

---

# Production d'une $\alpha$ -amylase thermostable par culture mixte de microorganismes

**Scheherazad Djekrif-Dakhmouche \*, Louisa Gillmann., Monique Saunier , Meraihi Z\*\***

\*Laboratoire SONAS-I.U.T. Université d'Angers, 4, boulevard Lavoisier 49000 Angers, France

\*\*Laboratoire de Génie enzymatique, Dpt Sc. Nature Vie, Université Mentouri, Constantine, Algérie.

\*email : [scheherazad2002@hotmail.com](mailto:scheherazad2002@hotmail.com)

*Un des objectifs de l'utilisation industrielle des microorganismes concerne la production d'enzymes thermostables, capables de supporter les températures élevées de certains processus. Des souches fongiques et levuriennes, productrices d' $\alpha$ -amylases thermostables, ont été isolées à partir de trois échantillons de blé en provenance de différentes localités de zone aride (Biskra, Oum El Bouaghi et Constantine). 15 souches fongiques et 3 souches levuriennes ont été isolées : elles appartiennent respectivement aux genres *Aspergillus*, *Penicillium*, *Alternaria*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Rhizopus*, *Geotrichum* et *Stachybotrys* (souches fongiques) et aux genres *Candida* et *Rhodotorula* (souches levuriennes). Notre travail a porté sur les souches de l'espèce *Aspergillus niger* et les souches levuriennes. L'étude de la production de l' $\alpha$ -amylase et de la thermostabilité de l'enzyme nous ont permis de sélectionner la souche d'*Aspergillus niger* B<sub>1</sub> et la levure *Rhodotorula sp.* La souche fongique B<sub>1</sub> est caractérisée par une production d' $\alpha$ -amylase maximale (5582.6 U). De plus, l'enzyme produite montre la meilleure thermostabilité puisqu'elle conserve 55.8% de son activité avec une demi-vie de 180 min, après une exposition à 80 °C pendant 150 min. L'enzyme de la souche B<sub>2</sub> conserve 52% de son activité dans les mêmes conditions de traitement. En ce qui concerne l'étude des souches de levures, la souche R montre une production d' $\alpha$ -amylase de (2540 U). L'enzyme obtenue est caractérisée par 55% d'activité dans les mêmes conditions que précédemment Sa demi-vie est de 120 min. Notre travail a aussi révélé que la production d'enzymes est plus importante (8124.10 U) dans le cas d'une culture mixte d'*Aspergillus niger* B1 (10<sup>5</sup> spores/ml) et *Rhodotorula sp.* (2.5 x 10<sup>5</sup> cellules/ml) cultivée sur lactosérum.*

**Mots clés :** *Aspergillus niger*, *Rhodotorula sp.*, culture mixte,  $\alpha$ -amylase, thermostabilité

## 1. Introduction

Le recyclage des résidus agro-alimentaires tels que le lactosérum, les déchets d'oranges, le corn steep liquor...etc contribue, d'une part à réduire la pollution de l'environnement et d'autre part, à produire, par le biais des biotechnologies, des métabolites à haute valeur ajoutée, en particulier des enzymes. Différentes recherches ont été menées pour valoriser les déchets industriels par une utilisation en tant que source de carbone. Parmi ces travaux, citons la production de pectinase (Fonseca et al., 1994), la production d' $\alpha$ -amylase (Djekrif, Dakhmouche et al., 2006), la production de polygalacturonase (Hart et al., 1991), la production des protéases (Nouadri et al., 2005) et la production de single cell protein (Naomici et al., 1981).

L'utilisation d'enzymes thermostables à l'échelle industrielle nécessite un choix judicieux des souches productrices, isolées à partir du milieu naturel et des matières organiques en décomposition.

