platine stérile, puis incubé à 28 °C jusqu'à un développement suffisant de la souche pour qu'elle soit prélevée pour faire l'objet de plusieurs repiquages permettant l'obtention d'une culture pure représentée par une seule espèce (Zoubiri L., 2012).

### III.1.4. Conservation

Les moisissures sont conservées par la méthode la plus simple et la plus communément utilisée au laboratoire qui consiste à repiquer ces souches à la fin de leur croissance en tubes sur gélose inclinée (Botton B. *et al.*, 1999), en utilisant comme milieu de conservation le CYA (Parks C., 1997). Après une semaine d'incubation à 30°C, les cultures sont conservées à 4°C (Botton B. *et al.*, 1999) ou par congélation en présence de substance cryoprotectrices tel que le glycérol (Bouchet P. *et al.*,1999).

### III.1.5. Production des amylases

Les amylases sont produites par une grande variété d'organismes vivants, allant des microorganismes aux plantes et aux animaux. A l'échelle industrielle, les amylases sont produites à partir de cultures microbiennes (milieu liquide et solide) ou par maltage des céréales (Khady B., 2013).

### III.1.5.1. Production de l' $\alpha$ -amylase en milieu solide

L'hydrolyse de l'amidon, en milieu solide par un microorganisme, est due à une action de l'  $\alpha$ -amylase qui se traduit par un éclaircissement autour des spots d'ensemencement. Si les microorganismes sont de genre amylase négative, le milieu reste inchangé et uniformément opalescent (Sodhi H. *et al.*, 2005). Le traitement de la surface du milieu solide, par une solution de Lugol diluée, donne avec l'iode un composé bleu violacé, tandis que la zone claire reste non colorée ; à cet endroit l'amidon a été hydrolysé (Sudo S. *et al.*, 1994 ; Solis P. *et al.*, 1993).

#### III.1.5.1.1. Préparation de l'inoculum

Pour la préparation de l'inoculum, 40ml du milieu PDA sont placés dans des erlenmeyer de 250ml. Ils sont ensuite ensemencés avec du mycélium. Après une incubation de 5 jours à 20-22°C, 50ml d'eau distillée stérile sont ajoutées et les spores sont suspendues par agitation (Nouadri T., 2011).

#### III.1.5.1.2. Préparation du milieu solide

La préparation d'une gélose nutritive en poudre se fait dans des Erlen-meyer de 250 ml, la composition du milieu nécessite 100 ml d'eau distillée, 2g d'amidon soluble, 10g de déchet organique (déchets d'orange ou de datte), 2g d'agar, 0.25g d'extrait de levure ; le pH est ajusté à 5.0. Le mélange est placé sur un agitateur magnétique chauffant. La solution est chauffée progressivement jusqu'à la formation d'un gel homogène. Après stérilisation, on laisse refroidir avant d'ajouter 200  $\mu$ l d'ampicilline pour tous les 100 ml de milieu afin d'éviter toute contamination. Ensuite le milieu est réparti dans des boîtes de pétri à raison de 40 ml de milieu par boîte. Après solidification le microorganisme (par exemple : *P. camemberti*) est ensemencé sur le milieu solide par touche d'environ 3mm de diamètre et incubé à 20-22°C pendant 7 jours. Les tubes à essai sont stérilisés à 110°C pendant 30 min et fermés stérilement (Nouadri T., 2011).

#### III.1.5.1.3. Inoculation et incubation du milieu solide

Après homogénéisation le milieu stérile est coulé dans des boîtes de pétri. Après séchage à l'étuve à 40°C pendant 20 min, la souche est ensemencée sur le milieu solide par stries et incubée à 20-22°C pendant 7 jours. (Nouadri T., 2011).

#### III.1.5.1.4. Recherche de l'activité $\alpha$ -amylasique dans le milieu de culture

La révélation des zones d'hydrolyse se fait après addition de 10 ml d'une solution iodée (Iugol: iodure de potassium 20 g, iode 10 g pour 100 ml d'eau distillée) qui donne une zone transparente par rapport aux zones qui contiennent de l'amidon non hydrolysé et qui apparaissent bleues. La formation d'une zone claire autour des colonies fongiques est considérée comme un test positif pour l'activité de l'amylase (Sindhu G. *et al.*, 2005 ; Rina R. *et al.*, 2001).

#### III.1.5.2. Production d' $\alpha$ -amylase par fermentation submergée

La fermentation submergée est une fermentation où le substrat est soluble, permettant une bonne homogénéisation des composants de milieu. Pour cela, il faut retenir ;

- Seules les souches répondant positivement au test amylolytique sont retenues pour la suite de travail qui comporte :
  - ✓ L'étude de la cinétique de production de biomasse et d'  $\alpha$ -amylase en suivant l'évolution de la biomasse et de l'activité amylasique des souches étudiées est nécessaire.
  - ✓ L'optimisation des productions (biomasse et  $\alpha$ -amylase) en utilisant une planification expérimentale (mtrices de Plackett-Burman). (Raimbault M., 1998).

##### III.1.5.2.1. Cinétique de croissance des différentes souches et de production d' $\alpha$ -amylase

La cinétique de croissance des souches nous permet de suivre l'évolution de la quantité de biomasse produite par chaque souche, durant le temps d'incubation d'une part, et les variations du pH du milieu, d'autre part (Zoubiri L., 2012).

##### ➤ Milieu de culture

Le milieu de base peut être constitué d'un sous-produit alimentaire (moût de datte). Ce milieu a été enrichi par (5) g/l d'amidon, 5 (g/l) d'extrait de levure et 4 (g/l) de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Zoubiri L., 2012).

##### ➤ Préculture

Une préculture dont le but est d'acclimater chaque souche potentiellement amylolytique au milieu de culture de base, a été réalisée dans des erlenmeyers de 100 ml à raison de 20 ml de milieu de culture enrichi et stérile. Après réactivation des souches, quelques spores identiques ou un fragment de mycélium sont prélevés à l'aide d'une anse de platine stérile pour ensemercer les 20 ml de milieu de culture. Après une légère

homogénéisation des erlens, ces derniers sont incubés à 30°C pendant 24 heures (Zoubiri L., 2012).

➤ **Culture discontinue non alimentée**

Les cultures sont réalisées dans des erlens de 500 ml à raison de 100 ml. L'ensemencement se fait par la prise de 1 ml des dilutions de la préculture après 24 heures d'incubation. Les cultures seront incubées à 30 °C pendant 120 heures et sous agitation de 180 tours/min. Des prélèvements effectués régulièrement chaque 24 heures, pour la détermination du pH, de la quantité de biomasse produite et de l'activité amylasique, est recommandés (Zoubiri L., 2012).

✓ **Mesure du pH**

Le pH de l'extrait enzymatique a été mesuré à l'aide d'un pH- mètre.

✓ **Détermination de la biomasse**

Le poids sec de la biomasse produite est déterminé chaque 24 heures jusqu'à la fin des fermentations, par prélèvement de 20 ml du moût fermenté et sa filtration à l'aide d'un papier Wattman, et rinçage avec l'eau distillée. La biomasse est séchée dans une étuve réglée à 105 °C jusqu' à poids constant (Pederson H., Nielsen J., 2000).

✓ **Dosage de l'activité amylasique**

L'activité amylasique est 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 (U/ml), correspondant à une  $\mu$  mole du glucose libéré par minute et par millilitre du milieu à 40°C et à pH 5.(Zoubiri L., 2012).

### III.1.5.2.2.Optimisation des productions (biomasse et -amylase)

Le terme biomasse désigne la partie biologique du processus de bioproduction. Il s'agit donc des cellules cultivées dans le réacteur. Plus particulièrement, on qualifie d'inoculum la biomasse injectée dans le réacteur au début de la production. De même on parle souvent de souche pour désigner le type de biomasse utilisé. Une bonne conduite de fermentation nécessite une bonne croissance de micro-organisme mis en jeu, et cela ne peut être atteint qu'après l'assurance d'un milieu de culture bien convenable en point de vue

composition en éléments nutritifs, d'une part et conditions expérimentales maîtrisables, d'autre part. Ces conditions ne peuvent être réunies qu'à l'aide d'une méthodologie reposant sur la planification expérimentale (Zoubiri L., 2012).

### III.1.5.3. Cinétique de production de l' $\alpha$ -amylase en Fermenteur (bioréacteur)

D'une manière très générale, un réacteur est l'endroit où a lieu une réaction. Plus concrètement il s'agit de l'enceinte physique, la cuve, dans laquelle une ou plusieurs réactions interviennent. On parle donc de réacteurs tant en industrie chimique (réactions chimiques) que dans le cadre de la biochimie (réactions enzymatiques). Et lorsque la réaction est initiée par un organisme vivant, on utilisera plus spécifiquement le terme de "bioréacteur" (Larpent G., 1992) (figure13).

Tenant compte des paramètres optimaux testés, une culture contrôlée est réalisée en fermenteur de différents volumes. La cuve est remplie avec 1.5 l de milieu de culture optimisé contenant la composition suivante : 10 (g/l) amidon, 5 (g/l) extrait de levure, 5 (ml/l) de glycérol, le pH initial étant ajusté avant stérilisation à 5,5 par HCl 0,1 N (Nouadri T., 2011).

