

République Algérienne Démocratique et Populaire  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique  
Université ABOU BEKR BELKAID –TLEMCEM–  
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Sciences de la Terre  
et de l'Univers  
Département de Biologie



Laboratoire : Antibiotiques, Antifongiques, Physico-chimie :  
Synthèse et activité biologique

## Mémoire

En vue de l'obtention du diplôme de Master en sciences biologique

Domaine : SNV

Filière : Sciences biologiques

Spécialité : Biochimie

Thème :

**Extraction et étude de la cinétique enzymatique de l' $\alpha$ -amylase  
d'origine microbienne (*Aspergillus niger*) et végétale (Blé germé)**

Présenté par :

**M<sup>elle</sup> ADDOUN IKRAM**

Soutenu le 25-06-2025 devant les membres de jury :

|                       |                  |            |               |
|-----------------------|------------------|------------|---------------|
| <b>Présidente :</b>   | BELKACEM Nacéra  | <b>MCA</b> | Univ. Tlemcen |
| <b>Encadreur :</b>    | AZZI Rachid      | <b>Pr</b>  | Univ. Tlemcen |
| <b>Co-Encadreur :</b> | BELYAGOUBI Larbi | <b>Pr</b>  | Univ. Tlemcen |
| <b>Examinatrice :</b> | ABBOU Fayza      | <b>MCB</b> | Univ. Tlemcen |

**Année Universitaire 2024/2025**

# Remerciements



Nous tenons tout d'abord à remercier Dieu tout-puissant, qui en son nom et avec sa protection, nous avons réussi à réaliser ce travail.

Tout d'abord, nous voulons exprimer notre profonde reconnaissance envers nos proches pour leur soutien indéfectible tout au long de cette expérience académique. Leurs encouragements, leur amour et leur compréhension ont été nos piliers dans les moments de questionnement et de fatigue. Leur présence nous a donné la force nécessaire pour continuer nos études et atteindre ce moment tant attendu.

Nous tenons également à remercier chaleureusement **Mr AZZI Rachid**, Professeur au département de Biologie, faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, des sciences de la Terre et de l'Univers, Université Aboubekr Belkaid Tlemcen pour son accompagnement précieux, son expertise et sa patience tout au long de l'élaboration de ce mémoire. Ses conseils éclairés, son écoute attentive et ses encouragements ont joué un rôle essentiel dans notre apprentissage et la qualité de ce travail.

Nous souhaitons aussi à remercier vivement **Mr BELYAGOUBI Larbi**, Professeur au département de Biologie, faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, des sciences de la Terre et de l'Univers, Université Aboubekr Belkaid Tlemcen, de nous avoir offert l'opportunité de poursuivre nos études supérieures et d'approfondir nos connaissances dans notre domaine d'intérêt d'identification des moisissures et des levures. Il a mis à notre disposition le matériel et les produits chimiques nécessaires pour la réalisation de notre travail. Merci également pour son aide, ses conseils, sa gentillesse.

J'adresse mes sincères remerciements à Mme **BELKACEM Nacéra**, Maitre des conférences A au département de Biologie, faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, des sciences de la Terre et de l'Univers, Université Aboubekr Belkaid Tlemcen, pour nous avoir fait l'honneur de présider le jury de ma soutenance.

J'adresse mes sincères remerciements à Mme **ABBOU Fayza**, Maître de conférences classe B, au Département de Biologie, faculté des sciences de la nature et de la vie, sciences de la terre et de l'univers Université Abou Bekr Belkaid de Tlemcen, d'avoir accepté d'examiner ce travail



# *Dédicace*

A mes **parents** ainsi qu'à mes sœurs « **Amina ; Selma et Zineb** », tous ma famille pour leur amour leur soutien et leur encouragement constants tous au long de mon parcours.

Dans ce mémoire j'aimerais dédier une espace spécifique à une personne qui a éclairé mon parcours au long de cette expérience « **Romayssa** » ton aide ton soutien et ta présence Merci.

Merci pour tus mes amies (AMINA, MERWA...) pour votre soutien et pour avoir supporté mes moments de stress.

## ملخص

يعد إنزيم ألفا-أميلاز إنزيمًا أساسيًا يحفز التحلل المائي للروابط الجليكوزية ألفا-4،1-جليكوزيدية في النشا لإنتاج المالتوز والجلوكوز. وهو يلعب دورًا حاسمًا في العديد من العمليات البيولوجية والصناعية، مثل تحويل النشا في الصناعات الغذائية والمنسوجات والصناعات الدوائية.

يمكن إنتاج ألفا-أميلاز ألفا من مصادر مختلفة. في هذه الدراسة، استخلصنا إنزيم ألفا-أميلاز من مصدر فطري باستخدام سلالة من أسبرجيلوس نيجر المعزولة من تربة بمنطقة غرداية ، ومن مصدر نباتي باستخدام القمح في حلة انتاش. تم استخلاص الإنزيمات وتنقيتها من خلال ترسيبها بوجود كبريتات الأمونيوم.

أُجريت اختبارات إنزيمية لتقييم فعالية الإنزيم ونشاطه من خلال قياس كمية المالتوز المنتجة. حيث أظهرت النتائج وجود اختلافات كبيرة في نشاط كل إنزيم.

تمت مقارنة هذه النتائج المتحصل عليها مع إنزيم ألفا أميليز التجاري المستخرج أيضًا من أسبرجيلوس نيجر. إذ كشفت الاختبارات أن إنزيم ألفا-أميلاز المستخلص من أسبرجيلوس نيجر كان له أكبر فعالية، مع قيمة Km منخفضة تبلغ حوالي 0.016 مليمول/لتر، بينما أظهر الإنزيم المستخلص من القمح أعلى معدل سرعة تفاعل أقصى (Vmax) ، حيث بلغ 0.62 مليمول/الدقيقة. كما أظهرت الإنزيمات الثلاثة المختبرة خصائص مميزة، والتي يمكن أن تؤثر على ملاءمتها للتطبيقات الصناعية المختلفة.

وختامًا، يمكن إنتاج إنزيم ألفا-أميلاز من أسبرجيلوس نيجر والقمح بكفاءة واقتصادية، باستخدام طرق تنقية مبسطة تساعد على تقليل تكاليف الإنتاج. وتُظهر هذه الإنزيمات إمكانات واعدة في مختلف العمليات الصناعية، مع تحقيق فوائد اقتصادية وبيئية مهمة.

---

كلمات مفتاحية: ألفا-أميلاز، أسبرجيلوس، القمح، فعالية الإنزيم مستخلص

## Résumé :

L' $\alpha$ -amylase est une enzyme essentielle qui catalyse l'hydrolyse des liaisons  $\alpha$ -1,4-glycosidiques de l'amidon pour produire du maltose et du glucose. Elle joue un rôle crucial dans de nombreux processus biologiques et industriels, comme la transformation de l'amidon dans l'agroalimentaire, le textile et l'industrie pharmaceutique.

La production d' $\alpha$ -amylase peut être réalisée à partir de différentes sources. Dans ce travail, nous avons réalisé une extraction d'enzyme  $\alpha$ -amylase d'origine fongique à partir d'une souche d'*Aspergillus niger*, isolé du sol aride de Ghardaïa, et d'origine végétale à partir du blé germé. Les enzymes ont été extraites, puis purifiées par précipitation au sulfate d'ammonium.

Des tests ont été réalisés pour évaluer la cinétique enzymatique et évaluer l'activité enzymatique en mesurant la production de maltose, et les résultats ont montré des différences significatives dans les cinétiques de chaque enzyme.

Les résultats de la cinétique sont comparés à ceux d' $\alpha$ -amylase commercialisé d'origine *Aspergillus niger*.

Les tests ont révélé que l' $\alpha$ -amylase provenant de *Aspergillus niger* a la meilleure affinité pour son substrat, avec un faible paramètre  $K_m$  de l'ordre de 0.016 mmol/l, tandis que l'enzyme extraite du blé a montré la plus grande vitesse de réaction maximale  $V_{max}$  de l'ordre de 0.62 mmol/min. Les trois enzymes testées ont des caractéristiques distinctes, ce qui pourrait avoir des implications sur des différentes applications industrielles.

En conclusion, l' $\alpha$ -amylase d'*Aspergillus niger* et du blé germé peuvent être produites de manière efficace et économique, avec des méthodes de purification simplifiées pouvant réduire les coûts. Ces enzymes ont un fort potentiel pour être utilisées dans des processus industriels divers, tout en offrant des avantages économiques et environnementaux.

---

Mots clés :  $\alpha$  -amylase – *Aspergillus niger* – Blé germe, Purification- Activité enzymatique

## **Abstract:**

Alpha-amylase is an essential enzyme that catalyzes the hydrolysis of  $\alpha$ -1,4-glycosidic bonds in starch to produce maltose and glucose. It plays a crucial role in various biological and industrial processes, such as starch transformation in the food, textile, and pharmaceutical industries.

The production of  $\alpha$ -amylase can be achieved from different sources. In this study, we extracted  $\alpha$ -amylase from a fungal source, using a strain of *Aspergillus niger* isolated from the arid soil of Ghardaïa, and from a plant source, using germinated wheat. The enzymes were extracted and purified through ammonium sulfate precipitation.

Enzymatic tests were conducted to evaluate enzyme kinetics and activity by measuring the amount of maltose produced. The results showed significant differences in the kinetic behavior of each enzyme.

These findings were compared with the kinetic parameters of a commercial  $\alpha$ -amylase also derived from *Aspergillus niger*. The tests revealed that the  $\alpha$ -amylase from *Aspergillus niger* had the highest substrate affinity, with a low  $K_m$  value of around 0.016 mmol/L, while the enzyme extracted from wheat showed the highest maximum reaction rate ( $V_{max}$ ), reaching 0.62 mmol/min. The three tested enzymes exhibited distinct characteristics, which could influence their suitability for different industrial applications.

In conclusion,  $\alpha$ -amylase from *Aspergillus niger* and germinated wheat can be produced efficiently and economically, using simplified purification methods that help reduce production costs. These enzymes demonstrate strong potential for use in various industrial processes while offering economic and environmental advantages.

---

**Keywords :**  $\alpha$ -amylase – *Aspergillus niger* – Purification – Enzymatic activity.

# *Table des matières*

|                                                                |           |
|----------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Introduction.....</b>                                       | <b>I</b>  |
| <b>Revue bibliographique.....</b>                              | <b>II</b> |
| 1. Définition.....                                             | 04        |
| 2. Nomenclature.....                                           | 04        |
| 3. Caractéristiques et propriétés des $\alpha$ - amylases..... | 04        |
| 3.1. Structure de l' $\alpha$ -amylase.....                    | 05        |
| 3.2. Poids moléculaire.....                                    | 05        |
| 3.3. Résidus de domaines catalytiques .....                    | 06        |
| 3.4. pH optimum.....                                           | 07        |
| 3.5. Température .....                                         | 07        |
| 3.6. Spécificité du substrat.....                              | 07        |
| 4. Utilisation de l'alpha-amylase en biotechnologie.....       | 08        |
| 4.1. Industries de transformation de l'amidon .....            | 08        |
| 4.2. Industries alimentaires.....                              | 08        |
| 4.3. Industries des détergentes .....                          | 08        |
| 4.4. Industries textiles .....                                 | 09        |
| 4.5. Industrie papetière .....                                 | 09        |
| 4.6. Elimination des polluantes environnementaux.....          | 09        |
| 4.7. Applications moléculaires.....                            | 10        |
| 4.8. Applications dans les industries pharmaceutiques.....     | 10        |
| 5. Différentes sources de alpha amylase .....                  | 10        |
| 5.1. Origine Animale .....                                     | 10        |
| 5.2. Origine végétale.....                                     | 11        |
| • Le blé comme source de alpha amylase .....                   | 11        |

|                                                                    |            |
|--------------------------------------------------------------------|------------|
| 5.3. Origine microbienne .....                                     | 11         |
| • Alpha amylase fongique .....                                     | 11         |
| 6.Mecanismes d'actions.....                                        | 12         |
| 7. <i>Aspergillus niger</i> .....                                  | 13         |
| 7.1. Espèce <i>Aspergillus niger</i> .....                         | 13         |
| 7.2. Taxonomie .....                                               | 14         |
| 7.3. Caractères cultureux .....                                    | 14         |
| 7.4. Reproduction .....                                            | 15         |
| 7.5. Utilisation industrielle d' <i>Aspergillus niger</i> .....    | 15         |
| <b>Matériel et méthodes.....</b>                                   | <b>III</b> |
| 1.Suche et Echantillonnage.....                                    | 17         |
| 1.1. <i>Aspergillus niger</i> .....                                | 17         |
| • Ensemencement.....                                               | 17         |
| • Identification de l'isolat fongique sélectionné.....             | 18         |
| 2.Production de alpha amylase .....                                | 19         |
| 2.1. Origine fongique .....                                        | 19         |
| 2.2. Origine végétale.....                                         | 21         |
| • Extraction de l'enzyme.....                                      | 22         |
| • Précipitation des protéines.....                                 | 22         |
| 3.Evaluation de l'activité enzymatique .....                       | 22         |
| 3.1. Préparation des solutions .....                               | 22         |
| 3.1.1. Alpha -amylase commercialisé <i>Aspergillus niger</i> ..... | 22         |
| 3.1.2. Alpha -amylase extraite d' <i>Aspergillus niger</i> .....   | 22         |
| 3.1.3. Alpha amylase extraite de blé .....                         | 23         |
| 3.1.4. Préparation du substrat (Amidon soluble) .....              | 23         |
| 3.1.5. Préparation du 3,5- dinitrosalicylique (DNSA).....          | 23         |

|                                                                                                              |           |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 3.2. La cinétique enzymatique.....                                                                           | 23        |
| • Principe.....                                                                                              | 23        |
| • Protocole.....                                                                                             | 24        |
| 4.Expression des résultats.....                                                                              | 25        |
| 4.1. Dosage du maltose produit de la réaction enzymatique.....                                               | 25        |
| 4.2. Dosage des protéines par la réaction de biuret .....                                                    | 26        |
| 4.3. Détermination de l'activité e alpha amylase ( $K_m$ , $V_{max}$ ).....                                  | 27        |
| 4.4. Analyse statistique .....                                                                               | 28        |
| <b>Résultats et discussion.....</b>                                                                          | <b>VI</b> |
| 1.Observation microscopique et macroscopique de la souche <i>d'Aspergillus niger</i> .....                   | 29        |
| 2. Détermination des paramètres cinétique ( $K_m$ , $V_{max}$ ) de alpha amylase de déférentes origines..... | 30        |
| 3. Détermination de l'activité catalytique et spécifique .....                                               | 34        |
| • Discussion .....                                                                                           | 36        |
| <b>Conclusion et perspectives.....</b>                                                                       | <b>V</b>  |
| Références bibliographiques .....                                                                            | 39        |
| Annexe.....                                                                                                  | 45        |

# *Liste des tableaux*

| <i>N°</i> | <i>titres :</i>                                                                                                                                      | <i>pages :</i> |
|-----------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------|
| 01        | Les sources des enzymes microbienne                                                                                                                  | 12             |
| 02        | Gamme d'étalonnage pour le dosage du maltose produit par les réactions enzymatiques                                                                  | 25             |
| 03        | Gamme d'étalonnage pour la détermination de la concentration des protéines                                                                           | 27             |
| 04        | Vitesse initiale pour les différentes concentrations du produit formé en présence de l'enzyme $\alpha$ -amylase de Bacillus.                         | 31             |
| 05        | Vitesse initiale pour les différentes concentrations du produit formé en présence de l'enzyme $\alpha$ -amylase extraite d' <i>Aspergillus niger</i> | 31             |
| 06        | Vitesse initiale pour les différentes concentrations du produit formé en présence de l'enzyme $\alpha$ -amylase extraite du blé                      | 32             |
| 07        | les résultats obtenues ( $V_{max}$ et $K_m$ ) pour les trois enzymes                                                                                 | 33             |
| 08        | les résultats obtenus activité catalytique et spécifique                                                                                             | 33             |