C'est dans cette optique que nous avons isolé la moisissure *Aspergillus niger* et la levure *Rhodotorula sp.* à partir des grains de blé dur de trois régions de zones arides ou

semi-arides afin d'optimiser la production de l'alpha-amylase thermostable. Le lactosérum a été utilisé comme milieu de base pour la production de l'alpha-amylase thermostable (E.C.3.2.1.1 :  $\alpha$ -1-4-glucan-4-glucanohydrolases). Celle-ci a une large application industrielle : industries alimentaire, pharmaceutique, textile, papeterie..).

## **2. Matériel et méthodes**

### **2.1. Micro-organismes**

#### 2.1.1 Isolement

L'isolement des micro-organismes est réalisé à partir des grains de blé dur en provenance de 03 régions climatiquement aride [Biskra (variété Hedba)] et semi-aride [Constantine (variété Hedba) et Oum El Bouaghi (variété Oued Zneti)]. Les blés ont été fournis par l'Institut Technique des Grandes Cultures (I.T.G.C.). Les étapes d'isolement réalisées sont celles recommandées par Moreau (1996) et Malloch (1997).

#### 2.1.2. Triage et traitement des grains

Le tri se fait en fonction de la taille, la couleur et l'aspect des grains : tout changement de taille, de couleur ou d'aspect général des grains permet de suspecter leur contamination intérieure.

Le traitement des grains (désinfection superficielle) se fait par une solution de HgCl<sub>2</sub> à 2% dans du HCl concentré pendant 1 à 2 min. Après au moins 3 rinçages à l'eau distillée stérile, les grains sont séchés avec du papier filtre stérile pour être ensuite ensemencés.

#### 2.1.3. Ensemencement et incubation

Les grains stériles sont ensemencés dans des boites de pétri contenant du sable stérile humecté de l'eau distillée stérile à raison de 10 grains par boite. L'ensemble est incubé à 30 °C pendant 3 jours.

#### 2.1.4 Observation et repiquage des mycéliums

Des observations quotidiennes au binoculaire sont effectuées dès la germination des grains et apparition des mycéliums. Ces derniers sont repiqués sur différents milieux de cultures (Botton et al., 1990; Guiraud, 1998).

#### 2.1.5. Les milieux de cultures

Les milieux de cultures utilisés sont : Agar blanc, Czapek Dox, PDA, Sabouraud, CYA.

#### 2.1.6. Purification

La purification des souches contaminées est effectuée par prélèvement d'une hyphes terminale après la culture en boite de pétri sur un milieu neuf. La souche est ensemencée au centre de la boite et le prélèvement a lieu lorsque le développement de la souche est suffisant.

L'ensemencement des levures est fait en surface sur milieu gélosé (PDA et Sabouraud) par étalement en stries transversales. Les boites sont ensuite incubées à 30 C pendant

24 à 72 h. A partir d'une colonie bien isolée, on effectue une coloration au bleu de méthylène et une observation microscopique.

### 2.1.7. Identification

#### 2.1.7.1. Identification des moisissures

L'identification des moisissures dépend d'une part, de l'examen macroscopique effectué sur un milieu solide (Czapek Dox gélosé) coulé en boîtes de pétri et d'autre part, de l'examen microscopique effectué sur une préparation à l'état frais, après fixation au lactophénol et coloration au bleu coton. Des mesures micrométriques sont effectuées par micromètre oculaire sur les sporanges, les sporangiophore et les spores. Comme la structure des moisissures est particulièrement fragile, une technique spéciale consiste à préparer une culture observable directement au microscope, il s'agit de la culture sur lame (Zaitlin et al., 2003).

#### 2.1.7.2. Identification des levures

L'identification des levures est basée sur les caractères cultureux : la forme, la couleur des colonies et l'aspect de la culture sur milieu liquide et solide (Bouix et al., 1999; Guiraud, 1998), les caractères morphologiques et cellulaires (le mode de reproduction végétative, aptitude à la filamentation) et les caractéristiques sexuelles et les caractères biochimiques (la fermentation et l'assimilation de différents substrats) (Guiraud, 1998 ; Kreger, 1984)

### 2.1.8. Conservation des souches

Les moisissures isolées sont conservées sur gélose inclinée à 4° C ou par congélation en présence de substance cryoprotectrices tel que le glycérol (Bouchet, 1999).