Un litre du milieu est préparé : 900 ml sont introduits dans la cuve du fermenteur et 100 ml dans un Erlenmeyer de 500 ml. La cuve et l'Erlenmeyer est autoclavés durant 15 min à 120°C. Les 100 ml utilisés comme préculture de 24 h sont inoculés et ajoutés aseptiquement au fermenteur. Des échantillons de 5 ml de la culture sont prélevés aseptiquement chaque 12 h. La fermentation est menée pendant 192 h à une vitesse d'agitation de 100 rpm, à une température contrôlée à 22°C et une aération de 0.5(l/min). Le développement de la moisissure est suivi durant les différentes phases de fermentation pour la production de l'  $\alpha$ -amylase. La biomasse, les protéines, l'activité  $\alpha$ -amylasique et pH sont déterminés à chaque prélèvement (Nouadri T., 2011).

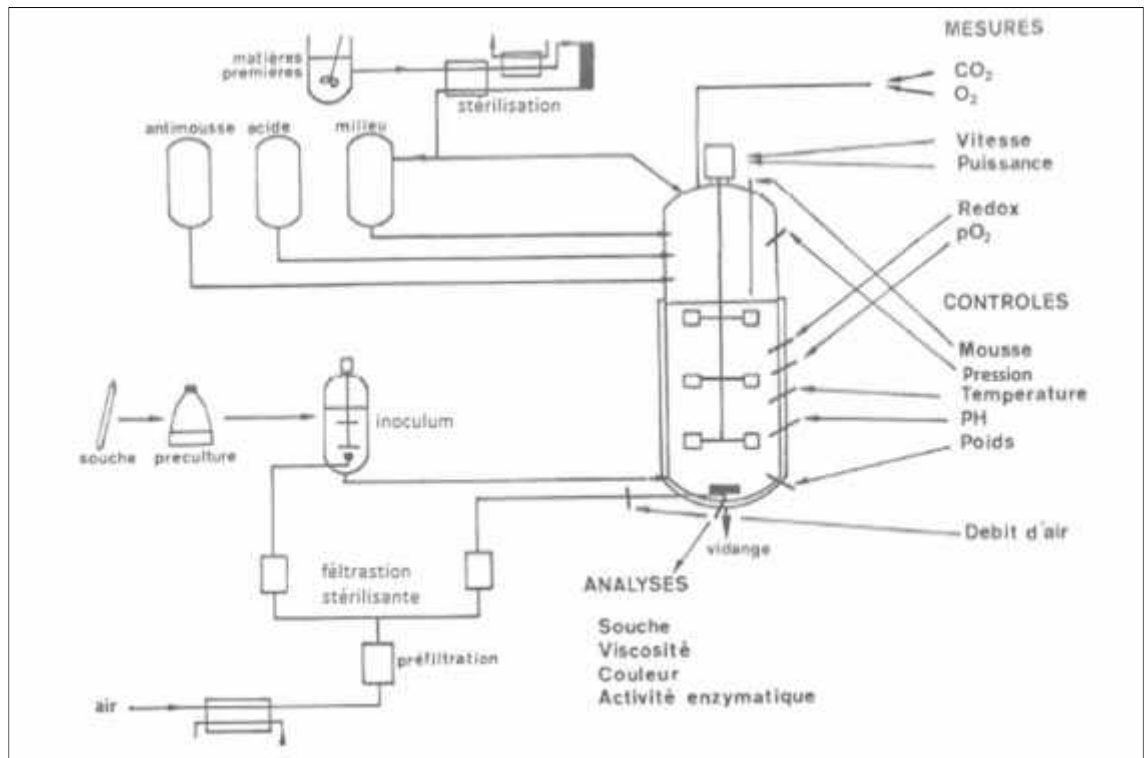


Figure 13 : L'installation de bio production des amylases (Scriban R., 1988).

### III.1.6. Purification de l' $\alpha$ -amylase

Après 168 heures d'incubation à 22°C et une agitation de 100rpm dans le milieu optimisé, le milieu de culture obtenu subit une filtration sur papier Wattman pour déterminer la biomasse. Le filtrat constitue l'extrait enzymatique brut. L'  $\alpha$ -amylase est purifiée en trois étapes (figure 14), selon les méthodes et les techniques utilisées ( Khoo S. *et al.*, 1994 ; Chao-Hsun Y. *et al.*, 2004 ; Damodar R. *et al.*, 2005 ; Abouzeid A., 1997).

#### III.1.6.1. Précipitation par le sulfate d'ammonium

La purification de l'  $\alpha$ -amylase nécessite donc l'élimination préalable des pigments et des substances visqueuses ainsi que le fractionnement des protéines. Parmi les méthodes de fractionnement on a utilisé la précipitation au sulfate d'ammonium. Le filtrat constitue l'extrait enzymatique brut. (Nouadri T., 2011).

#### III.1.6.2. Dialyse

Le précipité obtenu, après un fractionnement par le sulfate d'ammonium, est dilué dans un volume de tampon dialysé par une membrane de cellophane préalablement traitée. L'eau distillée est utilisée comme liquide de contre dialyse pendant une nuit à 4°C. L'activité  $\alpha$ -amylasique et les protéines du dialysat sont déterminées après cette étape (Kamoun P., 1977).

### III.1.6.3. Chromatographie

La chromatographie est un procédé physico-chimique de séparation, au même titre que la distillation, la cristallisation ou l'extraction fractionnée, des constituants d'un mélange homogène liquide ou gazeux. (Francis R., Annick R., 2004).

Il existe plusieurs méthodes de purification des amylases, mais les plus utilisées sont la chromatographie gel filtration et la chromatographie échangeuse d'ions, les protéines retenues sont éluées selon un gradient de NaCl entre 0 et 1 M et détectées en UV à 226 nm. (Le Moullac G., 1995).

Le dialysat est dissout dans la solution tampon de phosphate 0,1M à pH 6.0 et fractionné par la colonne de Sephadex préparée et équilibrée par le même tampon. L'éluion est effectuée à un débit de 1ml/min. La teneur en protéines de chaque fraction de 2 ml est déterminée à 280nm et l'activité -amylasique est notamment mesurée dans les fractions correspondant aux pics des protéines (Gerhartz W. *et al.*, 1990).

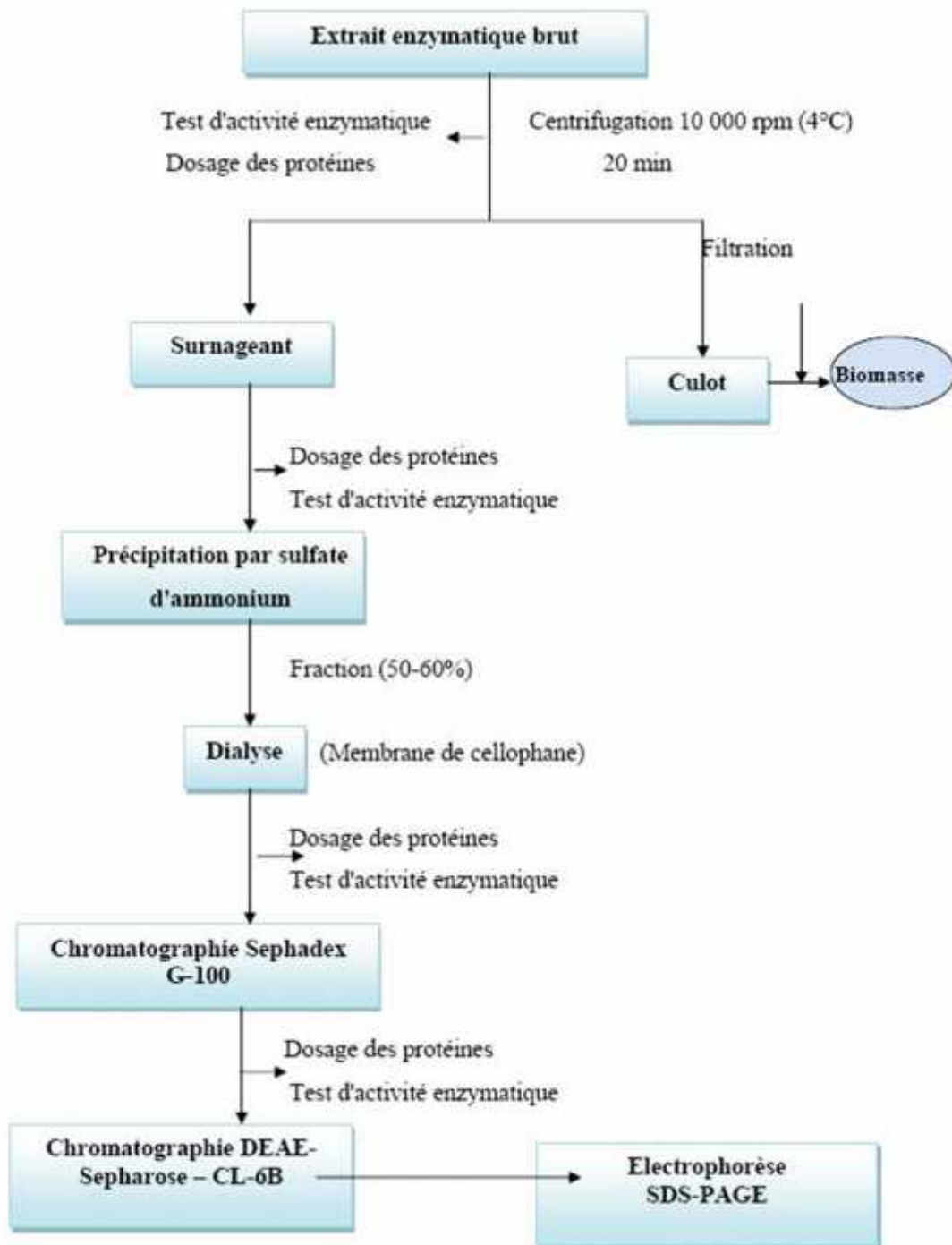


Figure 14 : Protocole de purification de l'amylase de *P. camemberti* PL21 (Nouadri T., 2011).