## *Liste des figures*

| <b>N°</b> | <b>titres :</b>                                                                                                                                             | <b>pages :</b> |
|-----------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------|
| 01        | image en deux D représente la structure secondaire d'une protéine                                                                                           | 03             |
| 02        | schéma représente l'hydrolyse de l'amidon                                                                                                                   | 04             |
| 03        | Les structures tridimensionnelles de la taka-amylase et de l'acide-amylase de <i>Aspergillus</i> sp. Dérivé de la banque de données sur les protéines (PDB) | 05             |
| 04        | image 3D de Alpha-amylase                                                                                                                                   | 06             |
| 05        | schéma représente la spécificité de l'amidon pour l'amylase                                                                                                 | 08             |
| 06        | schéma représente mécanisme d'hydrolyse enzymatique                                                                                                         | 13             |
| 07        | Images micro et macroscopique de <i>Aspergillus niger</i>                                                                                                   | 15             |
| 08        | La région de Cherradi Ghardaïa                                                                                                                              | 17             |
| 09        | représentation microscopique d'une <i>Aspergillus niger</i> mature                                                                                          | 18             |
| 10        | La méthode de scotch                                                                                                                                        | 19             |
| 11        | <i>Aspergillus niger</i> après 7 jours d'incubation sur milieu de fermentation à base de déchets de pommes de terre                                         | 20             |
| 12        | La filtration et la préparation des enzymes pour la centrifugation                                                                                          | 20             |
| 13        | La germination du blé sur Cotton.                                                                                                                           | 21             |
| 14        | Broyages du blé germinées et l'homogénéisation                                                                                                              | 21             |
| 15        | Le culot obtenu après la centrifugation                                                                                                                     | 22             |
| 16        | Les étapes de l'activité enzymatiques étudiée                                                                                                               | 25             |
| 17        | La courbe d'étalonnage du Maltose                                                                                                                           | 26             |
| 18        | Droite d'étalonnage de gélatine pour le dosage des protéines                                                                                                | 27             |

|    |                                                                                                                                                                               |    |
|----|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 19 | Résultats d'ensemencement des <i>Aspergillus niger</i> sur boîtes pétris macroscopique                                                                                        | 29 |
| 20 | représentation microscopique de <i>Aspergillus niger</i>                                                                                                                      | 29 |
| 21 | Evolution de la formation du produit de dégradation d'amidon en fonction du temps en présence de l'enzyme $\alpha$ -amylase commercialisée d'origine <i>Aspergillus niger</i> | 30 |
| 22 | Evolution de la formation du produit de dégradation d'amidon en fonction du temps en présence de l'enzyme $\alpha$ -amylase extraite d' <i>Aspergillus niger</i>              | 31 |
| 23 | Evolution de la formation du produit de dégradation d'amidon en fonction du temps en présence de l'enzyme $\alpha$ -amylase du Blé                                            | 32 |
| 24 | Graphique Lineweaver-Burk pour l' $\alpha$ -amylase de <i>Aspergillus Niger</i>                                                                                               | 32 |
| 25 | Graphique Lineweaver-Burk pour l' $\alpha$ -amylase du blé                                                                                                                    | 33 |
| 26 | Graphique Lineweaver-Burk pour l' $\alpha$ -amylase d' <i>Aspergillus niger</i> .                                                                                             | 33 |

# *Introduction*

Les enzymes sont des biomolécules catalytiques d'origine biologique qui jouent un rôle fondamental dans les réactions biochimiques. L' $\alpha$ -amylase (EC 3.2.1.1) occupe une place importante en raison de sa capacité à catalyser l'hydrolyse des liaisons  $\alpha$ -1,4-glycosidiques dans les polysaccharides tels que l'amidon, produisant ainsi des sucres simples comme le maltose et le glucose (Gupta et al., 2003).

L' $\alpha$ -amylase est largement utilisée dans divers secteurs industriels, notamment l'agroalimentaire (pour la fabrication de sirops sucrés, la panification et la clarification des jus), la pharmacie, le textile et la production de bioéthanol. Cette enzyme représente ainsi une alternative verte et durable aux procédés chimiques classiques, souvent plus polluants et énergivores (Van der Maarel et al., 2002).

L'extraction d' $\alpha$ -amylase peut être réalisée à partir de plusieurs sources : animales, végétales ou microbiennes. Cependant, les sources microbiennes, telles que les espèces des genres *Aspergillus*, *Bacillus* ou *Penicillium*, sont privilégiées en raison de leur rendement élevé, de leur croissance rapide, de leur capacité d'adaptation aux milieux de culture et de la facilité de manipulation génétique. Parallèlement, certaines sources végétales, comme les graines germées (blé, orge), offrent également une alternative intéressante, en particulier pour des applications alimentaires ou lorsqu'une origine non microbienne est requise (Pandey et al., 2000).

L' $\alpha$ -amylase occupe également une place centrale dans le domaine de la biotechnologie moderne en raison de sa polyvalence et de sa capacité à fonctionner dans diverses conditions industrielles.

Cette enzyme est largement utilisée dans les procédés biotechnologiques pour transformer l'amidon en sucres fermentescibles, qui sont notamment utilisés dans la production de bioéthanol, la fermentation alcoolique, ou encore dans les industries des boissons. Elle est également impliquée dans le développement de biocapteurs, de systèmes enzymatiques immobilisés, ainsi que dans la conception de nanosystèmes pour une délivrance contrôlée de médicaments. Son importance croissante dans ce domaine s'explique par sa facilité de production par des microorganismes génétiquement modifiés, sa stabilité et sa capacité à être optimisée pour des applications spécifiques via des techniques de biologie moléculaire (Gupta et al., 2003 ; Sivaramakrishnan et al., 2006). Ainsi, l' $\alpha$ -amylase représente un outil biotechnologique de premier plan dans les efforts de transition vers des procédés plus durables, plus efficaces et plus respectueux de l'environnement

L'intention de ce mémoire est de comparer l'extraction d' $\alpha$ -amylase à partir de sources microbiennes (notamment *Aspergillus niger*) et végétales (le blé germé), en évaluant leur activité enzymatique.

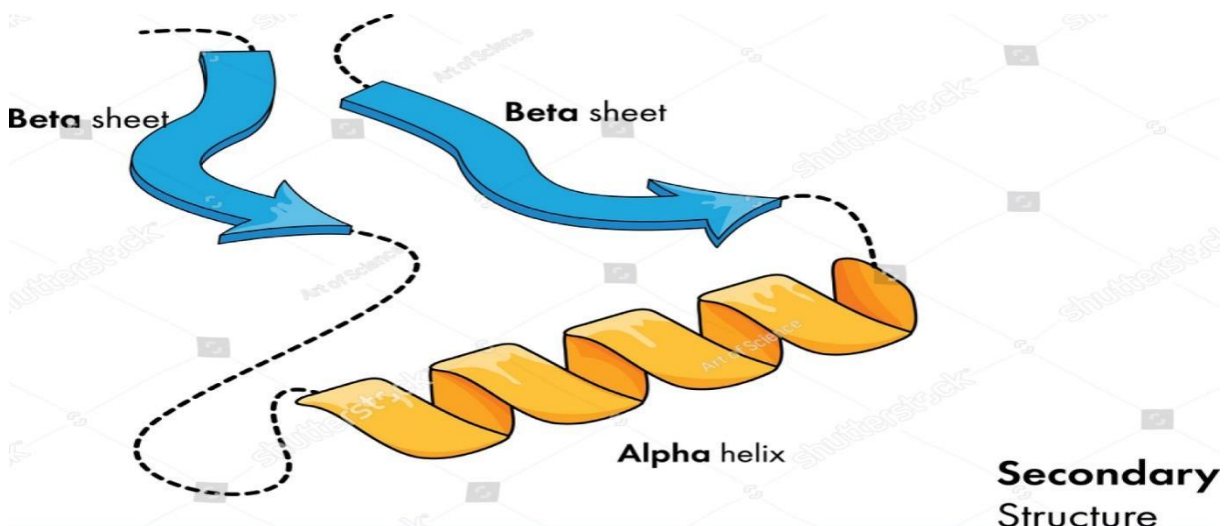
L'objectif de ce mémoire est d'étudier l'activité enzymatique des enzymes  $\alpha$ -amylase extraites d'une source microbienne (*Aspergillus niger*) et végétale (le blé germé), en évaluant les paramètres cinétiques ( $V_{max}$  et  $K_m$ ) et leurs activités catalytiques et spécifiques.

# Revue bibliographique

## 1. Généralités

Les enzymes sont des macromolécules protéiques de masse moléculaire importante (10 à 100 kDa). Elles catalysent les réactions chimiques en augmentant leur vitesse d'au moins  $10^6$  fois par rapport à la réaction en l'absence de ces molécules. Elles sont en effet présentes dans les cellules de tous les organismes vivants où elles jouent un rôle essentiel dans le contrôle des procédés métaboliques qui permettent la transformation des nutriments en énergie et en matériaux cellulaires. (Jones et al. 2010).

Ces protéines ont tendance à se replier sur elles-mêmes pour former principalement deux types d'arrangements secondaires, des hélices alpha et des feuillets beta. Cette structure est stabilisée par la création de liaisons hydrogènes. L'arrangement de ces structures secondaires les unes par rapport aux autres forme une structure tertiaire, stabilisée par des ponts disulfures. Illustre ces arrangements secondaires et leur organisation dans la structure des protéines (**Figure 1**) (Berg et al., 2002).



**Figure 1** : Image en deux Dimension (2D) représente la structure secondaire d'une protéine.

Les enzymes sont désormais utilisées dans divers secteurs de l'industrie. Elles sont utilisées dans les détergents, l'industrie papetière, l'industrie textile, l'industrie alimentaire, et bien d'autres secteurs encore. Utilisées depuis l'Antiquité, elles servent à saccharifier l'amidon, à traiter les troubles digestifs et à fabriquer des aliments.

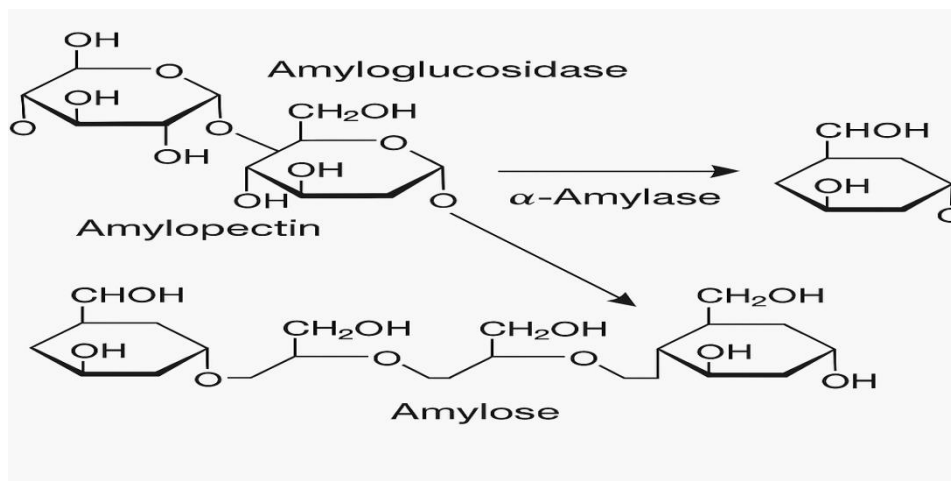
Parmi les nombreuses enzymes largement utilisées, l' $\alpha$ -amylase fait l'objet d'une demande croissante en raison de son rôle crucial dans l'hydrolyse de l'amidon et des applications de cette

action hydrolytique. Les sections suivantes décrivent les types d'amylases et leurs rôles dans les réactions enzymatiques. (Drauz et al., 2010).

## 2. Définition

L' $\alpha$ -amylase est une enzyme hydrolase qui catalyse l'hydrolyse des liaisons  $\alpha$ -1,4-glycosidiques internes de l'amidon pour produire du glucose et du maltose. Il s'agit d'une métalloprotéine dépendante du calcium, ce qui signifie qu'elle nécessite la présence d'un cofacteur métallique pour son activité (**Figure 2**).

Il existe deux types d'hydrolases : les endo-hydrolases et les exo-hydrolases. Les endo-hydrolases agissent à l'intérieur de la molécule de substrat, tandis que les exo-hydrolases agissent sur les extrémités non réductrices terminales. Ainsi, les résidus terminaux de glucose et les liaisons  $\alpha$ -1,6 ne peuvent pas être clivés par l' $\alpha$ -amylase (Gupta et al., 2003).



**Figure 2** : schéma représente l'hydrolyse de l'amidon

## 3. Nomenclature

Code : (E.C.3.2.1.1)

Nom commun : alpha- amylase.

Nom systématique : 1,4-alpha -D-glucane-4-glucanohydrolase (Schumburg et Slzmann, 1991).

## 4. Caractéristiques

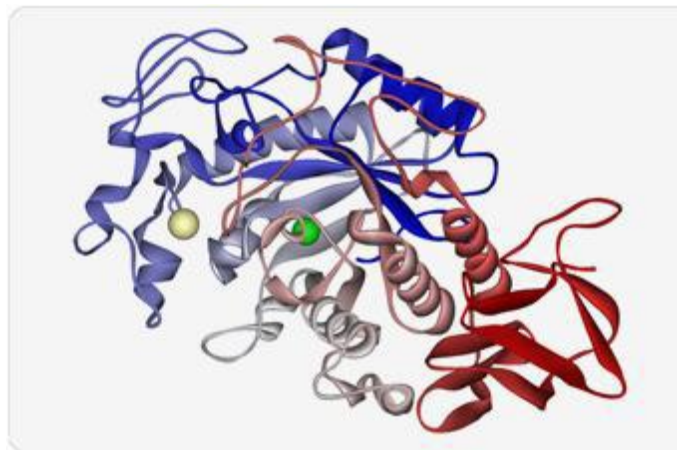
### 4.1. Structure

L' $\alpha$ -amylase est une glycoprotéine comportant trois domaines globulaires (A, B et C) (Farber et al., 1990). Elle renferme une partie glucidique formée principalement de D-mannose, D-glucose, D-galactose, D-xylose et D-glucosamine, associés chimiquement à la chaîne polypeptidique constituée de 471 à 483 résidus d'acides aminés avec 4 ou 5 ponts disulfures (**Figure 3**) (Heslot, 1996).

- Le domaine central A formé une structure de tonneau ( $\beta/\alpha$ ) qui contient 8 feuillets  $\beta$  plissés disposés de façon parallèle et 8 hélices  $\alpha$ . Il porte le site actif à la partie C-terminale des feuillets  $\beta$ .

- Le domaine B est formé d'une boucle de 64 résidus d'acide aminé reliant A- $\beta$ 3 avec A- $\alpha$ 3 et constitue une sorte de « couvercle » au-dessus du site actif.

Le domaine C est constitué d'un tonneau composé de 8 feuillets  $\beta$  antiparallèles (Kadziola et al., 1994).



**Figure 3** : Image en 3D de l'Alpha-amylase

### 4.2. Poids moléculaire

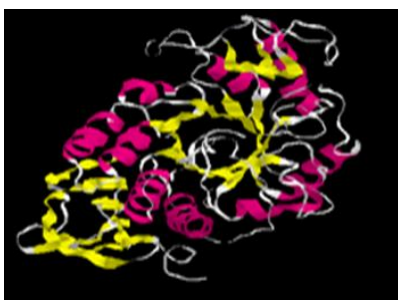
Le poids moléculaire des  $\alpha$ -amylases varie non seulement d'une origine à l'autre, mais également d'une espèce à l'autre. Il est compris entre 40 000 et 90 000 daltons (Schomburg et Salzmann, 1991).