Les colonies levuriennes sont aseptiquement transférées et ensemencées sur gélose inclinée de Malt agar (MA) pendant 3 jours pour permettre une croissance maximale. Les cultures sont alors stockées à 4 °C (UI-Haq et al., 2002) et à – 80°C en cryobilles.

## 2.2. Conditions de fermentation

### 2.2.1 Milieu de culture

Le milieu de fermentation est constitué de lactosérum enrichi (amidon 10g/l, extrait de levure 4g/l, NH<sub>4</sub>CL 4g/l, 2ml de solution d'oligo-éléments), le pH étant ajusté à 5. Il est ensuite reparti dans des erlens de 250 ml à raison de 50 ml de milieu par erlen. Après stérilisation à 110° C pendant 15 min,

### 2.2.2. Inoculum des cultures

Les cultures fongiques sont ensemencées à 10<sup>5</sup> spores/ml. Dans le cas des cultures levuriennes, le taux d'ensemencement est de 2,5 10<sup>5</sup> cellules/ml. Le milieu est incubé à 30° C pendant trois jours sous agitation à 200 rpm (Gonzalez et al., 1992).

### 2.3. E.tude de la thermostabilité de l'alpha-amylase

L'étude de la thermostabilité de l'alpha-amylase a été réalisée à 80°C sur l'extrait brut issu de la fermentation.

#### 2.2.1. Dosage de l'activité enzymatique

L'activité de l'alpha-amylase est obtenue avec 0.5 ml du filtrat ajouté à 0.5 ml d'amidon soluble à 1% dans le tampon phosphate 0.1 M pH 5. Le mélange est incubé à 40°C pendant 30 minutes. La réaction est stoppée par l'acide 2,4, dinitrosalicylique. L'unité de l'activité de l'alpha-amylase est 1 µmole de maltose libéré par min (Bernfeld, 1955).

### 2.4. Inoculum de la culture mixte

Pour déterminer la quantité adéquate de spores d'*Aspergillus niger* à apporter, la croissance a été suivie dans des échantillons ayant reçu respectivement des doses de  $0$ ,  $10^3$ ,  $10^4$ ,  $10^5$ ,  $10^6$  et  $10^7$  spores /ml. Après avoir déterminé le taux d'ensemencement des spores permettant la production maximale, l'inoculation de la levure est étudiée entre un taux de  $2.5 \times 10^4$  et  $2.5 \times 10^8$  cellules /ml.

## 3. Résultats et discussion

### 3.1. Fréquence des espèces observées

Une centaine de souches fongiques et trois souches levuriennes productrices d'alpha-amylases thermostables ont été sélectionnées à partir de région aride et semi-aride (tableau 1).

Espèces isolées	Constantine	Oum El Bouaghi	Biskra
<i>Cladosporium sp.</i>	5	12	-
<i>Rhizopus sp.</i>	2	-	-
<i>Alternaria sp.</i>	7	5	6
<i>Aspergillus flavus</i>	-	-	4
<i>Aspergillus oryzae</i>	-	1	1
<i>Aspergillus fumigatus</i>	-	1	-
<i>Aspergillus terreus</i>	-	3	-
<i>Aspergillus niger</i>	3	10	2
<i>Penicillium sp.</i>	4	4	3
<i>Stachybotrys sp.</i>	-	1	-
<i>Geotrichum sp.</i>	3	-	10
<i>Fusarium sp.</i>	-	-	10
<i>Ulocladium sp.</i>	-	1	-
<i>Rhodotorula sp.</i>	-	-	2
<i>Candida sp.</i>	-	-	1

**Tableau 1.** Les différentes souches isolées à partir du blé

Les études macroscopique et microscopique ont mis en évidence 9 genres de moisissures et 2 genres de levures.