### III.1.6.4. Electrophorèse analytique

L'enzyme subit une électrophorèse pour tester sa pureté et déterminer sa masse moléculaire. L'électrophorèse analytique en gel de polyacrylamide dans les conditions natives (PAGE) et dénaturantes (SDS-PAGE) est réalisée selon la méthode de Laemmli (1970). En conditions natives le gel de résolution à 10 % (m/v) et le gel de concentration à 4% en acrylamide sont utilisés. La migration est faite à 80 volts sur la mini-cuve et refroidie par circulation d'eau à 0-4°C (tableau V). (Laemmli U., 1970).

### II.1.7.Détermination de la masse moléculaire de l' -amylase

La technique d'électrophèse permet de déterminer la masse moléculaire des amylases obtenues. En conditions natives, le gel de résolution à 10 % (m/v) et le gel de concentration à 4% en acrylamide sont utilisés. La migration est faite à 80 volts sur la mini-cuve. La mobilité électrophorétique est calculée selon une courbe d'étalonnage de logarithme de poids moléculaires des protéines standards, en fonction de leur mobilité relative ( $d/D$  où  $d$ : distance parcourue et  $D$ : longueur de la bandelette). (Laemmli U., 1970).

**Tableau V :Composition de gel (Native PAGE et SDS-PAGE) (Laemmli U., 1970)**

Composition de gel (Native PAGE)	Composition de gel (SDS-PAGE)
Acrylamide-biacrylamide.....2.5 ml	Acrylamide-biacrylamide.....2.5 ml
Staking gel buffer stok.....5.0 ml	Staking gel buffer stok.....5.0 ml
10 % Ammonium per sulphate .....1 ml	10 % SDS.....0.2 ml
Eau distillée.....1 ml	10 % Ammonium per sulphate .....0.1 ml
TEMED ( N,N,N'N' -Tetramethylethylene diamine.....0.02 ml	Eau distillée .....11.5 ml
Soluble Strarch .....1%	TEMED ( N,N,N'N' -Tetramethylethylene diamine .....0.02 ml

### III.1.8. Caractérisation de l' -amylase purifiée

Les effecteurs sont des composés chimiques qui modifient plus ou moins les réactions enzymatiques. Ils peuvent jouer un rôle important dans la régulation des métabolismes et

permettre d'acquérir d'importantes informations sur la structure et le mode d'action des enzymes.

#### **III.1.8.1.Effet du pH**

Pour la détermination du pH optimum, le même protocole réalisé que précédemment est suivi, mais le pH du tampon phosphate 0.1 M varie de 3.0 à 10, pendant 10 min à 30°C. L'influence du pH sur l'activité enzymatique est déterminée par la mesure de l'activité relative.(Nouadri T., 2011).

#### **III.1.8.2. Effet de la température**

Pour la détermination de la température optimale de l'enzyme purifiée, des flacons contenant un mélange de 10µl d'enzyme avec 0.99ml d'une solution d'amidon à 1% dans 0.1M du tampon phosphate à pH6 sont préparés et incubés pendant 30 min à des températures allant de 10 à 70°C. L'activité spécifique de l'enzyme est mesurée.( Merabti R., 2006).

#### **III.1.8.3.Stabilité thermique de l' -amylase**

L'étude de la stabilité à la température de 30°C à 70°C est effectuée par la mesure de l'activité spécifique relative. Après incubation de l'extrait enzymatique à différents temps variant d'une heure à 4h la solution enzymatique est répartie en volumes identiques dans des tubes séparés qui sont chauffés ensemble dans un bain marie à une température soigneusement réglée. Les différents échantillons sont retirés les uns après les autres à des temps déterminés et refroidis instantanément dans un bain de glace. A chaque échantillon enzymatique traité par la température est appliqué le protocole de dosage de l'activité - amylasique (Nouadri T., 2011).

#### **III.1.8.4.Activité amylasique en fonction de la concentration en substrat.**

L'activité amylasique est étudiée à cet effet sur une gamme de concentration de 0 à 10% en amidon. Les vitesses initiales sont déterminées dans les conditions habituelles par le dosage de l'activité enzymatique (Nouadri T., 2011).

#### **III.1.9.Détermination des constantes cinétiques de l' -amylase purifiée :**

Les paramètres cinétiques ( $K_m$  et  $V_{max}$ ) de l' -amylase purifiée sont déterminés graphiquement par la représentation de Lineweaver-Burk. (1934). L'amidon soluble avec différentes concentrations (1 à 10 %) est utilisé comme substrat naturel de l'enzyme purifiée. (Soro Y., 2007).

### III.2. Intérêts des amylases microbiennes

L'amidon est un composé glucidique abondant et peu coûteux, dont la fonctionnalité et la valeur ajoutée peuvent être améliorées par un ensemble de modifications physiques, chimiques et/ou enzymatiques, afin de répondre à des besoins technologiques ou nutritionnels spécifiques (**Buelon A. et al., 1990**).

L' - amylase par sa capacité à modifier un certain nombre des propriétés de l'amidon, participe à de nombreuses applications, permettant de fabriquer des sucres adaptés aux demandes spécifiques des utilisateurs en industrie alimentaire (**Palmer T., 1975**).

La grande spécificité d'action de l' -amylase et les conditions très douces dans lesquelles elle opère, confèrent un avantage certain sur les catalyseurs chimiques ordinaires. Aussi, l'usage des préparations enzymatiques s'est considérablement développé dans de nombreux secteurs de la bio-industrie. En effet, de nombreux secteurs d'activité ont mis à profit depuis une trentaine d'année la bio-spécificité de l'enzyme et l'utilise comme agent de production de métabolites comme aides technologiques ou comme outils analytiques. Les industries pharmaceutique, alimentaire et chimique sont les principaux utilisateurs de cette enzyme (**Cuveillier G., 1999 ; Pandey A. et al., 2000**).

#### III.2.1. Thermostabilité des amylases microbiennes

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

Différents mécanismes expliquent cette thermostabilité : la composition en acides aminés, le nombre de pont S-S (**Matsumura M., Matthews B., 1989**), les interactions hydrophobes les liaisons hydrogènes et la présence de métaux tel que les ions  $\text{Ca}^{2+}$  (**Boel E. et al., 1990**). D'autres paramètres extrinsèques, comme les sels et le substrat influencent également la stabilité. Par ailleurs, des études sur les protéines eucaryotes naturellement glycosylées, ont prouvé que la glycosylation pourrait exprimer une stabilisation thermique significative. (**Vieille C., Zeikus J., 2001**).

### III.2.2. domaines d'utilisation d'amylases

Le secteur industriel présente une très grande diversité de techniques et de produits. Il offre aux enzymes hydrolytiques un large champ d'utilisation (Cosetes C., 1982 ; Mercier C., 1986). Les  $\alpha$ -amylases sont parmi les hydrolases les plus importantes pour toutes les industries à base d'amidon, et leur commercialisation est la plus ancienne, avec première utilisation en 1984, comme aide pharmaceutique pour le traitement de désordres digestifs (Zoubiri L., 2012).

Actuellement, les amylases microbiennes sont parmi les enzymes les plus utilisés dans les procédés industriels : industrie alimentaire, pharmaceutique, textile, papeterie, et détergent, en raison de leur productivité et thermostabilité (Behal A. *et al.*, 2006). Avec l'arrivée de nouvelles frontières en biotechnologie, le spectre de l'application de l'amylase s'est élargi vers d'autres domaines, comme la chimie clinique, médicale et analytique (Pandey A. *et al.*, 2000).

#### III.2.2.1 Domaine d'agro-alimentaire

Les applications de l' $\alpha$ -amylases dans le domaine alimentaire sont nombreuses. En effet les  $\alpha$ -amylases bactériennes thermostables sont utilisées dans la liquéfaction (Fogarty W., Kelly C., 1990 ; Santamaria R. *et al.*, 1999), elle conduit à la formation de la maltodextrines ou sirops de glucose qui sont caractérisés par leur {dextrose équivalent} (DE) qui représente le nombre de sucres réducteurs exprimé en équivalent glucose. En effet, les maltodextrines qui ont un DE entre 5 à 20 sont appréciés dans la fabrication d'aliments pour enfants (Cuveillier G., 1999).

##### ➤ Glucoserie

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

##### ➤ La sucrerie

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

Les  $\alpha$ -amylases bactérienne sont principalement utilisées en brasserie pour liquéfier l'amidon de l'orge, qui est ajouté généralement à l'extrait de malt pour augmenter la concentration en sucres fermentescibles (Sicard P., 1982).

➤ **Panification et biscuiterie**

L'usage de l' $\alpha$  amylase « améliorant de panification » est devenue une pratique de fabrication machinale dans l'industrie panair, non seulement pour améliorer la qualité du pain (Malhotra R. *et al.*, 2002). L'addition d'une petite quantité d' $\alpha$ -amylase, dans la farine, augmente la production de gaz carbonique après fermentation et conduit à l'obtention d'un pain aéré et donc léger (Pandey A. *et al.*, 2000) mais aussi pour contrôler le processus, de fabrication ce qui conduit à un gain en temps et en énergie. Cette industrie emploie les  $\alpha$ -amylases fongiques d'*A. oryzae* pour la régulation des activités diastasiques des farines en dégradant l'amidon en maltose. Cette opération favorise la formation de la mie souple en boulangerie et améliore la texture des gâteaux pâtisseries et des biscuits (Malhotra R. *et al.*, 2002).