### 4.3. Résidus et domaines catalytiques

La liaison  $\alpha$ -glycosidique est très stable et présente une vitesse d'hydrolyse spontanée à température ambiante. Le mécanisme catalytique des O-glycosyl hydrolases est répandu dans la nature. Ces enzymes hydrolysent la liaison glycosidique qui existent entre deux ou plusieurs glucides, ou entre un glucide et un groupement non glucidique. Un système de classification des glycosyl hydrolases, basé sur la similarité de séquence, a permis de répartir 85 familles différentes. La plupart des enzymes hydrolysant l'amidon appartiennent à la famille des  $\alpha$ -amylases ou à la famille 13 des glycosyl hydrolases, selon l'homologie de séquence d'acides aminés selon la classification d'Henrissat (1991) (**Figure 3**).

Les caractéristiques communes à la famille des  $\alpha$ -amylases sont les suivantes

- Activité d'hydrolyse où les enzymes agissent sur les liaisons  $\alpha$ -glycosidiques, en hydrolysant cette liaison pour produire des mono- ou oligosaccharides  $\alpha$ -anomériques ;
  - Activité de transglycosylation où des liaisons  $\alpha$ -1-4 ou 1-6 glycosidiques sont formées ;
  - Une combinaison des deux activités.
- Possèdent une structure de barillet TIM contenant les résidus du site catalytique ( $\beta/\alpha$ 8).
  - Elles possèdent quatre régions conservées dans leur séquence primaire. Certains de ces acides aminés conservés forment le site catalytique et d'autres sont impliqués dans la stabilité de la topologie conservée du tonneau TIM. Ces enzymes sont répertoriées dans la **Figure 4**.



Baril TIM de 2taa (Taka-amylase)



Baril TIM de 2aaa (acide-amylase)

**Figure 4** : Les structures tridimensionnelles de la taka-amylase et de l'acide-amylase d'*Aspergillus sp.* dérivé de la banque de données sur les protéines (PDB).

La famille des  $\alpha$ -amylases est celle du double déplacement à rétention (Van der Maarel et al., 2002). Le mécanisme de rétention de l'alpha est une caractéristique des enzymes de cette famille. Leurs spécificités réactionnelles varient considérablement. La fixation de différents domaines au site catalytique ou à des sous-sites de liaison de sucres supplémentaires autour de ce site constitue la principale raison de ces différences. Le domaine catalytique A est le domaine le plus conservé de la famille des  $\alpha$ -amylases. Il est constitué d'une structure en tonneau à la partie aminoterminal (β/α 8) (Mastuura et al., 1984).

#### 4.4. pH

Les  $\alpha$ -amylases sont généralement stables sur une large gamme de pH, allant de 4 à 11 (Fogarty et al., 1979) (Vihinen et al., 1989) (Hamilton et al., 1999) (Saito et al., 1973) (Khoo et al., 1994). Cependant, des  $\alpha$ -amylases avec une stabilité dans une gamme étroite ont également été rapportées. (Coronado et al., 2000 ; Robyt et al., 1971)

#### 4.5. Température

La température optimale pour l'activité de l' $\alpha$ -amylase dépend de la croissance du micro-organisme. Les thermostabilités sont affectées par de nombreux facteurs, tels que la présence de calcium, de substrat et d'autres stabilisants (Vihinen et al., 1989).

Selon l'origine et l'espèce, les  $\alpha$ -amylases ont des températures optimales comprises entre 40 °C et 90 °C (Schomburg et al., 1991). En effet, l' $\alpha$ -amylase bactérienne est réputée pour sa grande thermostabilité. Celle de *Bacillus amyloliquefaciens* présente un optimum de température qui, selon les applications, se situe entre 70 °C et 90 °C, alors que l'optimum de  $\alpha$ -amylase fongique se situe entre 50 °C et 70 °C (Panchal, 1990).

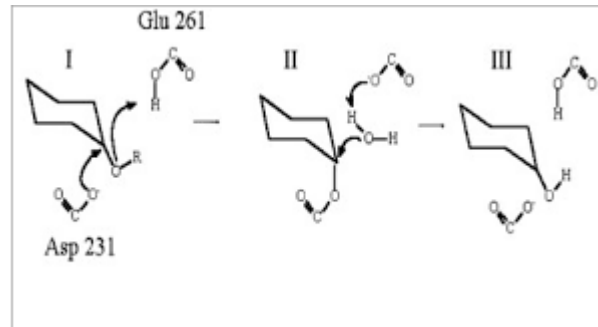
#### 4.6. Les effecteurs

Toutes les alpha-amylases exigent la liaison à au moins un ion calcium pour le maintien de leur intégrité et de leur stabilité structurale (Stear et Levitzki, 1973). Cependant, lorsque la concentration de calcium dépasse 20 mM, il agit comme un inhibiteur (Boel et al., 1990).

#### 4.7. Spécificités du substrat

L'amidon constitue le substrat naturel de l'amylase alpha. Dans la molécule d'amidon, les unités de glucose sont reliées par des liaisons osidiques  $\alpha$  (1- 4) en formant ainsi des chaînes hélicoïdales d'amylose, sur lesquelles de courtes chaînes de même structure se branchent par

des liaisons osidiques  $\alpha$  (1-6) (**Figure 5**) La production d' $\alpha$ -amylase par certaines souches fongiques (*Aspergillus* sp., *Rhizopus* sp. Et *Penicillium* sp.) est contrôlée par l'amidon, ce qui constitue une induction de l'enzyme par son substrat naturel (Leveau et Bouix, 1993 ; Nouadri, 2011).



**Figure 5** : Schéma représente la spécificité de l'amidon pour l'amylase

## 5. Utilisation de l'alpha-amylase en biotechnologie

### 5.1. Industries de transformation de l'amidon

Les  $\alpha$ -amylases thermostables transforment l'amidon en glucose et fructose dans l'industrie. Celles de *Bacillus* sont privilégiées car elles résistent aux hautes températures (70-100 °C), réduisent les risques de contamination, accélèrent les réactions et permettent de réaliser des économies d'énergie (Regulapati et al., 2007 ; Maarel et al., 2002 ; Ogasahara et al., 1970).

### 5.2. Industries alimentaires

Grâce aux avancées biotechnologiques, les amylases génétiquement modifiées sont employées en toute sécurité dans l'industrie alimentaire (boulangerie, brasserie, jus de fruits, sirops, etc.). En boulangerie, l' $\alpha$ -amylase dégrade l'amidon de la farine, permet d'accélérer la fermentation, d'améliorer le volume, la texture et le goût des produits, et de prolonger leur fraîcheur. Aujourd'hui, une amylase maltogénique thermostable issue de *Bacillus stearothermophilus* est utilisée à des fins commerciales (Gupta et al., 2003 ; Zeman et al., 1985 ; Ogasahara et al., 1970).

### 5.3. Industries des détergents

Les enzymes, et plus particulièrement les amylases, sont largement utilisées dans l'industrie des détergents, avec une présence dans 90 % des détergents liquides. Elles aident à supprimer les taches d'amidon (pâtes, chocolat, sauces, etc.) et permettent d'améliorer la blancheur et la

propreté des surfaces. Leur efficacité est conditionnée par leur stabilité et leur compatibilité avec les composants du détergent, tout en contribuant à rendre les produits plus écologiques (Mitidieri et al., 2006 ; Kirk et al., 2002).

Dans les détergents, l'utilisation d'amylases pose problème : elles doivent rester stables et actives en présence de protéases. Les températures de lavage ont baissé pour économiser l'énergie, ce qui complique le nettoyage, mais les enzymes peuvent aider les amylases utilisées sont souvent issues de *Bacillus* ou d'*Aspergillus* (Ramasesh et al., 1982).

#### **5.4. Industries textiles**

Dans l'industrie du textile, après le tissage, l' $\alpha$ -amylase est employée pour supprimer l'amidon déposé sur les fils. Cette enzyme élimine l'ensimage sans endommager le tissu. Les  $\alpha$ -amylases provenant de *Bacillus* sont utilisées dans ce domaine depuis longtemps (Feitkenhauer, 2003), (Haq et al., 2010).

#### **5.5. Industries papetières**

L' $\alpha$ -amylase est un produit utilisé dans l'industrie papetière. Elle permet de modifier l'amidon du papier. Ainsi, elle réduit sa viscosité tout en maintenant un haut poids moléculaire.

L'amélioration de l'encollage et de la finition du papier est rendue possible par ce procédé, ce qui donne une surface lisse et résistante.

L' $\alpha$ -amylase active à froid est particulièrement utile, car elle permet de réduire la viscosité de l'amidon pour un couchage optimal (Kuddus, 2010 ; Fryer et al., 2009 ; Bruinenberg et al., 1996).

#### **5.6. Élimination des polluants environnementaux**

L'amidon est un polysaccharide qui joue un rôle de réserve d'énergie par de nombreuses plantes. On le trouve aussi en grande quantité dans les déchets de la transformation végétale.

Des problèmes de pollution peuvent être causés par ces déchets.

Pour purifier ces matières polluantes, on peut utiliser des enzymes amylolytiques microbiennes. Celles-ci sont produites par certaines levures. Elles servent à décomposer l'amidon (Wu et al., 2008 ; Barbesgard et al., 1999).

### 5.7. Applications moléculaires

L'expression des gènes peut être étudiée par le biais de l'analyse des dosages de gènes rapporteurs.

En biologie moléculaire, on peut utiliser l'amylase comme méthode de sélection complémentaire à la résistance aux antibiotiques

Une perte de l'activité de l'amylase est causée par l'insertion d'ADN étranger dans le gène de l'amylase. Cette perte est facilement détectable par une coloration à l'iode (Aubel et al., 2001 ; Ikuta et al., 1990).

### 5.8. Applications dans les industries pharmaceutiques

L' $\alpha$ -amylase pourrait être utile dans les industries pharmaceutiques et de la chimie fine, à condition que des enzymes adaptées soient développées.

Elle abîme des produits naturels que l'on peut décomposer, comme l'amidon, qu'on trouve dans certains médicaments

L'ajout d' $\alpha$ -amylase aux comprimés d'amylose réticulée (CLA) peut influencer la libération des médicaments. En effet, cela modifie la vitesse de dégradation et donc la cinétique de libération. Cette modification est particulièrement importante pour les médicaments à solubilité limitée (Dumoulin et al., 1999 ; Fogarty et al., 1980).

## 6. Différentes sources et origines de l'alpha amylase

Les alpha-amylases sont abondantes dans tous les règnes, elles ont été isolées par extraction à partir des tissus végétaux et animaux ou par fermentation par des cellules microbiennes (Srinivasa Rao et al., 2004).

### 6.1. Origine animale

L'extraction des amylases d'origine animale se fait généralement à partir de la salive et du pancréas des mammifères (French, 1975).

Les alpha amylases d'origine animale sont incapables d'hydrolyser la liaison  $\alpha$  (1→6) de l'amylopectine ou des 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, du maltose et des dextrines limites pour l'amylopectine (Coolbear et al., 1992).

## 6.2. Origine végétale

L'alpha-amylase végétale possède une importance primordiale dans le métabolisme glucidique où elles participent à la conversion de l'amidon en le réduisant en sucres réducteurs qui sont la source énergétique nécessaire à la germination et elles sont généralement incapable d'hydrolyser le maltose. Ces enzymes végétales sont synthétisées par un mécanisme cellulaire complexe au cours de la germination des graines, qui requiert une activité enzymatique très importante pour mobiliser les réserves et permettre le développement de l'embryon (Brawn et al., 1993).

### ➤ Le blé comme source de alpha amylase (exemple étudiées)

Le blé est une source naturelle d'alpha-amylase est principalement produite lorsque le grain de blé commence à germer, activant ainsi des mécanismes enzymatiques pour transformer les réserves d'amidon en énergie utilisable. Dans le blé, la quantité d'alpha-amylase peut varier selon les conditions de culture et de récolte, notamment en cas de germination précoce causée par l'humidité. Cette variation est importante car elle influence directement la qualité technologique du blé. Un taux équilibré d'alpha-amylase est donc crucial pour garantir de bonnes propriétés de transformation du blé (Zhao et al ;2018).

## 6.3. Origine microbienne

L'alpha-amylase bactérienne est obtenue principalement par fermentation de bacillacées (Milner et al., 1997). Historiquement la première enzyme a été produite à partir de souches de *Bacillus amyloliquefaciens* et *B. licheniformis* (Bousseboua, 2002) ou *B. subtilis* (Mctigue et al., 1995). Cependant, d'autres espèces produisant également cette enzyme ont été découvertes, telles que *Thermobifida fusca* (Chao-Hsun Yang et Wen-Hsiung Liu, 2004) et *Streptomyces sp.* (Samrat Chakrabortya et al., 2009).

De nombreuses amylases aux propriétés industrielles ont été découvertes chez des bactéries acidophiles, alcalinophiles et thermophiles, ce qui ouvre de nouvelles perspectives pour leur utilisation dans divers secteurs industriels. Ces enzymes interviennent dans la transformation de l'amidon par fragmentation rapide en clivant les liaisons  $\alpha$  (1→4) (Nadirman et al., 2006).

### ➤ L'alpha-amylase fongique

La production industrielle d'enzymes à partir de microorganismes fongiques ce trouve depuis longtemps, car la première production d'alpha-amylase a été réussie par Takamine en 1894. Les principaux microorganismes fongiques produisant d'alpha-amylase sont les moisissures des genres *Aspergillus* et *Rhizopus* (**Tableau 1**). En plus des moisissures, les levures participent également à la production d'alpha-amylase (Bouix et Leveau, 1999) (**Tableau 1**).

**Tableau 1** : Les sources des enzymes microbiennes.

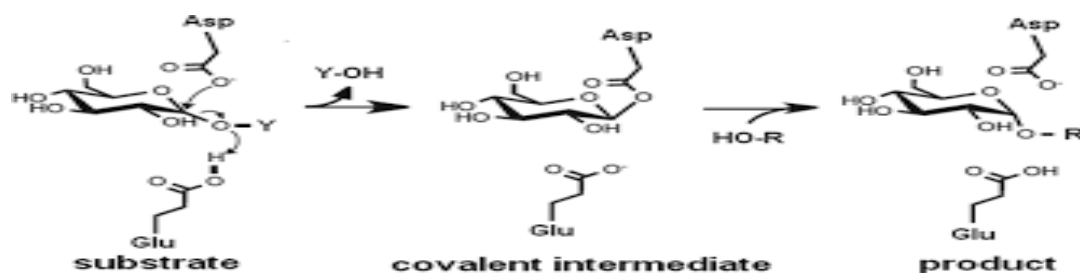
| <b>Enzymes microbiennes</b>        |
|------------------------------------|
| <b>Bactéries</b>                   |
| <i>Bacillus licheniformis</i>      |
| <i>Bacillus steorothermophilus</i> |
| <i>Bacills circulans</i>           |
| <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>  |
| <i>Bacills coagulans</i>           |
| <i>Thermomonospora fuska</i>       |
| <i>Alteromonas haloplanktis</i>    |
| <i>Termus filiformis</i>           |
| <i>Streptomyces rimosus</i>        |
| <b>Moisissure</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>Levure</b>                      |
| <i>Saccharmyces cerevisiae</i>     |
| <i>Canadida</i>                    |
| <i>Pichia</i>                      |
| <i>Endomycopsis</i>                |
| <i>Lipomyces</i>                   |

## 7. Mécanisme d'action

L'activité catalytique de l'enzyme implique la participation des trois acides aminés du site actif ASP 231 (nucléophile catalytique), Glu 261(donneur catalytique de l'hydrogène) et ASP 328

(l'aide de catalyse) (Mc carter et Withers, 1996 ; Uitdehaag et al., 1999). En effet, la réaction catalytique se produit en trois étapes :

- Protonation de l'oxygène glycosidiques par le donneur de proton Glu 261 suivi d'une attaque nucléophile sur C1 du résidu du sucre en position 1 par Asp 231 et le départ de L'extrémité réductrice du substrat.
- Activation d'une molécule d'eau, vraisemblablement par le maintien du Glu 261 Déprotonné
- Régénération de l'état initial et libération de l'autre fragment du substrat, par hydrolyse du lien covalent entre l'oxygène nucléophile de l'Asp 231 et le C1de résidu du sucre en position1 (**Figure 6**) (Nielson et al., 2001 ; Davies et al., 1999).