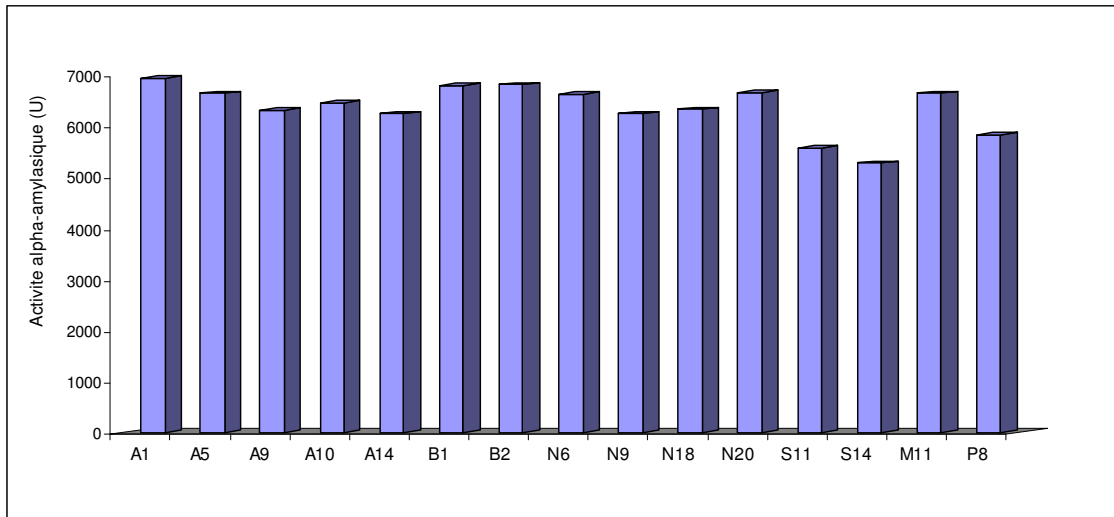
Le nombre d'espèces isolées par échantillon de blé varie entre 24 et 38.

Nous avons constatée une forte densité fongique dans les trois échantillons.

Parmi les espèces recensées, seules *Aspergillus niger*, *Alternaria sp.* et *Penicillium sp* sont présents dans les trois échantillons. Les autres espèces ont une distribution limitée à un ou deux échantillons. 25 % des souches sélectionnées représentent le genre *Aspergillus*. Pour cette étude, 15 souches d' *Aspergillus niger* et trois souches de levures ont été étudiées pour la production de l'alpha amylase..

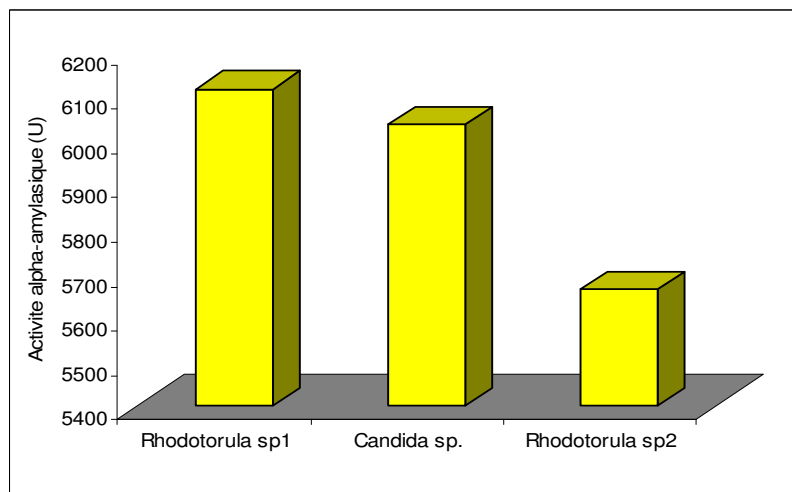
## 2-Activité amyliasique des souches sélectionnées

Les résultats obtenus par les souches fongiques sont présentés dans la figure suivante :



**Figure 1.** Etude de la production d'alpha-amylase chez les souches fongiques

Les résultats obtenus des souches levuriennes illustrés dans l'histogramme suivant :