➤ **Industrie des boissons**

Dans ce secteur, l' $\alpha$ -amylase fongique intervient essentiellement dans la fabrication d'alcool éthylique, de boissons sucrées non alcoolisées, de jus de fruits (Mamo G. *et al.*, 1999). En brasserie, elle permet d'obtenir des bières sans dextrines, dites bières à basses colories (Nouadri T., 2011).

### III.2.2.2. Domaine industriel

Les  $\alpha$ -amylases sont aussi utilisées dans l'industrie des textiles pour le dés encollage des tissus ainsi que dans les domaines de la tannerie, de la papeterie (Teodoro C. *et al.*, 2000). L' $\alpha$ -amylase en papeterie sert à solubiliser l'amidon par liquéfaction servant à l'encollage et au couchage du papier (Sicard P., 1982), et des détergents pour les lessives où elles facilitent la disparition des tâches en dégradant les souillures, permettant ainsi l'augmentation du pouvoir blanchissant. Dans les détergents d'aujourd'hui de blanchisserie, environ 50 % des détergents liquides et 25 % des détergents en poudre contiennent des enzymes (protéase,  $\alpha$ -amylase, pectinase) pour aider à la décomposition des tâches. En effet, L' $\alpha$ -amylase dégrade les tâches à base d'amidon en plus petits segments, les oligosaccharides et les dextrines libérés de l'action hydrolytique des enzymes sont solubles, par conséquent, la tâche est physiquement découpée (Igarashi K. *et al.*, 1998).

### III.2.2.3. Domaine médical et pharmaceutique

Dans le domaine médical, le taux de l'  $\alpha$ -amylase dans les liquides biologiques peut être utilisé pour détecter certaines maladies : insuffisance cardiaque, oreillons, cancer du pancréas (Rown D., 1990 ; Pandey A. *et al.*, 2000).

Dans le domaine pharmaceutique, l'  $\alpha$ -amylase est utilisée comme agent anti-inflammatoire en soutenant le traitement par des antibiotiques, ou comme un aide digestif pour éviter les dyspepsies et les fermentations intestinales. L'  $\alpha$ -amylase peut être également utilisé dans le traitement du diabète et l'obésité (Cuveillier G., 1999).

## Conclusion

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

Bien que, l'utilisation d'amylases, les -amylases, en particulier, dans liquéfaction de l'amidon et d'autres industries à base d'amidon a été répandu depuis de nombreuses décennies et un certain nombre de sources microbiennes existent pour la production efficace de cette enzyme, la production industrielle de cette enzyme a été limitée à seulement quelques souches sélectionnées de champignons et de bactéries. En outre, il se pose un besoin pour plus d'efficacité des amylases dans les différents secteurs, ce qui peut être réalisé soit par modification chimique des enzymes existantes ou grâce à l'ingénierie des protéines.

A partir de cette étude, on a essayé de mettre l'accent sur les principaux microorganismes producteurs des amylases, ainsi les différentes techniques utilisées pour leur culture et l'extraction des ces enzymes. Or, la production des amylases microbiennes ne dépassent qu'éventuellement l'étape de l'optimisation, car, la diversité des microorganismes producteurs rend difficile d'adopter un protocole universel de production.

De même, notre travail nécessite des travaux expérimentaux visant à :

- Isoler des souches autochtones (d'origine sahariennes) productrices des amylases.
- Préciser un protocole majeur pour la production et la purification de ces enzymes, à fin de passer à une échelle de production plus élevée (industrielle).
- Tester l'efficacité et l'activité des amylases microbiennes, par comparaison avec celles de synthèse chimiques.

## Références bibliographiques

- Abouzeid A. (1997).** Production, purification and characterization of an extracellular -amylase enzyme isolated from *Aspergillus flavus*. *Microbios*. Vol. 89 (358): 55-66.
- Abu E., Ado S., James D. (2005)** . Raw starch degrading amylase production by mixed culture of *Aspergillus niger* and *Saccharomyces cerevisiae* grown on sorghum pomace. *African Journal of Biotechnology*. Vol. 4 (8) : 785-790p. Cité par Merabti R. (2006).
- Ahearn D. (1973).** Estuarine Microbial Ecology : The Belle W. In . *Marine Science* 1. University of South Carolina Press. 433-440p. Cité par Merabti R. (2006).
- Anonyme (2013).** Structure des oses, Académie de Rouen-NBERGERE .11 p.
- Arvisenet G. (2001).** Influence des interactions physico-chimiques entre amidons et composés d'arôme sur la libération des arômes et les propriétés rhéologiques dans des matrices aqueuses complexes . Thèse de l'université de Bourgogne, Enesad, Ensba. Cité par Kara Slimane A (2010).
- Atkin N., Cheng S., Abeysekera R., Robards A. (1999.).** Localisation of amylose and amylopectin in starch granules using enzyme-gold labelling. *Stärke*. vol. 51( 5) : 163-172. Cité par Kara Slimane A (2010).
- Axelsson L., Salminen S., Wright A., Ouwehand A. (2004).** Classification and physiology. In: *Lactic acid bacteria: Microbiological and functional aspects*. Ed. Marcel Dekker. Inc, New York. 1- 66p.
- Badot R., Merlin D. (1984).** Métabolisme énergétique et mouvement révolutif chez le haricot (*Phaseolus vulgaris*). *Biol.Veg*. vol. (4) : 7-12p.
- Banks W., Greenwood C. (1975).** "starch and its components". Ed. Banks et C.T.Greenwood, Edinburgh University Press .Cité par Kara Slimane A (2010).
- Baudry Ch., Brezellec H. (2006).** *Microbiologie-Immunologie : Exercices d'application*. 2<sup>ème</sup> Ed. Wolters kluwer, France. 126p.
- Behal A., Singh J., Sharama M., Pur P., Batra N. (2006).** Characterisation of Alkaline -Amylase from *Bacillus sp* AB 04. *International Journal of Agriculture & Biology*. vol. 08(1) : 80-83p.
- Bemiller J. (1967)** "Acid-catalyzed hydrolysis of glycosides. 5. Hydrolysis of polysaccharides.", *Adv. Carbohydr. Chem*. vol. (22) : 85-108p.

- Benaouida k. (2008).** Etude de l'alpha amylase de levures isolées d'un écosystème extrême (sol environnant des sources thermales) et cultivées sur un milieu à base de lactosérum. Mémoire de magister : Microbiologie appliqués. Constantine : Université Mentouri, 67 p.
- Benfield P. (1955).** Amylases, alpha and beta. In: Colowick, S.P. and Kaplan, N. O. Methods in enzymology. New York: Academic Press. vol. (1) : 149-158p.
- Berry D., Paterson A. (1990).** Enzymes in food industry. In Suckling C.J. Enzymes chemistry impact and application. Ed. Chapman H. London. 306-351 P. Cité par Benaouida K. (2008).
- Betheau Y., Kotoujansky A., Colenoa A. (1985).** Sources actuelles et potentielles d'enzymes d'hydrolyses et de dépolymérisation. In Mouranche A., Coste C. (Ed) : Hydrolyses et dépolymérisation enzymes. d'intérêt industriel. Ed. Ghautier-Villard. 306-356p. Cité par Saci A. (2012).
- Bhella R., Altossar I., (1987).** Translational control of  $\alpha$ -amylase gene expression in *Aspergillus niger*. Biotechnology and Applied Biochemistry. Vol. (9) : 287-293p. Cité par Nouadri T.(2011).
- Biezen C., Raper K., Fennel R. (1977).** The genus *Aspergillus* in food. Indian phytopathol. vol. (35) : 153-155p.
- Blin C. (2002).** Etude comparative du catabolisme de l'acide ricinoléique chez les levures du genre *Sporidiobolus* : mise en évidence et caractérisation du système bêta-oxydase impliqué. Thèse de doctorat : Ecole Nationale Supérieure de Biologie Appliquée à la Nutrition et à l'Alimentation. France : Université de Bourgogne.
- Boel E., Brady L., Brzozwski A., Derewenda Z., Dodson G., Jensen V., Petersen S., Swift H., Thim L., Woldike., H. (1990).** Calcium binding in  $\alpha$ -amylases: an X ray diffraction study at 2.1-Å resolution of two enzymes from *Aspergillus niger*. Biochemistry. vol. (29) : 6244-6246p.
- Boiron P. (1996).** Organisation et biologie des champignons. Nathan. Paris. 19-79p. Cité par Dendouga W. (2006).
- Botton B., Breton A., Fevre M., Gauthier S., Guy P., Larpent J., Reymond P., Sanglier J., Vayssier Y., Veau P. (1990).** Moisissures utiles et nuisibles : Importance industrielle. 2<sup>ème</sup> Ed. Masson, Paris. 16-41; 110-364p. Cité par Belmessikh A. (2011).
- Botton B., Breton A., Fevre M., Gauthier S., Guy P., Larpent J., Reymond P., Sanglier J., Vayssier Y., Veau P. (1999).** Moisissures utiles et nuisibles. Importance industrielle. Masson. Paris. 12-426p. Cité par Dendouga W. (2006).