**Figure 6** : Schéma qui représente le mécanisme d'hydrolyse enzymatique

## 8. *Aspergillus niger*

Le nom *Aspergillus* a été introduit pour la première fois par Micheli en 1729 pour décrire des champignons asexués (Tsang et al., 2018) et le genre *Aspergillus* comprend environ 180 espèces vitales pour l'industrie alimentaire (Robert et al., 1989).

Certaines d'entre elles sont exploitées pour produire des aliments fermentés (Tsang et al., 2018)

### 8.1. Espèce *Aspergillus niger*

L'*Aspergillus niger*, également appelé aspergille noire, est l'une des espèces les plus utilisées. On le trouve dans les industries agro-alimentaires ainsi que dans les différentes recherches visant à étudier ses propriétés.

Elle produit de nombreux métabolites d'intérêt, tels que les enzymes pectinases, amylases et les acides organiques. Il s'agit d'un champignon filamenteux ascomycète. C'est une des espèces

des plus connues de genre *Aspergillus niger*, elle forme une moisissure noire sur les fruits et les légumes (Raper et al., 1977).

L'*Aspergillus niger* est capable de croître dans une large plage de température (6-47 °C). Il présente un optimum à 35-37 °C. Cette espèce se caractérise par la production d'un grand nombre de spores en chaîne. La sporulation produit des conidies contenant des spores asexuées.

Ces dernières sont haploïdes et disséminées dans l'atmosphère après maturation. La croissance végétative se fait, initiée par la germination des spores, qui donne lieu à la formation d'un hyphes tubulaire, donnant naissance à un réseau mycélien par ramification qui acquiert les (Ward et al., 2006 ; Meyer et al., 2004).

## 8.2. Taxonomie

En 1980, Al-Musallam a révisé la taxonomie de ce groupe de champignons en utilisant une analyse par grappes a permis d'évaluer l'ensemble des paramètres morphologiques et culturels disponibles.

La nature du groupe *Aspergillus*, qui se compose de champignons filamenteux et cosmopolites.

Il comprend des espèces importantes pour la mycologie médicale et alimentaire, ainsi que pour la recherche (Díaz et al., 2020).

## 8.3. Caractères culturels

*Aspergillus niger* pousse rapidement (2-3 jours) sur les milieux de culture classiques (géloseau malt et Sabouraud). La température optimale de croissance varie généralement entre 25 et 30 °C, mais peut aller jusqu'à 42 °C (Tabuc, 2007), et son développement est également inhibé par l'ajout d'actidione au milieu de culture (Quatresous, 2011). Les colonies peuvent atteindre 3 à 4 cm en 10 jours, avec un mycélium hyalin et étendu, principalement immergé dans la gélose. Les colonies apparaissent d'abord blanches, puis jaunes, et enfin granuleuses noires lors de la maturation (**Figure 7**) (Quatresous, 2011). En effet, ce champignon produit également du mycélium aérien blanc et de très nombreuses structures sporifères érigées, pulvérulentes, brun-noir, généralement disposées en cercles concentriques (Quatresous, 2011). Le revers des colonies est incolore ou jaune pâle, et un exsudat jaune pâle peut être produit en toutes petites gouttelettes (Tabuc, 2007).



**Figure 7 :** Images micro et macroscopique de *Aspergillus niger*

#### 8.4. Reproduction

*A. niger* est un champignon ascomycète connu pour se reproduire uniquement par des spores asexuées (Wadman et al., 2009). Le cycle asexué est le principal moyen de dispersion cellulaire et protège le génome fongique dans des conditions défavorables, et la production de métabolites secondaires est fréquemment associée à ces processus de développement. La sporulation produit des conidies contenant des spores haploïdes et asexuées uni-nuclées (Ward et al., 2006). La croissance est initiée par germination de la spore, avec formation d'hyphes tubulaires, se développant de manière apolaire par extension apicale et ramification pour former un réseau de mycélium, qui acquiert des nutriments de l'environnement (Ward et al., 2006).

#### 8.5. Utilisations industrielles d'*Aspergillus niger*

Les principales applications industrielles d'*A. niger* sont appuyées sur l'art traditionnel et les sciences liées à la production d'aliments fermentés, ainsi que sur les procédés classiques de biochimie, microbiologie, génétique et le génie génétique (Ward et al., 2006). L'*A. niger* est aussi utilisé comme usine cellulaire pour la production d'enzymes telles que la pectinase, la protéase et l'amyloglucosidase, qui étaient les premières à être exploitées et ont initialement été produites en culture de surface (Schuster et al., 2002). La plupart des préparations commerciales des pectinases sont d'origine fongique, les pectinases d'*A. niger* sont les plus utilisées en industrie, car ces enzymes sont extracellulaires ce qui facilite leur extraction et leur purification. De plus, l'*A. niger* est considéré comme inoffensif pour l'alimentation, ce qui favorise l'utilisation des métabolites produits par ce champignon en toute sécurité (Morula et al., 2011).

L'*Aspergillus niger* peut être cultivé et utilisé pour synthétiser d'autres composés utiles dans divers domaines :

### ✓ Production d'acide citrique

En 1919, *Aspergillus niger* est devenu un organisme industriellement utilisé, lorsqu'il a été possible pour la première fois de produire de l'acide citrique par fermentation (Roukas, 2000 ; Schuster et al., 2002). C'est grâce aux rendements élevés de ces organismes que l'acide citrique est produit presque exclusivement par la fermentation d'*Aspergillus niger* et d'*Aspergillus fistulosum*. La Food and Drug Administration (FDA) a classé *Aspergillus niger* comme source d'acide citrique (Schuster et al., 2002). Il est couramment employé dans une variété d'industries dont les ventes dépassent largement celles des autres métabolites tels que l'acide gluconique (Roukas, 2000 ; Schuster et al., 2002).

### ✓ Reproduction d'enzymes

L'espèce d'*Aspergillus niger* est capable de produire une très large gamme d'enzymes d'intérêt industriel à part les pectinases, citant : les protéases, les amylases..., etc. Les principales activités protéolytiques d'*Aspergillus niger* semblent être dues à des protéases extracellulaires acides, ce qui reflète l'adaptation de ce dernier aux milieux de croissance à pH acide (Schuster et al., 2002). Grâce à ses fortes capacités hydrolytiques et à sa tolérance à l'acidité (pH < 3), *Aspergillus niger* permet d'éviter les contaminations bactériennes durant les processus biotechnologiques (Jarai et al., 1994 ; Dekrif-Dakhmouche et al., 2006).

# Matériel et méthodes

Cette étude est réalisée au sein de laboratoire de recherche « antibiotique antifongique physico-chimie, synthèse et activité biologique », et le laboratoire « Produits naturels » département de biologie, faculté des sciences de la nature et de la vie, des sciences de la terre et de l'univers, université Abou Bakr Belkaïd, Tlemcen.

Elle a pour objectif l'étude de la cinétique et de l'activité enzymatique de l'enzyme  $\alpha$ -amylase d'origine fongique, extraite d'*Aspergillus niger* cultivées sur un milieu liquide à base de bouillon dextrose de pomme de terre, et d'origine végétal, extraite de blé germiné, comparée à celle d' $\alpha$ -amylase commercialisée d'origine fongique, purifié à partir de *Aspergillus Niger*.

## 1.Souche Echantillonnage

### 1.1. d'*Aspergillus niger*

L'échantillon d' *Aspergillus niger* est prélevé des sols. Dans le présent travail, les échantillons sont prélevés à partir de région des zones aride : la région de Cherradi Ghardaïa située à 600km au sud d'Alger. Cette région a un climat désertique chaud (**Figure 8**).

Une quantité du sol est prélevée à partir d'une profondeur de 10 cm à l'aide d'une spatule stérile et est introduite dans une seringue stérile afin de la transporter jusqu'au laboratoire. Ce prélèvement et l'isolement ont été réalisés par le Pr BELYAGOUBI Larbi, laboratoire des produits naturels, département de biologie, faculté des sciences de la nature et de la vie, des sciences de la terre et de l'univers, université Abou Bakr Belkaïd, Tlemcen.



**Figure 8** : une carte qui représente la région de Cherradi Ghardaïa

### ➤ Ensemencement

Les échantillons sont déposés sur des boîtes de Piétri contenant du milieu gélosé bouillon dextrose de pomme de terre (PDB), puis répartis uniformément à l'aide d'une spatule stérile en effectuant un mouvement de balayage et de rotation sur toute la surface du milieu. Ensuite, les boîtes sont incubées à 30°C pendant 5 jours, la durée nécessaire à l'apparition des colonies fongiques.

### ➤ Identification de l'isolat fongique sélectionné

L'identification de l'isolat sélectionné est basée sur l'étude morphologique afin de déterminer leur aspect macroscopique et microscopique.

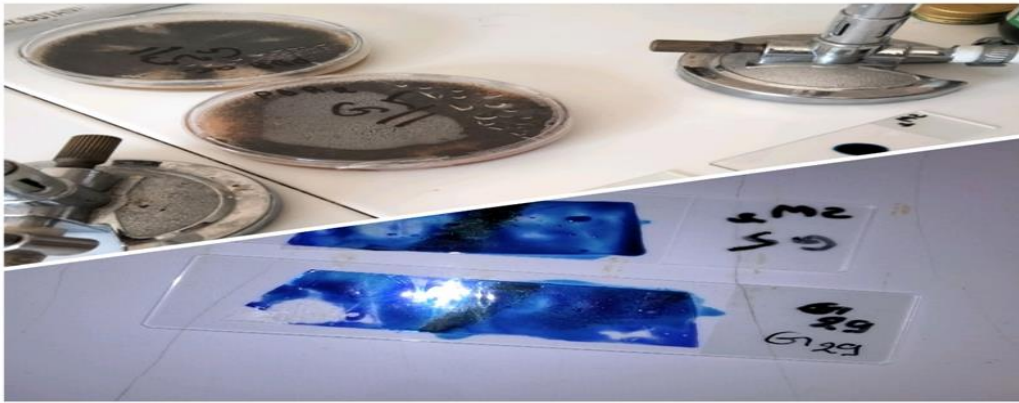
#### -Observation microscopique

L'identification microscopique des champignons repose sur la méthode du scotch (test du drapeau), utilisée pour les cultures filamenteuses et poudreuses et la méthode du lactophénol-bleu de coton (**Figure 9**) (Chabasse et al.,2002).



**Figure 9** : Représentation microscopique d'*Aspergillus niger* mature (Photo laboratoire)

Un petit morceau de scotch est appliqué par la face collante sur la colonie à l'aide d'une pince, puis déposé sur une lame porte –objet, Une goutte de colorant (Bleu de coton) est, ensuite, ajoutée. L'ensemble est recouvert d'une lamelle couvre-objet qui écrase la préparation (**figure 10**) (Chabasse et al., 2002).



**Figure10** : La méthode de scotch (**Photo laboratoire**)

## 2. Production de l' $\alpha$ -amylase

### 2.1. D'origine fongique : Extrait d'*Aspergillus niger* « fermentation en milieu liquide »

- Préparation du milieu de culture liquide

Un milieu de culture liquide a été préparé en utilisant du PDB (Bouillon de dextrose de pomme de terre) liquide enrichi en extraits de pomme de terre et d'autres nutriments essentiels (Acide lactique, sucre). Ce milieu a été sélectionné pour sa capacité à favoriser la croissance optimale du micro-organisme cible et à stimuler la production d'amylase. Les extraits de pomme de terre fournissent une source riche en hydrates de carbone, tandis que les autres nutriments ajoutés assurent un environnement nutritif complet pour le développement et la fonction enzymatique d'*Aspergillus niger*.

- Inoculation de la souche

L'inoculation de la souche d'*Aspergillus niger* a été réalisée en introduisant une quantité déterminée de la souche cultivée dans le milieu de culture liquide. Cette étape implique l'utilisation d'une culture préexistante pour ensemercer le milieu de fermentation.

- Incubation

Par la suite, l'erlenmeyer contenant la culture inoculée a été placé dans un incubateur réglé entre 25°C et 30°C (température optimale de croissance pour *Aspergillus niger*), La culture a été laissée, fermenter pendant 7 jours, afin de permettre à la souche de se développer et de produire de l'amylase. Pendant la phase d'incubation, un suivi régulier de la fermentation a été effectué. Cela implique l'observation visuelle de l'aspect du milieu de culture pour

détecter tout changement significatif, ainsi que l'évaluation de la turbidité de la culture. (Figure 11)

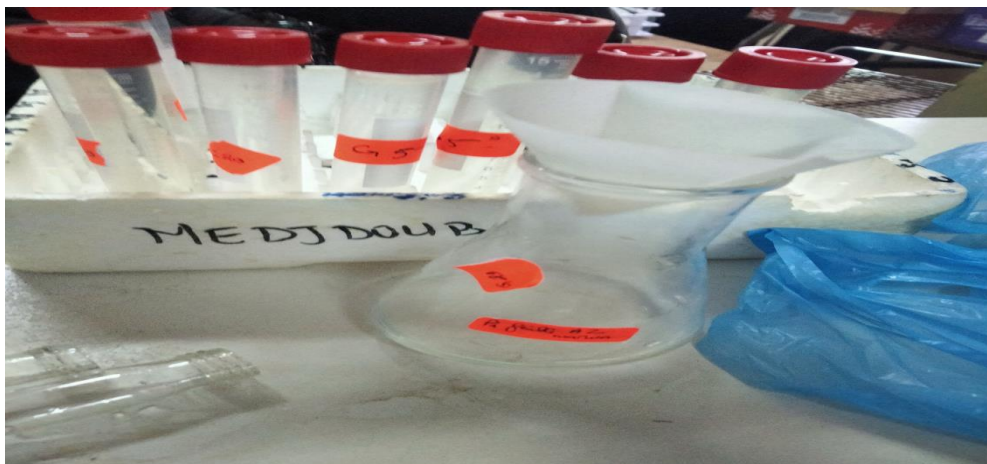


**Figure11** : *Aspergillus niger* après 7 jours d'incubation sur milieu de fermentation à base de déchets de pommes de terre (Photo laboratoire).

- Précipitation et purification de l'enzyme

Après la période d'incubation, la suspension obtenue est filtrée.

La précipitation des protéines est réalisée, en ajoutant progressivement le sulfate d'ammonium, jusqu'à 50%. Après incubation à 4°C pendant 2 heures, le mélange est centrifugé à une vitesse de 4000 tr/min pendant 15 minutes à 4°C (Figure 12). Le culot est recueilli (extrait protéique) pour l'étude de la cinétique enzymatique de l'alpha amylase.



**Figure 12** : la Filtration et la précipitation des enzymes (Photo laboratoire).

## 2.2. D'origine végétale : Extrait du Blé germer

Extraction de l'alpha-amylase d'origine végétale peut être réalisée à partir de plantes riches en cette enzyme comme les graines du blé germer

### ➤ Germination des graines

Les graines du Blé sont trempées dans de l'eau pendant 24 heures pour les hydrater ; puis, elles sont germées dans des conditions humides et sombres pendant 2 à 5 jours (**Figure 13**) Les graines germées sont, ensuite, broyées à l'aide d'un mortier.