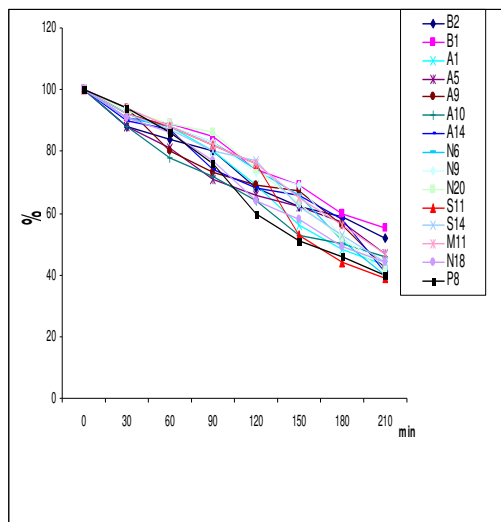


**Figure 2.** Etude de la production de l'enzyme chez les souches levuriennes

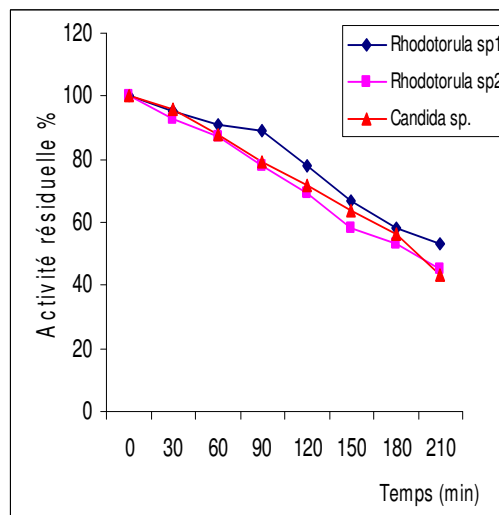
Nous constatons que l'ensemble des souches sont productrices d' $\alpha$ -amylase avec une différence significative avec  $F=36.37$ ,  $P= 0.001$  pour les moisissures et  $F=8.83$ ,  $P 0.001$  pour les levures.

### 3- Etude et comparaison de la thermostabilité de l' $\alpha$ -amylase des souches sélectionnées

Les résultats expérimentaux de la thermostabilité des souches fongiques et levuriennes sont consignés dans les figures 3 et 4 .



**Figure 3.** Etude de la thermostabilité de l' $\alpha$ -amylase des souches fongiques



**Figure 4.** Etude de la thermostabilité de l'enzyme chez les levures

L'étude de la stabilité de l' $\alpha$ -amylase à 80°C chez les souches fongiques montre que la souche fongique *A.niger* (B1) produit l'enzyme la plus thermostable puisqu'elle conserve 55.8% de son activité initiale. Sa demi-vie est de 180 min.

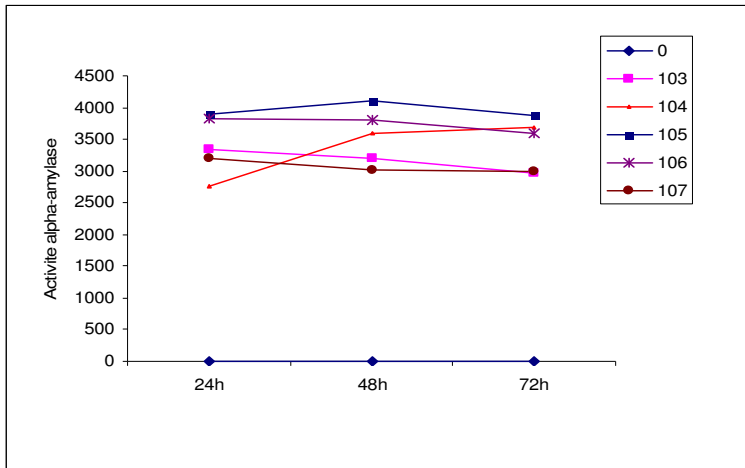
Parmi les souches de levures isolées, la souche *Rhodotorula sp1* possède une  $\alpha$ -amylase thermostable. Elle conserve 55% de son activité et présente une demi-vie de 120 min. Ces souches proviennent de la zone aride de Biskra

Il existe un optimum de température pour lequel l'activité enzymatique est maximale et la dénaturation de l'enzyme faible (Argos, 1979).