- Bouchet P., guignard J., Vihard J. (1999).** Les champignons mycologie fondamentale et appliquée. Ed. Masson, Paris. 45p.
- Bouix M., Leveau J. (1991).** Les levures *Ds* : Techniques d'analyse et de contrôle dans les industries agroalimentaires. Ed. Lavoisier-Tec & Doc, Paris. 206-229p. Cité par Benaouida k. (2008).
- Bouix M., Leveau J. (1999).** Production des enzymes. Ed. Lavoisier. 344-400p. Cité par Benaouida K. (2008).
- Bourgeois C., Mescle J., Zucca J. (1989).** Microbiologie alimentaire. Aspect microbiologique de la sécurité et de la qualité des aliments. Lavoisier, Paris. 244p. Cité par Zoubiri L. (2012).
- Branger A., Richer M., Roustel S. (2007).** Microbiochimie et Alimentation. Educagri. Ed. Dijon. 343p. Cité par Kermiche M. (2013).
- Brawn S., Kelly R. (1993).** Characterization of amylolytic enzymes having both (alpha)-1,4 and (alpha)-1,6 hydrolytic activity from the thermophilic *archaea Pyrococcus furiosus* and *Thermococcus litoralis*. Applied and Environmental Microbiology. vol. 59(8) : 2614-2621p..
- Brock A. (1987).** Reaction kinetics of different forms of human  $\alpha$ -amylase isoenzymes. Advances in Clinical Enzymology. vol. (5) : 137-143. Cité par Prudence M. (2002).
- Buelon A., Colonna P., Leloup V. (1990).** Les amidons et leurs dérivés dans les industries des céréales. Industries Alimentaires et Agricoles. vol. (6) : 515-532p.
- Buleon A., Colonna P., Planchot V. (1998).** Ball S. Starch granules : structure and biosynthesis., Int. J. Biol. Macromol. vol. 23(3) :85-112. Cité par Kara Slimane A. (2010).
- Burhan A., Nisa U., Gokhan C., Omer C., Ashabil A., Osman G. (2003).** Enzymatic properties of a novel thermostable, thermophilic, alkalineand chelator resistant amylase from an alkaliphilic *Bacillus* Sp. Isolate ANT-6. Process Biochem. vol. (38) : 1397-1403p. Cité par Merabti R. (2006).
- Bushuk W., Rasper V. (1994).** Wheat: Production, properties and quality. Blackie Academic & Professional. Springer. 239 P. Cité par Kermiche M. (2013)
- Chakraborty R., Srinivasan M., Raghavan S. (1995).** Production of acid proteases by a new *Aspergillus niger* during solid substrate fermentation. J. Biotechnol. vol. (10) : 17-30p.

- Chao-Hsun Y., Wen-Hsiung L. (2004)** .Purification and properties of a maltotriose-producing Alpha amylase from *Thermobifida fusca*, Institute of Microbiology and Biochemistry, National Taiwan University; Enzyme and Microbial Technology. vol (35) : 254-59p. Cité par Nouadri T.(2011).
- Chiasson L., Josse R., Hunt J., Palmason C., Rodger N., Ross S., Ryan E., Tan M., Wolever T. (1994)**. The efficacy of acarbose in the treatment of patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus:a multicenter controlled clinical trial. Annals of Internal Medicine. vol. (121) : 928-935p.
- Clark H., Geldriche E., Kabler P., Huff C. (1985)**. Identification of Industrial microorganismes. Appl. Microbiol. Process Biochem. vol. (30) : 723-727p.
- Cofalec N. (2006)**. Caractérisation des levures de boulangerie. Adopté par Comité de Fabrication de levures de panification de l union européenne, Paris. 1-10p.
- Comi K., Akeno T. Minitoki T. Ozeki K. Kumagai C. Okazaki N. Linura Y.(2000)**.Molecular cloning and caractérisation of a transcriptional activator gene amy involved in the amyolytic gene expression in *Aspergillus oryzae*. Basic Biotechnol .Biochem. vol. (64) : 816-827p.
- Coolbear T., Daniel R., MORGAN H. (1992)**. The enzymes from extreme *thermophils*: bacterial sources, thermostabilities and industrial relevance. Advanced Biochemistry and Engineering Biotechnology. vol. (45) : 57–97p.
- Costes C. (1982)**. Les enzymes ; Production et utilisations industrielles. Bordas, Paris. 195p. Cité par Benaouida K. (2008).
- Coulibaly L., Agathos S. (2003)**. Transformation kinetics of mixed polymeric substrates under transitory conditions by *Aspergillus niger*. African J. Biotechnol. vol. 2 (11) : 438-443p.
- Cuveillier G. (1999)**. Réacteurs enzymatiques à enzymes libres. In Scriban R. Ed. Biotechnologie. Lavoisier. 425p. Cité par Saci A. (2012).
- Dall W., Moriarty D. (1983)**. Functional aspects of nutrition and digestion, In : The Biology of Crustacea. Ed. Academic Press, New York. 215-262p.
- Damodara R., Mendu B., Ratnam A., Purnima C., Ayyann A. (2005)**: Affinity chromatography of -amylase from *Bacillus licheniformis*,. Department of Pediatrics, Division of Infectious Diseases. Johns Hopkins University School of Medicine, 720p. Cité par Nouadri T. (2011).
- Dao H. (2005)**. Caractérisation de certains gènes polycétones synthases chez *Aspergillus ochraceus* NRRL 3174 producteur d'ochratoxine A et d'acide

penicillique. Thèse de doctorat : Microbiologie. Toulouse : Institut national polytechnique, 126p.

**Dauter Z., Dauter M. Brzozowski A. Christensen. Borchert T., Davies G. (1999).** X-ray structure of Novamyl, the five-domain "maltogenic" alphaamylase from *Bacillus stearothermophilus*: maltose and acarbose complexes at 1.7Å resolution *Biochem.* vol. (38): 8385-8392.p

**Davies G., Brzozowski J., Dauter Z., Rasmussen M., Borchet T., Wilson K. (2005).** Structure of a *Bacillus halmapalus* family 13 -amylase, BHA, in complex with an acarbose-derived nonasaccharide at 2.1 Å resolution. *Biological cristography.* vol. (61) : 190-193p.

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

**Delgado-Jarana J., Rincon A., Benitez T. (2002).** Aspartyl protease from *Trichoderma harzianum* CECT 2413: cloning and characterization. *Microbiology.* vol. (148) : 1305- 1315p.

**Demain A., Solomon N. (1985).** *Biology of industrial microorganisms.* The Benjamin/Cummings publishing company, Inc. 291-357. Cité par Saci A. (2012).

**Dendouga W. (2006).** Isolement et identification de moisissures productrices de protéases à partir de milieux extrêmes. Extraction et étude des propriétés de la protéase produite. Mémoire de Magister : Microbiologie appliqués. Constantine : Université Mentouri, 80 p.

**Desaunay A. (2011).** Etude et modélisation de la biosorption des métaux par les bactéries. Application au transfert du cadmium et du zinc, seuls ou en mélange, par *Escherichia coli* et *Cupriavidus metallidurans* en colonnes de sable d'Hostun. Thèse Doctorat : Océan, Atmosphère, Hydrologie. Grenoble : Université de Grenoble, 209p.

**Deutch C. (2002).** Characterization of a salt-tolerant extracellular -amylase from *Bacillus dipsosauri*. *Lett Appl Microbiol.* vol. (35) : 78-84p.

**Durand G., Monson P. (1982).** *Les enzymes: production et utilisations industrielles.* Bordas. Paris. 36-153p. Cité par Dendouga W. (2006).

*Electron. J. Biotechnol.* 1 (<http://www.ejbiotechnology.info>) .Cité par Zoubiri L. (2012)

**Ellaiah P., Adinarayana K., Sunitha M., Devi R. (2003).** Alpha amylase product by *Penicillium sp.* from some soil in India. *Lab: pharmaceutical biotech. Indian journal of microbiology.* vol. 43(2) : 135-137p.

**Favet M (2013)** relations entre les micro-organismes et les aliments (Séminaire de Bactériologie). 06 p.

**Feller G., Bussy O., Houssier C., Gerday C. (1996).** Structural and functional aspects of chloride binding to *Alteromonas haloplanctis* alpha-amylase. *The Journal of Biological Chemistry*. vol. (271) : 23836-23841p. Cité par Prudence M. (2002).

**Fogarty W., Kelly C. (1990).** Recent advances in microbial amylases m. *Microbial enzymes and biotechnology*. Fogarty W. M. et Kelly C. T 2<sup>nd</sup> Ed. Elsevier Applid science, London. 133p. Cité par Saci A. (2012).

**Francis R., Annick R.(2004).** Analyse chimique, méthodes et techniques instrumentales modernes. Ed. I.S.B.N, Paris. 459p.

**Franco O., Rigden D., Melo F., Bloch C., Silva J. (2000).** Activity of wheat amylase inhibitors towards bruchid -amylase and structural explantation of observed specificities. *Eu.J. Biochem*. vol. (267) : 2166- 2173.p

**French D., Enas N., Danial M. (1975).** Chemistry and biochemistry. MTP International review of science biochemistry of carbohydrates serie 1,5 Butterworth Park Press. vol. (12) : 309-321p.

**Gacem M. (2012).** Contribution à l'étude de l'activité antifongique et antimycotoxinogène des extraits méthanolique et aqueux des graines de *Citrullus colocynthis* sur la croissance de quelque moisissure d'altération de blé tendre stocké. Mémoire de Magister : Microbiologie appliquée. Ouargla: Université Kasdi Merbah, 87 p.

**Gerhartz W. (1990).** General Production Methods In: *Enzymes in Industry*: VCH Publishers, New York (USA). 67-72 p.

**Gibson R., Barker P. (1979).** The decapod hepatopancreas. *Oceanography and Marine Biology. An annual review*. vol. (17) : 285-346p.

**Godfrey T., West S. (1996).** In : *Industrial enzymology*. Stockton Press. 2<sup>nd</sup> ed : Godfrey T. and West S, New York. 371p. Cité par Prudence M. (2006).