**Figure13** : La germination du blé sur Cotton (**Photo laboratoire**).

### ➤ Extraction de l'enzyme

Les graines germées et broyées sont mélangées et homogénéisées soigneusement avec une quantité d'une solution tampon PBS (pH 6.9) (**Figure 14**).



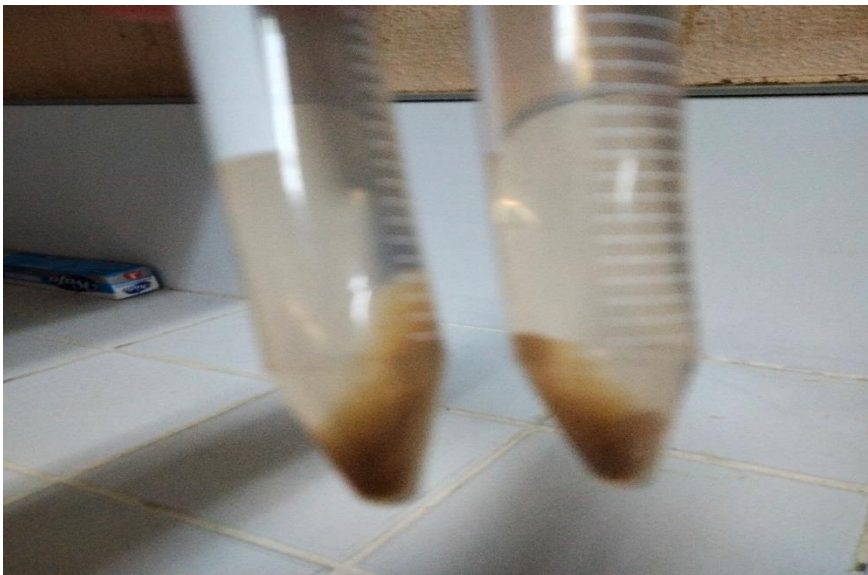
**Figure14** : Broyage du blé germinées et l'homogénéisation (**Photo laboratoire**)

Le mélange obtenu est filtré à l'aide d'une bande de gaze et du papier filtre pour éliminer les débris solides.

Le filtrat est centrifugé 3000 tr/min pendant 15 minutes à 4 °C, Récupérez le surnageant contenant l'alpha-amylase.

### ➤ Précipitation des protéines

La précipitation des protéines est réalisée, en ajoutant progressivement le sulfate d'ammonium, jusqu'à 50%. Après incubation à 4°C pendant 2 heures, le mélange est centrifugé à une vitesse de 4000 tr/min pendant 15 minutes à 4°C. Le culot est recueilli (extrait protéique) pour l'étude de la cinétique enzymatique de l'alpha amylase (**Figure 15**).



**Figure 15** : l'extrait enzymatique obtenu après la centrifugation (**Photo laboratoire**)

## 3. Evaluation de l'activité enzymatiques

Trois enzymes d' $\alpha$ -amylase ont été utilisées dans cette partie :  $\alpha$ -amylase extraite d'origine fongique d'*Aspergillus niger*, d'origine végétale extraite du blé et  $\alpha$ -amylase commercialisée d'origine fongique, purifiée à partir d'*Aspergillus niger*.

### 3.1. Préparation des solutions

#### 3.1.1. $\alpha$ -amylase commercialisé *Aspergillus niger*

L'origine de l' $\alpha$ -amylase utilisée comme référence est d'origine fongique *Aspergillus niger*. (E.C.3.2.1.1).

### 3.1.2. $\alpha$ -amylase extraite d'*Aspergillus niger* :

L'extrait enzymatique récupéré sous forme de poudre a été solubilisé dans une solution tampon PBS (0,02M, pH 6,9).

### 3.1.3. $\alpha$ -amylase extraite du blé :

L'extrait enzymatique récupéré sous forme de poudre a été solubilisé dans une solution tampon PBS (0,02M, pH 6,9).

### 3.1.4 Préparation du substrat (amidon soluble) :

Le substrat utilisé est l'amidon soluble de pomme de terre. 1g d'amidon soluble a été dissout dans 50ml de solution tampon phosphate (0,02M, pH 6,9). L'ensemble a été chauffé à une température de 50-70°C, sous agitation.

### 3.1.5 Préparation du 3,5-dinitrosalicylique (DNSA) :

Une solution chromogène a été préparée en utilisant le 3,5-dinitrosalicylique (DNSA), le NaOH (2N) et le tartrate double de sodium et de potassium suivant le protocole décrit par Sigma Aldrich :

1g de DNSA est dispersé dans 40ml d'eau distillée. La solution obtenue est de couleur jaune opaque.

En parallèle, nous avons préparé une solution de NaOH (2N) dans 20 ml d'eau distillée dans laquelle nous avons dissous 30 g de tartrate double de sodium de potassium sous agitation.

Une fois les deux solutions sont mélangées, le réactif devient limpide avec une couleur orange. Le volume final est ajusté à 100ml avec de l'eau distillée. Le réactif obtenu est conservé à l'abri de la lumière et à +4°C.

## 3.2. La cinétique enzymatique

### ✓ Principe

Le principe fondamental de ce mode opératoire réside dans la création de diverses concentrations de substrat dans un environnement expérimental contrôlé.

En ajustant les proportions d'enzyme et de substrat dans chaque tube, nous visons à observer comment la variation de la concentration de substrat affecte la réaction enzymatique. Cette approche permet d'évaluer la cinétique de la réaction et d'identifier des tendances significatives.

En comprenant comment la concentration de substrat influence la vitesse et l'efficacité de la réaction, nous pouvons déduire des informations cruciales sur le mécanisme d'action enzymatique et optimiser les conditions expérimentales pour des applications pratiques. Cela nous a également permis de comparer les activités enzymatiques des deux sources d'enzymes et d'évaluer leur efficacité dans la dégradation de l'amidon.

Cette méthode consiste à évaluer l'activité enzymatique des enzymes  $\alpha$ -amylases d'origine fongique et végétale

En milieu alcalin et à chaud, l'oxydation des groupements aldéhydes et cétones libres des sucres provoque simultanément la réduction de l'acide 3,5-dinitrosalicylique (DNSA) de couleur jaune orange en acide 3-amino 5-nitrosalicylique de couleur rouge orange qui absorbe à 540 nm. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la quantité de sucres réducteurs présents dans le milieu réactionnel (Thalapaneni et al., 2008).

#### ✓ Protocole

Pour cette partie, nous avons testé les deux enzymes préparées (d'origine fongique et d'origine végétale) et une enzyme commercialisée d'origine *Aspergillus niger*.

Pour chaque enzyme, quatre tubes de différentes concentrations (2%, 1,5%, 1% et 0,5%) sont préparés à partir de la solution d'amidon soluble (2%) afin d'évaluer la réaction enzymatique.

Dans le premier tube, de concentration de 2% est obtenue en mélangeant 1 ml d'enzyme  $\alpha$ -amylase avec 1 ml d'amidon.

Le deuxième tube, de concentration 1,5%, est constitué en ajoutant 1 ml d'enzyme  $\alpha$ -amylase à un mélange de 250  $\mu$ l de solution tampon phosphate salin (PBS) et 750  $\mu$ l d'amidon (2%).

Le troisième tube, de concentration 1%, 1 ml d'enzyme est combiné avec 500  $\mu$ l de solution tampon PBS et 500  $\mu$ l d'amidon (2%).

Le quatrième tube, de concentration 0,5%, est préparé en ajoutant 1 ml d'enzyme  $\alpha$ -amylase à un mélange de 750  $\mu$ l de solution tampon phosphate salin (PBS) et 250  $\mu$ l d'amidon (2%).

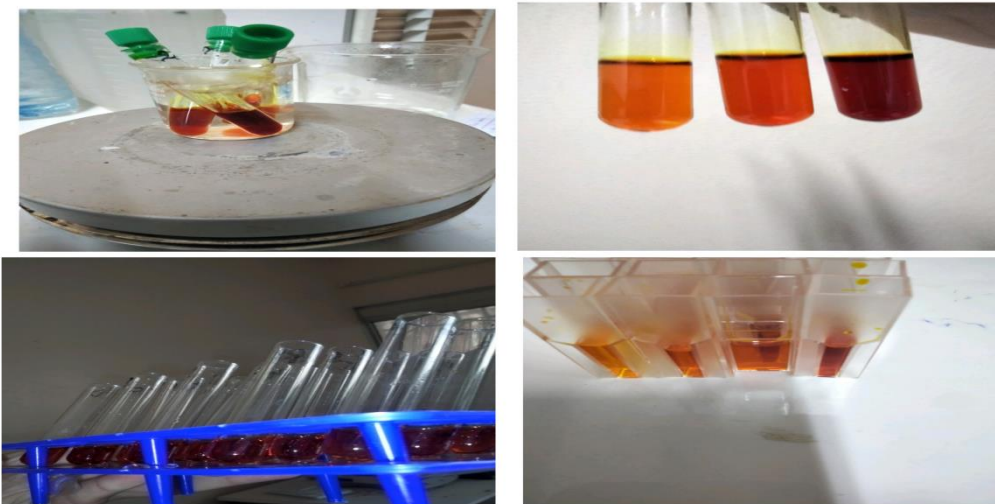
Chaque tube est incubé à une température de 37°C pendant 15 minutes avec agitation.

Un prélèvement de 500 $\mu$ l du milieu réactionnel, pour chaque concentration, a été réalisé en quatre ou cinq parfois temps (4,8,12,16 et 20 min). 1ml de DNSA a été ajouté à chaque tube,

Les tubes sont introduits dans un bain marie bouillant pendant 5 min et déposés après dans un bain glaçant ce qui provoque un choc thermique conduisant à l'arrêt de la réaction entre le maltose et le DNSA (**Figure 16**).

L'absorbance est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre à 540 nm, contre un blanc de la réaction, contenant 1ml de PBS au lieu de 1ml d'extrait enzymatique.

La réaction enzymatique est répétée 3 fois pour chaque enzyme



**Figure 16** : Les étapes de l'activité enzymatique étudiée (**Photo laboratoire**)

## 4. Expression des résultats

### 4.1. Dosage du maltose, produit de la réaction enzymatique

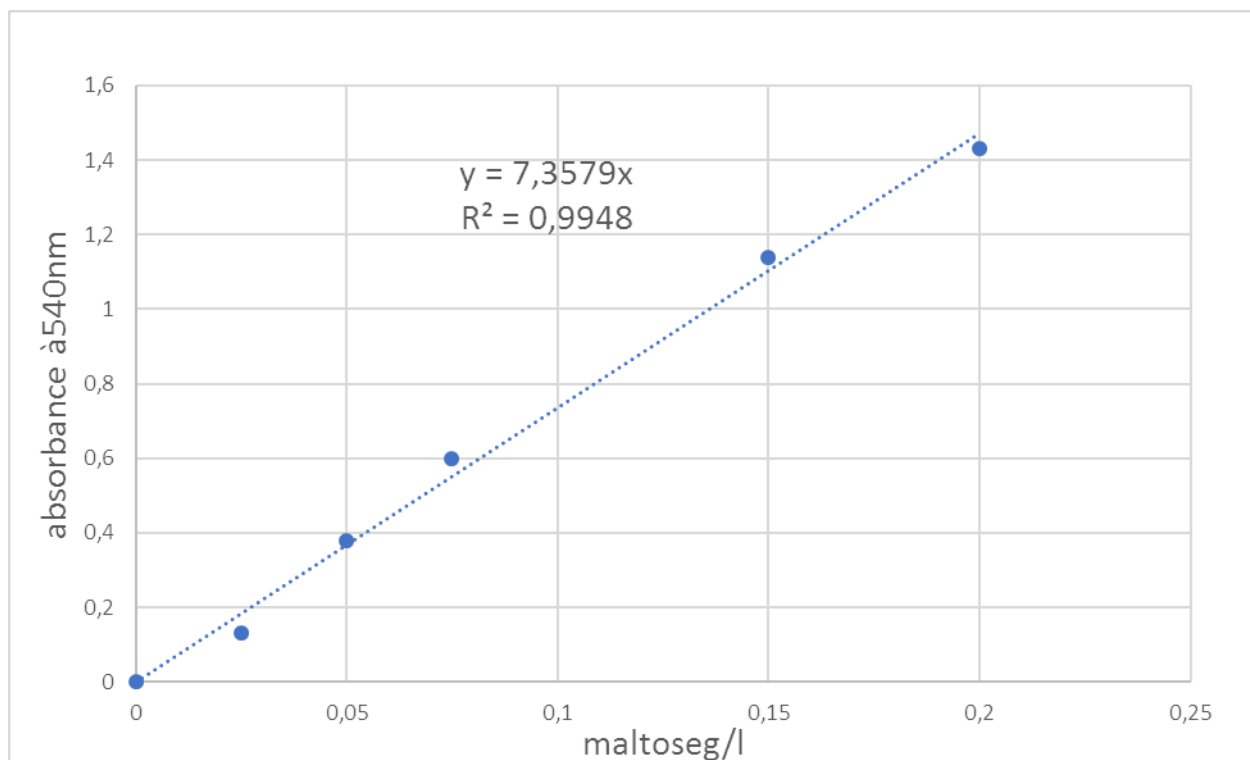
Le maltose est le sucre produit de la réaction enzymatique de substrat (Amidon soluble) et leur enzyme  $\alpha$ -amylase :

- A partir d'une solution mère aqueuse du maltose à 2%, des solutions filles sont ainsi préparées à des concentrations allant de 0,025 g/l jusqu'à 0,2 g/l ;
- 1 ml du réactif DNSA est ajouté à chaque tube
- L'ensemble est porté à l'ébullition (100°C) durant 5min ;
- Après refroidissement, le mélange est complet en ajoutant 3 ml par l'eau distillée ;
- La lecture de l'absorbance de chaque solution est effectuée à l'aide d'un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 540 nm contre un blanc (**Tableau 2**)

L'équation de régression linéaire ( $y=7,3579x$ ,  $R^2 0,9948$ ) est utilisée pour déterminer les concentrations des produits obtenus dans chaque tube des réactions enzymatiques étudiée (Figure17).

**Tableau 2 :** Gamme d'étalonnage pour le dosage du maltose produit par les réactions enzymatiques

|                                |                                        |       |      |       |     |      |     |
|--------------------------------|----------------------------------------|-------|------|-------|-----|------|-----|
| Tube                           | 0                                      | 1     | 2    | 3     | 4   | 5    | 6   |
| Concentration de maltose (g/l) | 0                                      | 0,025 | 0,05 | 0,075 | 0,1 | 0,15 | 0,2 |
| Volume de maltose (ml)         | 0                                      | 0,25  | 0,5  | 0,75  | 1   | 1,5  | 2   |
| Volume d'eau distillé(ml)      | 2                                      | 1,75  | 1,5  | 1,25  | 1   | 0,5  | 0   |
| DNSA (ml)                      | 1                                      | 1     | 1    | 1     | 1   | 1    | 1   |
|                                | Agiter et incuber à 100°C pendant 5min |       |      |       |     |      |     |
| Eau distillée (ml)             | 3                                      | 3     | 3    | 3     | 3   | 3    | 3   |
|                                | Agiter et mesurer l'absorbance à 540nm |       |      |       |     |      |     |



**Figure 17 :** La courbe d'étalonnage du Maltose

#### 4.2. Dosage des protéines par la réaction du biuret

La réaction du biuret est caractéristique de la liaison peptidique, c'est donc une réaction très générale des protéines. Elle consiste en la formation d'un complexe coloré bleu-violet par les protéines et le sulfate de cuivre en milieu alcalin. L'intensité de la coloration de ce complexe est proportionnelle à la concentration en protéines.