### 4- Culture mixte (moisissure-levure)

#### 4.1. Densité de l'inoculum de spores

Les résultats de l'inoculation par les spores de la souche d' *Aspergillus niger* B<sub>1</sub> sont présentés dans les figures 5.

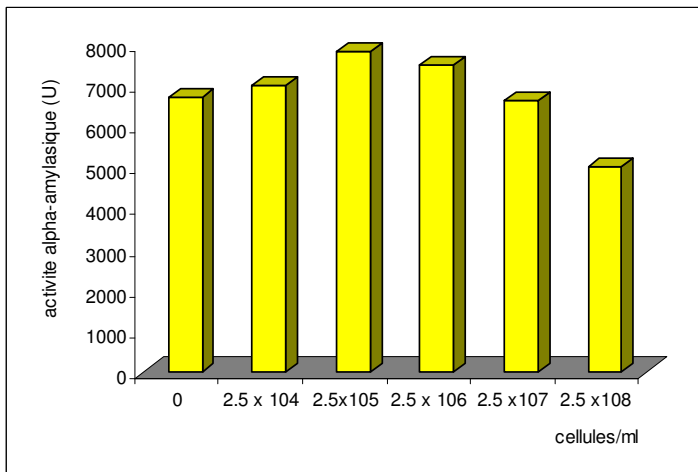


**Figure 5.** Etude de la densité de l'inoculum de spores

On conclut qu'une dose d'inoculum de  $10^5$  spores/ml est suffisante pour obtenir une bonne activité  $\alpha$ -amylasique ainsi qu'une bonne croissance

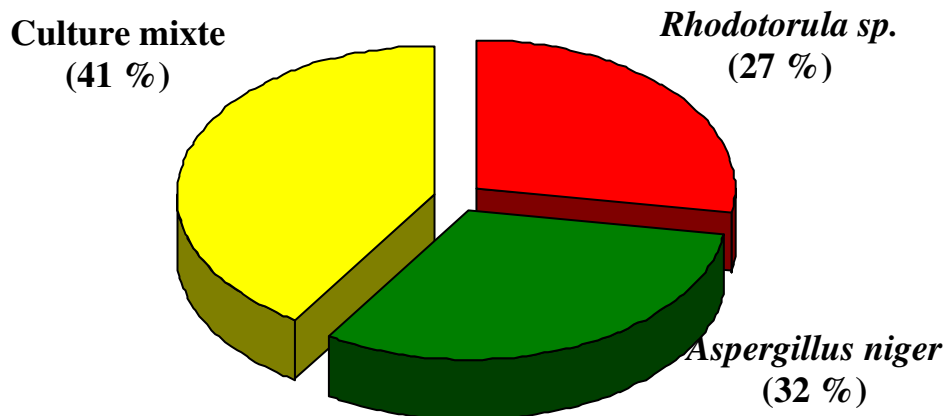
#### 4.2. Détermination du taux d'ensemencement pour la production alpha-amylasique de la culture mixte

Le taux d'ensemencement en spores est fixé à  $10^5$  spores/ml, celui de la levure variant de  $2.5 \times 10^4$  à  $2.5 \times 10^8$  cellules/ml.



**Figure 6.** Détermination du taux d'ensemencement de la levure

Les résultats obtenus (figure 6) indique que l'activité enzymatique est plus marquée pour des taux d'ensemencement de  $10^5$  spores/ml pour l'espèce *A.niger* et  $2.5 \times 10^5$  cellules/ml *Rhodotorula sp*<sub>1</sub>. L'activité alpha amylasique de la culture mixte est de **8124 U** alors que les cultures individuelles sont respectivement pour *Aspergillus niger B*<sub>1</sub> de **6011 U** et pour *Rhodotorula sp R*<sub>1</sub> de **5192 U**.