**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*. vol. (90) : 207-214p.

**Goudjal M. (2006).** Cours de microbiologie industrielle.2p.

**Guiraud J.,(1998).** Microbiologie alimentaire. Dunod; Paris. 79p. Cité par Belmessikh A. (2011).

- Gupta R., Gigras P., Mohapatra H., Goswami V., Chauhan B. (2003).** Microbial -amylases : a biotechnological perspective. *Process Biochemistry*. vol. (38) : 1599-1616p.
- Hanjun T., Toshio M., Yukio K . (2006).** "Molecular arrangement in blockets and starch granule architecture". *Carbohydrate Polymers*. vol. (63) : 555- 560p.
- Harrigan W. McCance M. (1976).** Laboratory methods in food and dairy microbiology. Academic press, London. 21-277p. Cité par Dendouga W. (2006).
- Hart T., Shears P. (1997).** Atlas de poche de microbiologie. Ed. M.S.F, Paris. 310p.
- Hernandez J. (1986).** Les isoamylases humaines. Thèse de Doctorat : Pharmacie. Paris : Université Paris V (René Descartes). 151 p.
- Heslot H. (1996).**L'ingenierie des proteines et ses applications. Lavoisier Tcc . Doctora : Bochmie.Paris :INA, 432 p.
- Hizukuri S. (1986).**"Polymodal distribution of the chain lengths of amylopectins, and its signifiante.". *Carbohydrate Research*. vol. (147) : 342-347p. Cité par Monnet D. (2008).
- Horii A., Emi M., Tomita N., Nishide T., Ogawa M., Mori T., Matsubara K. (1987).** Primary structure of human pancreatic -amylase gene : its comparison with human salivary -amylase gene. *Gene*. vol. (60) : 57-64p.
- Ibukun E., Akindumila F. (1998).** Extracellular amylase production by isolates of Bacilli micro-organism cultured on different starchy food broths. *Nig. J. Biochem. Mol. Biol*. vol. (13) : 91-95p. Cité par Merabti R. (2006).
- Igarshi K., Hatada Y., Hagihara H., Saeki K., Takaiwa M., Ulmura T., Ara K., Ozaki K., Kawai S., Kobayashi T., Ito S. (1998).** Enzymatic properties of novel liquefying -amylase from an alkalophilic *Bacillus* isolated and entire nucleotides and aminoacids sequences. *Appl. Environ. Microbiol*. vol. 64 (9) : 3282 -3289p.
- Issac S., Frankland J., Watling R., Whalley A. (1993).** Airworth and Bishy's Dictionary of the Fungi. 8<sup>th</sup> Ed. CAB International, Wallingford, United Kingdom. 616p.
- Jane ek S. (1994).** Sequence similarities and evolutionary relationships of microbial, plant and animal -amylases. *European Journal of Biochemistry*. vol. (224) : 519-524p.
- Joyeaux A. (1982).** Les préparations industrielles d'enzymes. In **Durand G., Monson P.** Ed. Gauthier-Villard. 36p.
- Julien R. (2002).** Les moisissures parlons-en. Objectif prevention. vol. 25 (4) : 7-8p.

- Kainuma K., D French. (1972).** "Nageli amyloextrin and its relationship to starch granule structure II. Role of water in cristallization of B-starch". *Biopolymers*. vol. (11) : 2241-2250p.
- Kamoun P. (1977)** .Appareils et méthodes en biochimie 2<sup>ed</sup>. Flammarion Médecine sciences, Paris. 110-115p.
- Kara Slimane A. (2010).** Préparation des copolymères hydrosolubles à base d'amidon, Modification et contrôle des propriétés. Thèse magister : Chimie et Physico-Chimie Organique Macromoléculaire. TLEMCEN : Unversite Abou-Bakr Belkaid, 106 p.
- Karam H., Karam N. (2000).** Isolement et identification de bactéries lactiques du lait cru de chamelle. XIIèmes Journées Nationales de Microbiologie. Constantine. Cité par Dendouga W. (2006).
- Kathiresan K., Manivannan S. (2006).** -Amylase production by *Penicillium fellutanum* isolated from mangrove rhizosphere soil. *Afr. J. Biotechnol.* vol. (5) : 829-832p.
- Keating L., Kelly C., Forgartry W. (1998).** Mechanism of action and the substrate dependent pH maximum shift of the -amylase of *Bacillus coagulans*. *Carbohydrate Research* .vol. (53) :309-318.p
- Kermiche M. (2013).** Caractérisation de certaines souches microbiennes évoluant dans le blé fermenté et mise en évidence de leurs activités enzymatiques. Thèse Magister : Biotechnologie Alimentaire. Constantine : I.N.A.T.A.A, 91 p.
- Khady B., (2013).** Contribution à l'étude des amylases du sorgho et leurs utilisations dans la transformation des produits amyliacés. Thèse doctorat : Sciences agronomiques et ingénierie biologique. Liege : GAB,148p.
- Khoo S., Nazalan M., Razip M., Azizan M. (1994).** Purification and properties of two forms of glucoamylase from *Aspergillus niger*. *Folia Microbial.* vol. 41(2) : 65-74. Cité par Nouadri T.(2011).
- Konsoula Z., Liakopoulou-Kyriakides M. (2007).** Co-production of alpha-amylase and beta-galactosidase by *Bacillus subtilis* in complex organic substrates. *Bioresour Technol.* vol. (98) : 150-157p.
- Kreger-Van N. (1984).** The Yeast, a Taxonomic Study. Elsevier Biomedical. Cité par Benaouida k. (2008).
- Kruh J. (1982).** **Biochimie I** : Biologie cellulaire et moléculaire. Hermann éditeur, Paris.253p. Cité par Soro Y.(2007).

- Labrecque M. (2003).** Etude de la capacité de deux souches de levures à dégrader le xylène. Mémoire : Faculté des sciences de l'agriculture et de l'alimentation. Université Laval, 19- 24p. Cité par Benaouida k. (2008).
- Laemmli K. (1970).** Cleavage of structural protein during the assembly of the head of *Bacteriophage* T4. *Nature*. vol. ( 227): 680-685. Cité par Nouadri T.(2011).
- Larpent G., Sauglier J. (1992).** Biotechnologie : principes et méthodes. Biosciences et Techniques. Ed. Doin, Paris. 574-587p. Cité par Dendouga W. (2006).
- LeMoullac G.(1995).** Adaptation des enzymes digestives à l'alimentation chez la crevette *Penaeus vannamei* (Crustacea, Decapoda).Thème mémoire : Sciences de la Vie et de la Terre. Montpellier : EPHE, 113p.
- Leclerc H., Meyer A., Deiana J. (1995).** Cours de microbiologie générale. Nouveau programme. Biosciences et Techniques. Ed. doin, Paris. 73-92p. Cité par Zoubiri L. (2012).
- Ledermann H., Hoxter G. (1994).** Effect of acarbose on postprandial increase in blood glucose. Additive acute effect of once daily administration in insulin treated diabetes.*Fortschritte der Medizin*. vol. (112) : 467-470p.
- Lee J., Paetzel M. (2011).** Structure of the catalytic domain of glucoamylase from *Aspergillus niger*. *structural communications*. vol. (67) : 188-192p.
- Lenoir J., AUBERGER B., GRIPON J. (1979).** Les caractères du système protéolytiques de *P.caseicolum* III, le lait. vol. (503) :138-157p.
- Leveau J., Bouix M. (1993).** Les moisissures. Ed. Tec et Doc .Lavoisier, Apria. 110-170p. Cité par Zoubiri L. (2012).
- Leveau J., Bouix M. (1993).** Microbiologie industrielle. Les micro-organismes d'intérêt industriel. Lavoisier TEC& DOC, Paris. vol. (08) : 2-92p.
- Levitzki A., Steer M. (1974).** The allosteric activation of mammalian alpha-amylase by chloride. *European Journal of Biochemistry / FEBS*. vol. (41) : 171-180p.
- Lodder J. ( 1971).** The yeasts, a taxonomic study. Ed. Amsterdam Londres, North Holland. 1385p.
- Lowry O., Rosebrough N., Farr A., Randall R. (1951).** Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*. vol. (193) : 265-275p.
- Madigan M., Martinko J. (2007).** Biologie des microorganismes. 11<sup>ème</sup> Ed. Pearson Broek, France. 478- 479p.
- Malhotra R., Noorwez S., Satyanarayana T. (2002).** Production and partial characterization of thermostable and calcium-independent alpha-amylase of an

extreme thermophile *Bacillus thermooleovorans* NP54. Lett. Appl. Microbiol. vol. 31(5) : 378-384p.

**Mamo G., Gessesse A. (1999).** Purification and characterization of two raw-starch-digesting thermostable  $\alpha$ -amylase from a *thermophilic Bacillus*. Enzyme and Microbial Technology. vol. (25) : 433-438p.

**Martin M., Plou F., Alcade M., Ballasteros A. (2003).** Immobilization on Eupergit C of cyclodextrin glucosyltransferase (CGTase) and properties of immobilized biocatalyst, J. Mol. Catal. vol. (21) : 299-308p. Cité par Nouadri T. ( 2011).

**Mastuura Y., Harada W., Kakudo M. (1984).** Structure and possible catalytic residues of Taka-amylase A. Ed. C. N. R .S, Turakai. 702p.

**Matsumura M., Matthews B. (1989).** Substantial increase of protein stability by multiple disulphide bonds. Nature. vol. (342) : 291-293p.

**Matsuo T., Odaka H., Ikeda H. (1992).** Effect of an intestinal disaccharidase inhibitor (AO-128) on obesity and diabetes. The American Journal of Clinical Nutrition. vol. (55) : 314-317p.