Une gamme d'étalonnage a été préparée à partir de la gélatine (10g/l) :

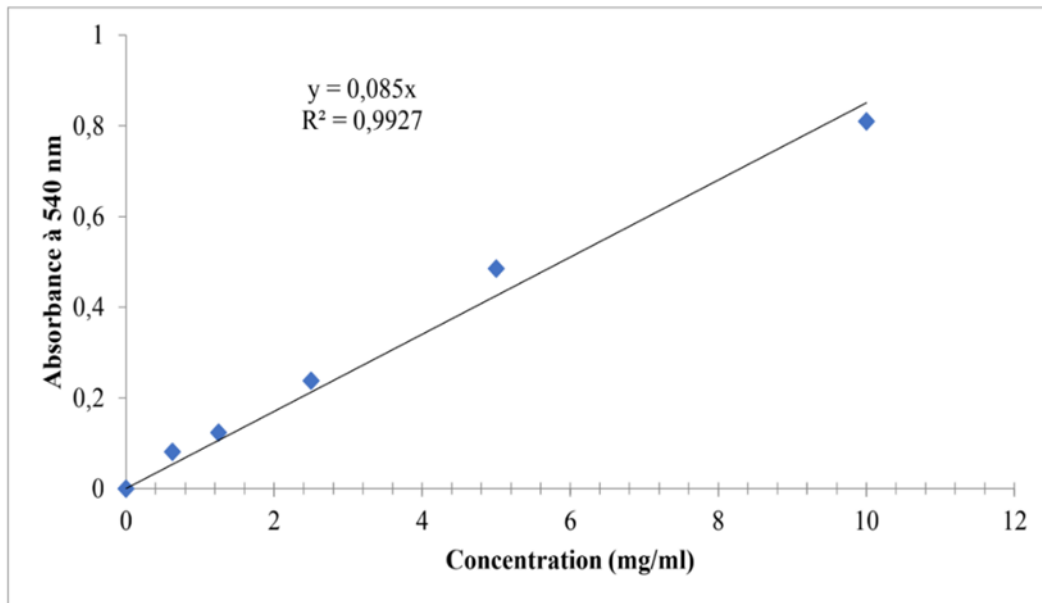
4 ml du réactif Biuret est ajouté à 1ml de chaque concentration de la gélatine préparée. L'ensemble est incubé à température ambiante, pendant 20 min.

L'absorbance a été mesurée à 540 nm à l'aide d'un colorimètre contre un blanc contenant l'eau distillée (**Tableau 3**).

La concentration des protéines dans l'extraits enzymatiques préparés est calculée à partir de l'équation de la gamme d'étalonnage ( $y=0,085x$ ,  $R^2 0.9927$ ) des concentrations de la gélatine en fonction des absorbances mesurés (**Figure 18**).

**Tableau 3** : Gamme d'étalonnage pour la détermination de la concentration des protéines

|                               |                                                 |   |   |   |   |    |
|-------------------------------|-------------------------------------------------|---|---|---|---|----|
| Numéro du tube                | 1                                               | 2 | 3 | 4 | 5 | 6  |
| Concentration protéines (g/l) | 0                                               | 2 | 4 | 6 | 8 | 10 |
| Volume de solution mère (ml)  | 0                                               | 2 | 4 | 6 | 8 | 10 |
| Volume d'eau distillée (ml)   | 10                                              | 8 | 6 | 4 | 2 | 0  |
| Réactif Biuret (ml)           | 4                                               | 4 | 4 | 4 | 4 | 4  |
|                               | Incubation à température ambiante durant 20 min |   |   |   |   |    |
|                               | Lecture des absorbances à 540nm                 |   |   |   |   |    |



**Figure18** : Droite d'étalonnage de gélatine pour le dosage des protéines

#### 4.3. Détermination de l'activité de l' $\alpha$ -amylase ( $K_m$ et $V_{max}$ )

Pour la détermination des paramètres cinétiques ( $K_m$  et  $V_{max}$ ) de chaque enzyme étudiée, nous avons suivi les étapes suivantes :

- Tracer les courbes cinétiques, concentrations du produit en fonction du temps, de chaque dilution d'amidon ;
- Déterminer la vitesse initiale ( $V_i$ ) pour chaque courbe à partir des équations de régression linéaire de chaque enzyme et chaque concentration substrat :
- Représenter graphiquement  $1/V_i = f(1/[S])$  (Présentation de Lineweaver-Burk).
- Déterminer graphiquement les paramètres cinétique  $K_m$  et  $V_{max}$ .
- Déterminer l'activité catalytique et spécifique.

#### 4.4. Analyse statistique

Toutes les expériences ont été réalisées en triplicata et les résultats ont été exprimés sous forme de moyennes  $\pm$  écart-type. Les données ont été analysées statistiquement à l'aide du logiciel Excel pour déterminer les différences significatives entre les échantillons.

Résultats

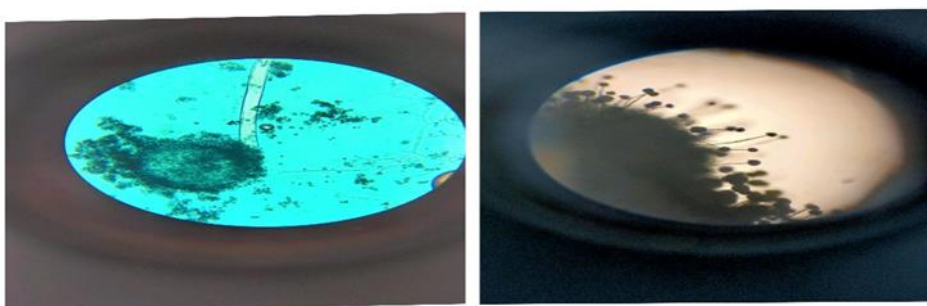
Et

Discussion

### 1. Observation microscopique et macroscopique de la souche d'*Aspergillus niger*

La souche d'*Aspergillus Niger* cultivée sur milieu gélosé dans une boîte de Piétri a été observée microscopiquement et macroscopiquement et ses principales caractéristiques morphologiques ont été révélées.

Le mycélium est constitué d'hyphes septés blancs, qui deviennent noirs au fur et à mesure du développement des conidiophores. Ils sont dressés, lisses et non ramifiés, avec une vésicule sphérique recouverte de phialides disposées en une ou deux rangées. Les conidies, globuleuses, noires et rugueuses. Les principales caractéristiques morphologiques observées au microscope optique confirment l'identification de cette souche fongique de l'espèce *Aspergillus niger* (Figure 19).



**Figure 19** : Représentation microscopique d'*Aspergillus niger* (Photo laboratoire)

L'observation macroscopique de la souche d'*Aspergillus niger* montre des colonies circulaires avec une tête aspergillaire distincte. Les colonies commencent par être blanches et translucides, puis deviennent noires en sporulant. La taille des colonies peut atteindre 4 à 5 cm en 7 jours sur milieu gélosé incubé à 25 °C (Figure 20).



**Figure 20** : Résultats d'ensemencement des *Aspergillus niger* sur boîtes pétris macroscopique (Photo laboratoire).

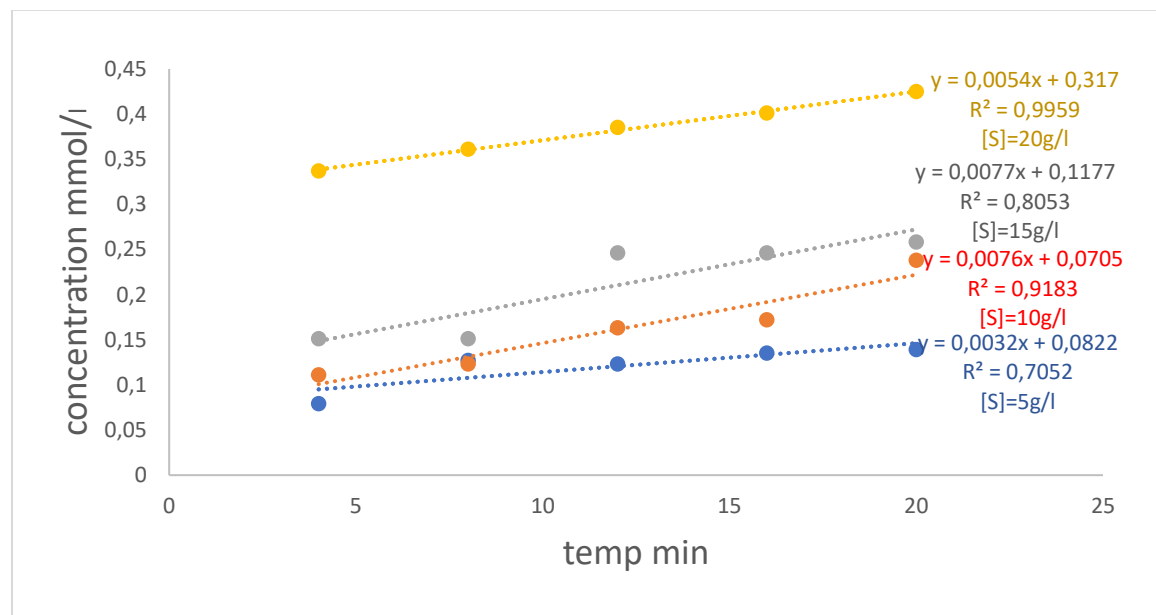
## 2.Détermination des paramètres Cinétiques (Km et Vmax) de l' $\alpha$ -amylase de différentes origines

Nous avons étudié la cinétique enzymatique des enzymes  $\alpha$ -amylase d'origine fongique, extraite d'*Aspergillus niger* et d'origine végétale, extraite du blé, comparée à celle d' $\alpha$ -amylase commercialisée, d'origine *Aspergillus niger*.

La détermination des paramètres cinétiques Km et Vmax a été réalisée en utilisant le maltose comme produit de dégradation afin de caractériser la vitesse de réaction de ces enzymes. Des variations importantes dans les cinétiques enzymatiques entre les trois enzymes  $\alpha$ -amylase étudiées ont été observées, ce qui met en évidence les particularités de leur activité catalytique.

L'analyse détaillée des cinétiques enzymatiques fournit des informations précieuses sur les performances de ces enzymes et leur potentiel d'utilisation dans différents secteurs industriels. Les graphiques et figures présentés ci-après illustrent les résultats de cette analyse cinétique comparative.

La **figure 21** présente l'évolution de la formation du maltose, produit de dégradation d'amidon, en fonction du temps en présence de l'enzyme  $\alpha$ -amylase commercialisée d'origine *Aspergillus niger*.



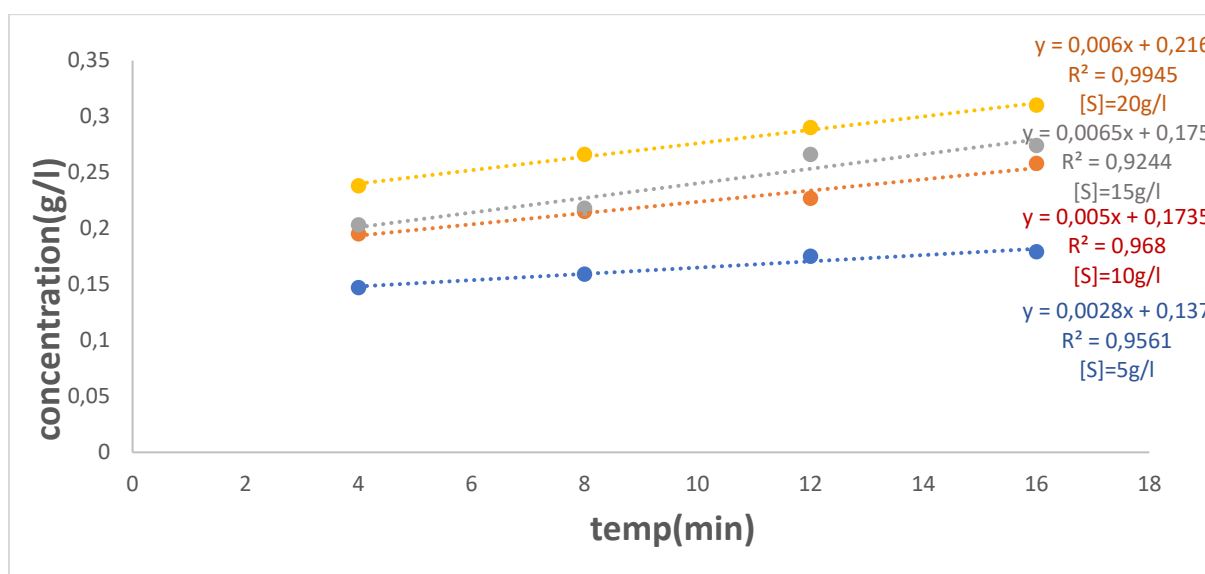
**Figure 21** : évolution de la formation du maltose en fonction du temps en présence de l'enzyme  $\alpha$ -amylase commercialisée d'origine *Aspergillus niger*

A partir de ces courbes, nous avons déterminé la vitesse initiale pour chaque concentration du substrat étudié en présence de l'enzyme  $\alpha$ -amylase commercialisée d'origine *Aspergillus niger* (Tableau 4).

**Tableau 4 :** Vitesse initiale pour les différentes concentrations du produit formé en présence de l'enzyme  $\alpha$ -amylase commercialisée d'origine *Aspergillus niger*.

|                                    |             |             |             |            |
|------------------------------------|-------------|-------------|-------------|------------|
| Concentration du substrat (Amidon) | 0.030mmol/l | 0.061mmol/l | 0.092mmol/l | 0.12mmol/l |
| Vi (mmol/l/min)                    | 0,0854      | 0,07081     | 0,1254      | 0,3224     |

La **figure 22** présente l'évolution de la formation du maltose, produit de dégradation d'amidon, en fonction du temps en présence de l'enzyme  $\alpha$ -amylase extraite d'*Aspergillus niger*

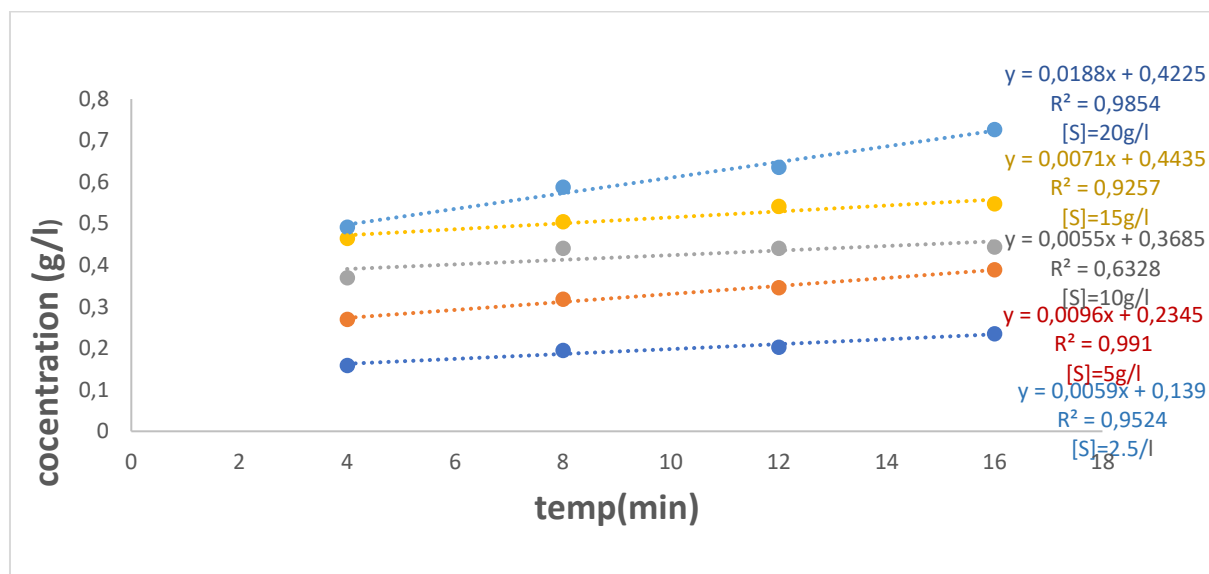


**Figure 22 :** Evolution de la formation du maltose en fonction du temps en présence de l'enzyme  $\alpha$ -amylase extraite d'*Aspergillus niger*

**Tableau 5 :** Vitesse initiale pour les différentes concentrations du produit formé en présence de l'enzyme  $\alpha$ -amylase extraite d'*Aspergillus niger*

|                                    |             |              |              |            |
|------------------------------------|-------------|--------------|--------------|------------|
| Concentration de substrat (Amidon) | 0.030mmol/l | 0,061 mmol/l | 0,092 mmol/l | 0.12mmol/l |
| Vi (mmol/l/min)                    | 0,1398      | 0,1785       | 0,1815       | 0,222      |

La **figure 23** l'évolution de la formation du maltose, produit de dégradation d'amidon, en fonction du temps en présence de l'enzyme  $\alpha$ -amylase d'origine végétale extraite du blé.