**Figure 7.** L'activité alpha amylasique de la culture mixte et des cultures individuelles

## 5. Discussion

La thermostabilité des enzymes de nos souches dépasse largement les valeurs citées par la littérature. Ces résultats peuvent s'expliquer par la nature de la souche, la structure de l'enzyme et les conditions environnementale (l'adaptation physiologique) dont on sait qu'elles ont un impact sur la thermostabilité.

Selon les études bibliographiques, la structure de l'enzyme et sa thermostabilité sont influencées par les liaisons ioniques, les liaisons hydrogène et les interactions hydrophobes ainsi que les ponts disulfures (Vieille et al., 2001). La présence des ions  $Ca^{2+}$  et  $Zn^{2+}$  dans la structure de l'alpha amylase (métalloenzyme à  $Ca^{2+}$  et  $Zn^{2+}$ ) augmente considérablement sa stabilité (Bose et al., 1996; Savcheko et al., 2002) La stabilité thermique de l'alpha amylase est également prolongée en présence de l'amidon (substrat de l'enzyme) (Aguilar et al., 2002; Vallier et al., 1977).

Plusieurs études sur les cultures mixtes levures-moisissures ont démontré qu'il existe une synergie entre les deux types de micro-organismes tant sur la biomasse que sur l'activité enzymatique (Soso et al., 1988).

Selon Ghanem, 1992, la production de protéine uni-cellulaire est plus importante avec une culture mixte entre *Trichoderma reesei* et *Kluyveromyces maiscianus*.

Les travaux de Abouzeid et al., 1986, sur la production d'éthanol à partir de l'amidon révèlent que l'activité amylasique et la production d'éthanol ont nettement augmenté avec une culture mixte d' *Aspergillus niger* et *Saccharomyces cerevisiae*. Ceci est dû à une synergie métabolique entre les deux espèces

## Bibliographie

- 1-Abouzeid M.M. and Reddy C.A. Direct fermentation of potato starch to ethanol cocultures of *Aspergillus niger* and *Saccharomyces cerevisiae* Microb.Technol.,vol.16, n° 2, 1986, p.203-213.
- 2-Aguilar G., Mordon Guyot J., Trejo- Aguilar B. & Guyot J. P. Purification and characterization of an extracellular  $\alpha$ -amylase produced by *Lactobacillus manihottivorans* LMG 1801 (t), an amylolytic lactic acid bacterium enzyme. Microb.Technol.,vol. 27, n°6, 2000, p.406-413.
- 3-Argos P., Rossmann M. G., Grau U. M., Zuber G. F. & Tratschi J. D. Thermal stability and protein structure. Biochem.,n°18, 1979, p.5698-5703.