**Mazur A., Nakatani H. (1993).** Multiple attack mechanism in the porcine pancreatic  $\alpha$ -amylase hydrolysis of amylose and amylopectine. Arch. Bioch. Biophysics. vol. 306 (1) : 29-38.Cité par Benaouida K. (2008).

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

**Merabti R. (2006).** Isolement et caractérisation de souches levuriennes amylolytiques à partir de sol saharien algérien. Mémoire de Magistère : Biochimie et Microbiologie Appliquées. Constantine : Université Mentouri, 56p.

**Mercier C. (1986).** Starch in polysaccharides. Acad. Press, Newyork. 209-382p. Cité par Benaouida K. (2008).

**Mercier C. (1997).** Transgènes et modification quantitative et/ou qualitative de la composition de lait à de fins nutritionnels. In : Frened G. Ed. intérêts nutritionnels et diététique du lait de chèvre, Nord-France. 177p.

**Merritt A., Karn R. (1977).** The human  $\alpha$ -amylases. Advances in Human Genetics. vol (8) : 135-234p.

**Mikami B., Degano M., Hehre E., Sacchettini, J. (1994).** crystal structures of soybean beta-amylase reacted with beta maltal active site components and their apparent role in catalysis; Biochemistry. Ed. C.N.R.S, Paris. 7787p.

**Mikami B., Hehre E., Sato M., Katsube Y., Hirose M., Morita Y., Sacchettini J. (1993).** The 2.0-Å resolution structure of soybean beta-amylase complexed with alpha-cyclodextrin ,Biochemistry. Ed. C.N.R.S, Paris. 6845p.

**Miller G. (1959).** Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Analytical Chemistry. vol. (31) : 426-489p.

**Miller J. (2002).** Enzymic hydrolysis of protein by various enzyme preparations. J. Ferment. Technol. vol. (54) : 872-884p.

**Monnet D. (2008).** Etude de l'évolution des propriétés mécaniques de matériaux amylicés par sélection et/ou modifications structurales dirigées. thèse doctorat : Chimie. Reims Champagne-Ardenne : STS, 167 p.

**Mostafa Kh. (2002).** El-Sanabray: graft polymerization of different monomers onto carbamated starches derived from native and hydrolyzed starches, Cité par Monnet D. (2008).

**Muller L., Junge B., Frommer W. (1980).** In : Enzyme inhibitors. Ed. Brodbeck U. Verlag Chemie, Weinheim. 122p. Cité par Prudence M. (2006).

**Multon J., (1992).**Le sucre, les sucres, les édulcorants et les glucides de charge dans les IAA, Collection sciences et techniques agro-alimentaires. Ed.Tec & doc. Lavoisier. 286-287p. Cité par Kara Slimane A (2010 ).

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

**Nishide T., Nakamura Y., Emi M., Yamamoto T., Ogawa M., Mori T., Matsubara K. (1986).** Primary structure of human salivary alpha-amylase gene. Gene. vol. (41) : 299-304p.

**Noda K., Umeda F., Nawata H. (1997).** Effect of acarbose on glucose intolerance in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. Diabetes Research and Clinical Practice. vol. (37) : 129-136p.

**Nouadri T. ( 2011).** L' -amylase de *Penicillium camemberti* PL21:Production, Purification, Caractérisation et Immobilisation. Thèse de Doctorat : Biotechnologies. Constantine: Université Mentouri, 147 p.

- Owen G. (1966).** Digestion. In : Physiology of Mollusca. Ed. Wilbur K.M. and Yonge C.M. Academic Press, New York. vol. (2) : 53-96p. Cité par Prudence M. (2006)
- Roger P., Tran V., Lesec J., Colonna P. (1996).** "Isolation and characterisation of single chain amylose". Journal of Cereal Science. vol (24) : 247-262p.
- Palmer T. (1975).** Glucose syrups in food and drink. Process Biochemistry. Cité par Merabti R. (2006).
- Panchal C., (1990).** Yeast strain selection. Marcel Dekker. Ed. USA, New York .189p.
- Pandey A., Nigam P., Soccol C., Soccol V., Singh D., Mohan R. (2000).** Advances in microbial enzymes. Biotechnology and Applied Biochemistry. vol. 31(2) : 135-152p.
- Park C., Chang C., Kim J., Ogrydziak D., Ryui D. (1997).** Expression, secretion, and processing of rice Alpha-amylase in the yeast *Yarrowia lipolytica*. J. Biol. Chem. vol. 272 (11) : 6876-6881p.
- Parks C. (1997).** Hand book of microbiological media. Second edition by CRC. 400p. Cité par Dendouga W. (2006).
- Pederson H., Nielsen J. (2000).**The influence of nitrogen sources on the alpha-amylase productivity of *A.oryzae* in continuous cultures. Appl. Microbial. Biota. vol. (53) : 278-281p.
- Penaud S. (2006).** Analyse de la séquence génomique et étude de l'adaptation à l'acidité de *Lactobacillus delbrueckii ssp.bulgaricus* ATTC11842. Thèse de doctorat : Institut National Agronomique. Paris : Grignon, 267 p.
- Perry J., Staley J., Lory S. ( 2004).** Microbiologie. Sinauer associates, Paris. 575-576p. Cité par Belmessikh A. (2011).
- Phaff H., Starmer W. (1987).** Yeasts Associated with Plants, Insects and Soil In: Rose A.H., Harrison J.S. Ed. The yeasts, VI, Biology of yeast. 2<sup>nd</sup> Ed. Academic Press, Londres. 123-174p. Cité par Merabti R. (2006).
- Pol D. (1996).** Travaux pratiques de biologie des levures. Guide de laboratoire. ellipses Ed. marketing S, Paris. 20-38p, 42-57p, 141-151p.
- Prudence M. (2006).** Caractérisation de marqueurs génétiques fonctionnels de la nutrition et/ou de l'adaptation (les amylases) chez l'huître creuse *Crassostrea gigas* : intérêts pour la sélection. Thèse doctorat : Physiologie, Biologie des Organismes, Populations, Interactions. France : Université de Caen/Basse-Normandie, 197p.

- Raimbault M., 1998.** General and microbiological aspects of solid substrate fermentation.
- Reaven G., Lardinois C., Greenfield M., Schwartz H., Vreman H. (1990).** Effect of acarbose on carbohydrate and lipid metabolism in NIDDM patients poorly controlled by sulfonylureas. *Diabetes Care.* vol. (13) : 32-36p. Cité par Prudence M. (2006).
- Regiant A., Forllini E., Marson G. (1998).** OA El Seoud, Second International Symposium on Natural Polymers and composites, 235-239p. Cité par Kara Slimane A (2010).
- Richard H. (1984).** Enzymologie et biocatalyse. in *Biotechnologie, Techniques et Documentation* Lavoisier éditeur, Paris. 662 p. Cité par Soro Y.(2007).
- Richard K. (2005).** Génomique fonctionnelle in vivo de l'oxydoréductase PA3498 chez *Pseudomonas aeruginosa*. Université Laval, Québec. Cité par Dendouga W. (2006).
- Rina R. (2001).** Production of alpha-amylase by an Alkalophilic *Penicillium griseoroseum* RR-99. *Acta, Microbiological Polonica.* vol. 56 (2) : 102-109p.
- Rodriguez J., Martínez M., Horn N., Dodd H. (2003).** Heterologous production of bacteriocins by lactic acid bacteria. *Int. J. Food Microbiol.*vol. (80) : 101-116p.
- Roger P., Tran V., Lesec J., Colonna P. (1996).** "Isolation and characterisation of single chain amylose". *Journal of Cereal Science.* vol. (24) : 247-262p. Cité par Monnet D. (2008).
- Roquebert M. (2002).** Les contaminants biologiques des biens culturels. Elsevier. 419p. Cité par Kermiche M. (2013).
- Rown D. (1990).** *Traité de Biochimie.* Ed. De Beack,Paris. 320p. Cité par Benaouida K. (2008).
- Sakai T., Satake H., Minakata H., Takeda M. (2004).** Characterization of crustacean cardioactive peptide as a novel insect midgut factor : isolation, localization, and stimulation of -amylase activity and gut contraction. *Endocrinology.* vol. (145) : 5671-5678p.
- Santamaria R., Del Rio G., Saab G., Rodriguez M., Sobren X., Lopez-Maguia A. (1999).** Alcoholysis reactions from starch with alpha-amylases. *FEBS lett.* vol . 452(3) : 346-350p.