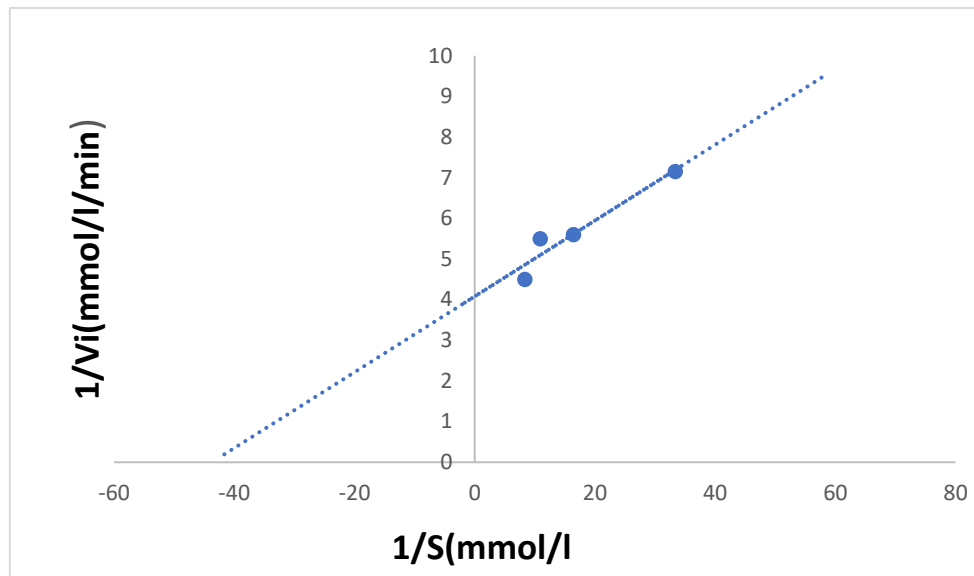


**Figure 23** : Evolution de la formation du maltose en fonction du temps en présence de l'enzyme  $\alpha$ -amylase extraite du blé

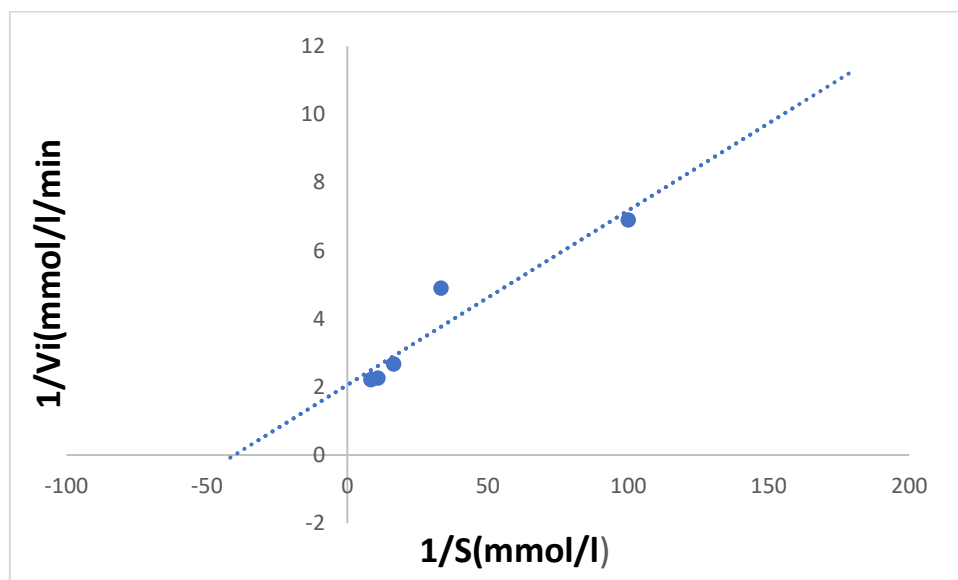
**Tableau 6** : Vitesse initiale pour les différentes concentrations du produit formé en présence de l'enzyme  $\alpha$ -amylase extraite du blé

| Concentration de substrat (Amidon) | 0.01mmol/l | 0.03mmol/l | 0.061mmol/l | 0.092mmol/l | 0.12mmol/l |
|------------------------------------|------------|------------|-------------|-------------|------------|
| Vi(mmol/l/min)                     | 0,1449     | 0,2441     | 0,374       | 0,4506      | 0,4413     |

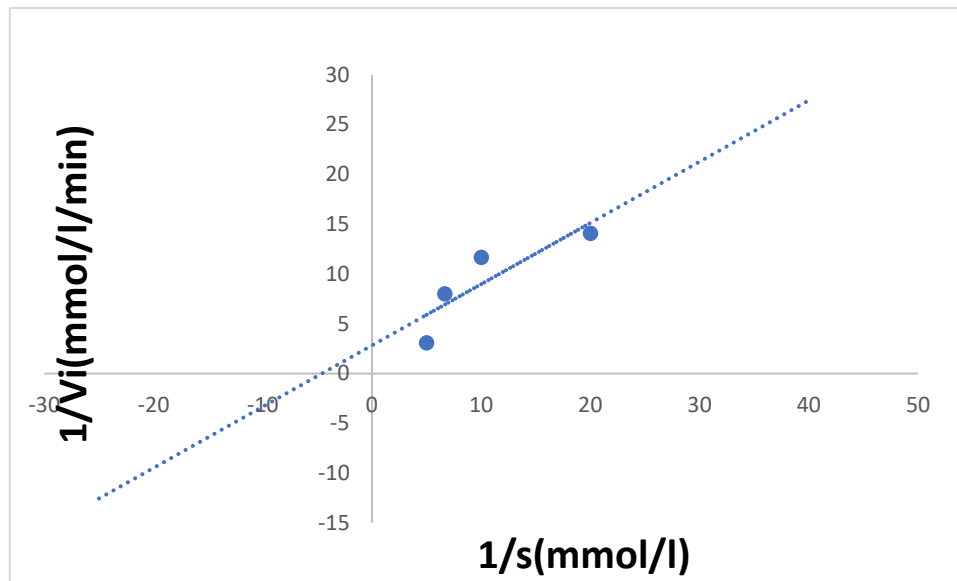
Les **figures (24, 25 et 26)** représentent les Représentation des doubles inverses ( $1/V_i = f(1/[S])$ ) ou représentation de Lineweaver-Burk. Ces droites permettent de déterminer les paramètres de la cinétique enzymatique ( $V_{max}$  et  $K_m$ ) des trois enzymes étudiées.



**Figure 24 :** Graphique Lineweaver-Burk pour l' $\alpha$ -amylase d'origine fongique extraite d'*Aspergillus niger*



**Figure 25 :** Graphique Lineweaver-Burk pour l' $\alpha$ -amylase d'origine végétale extraite du blé



**Figure 26 :** Graphique Lineweaver-Burk pour l' $\alpha$ -amylase commercialisée d'origine *Aspergillus niger*.

A partir des courbes de Lineweaver-Burk, nous avons déterminé les valeurs de la cinétique enzymatique ( $V_{max}$  des  $K_m$ ) des trois enzymes, représentés dans le tableau suivant :

**Tableau 7 :** Paramètres de la cinétique ( $V_{max}$  et  $K_m$ ) pour les trois enzymes étudiées

| Origine d'enzyme                       | $V_{max}$     | $K_m$       |
|----------------------------------------|---------------|-------------|
| Extrait d' <i>Aspergillus niger</i>    | 0.25 mmol/min | 0.025mmol/l |
| Extrait de Blé germé                   | 0.5 mmol/min  | 0.02 mmol/l |
| Commercialisé <i>Aspergillus niger</i> | 0.4mmol/min   | 0.11mmol /l |

En comparant la cinétique des trois enzymes  $\alpha$ -amylase étudiées, nous avons enregistré que l'enzyme  $\alpha$ -amylase commercialisée d'origine *Aspergillus niger* à une  $V_{max}$  de 0,4 mmol/min et un  $K_m$  de 0,11 mmol/L. Tandis que, l'enzyme d'origine fongique extraite d'*Aspergillus niger* à une  $V_{max}$  de 0,25 mmol/min et un  $K_m$  de 0,025 mmol/L et l'enzyme d'origine végétale extraite de blé à une  $V_{max}$  de 0.5mmol/L et un  $K_m$  de 0.02mmol/L.

### 3.Détermination de l'activité catalytique de l'activité spécifique

L'activité catalytique d'une enzyme, exprimée en unité international (UI), est définie comme la quantité d'enzyme qui produit la transformation d'une micromole de substrat par minute à 25°C ( $\mu\text{mole min}^{-1}$ ).

L'activité spécifique c'est l'activité enzymatique (U) par milligramme de protéine totales dans l'échantillon.

Nous avons calculé les valeurs de l'activité catalytique et l'activité spécifique des trois enzymes, représentés dans le tableau suivant :

**Tableau 8 :** Résultats de l'activité catalytique et spécifique des trois enzymes étudiées

| Origine d'enzyme                       | Activité catalytique           | Activité spécifique |
|----------------------------------------|--------------------------------|---------------------|
| Extrait d' <i>Aspergillus niger</i>    | 250 $\mu\text{mol}/\text{min}$ | 3125U/mg            |
| Extrait de Blé germé                   | 500 $\mu\text{mol}/\text{min}$ | 735.29U/mg          |
| Commercialisé <i>Aspergillus niger</i> | 400 $\mu\text{mol}/\text{min}$ | 2500U/mg            |

Le tableau met en évidence l'efficacité différente de trois extraits enzymatiques. L'extrait d'*Aspergillus niger* présente la plus haute activité spécifique (3 125 U/mg), ce qui reflète une forte pureté enzymatique malgré une activité catalytique modérée (250  $\mu\text{mol}/\text{min}$ ). En revanche, l'extrait de blé germé présente la plus grande activité catalytique (500  $\mu\text{mol}/\text{min}$ ), mais une activité spécifique très faible (735,29 U/mg), ce qui indique une présence importante de protéines non enzymatiques. Enfin, l'enzyme commercialisée à base d'*Aspergillus niger* présente un bon équilibre entre les deux paramètres (400  $\mu\text{mol}/\text{min}$  et 2 500 U/mg), ce qui traduit un extrait purifié et stable, adapté aux applications industrielles.

### Discussion :

Les enzymes  $\alpha$ -amylase provenant de différentes sources (microbiennes et végétale) présentent des caractéristiques cinétiques distinctes. La fermentation est une méthode fréquemment employée en biotechnologie pour extraire l'enzyme d' $\alpha$ -amylase à partir d'*Aspergillus niger*. Cette méthode a été sélectionnée en raison de son coût réduit et de sa rapidité d'exécution. Effectivement, ce processus de fermentation est plutôt simple, ne demandant pas d'équipements spécifiques ni de conditions de culture complexes. En outre, cela facilite la fabrication rapide et efficace de l'enzyme, ce qui revêt une importance capitale pour les applications industrielles qui requièrent une production en grande quantité. Cette méthode permet d'obtenir de manière rentable et efficace une source d'enzyme  $\alpha$ -amylase de bonne qualité.

La production d' $\alpha$ -amylase par *Aspergillus niger* à partir de déchets végétaux a fait l'objet de nombreuses études. Prenons l'exemple de **Krischna et al. (2012)**

L'extraction de l' $\alpha$ -amylase à partir de sources végétales repose principalement sur l'utilisation de graines germées (comme le blé, le maïs ou l'orge), où cette enzyme est naturellement produite pour mobiliser les réserves d'amidon lors de la germination. Le processus commence généralement par le broyage du matériel végétal suivi d'une extraction aqueuse sous agitation, parfois à l'aide de tampons spécifiques (phosphate ou citrate) pour stabiliser l'enzyme (**Azwanida, 2015 ; Pandey et al., 2000**).

Les valeurs de  $V_{max}$  et de  $K_m$  indiquent respectivement la vitesse de réaction maximale et l'affinité de l'enzyme envers son substrat, mettant en évidence des disparités significatives entre les trois enzymes en ce qui concerne leur efficacité catalytique et leur interaction avec le substrat.

L'enzyme d'origine végétale extraite de blé a présenté une  $V_{max}$  plus élevée que les deux autres enzymes d'origine *Aspergillus niger*, ce qui indique que cette enzyme a une capacité plus élevée à stimuler la réaction.

Toutefois, l'enzyme d'origine fongique extraite d'*Aspergillus niger* a donné une affinité plus élevée pour son substrat. Elle a enregistré la valeur de  $K_m$  le plus faible ( $K_m$  d'ordre de 0,016 mmol/L), en comparaison avec l'enzyme d'origine végétale extraite du Blé ( $K_m$  d'ordre de 0,1 mmol/L) et l'enzyme commercialisée d'origine d'*Aspergillus* ( $K_m$  d'ordre de 0,2 mmol/L).

L'activité catalytique et spécifique des enzymes est fondamentale pour comprendre leur fonctionnement et leur rôle dans les processus biologiques. La spécificité et l'activité catalytique

des enzymes sont étroitement interdépendantes et jouent un rôle crucial dans la régulation des réactions biochimiques au sein des cellules vivantes.

Les trois extraits enzymatiques présentent des différences notables. Le premier extrait du blé montre une activité catalytique élevée (500 U), mais une activité spécifique modérée (735,29 U/mg), suggérant une faible pureté enzymatique. Le deuxième extrait d'*Aspergillus niger*, bien que présentant une activité catalytique plus faible (250 U), affiche une activité spécifique très élevée (3125 U/mg), indiquant une forte pureté et une grande efficacité. Le troisième extrait commercialiser offre un bon compromis avec 400 U d'activité catalytique et 2500 U/mg d'activité spécifique. Ainsi, l'analyse comparative montre que l'enzyme extrait d'*Aspergillus niger* est le plus pur, tandis que l'extrait du blé contient davantage de protéines non enzymatiques.

L'analyse comparative des paramètres cinétiques des enzymes  $\alpha$ -amylase d'origine fongique et végétale met en lumière des opportunités pour la fabrication d'une enzyme moins coûteuse, en exploitant les caractéristiques spécifiques de chaque enzyme pour optimiser les processus de production.

Les avantages potentiels de la fabrication d'une enzyme moins coûteuse reposent sur la compréhension approfondie des propriétés cinétiques des enzymes, offrant des pistes pour améliorer l'efficacité et la rentabilité des processus de production enzymatique (**Gupta et al., 2020 ; Zhang et al., 2018**).