- 4-Bernfeld P. Amylase  $\alpha$  and  $\beta$ . Methods in enzymology (Kaplan ed), academic press; 1: 149-158, 1955.
- 5-BOSE K., DAS D. Thermostable alpha-amylase production using *Bacillus licheniformis* NRRLB 14368 Idian. J.Exp. Biol, vol.34, n°12, 1996, p. 1279-82.
- 6-Botton B., Breton A.,Fevra M.,Gauthier S., Guy Ph., Larpent J-P.,Reymond P.,Sanglier J.J.,Vayssier Y.,Veau P. Moisissures utiles et nuisibles. Importance industrielle. Masson, Paris : 41-48, 210-220, 1990.
- 7-Bouchet P. H., guignard J. L. & Vihard J. Les champignons mycologie fondamentale et appliquée. Masson (Ed) p. 36-45. 1999.
- 8-Bouix M. & Leveau J. Y. Production des enzymes in Scriban R. Biotechnologies Ed Lavoisier p. 344-400, 1999.
- 9-Djekrif-Dakhmouche S., Gheribi-Aoulmi Z., Meraihi Z. & Bennamoun L. Application of a statistical design to the optimization of culture medium for  $\alpha$ -amylase production by *Aspergillus niger* ATCC 16404 grown on orange waste powder. J.Food Engineering n°73, 2006, p. 190-197.
- 10-Fonseca M.J.V., Said S. The pectinase produced by *Tubercularia vulgaris* in submerged culture using pectin or orange - pulp pellets as inducer. Appl Microbiol Biotechnol vol.42, 1994, p. 32-35.
- 11-Ghanem K. M. 1992. Single cell protein production from beet pulp by mixed culture. Microbiologia,vol. 8, n°1, 1994, p. 39-43.
- 12-Gonzalez Ma. P., Siso Ma.I.G., Murado M.A., Pastrana L., Montemayor Ma. I. and Miron J. Depuration and valuation of mussel - processing wastes. Characterization of amylolytic postincubates from different species grown on an effluent. Bioresource technology n°42,1992, p. 133-140.
- 13-Guiraud Joseph-Pierre. Microbiologie alimentaire. Dunod, Paris : 8-101, 1998.
- 14-Hart H.E., Parish M.E., Burns J.K. and Wicker L. Orange finisher pulp as substrate for polygalacturonase production by *Rhizopus oryzae*. Journal of food science, vol.56 n°2,1991, p. 480 - 483.
- 15-Kreger-Van Rij N. J. The yeast, a taxonomic study. 3<sup>ème</sup> edition Elsevier Science Publishers, Amesterdam, 1984.
- 16-Malloch D. Mould isolation, cultivation and identification. University of Toronto, 1997.
- 17-Moreau C. Les moisissures In Bourgeois C. M., Mescle J.F. & Zucca J.. Microbiologie alimentaire, tome 1 Aspect microbiologique de la securite et de la qualite des aliments. Ed Tec et Doc 1996.
- 18-Naomichi.Nishio and Nagai Shiro. Single cell protein production from mandarin orange peel. European J.Appl.Microbiol.Biotechnol.;, vol. 11, 1981, p.156-160.
- 19-Nouadri E., Meraihi Z. & Dakhmouche S. Optimization of medium components for the production of  $\alpha$ -amylase by *Penicillium camemberti* PI21. Arab. J. Lab. Med. vol.31, No 3,2005, p. 441-449.
- 20-Savcheko A., Vieille C., Kang S. & Zeikus J. C. Pyrococcus  $\alpha$ -amylase is stabilizad by calcium and zinc. Department of biochemistry molecular biology, university east Lausing, 2002, p. 111-123.
- 21Siso.M.I.G,Murado.M.A,Franco.J.M,Miron.J,Gonzalez.M.P..Microfungus-yeast mixed cultures in the degradation of amylaceous wastes.I:Interactions affecting amylolytic activity.Biotechnology Letters; n°10, vol.6, 1998, p.431-436.
- 22-Smith R. Fungal identification guide. Department of veterinary pathology, Texas University, 2002..
- 23-Ul-Haq I., Roheena A., Ashraf H. & Shah A.H. Isolation and screening of fungi for the biosynthesis of  $\alpha$ -amylase. Biotechnology, n°1, vol. (2-4), 2002, p. 61-66.
- 24-Vallier P., Bata J. et Colobert L. Conditions optimales de production d' $\alpha$ -amylase en milieu liquide par *Aspergillus oryzae*. Ann Microbiol (Inst Pasteur); vol.1280., 1977, p. 359-371.
- 25-Vieille C. &Zeikus G. J. Hyperthermophilic Enzyme, Source, Uses and Molecular Mechanisms for thermostability, Michigan Satate University, East Lansing Michigan. 2001.
- 26-Zaitlin B., Watson S. B., Ridal D., Stachwill T. & Parkinson D.. Actinomycetes in Lake Ontario, habitats and geosmim and MIB production, 95 (2), 2003, p.113-118.