- Sardar M., Gupta N. (1998).** Alginate beads as an affinity material for alpha amylases. these magistry. Chemistry Department .Indian Institute of Technology .India:INA, 165p.
- Scriban R. (1984).** Biotechnologies. 2<sup>ème</sup> Ed. Techniques et Documentation-Lavoisier, Paris. 531p.
- Scriban R.(1993).** Biotechnologies. Technique et documentation -Lavoisier. Ed C.N.R.S, Paris .448p.
- Scriban R. (1988).** Biotechnologie, Techniques et Documentation, Lavoisier, Paris.
- Scriban R. (1999).** Biotechnologies. Techniques et Documentation Lavoisier .5<sup>ème</sup> édition. 157p. Cité par Benaouida K. (2008).
- Sicard P. (1982).** Applications industrielles des enzymes . In : Les enzymes production et utilisations industrielles . Durand G., Monson P. Ed. Gauthier – Villars, Paris. 164p.
- Simon P., Meunier R. (1970).** Microbiologie industrielle et génie biochimique. (31-47). Ed. Masson ET Cie, Paris Vie. 385-411p. Cité par Benaouida k. (2008).
- Sindhu G., Suprabha N., Shashidha R. (2009).** Optimization of process parameters for the production of a- amylase from *Penicillium janthinellum* (NCIM 4960) under solid state fermentation .African Journal of Microbiology Research.vol 3(9) : 498-503p.
- Sodhi H., Sharma K., Gupta J., Soi S. (2005).** Production of a thermostable a-amylase from *Bacillus sp. PS-7* by solid state fermentation and its synergistic use in the hydrolysis of malt starch for alcohol production. Process Biochemistry. Vol. (40) : 525–534p.
- Solis-Pereira S., Ernesto V., Gustavo V., Mariano G. (1993).** Affect of different sources on the synthesis of pectinase by *Aspergillus niger* in submerged and solid state fermentations.Appl.Microbiol. vol. (39) : 36-411p.
- Soro Y. (2007).** Purification et caractérisation de l'alpha-glucosidase du suc digestif de *Archachatina ventricosa* (Achatinidae); Application à la synthèse de polyglucosylfructosides. Thèse doctorat : Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bio ingénieries. Toulouse: INSA de Toulouse, Université de Cocody,183p.
- Souza P. (2010).** Application of microbial -amylase in industry-a review. Brazilian Journal of Microbiology. vol. (41) : 850-861p.

- Srinivasa M., Reddy G., Venkateswara Rao G., Sambasiva Rao K. (2004).** Studies on the extraction and characterisation of thermostable  $\alpha$ -amylase from pericarp of *Borassus indica*. *African Journal of Biotechnology*. vol. (4) : 289-291p.
- Stefanova M., Emanuilova E. (1992).** Characterization of a thermostable  $\alpha$ -amylase from *Bacillus brevis*. *Eu.J. Biochem.* vol. (207): 345-349p.
- Stein E., Fischer E. (1958).** The resistance of  $\alpha$ -amylases towards proteolytic attack. *The Journal of Biological Chemistry*. vol. (232) : 867-879p. Cité par Prudence M. (2002).
- Stein, E., Hsiu, J., Fischer, E. (1964).**  $\alpha$ -amylases as calcium-metalloenzymes. I. Preparation of calcium-free apoamylases by chelation and electro dialysis. *Biochemistry*. vol. (3) : 56-61p.
- Stiefel D., Keller P. (1975).** Comparison of human pancreatic and parotid amylase activities on different substrates. *Clinical Chemistry*. vol. (21) : 343-346p. Cité par Prudence M. (2002).
- Streit F., Corrieu G., Béal C. (2007).** Acidification improves cryotolerance of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CF11. *J. Biotechnol.* vol. (128) : 659-667.
- Sudo S., Ishikawa T., Sato K., Oba T. (1994).** Comparison of acid stable  $\alpha$ -amylase production by *Aspergillus kawachii* in solid-state and submerged cultures. *J. Fermentation and Bioengineering*. vol. 77(5) : 483-489p.
- Suortti T., Gorenstein M., Roger P. (1998).** Determination of the molecular mass of amylose". *Journal of Chromatography*. vol. (828) : 515-521p. Cité par Monnet D. (2008).
- Svensson B. (1988).** Regional distant sequence homology between amylases,  $\alpha$ -glucosidase and transglucanases. *FEBS Letters*. vol. (230) : 72-76p.
- Swann E., Frieders E., McLaughlin D. (1999).** *Microbotryum*, *Kriegeria* and the changing paradigm in basidiomycete classification. *Mycologia*. vol. (91) : 51-66p.
- Teodoro C., Martins M. (2000).** Culture conditions for the production of thermostable amylase by *Bacillus sp.* *Brazilian Journal of Microbiology*. vol. (31) : 28-302p.
- Terrouche A. (2009).** Biodegradation du mek en reacteur batch: influence de la presence d'acetone et des conditions de culture initiales. Thèse magister: Chimie Analytique et Physique. Constantine: UMC, 93p.
- Tricoli J., Shows T. (1984).** Regional assignment of human amylase to p22-p21 of chromosome 1. *Somatic Cell and Molecular Genetics*. vol. (10) : 205-210p.

**Ulacio D., Perez C., Pineda Y. (1997).** Mycoflora in tobacco plant roots (*Nicotiana tabacum*) in portuguesa state. *Bioagro. Venezuela.* vol. 9 (1) : 3-11p.

**Vallier P., Bata J., Colabert L. (1977).** Optimal conditions of alpha-amylase production by *Aspergillus oryzae* in liquid media. *Annals of Microbiology.* vol (128): 359–371p.

**Van-Uden N., Fell J. (1968).** *Advances in Microbiology of the Sea.* Academic Press, New York. vol. (1) : 167-201p.

**Vieille C., Zeikus J. (2001).** Hyperthermophilic Enzymes: Sources, Uses, and Molecular Mechanisms for Thermostability. *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* Vol. 65(1) :1-43p. Cité par Merabti R. (2006).

**Wakim J., Robinson M., Thoma J. (1969).** The active site of porcine pancreatic - amylase : factors contributing to catalysis. *Carbohydrate Research.* vol (10) : 487-503p. Cité par Prudence M. (2002).

**Walker G., White N. (2005).** *Introduction to Fungal Physiology* in Kavanagh K., *Fungi: Biology and applications.* John Wiley & Sons Ltd. England. 2p. Cité par Belmessikh A. (2011).

**Waller J. (2004).** Physiologie de l'infection par les dermatophytes. *Med. Vet. Res.* vol. 56 (4) : 101-106p.

**Wang T., Lin L., Hsu W. (1989).** Cloning and expression of *Schwanniomyces occidentalis* -amylase gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology.* vol. 55 (12) : 3167-3172p.

**Zakowski J., Bruns D. (1985).** Biochemistry of human alpha amylase isoenzymes. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences.* vol. (21) : 283-322p. Cité par Prudence M. (2002).

**Zoubiri L. (2012).** Production d'alpha amylase par des moisissures cultivées sur milieu à base de rebuts de dattes. Mémoire de magister : INATAA. Constantine : Université Mentouri, 67 p.

## **Annexes**

- **Composition du concentré Czapec**

NaNO<sub>3</sub>: 30g

KCl: 5g

MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O: 5g

FeSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O : 0.1g

ZnSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O : 0.1g

CuSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O : 0.05g

q.s.p 1l d'eau distillée. Agiter vigoureusement.

- **Composition du milieu Czapec (CYA)**

Saccharose:30g

Agar:15g

Extrait de levure : 5g

K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>:1g

Concentré Czapec:10ml

q.s.p 1l l'eau distillée.

Agiter vigoureusement à température faible puis ramener à l'ébullition.

Répartir dans des tubes. Autoclaver à 121°C pendant 15mn.

- **Composition du milieu PDA**

Extrait de pomme de terre : 1000ml

Glucose: 20g

Agar: 20g

Dissoudre l'Agar à chaud dans l'extrait puis ajouter le glucose, Stériliser à 110°C pendant 30 mn.

## Résumé

### **Titre : Intérêt techno-fonctionnel des amylases d'origine microbienne**

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

On a considéré que les plantes et les animaux étaient les meilleures sources d'enzymes. Cependant, différents microorganismes ont été intensivement utilisés pour la biosynthèse des enzymes amylolytiques. L'utilisation des microorganismes dans la production d'enzymes amylolytiques est de plus en plus sollicitée à cause de la facilité de leur culture et l'absence de risques pathogènes. L'amylase microbienne s'est avérée plus stable que celle d'origine chimique (de biosynthèse).

Le choix du milieu approprié de fermentation est essentiel pour les microorganismes, aussi bien pour la croissance que pour la production d'enzymes. La production d'enzymes amylolytiques par les microorganismes sera considérablement améliorée par l'addition de différentes sources de carbone et d'azote et des éléments énergétique.

L'utilisation de ces enzymes a été étendue à des secteurs variés, tels que les industries agroalimentaires, pharmaceutique, textile, de la brasserie, et des détergents.

**Mots clé :** Amylases, Bactéries champignons, Fermentation, Valorisation .

### **العنوان : الفائدة التقنية و الوظيفية للأميلاز ذات الأصل الجرثومي**

الأميلاز جزيئة ضخمة من صنف البروتينات الكروية نمط الأندوغلليكان صف الأنزيمات الحالة للنشاء . كان يعتقد بأن النباتات والحيوانات هي أهم مصادر للأنزيمات . ومع ذلك فقد استعملت كائنات دقيقة (متعضيات مجهرية) بكثافة في التصنيع الحيوي للأنزيمات الحالة للنشاء . استعمال الكائنات الدقيقة في إنتاج الأنزيمات الحالة للنشاء أصبح مطلوباً أكثر فأكثر وذلك لسهولة زراعتها وعدم التعرض للإصابة . لقد ثبت بأن الأميلاز الجرثومي أكثر استقراراً من الأميلاز الكيميائي (من التصنيع الحيوي).

اختيار الوسط الملائم للتخمير بالنسبة للكائنات الدقيقة ذو أهمية من حيث النمو ومن حيث إنتاج الأنزيمات . إنتاج الأنزيمات الحالة للنشاء من طرف الكائنات الدقيقة يتحسن كثيراً عند إضافة مصادر مختلفة للكربون والأزوت وعناصر طاقة .

استعمال هذه الأنزيمات توسع إلى قطاعات متنوعة كالصناعات الغذائية ، الصيدلانية ، النسيج ، الخمر ، ومواد التنظيف

**الكلمات المفتاحية :** الأميلاز ، بكتيريا ، فطريات ، تخمر ، تثمين.