Cependant, il est important de considérer les éventuels inconvénients liés à la fabrication d'une enzyme moins coûteuse. Par exemple, une réduction excessive des coûts pourrait compromettre la qualité ou la pureté de l'enzyme, ce qui pourrait avoir un impact négatif sur son activité et sa performance dans les applications industrielles. De plus, les coûts de purification et de formulation de l'enzyme doivent être pris en compte pour garantir une enzyme de haute qualité (**Johnson et al., 2019 ; Smith et al., 2017**).

Conclusion

Et

Perspectives

Cette étude a permis de démontrer que la production d' $\alpha$ -amylase à partir d'*Aspergillus niger* cultivé sur un milieu liquide à base de pomme de terre, ainsi que celle obtenue à partir de blé germé, constitue une méthode efficace, économique et respectueuse de l'environnement. Ces deux substrats, facilement disponibles, offrent une alternative intéressante pour la synthèse de cette enzyme à fort potentiel industriel.

Les résultats expérimentaux indiquent qu'il est possible d'optimiser les étapes de purification à l'aide de techniques alternatives, telles que l'utilisation de tampons phosphate lors de l'extraction et l'application de la chromatographie d'échange d'ions. Ces méthodes permettent d'obtenir une  $\alpha$ -amylase de haute pureté à faible coût, ce qui représente un atout majeur pour une production à grande échelle.

Par ailleurs, la conservation de l'enzyme, étape souvent négligée, est essentielle. Le recours à des techniques adaptées, telles que la lyophilisation ou la cryoconservation, est recommandé pour préserver durablement l'activité enzymatique.

À l'avenir, ces stratégies pourront être intégrées à des travaux de recherche futurs visant à évaluer le potentiel inhibiteur de l'enzyme, ouvrant ainsi la voie au développement de nouvelles applications thérapeutiques ciblées, notamment dans le traitement des maladies métaboliques.

En conclusion, l'approche présentée dans cette étude peut être considérablement bénéfique aux secteurs agroalimentaire, pharmaceutique et biotechnologique, en proposant une méthode de production durable, économique et efficace de l' $\alpha$ -amylase, avec *Aspergillus niger* comme source microbienne prometteuse.

# **Références bibliographiques**

- Aubel, D., Morris, R. P., Rimann, M., Kaufmann, H., Thompson, C. J., Bailey, J. E., & Azwanida, N. N. (2015).** Avis d'expert sur les méthodes d'extraction des plantes médicinales, leurs principes, leurs avantages et leurs limites. *Medicinal & Aromatic Plants*, 4(3), 196. [<https://doi.org/10.4172/2167-0412.1000196>](<https://doi.org/10.4172/2167-0412.1000196>)
- Barbesgard, P., Heldt-Halsen, H., & Diterichsen, B. (1999).** Sur la sécurité de l'*Aspergillus oryzae* *Microbiologie Appliquée et Biotechnologie*, 9, 569–572.
- Berg, J. M., Tymoczko, J. L., & Stryer, L. (2002).** *Biochemistry* (5<sup>e</sup> éd.). W. H. Freeman and Company.
- Bruinenberg, P. M., Hulst, A. C., Faber, A., & Voogd, R. H. (1996).** Procédé de collage ou de revêtement de surface du papier (Brevet européen EP 0 690 170 A1).
- Boel, E., Brady, L., Brzozowski, A. M., Derewenda, Z., Dodson, E., Dodson, G., ... Amos, W. B. (1990).** Calcium binding in  $\alpha$ -amylases: An X-ray diffraction study at 2.1 Å resolution of two enzymes from *Aspergillus* *Biochemistry*, 29(23), 6244–6249.
- Boussebou, N. (2002).** Contrôle de bruit dans les environnements \[Non publié / mémoire ?].
- Chakrabarti, S., Mondal, D., Majhi, A., Das, A., & Mondal, W. V. (2009).** \[Titre manquant]—merci de fournir le titre complet et le journal.
- Chabasse, D. (2002).** Les phaeohyphomycètes, agents de phaeohyphomycoses : des champignons émergents. *Journal de Mycologie Médicale*, 12(1), 65–85.
- Coronado, M., Vargas, C., Hofemeister, J., Ventosa, A., & Nieto, J. J. (2000).** Production et caractérisation biochimique d'une  $\alpha$ -amylase à partir de l'halophile modéré *Halomonas meridiana* *FEMS Microbiology Letters*, 183, 67–71.
- Coolbear, T., Whittaker, D. J., Daniel, R. M., & Cowan, D. A. (1992).** The purification and characterization of an extremely thermostable  $\alpha$ -amylase from the hyperthermophilic archaeobacterium *Pyrococcus furiosus* *Biochemical Journal*, 281(1), 127–133.
- Davies, G. J., Wilson, K. S., & Henrissat, B. (1999).** Nomenclature for sugar-binding subsites in glycosyl hydrolases. *Biochemical Journal*, 321(2), 557–559.

**Díaz, M. R., et al. (2020).** *Aspergillus* section Fumigati in clinical practice in Hong Kong, China. *Frontiers in Microbiology*, 9, 789.

**Drauz, K., Gröger, H., & May, O. (Eds.). (2012).** Enzyme catalysis in inorganic synthesis: A comprehensive handbook. John Wiley & Sons.

**Dumoulina, Y., Cartiliera, L., & Mateescu, M. (1999).** Comprimés d'amylose réticulée contenant de l' $\alpha$ -amylase : un système de libération de médicament contrôlé enzymatiquement. *Journal de Libération Contrôlée*, 60, 161–167.

**Farber, G. K., & Petsko, G. A. (1990).** The  $\alpha$ -amylase family of enzymes. *Proteins: Structure, Function, and Genetics*, 7(3), 205–217.

**Feitkenhauer, H. (2003).** Digestion anaérobie des eaux usées de désencollage : influence du prétraitement et du tensioactif anionique sur la dégradation et l'accumulation intermédiaire. *Enzyme and Microbial Technology*, 33, 250–258.

**Fogarty, W. M., & Kelly, C. T. (1980).** Enzymes microbiennes et bioconversions. In *Microbiologie économique* (pp. 115–170). Academic Press.

**Fogarty, W. M., & Kelly, C. T. (1979).** Développements en biologie microbienne extracellulaire enzymes. In A. Wiseman (Ed.), *Sujets en biotechnologie des enzymes et de la fermentation* (Vol. 3, pp. 45–108).

**Fryer, P. J., & Asteriadou, K. A. (2009).** Carte de nettoyage prototype : une classification des processus de nettoyage industriel. *Tendances en Science et Technologie Alimentaires*, 20, 255–262.

**Fussenegger, M. (2001).** Conception d'un nouveau système de dépistage des mammifères pour la détection d'antibiotiques streptogramines biodisponibles et non cytotoxiques. *Journal of Antibiotics*, 54, 44–54.

**Gupta, R., Gigras, P., Mohapatra, H., Goswami, V. K., & Chauhan, B. (2003).** Microbial  $\alpha$ -amylases: A biotechnological perspective. *Process Biochemistry*, 38 (11), 1599–1616.

**Hamilton, L. M., Kelly, C. T., & Fogarty, W. M. (1999).** Purification et propriétés de l' $\alpha$ -amylase dégradant l'amidon brut de *Bacillus* sp. IMD434. *Biotechnology Letters*, 21, 111–115.

**Haq, I., Ali, S. J., Javed, M. M., Hameed, U., Saleem, A., Adnan-Qadeer, M. A. (2010).** Production d' $\alpha$ -amylase à partir d'une souche mutante de *Bacillus amyloliquefaciens* induite

aléatoirement et son application comme désencolleur dans l'industrie textile. *Pakistan Journal of Botany*, 42(1), 473–484.

**Heslot, H. (1996).** A novel secreted  $\alpha$ -amylase from *Streptococcus bovis* with properties identical to those of mammalian  $\alpha$ -amylases. *Biochimica et Biophysica Acta – Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1294(1), 74–80.

**Ikuta, N., Souza, M., Valencia, F., Castro, M., Schenberg, A., Pizzirani, A., & Astolfi-Filho, S. (1990).** Le gène de l' $\alpha$ -amylase comme marqueur pour le clonage de gènes : criblage direct des clones recombinants. *Nature*, 8, 241–242.

**Jégorov, N. S. (1987).** Biotechnologie : Problèmes et perspectives. École supérieure.

**Kadziola, A., Abe, J., Iwasaki, K., Jigami, Y., & Ueno, H. (1994).** Crystal and molecular structure of the barley  $\alpha$ -amylase isozyme 1. *FEBS Letters*, 341(2–3), 276–280.

**Khoo, S. L., Amirul, A. A., Kamaruzaman, M., Nazalan, N., & Azizan, M. N. (1994).** Purification et caractérisation de l' $\alpha$ -amylase à partir de *Aspergillus flavus*. *Folia Microbiologica*, 39, 392–398.

**Kirk, O., Borchert, T. V., & Fuglsang, C. C. (2002).** Applications industrielles des enzymes. *Current Opinion in Biotechnology*, 13, 345–351.

**Kuddus, M. (2010).**  $\alpha$ -Amylases microbiennes actives à froid : des fondamentaux aux développements récents. In *Thèmes actuels de recherche, de technologie et d'éducation en microbiologie appliquée et biotechnologie microbienne* (pp. 1265–1276).

**Leveau, J. Y., & Bouix, M. (1993).** The effect of culture conditions on production of pectinolytic enzymes by *Penicillium griseoroseum*. *Journal of Applied Bacteriology*, 74(4), 416–423.

**Maarel, M., van der Veen, B., Uitdehaag, J., Leemhuis, H., & Dijkhuizen, L. (2002).** Propriétés et applications des enzymes de conversion de l'amidon de la famille des  $\alpha$ -amylases. *Journal de Biotechnologie*, 94, 137–155.

**Matsuura, Y., Kusunoki, M., Harada, W., & Kakudo, M. (1984).** Structure et résidus catalytiques possibles de la taka-amylase AJ. *Biochemistry*, 95, \ [pages manquantes].

**McCarter, L., & Withers, S. G. (1996).** Mechanisms of enzymatic glycoside hydrolysis. *Current Opinion in Structural Biology*, 6(5), 757–765.

**Merabti, A. (2006).** Production et caractérisation d'enzymes microbiennes : application dans les industries alimentaire, pharmaceutique, textile et papeterie (Thèse de doctorat, Université de Constantine, Algérie).

**Meyer, V., Schreiner, U., Dietzel, L., Stabler, N., Schwarz, W. H., & Braun, H. P. (2004).** Identification of the *Aspergillus niger* proteins which are secreted in submerged cultures. *Biotechnology Letters*, 26(22), 1733–1737.

**Mitidieri, S., Martinelli, A. H. S., Schrank, A., & Vainstein, M. H. (2006).** Formulation de détergent enzymatique contenant de l'amylase d'*Aspergillus niger*: une étude comparative avec des formulations de détergents commerciaux. *Bioresource Technology*, 97, 1217–1224.

**Nielson, J. E., & Borchert, T. V. (2001).** Protein engineering of bacterial  $\alpha$ -amylases. *Biochimica et Biophysica Acta – Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1547(2), 253–274.

**Nouadri, T. (2011).** Production d'amylase par le champignon filamenteux *Aspergillus tamarii* (Thèse de doctorat, Université de Skikda, Algérie).

**Ogasahara, K., Imanishi, A., & Isemura, T. (1970).** Études sur l' $\alpha$ -amylase thermophile de *Bacillus stearothermophilus* I: quelques propriétés générales et physico-chimiques de l' $\alpha$ -amylase thermophile. *Journal of Biochemistry*, 67, 65–75.

**Panchal, C. J. (1990).** Production, purification and properties of  $\alpha$ -amylase from *Schwanniomyces castellii* (Hansei). *Journal of Industrial Microbiology*, 6(4), 279–283.

**Prasad, N. K. (2011).** Enzyme technology: Pacemaker of biotechnology. PHI Learning.

**Pandey, A., Nigam, P., Soccol, C. R., Soccol, V. T., Singh, D., & Mohan, R. (2000).** Advances in microbial amylases. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 31(2), 135–152.

**Ramasesh, N., Sreekantiah, K. R., Murthy, K. R., & Ramasesh, V. S. (1982).** Purification et caractérisation de l' $\alpha$ -amylase thermophile d'*Aspergillus niger*. *Van Thieghem Starke*, 34, 274–279.

**Raper, K. B., et al. (1977).** *Aspergillus niger*. In *Aspergillus* (pp. 1–14). Academic Press.

- Regulapati, R., Malav, P. N., & Gummadi, S. N. (2007).** Production d' $\alpha$ -amylase thermostable par fermentation en milieu solide : une revue. \[Journal ou revue non spécifié], 2(1), 1–11.
- Robyt, J., & Ackerman, R. J. (1971).** Isolement, purification et caractérisation d'une amylase productrice de maltotétraose à partir de *Pseudomonas stutzeri*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 145, 105–114.
- Saito, N. (1973).**  $\alpha$ -Amylase extracellulaire thermophile de *Bacillus licheniforme*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 155, 290–298.
- Schaumburg, I., & Slzmann, R. (1991).** Purification and characterization of a novel thermostable  $\alpha$ -amylase from the hyperthermophilic archaeobacterium *Pyrococcus woesei* after cloning and expression of its gene in *Escherichia coli*. *European Journal of Biochemistry*, 202(1), 87–93.
- Sivaramakrishnan, S., Gangadharan, D., Nampoothiri, K. M., Soccol, C. R., & Pandey, A. (2006).**  $\alpha$ -Amylases from microbial sources – An overview on recent developments. *Food Technology and Biotechnology*, 44(2), 173–184.
- Srinivasa, R., Mathur, P. M., & Desai, S. (2004).** Production of fungal  $\alpha$ -amylase on wheat bran. *Journal of Scientific and Industrial Research*, 63, 847–851.
- Stear, M. L., & Levitzki, A. (1973).** Kinetics of the reaction catalyzed by  $\alpha$ -amylase. *Journal of Biological Chemistry*, 248(3), 963–969.
- Tabuc, C. (2007).** Isolement et identification des moisissures dans différents substrats (Thèse de doctorat, Université de Bucarest, Roumanie).
- Souza, P. M. D. (2010).** Application of microbial  $\alpha$ -amylase in industry – A review. *Brazilian Journal of Microbiology*, 41(4), 850–861.
- Tsang, C. C., Hui, T. W. S., Lee, K. C., Teng, J. L. L., Tse, H., Yuen, K. Y., & Chan, J. F. W. (2018).** Genetic diversity of *Aspergillus* section *Fumigati* in clinical practice in Hong Kong, China. *Frontiers in Microbiology*, 9, 789.
- Van der Maarel, M. J., van der Veen, B., Uitdehaag, J. C., Leemhuis, H., & Dijkhuizen, L. (2002).** Properties and applications of starch-converting enzymes of the  $\alpha$ -amylase family. *Journal of Biotechnology*, 94(2), 137–155.

**Vihinen, M., & Mantsala, P. (1989).** Enzymes amylolytiques microbiennes. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 24, 329–418.

**Vishwanatha, K. S., Appu Rao, A. G., Singh, S. A., & Tharanathan, R. N. (2010).** Fungal  $\beta$ -glucosidase: microbial production and effect on different food matrices. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 50(5), 425–440.

**Ward, O. P., Qin, W. M., Dhanjoon, J., Ye, J., & Singh, A. (2006).** Physiology and biotechnology of *Aspergillus*. *Advances in Applied Microbiology*, 58, \[pages manquantes].

**Wu, H., Mulchandani, A., & Chen, W. (2008).** Affichage de surface microbienne polyvalent pour l'assainissement de l'environnement et la production de biocarburants. *Tendances en Microbiologie*, 14(4), 181–188.

**Zeman, N., & McCrea, J. (1985).** Production d' $\alpha$ -amylase à l'aide d'un organisme à ADN recombinant. *Le Monde des Céréales*, 30, 777–780.