

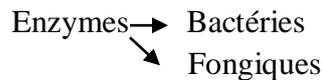
Isolement des souches productrices d'enzymes

- Type d'enzyme ?
- Choix du microorganisme ?
- Choix du milieu naturel ?

❖ **Type d'enzyme**

- Famille des glucides ; amylases, gluconases, lactases, invertase....
- Famille des protéines : protéases, présure.
- Famille des lipides : lipases.

❖ **Choix des micro-organismes**



A. Enzymes bactériennes

Bacillus : amylases, gluconases, protéases.

Actinomycètes : glucose- invertase

Archaea (extremophiles) : groupe de micro-organismes à :

- enzymes thermostables
- enzymes actives aux pH extrêmes

B. Enzymes fongiques

Moisissures

- *Aspergillus oryzae* : amylases, protéases acides
- *Aspergillus niger* : cellulases, gluconase
- *Rhizopus* : lipases
- *Mucor* : protéases acides

Levures

- *Saccharomyces cerevisiae*
- *Kluyveromyces lactis* : lactase
- *Kluyveromyces fragilis* : lactase

❖ **Choix du milieu naturel**

- Les micro-organismes sont recherchés là où les substances à hydrolyser sont abondantes. Exp. Les micro-organismes produisant les cellulases sont recherchés dans les sols forestiers riches en cellulases. La recherche des micro-organismes produisant des lactases est effectuée sur des laitiers.
- Le plus souvent, les enzymes sont **induites** par la présence du substrat.
- Si on cherche certaines propriétés particulières (Exp. thermostabilité), il faut chercher les souches dans les milieux approprié (sources thermales).

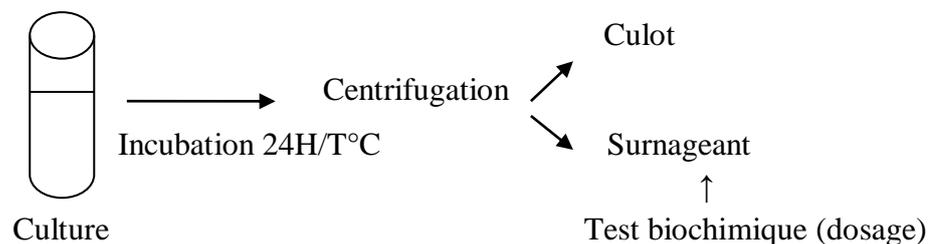
- **Le principe de la sélection**, repose sur l'utilisation des milieux de culture sélectifs (G^+ , G^-). Le milieu de sélection doit contenir **le substrat de l'enzyme** comme **seule source de carbone**. Il s'agit de sélectionner des souches à activité enzymatique abondante.

Recherche et confirmation de l'activité enzymatique des souches

Il s'agit de **chercher la synthèse** de l'enzyme et de **la quantifier**.

Le principe : mettre en évidence l'activité enzymatique des souches isolées sur des milieux gélosés contenant des substrats spécifiques de l'enzyme.

- **Milieu liquide :**



- **Milieu solide :**

- ✚ Visualiser, après incubation, l'activité enzymatique qui diffuse à travers la gélose sous forme d'un halo qui est proportionnel à l'action enzymatique.
- ✚ Mesure du diamètre du halo → indication préliminaire de mesure de l'activité enzymatique.

A/ Recherche de l'activité enzymatique milieu gélose (Cas d'utilisation de la souche)

1) Activité protéasique

Les protéases sont des enzymes qui scindent la molécule protéique en fragment de polypeptides constitués de quelques acides aminés.

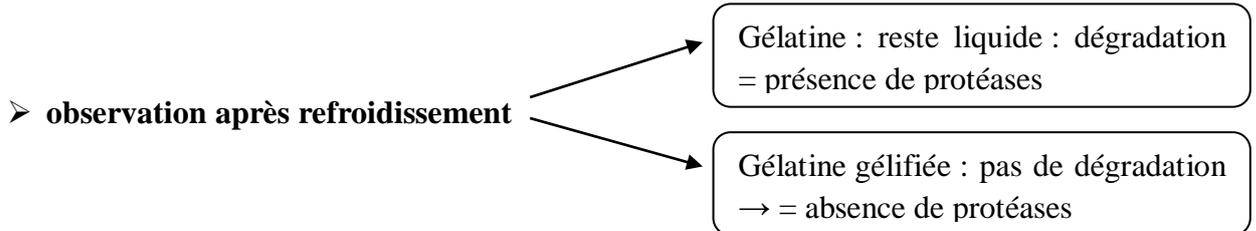
a) Milieu gélosé au lait

Milieu (1000 ml)	Lait en poudre10g
	Agar15g

- Ensemencement de la souche sélectionnée en spot
- Incubation 24 H à la température de croissance de la souche
- Recherche (visualiser) les zones claires autour des colonies
 - Une zone claire se traduit par la présence des protéases
 - = Dégradation des micelles de caséine se dispersant sur la gélose autour des colonies.

b) Milieu gé à base de gélatine

- Ensemencement d'un milieu semi-molle contenant de la gélatine avec la souche isolée.
- Incubation à la température optimale de croissance
- Refroidissement (T°C ambiante) → observation.
- L'activité protéasique entraine la liquéfaction de la gélatine.



2) Recherche de l'activité cellulosique

Milieu	C M C (carboxyméthyl cellulose)...5g
1000ml	Agar15g

- Ensemencement de la souche (ou des souches isolées) puis incubation à la T°C de croissance pendant 24H (Bactérie).
- La révélation s'effectue par recouvrement de la boîte avec une solution au rouge Congo (1%) (Accentue le contraste).
- Observation d'un halo orange sur un fond rouge = CMC dégradée= présence de cellulases

- Quantifier =
$$\frac{\text{Diamètre du halo}}{\text{Diamètre de la cellule}}$$

B/ Cas de l'utilisation d'un d'extrait enzymatique

- Culture 25 ml (en fiole), incubation, centrifugation →Culot
↙ Surnageant
- Stockage de l'extrait dans des tubes à eppendorf (2-3 ml).
- Conservation à -20C° jusqu'à utilisation ultérieurs.

❖ **Milieu solide :**

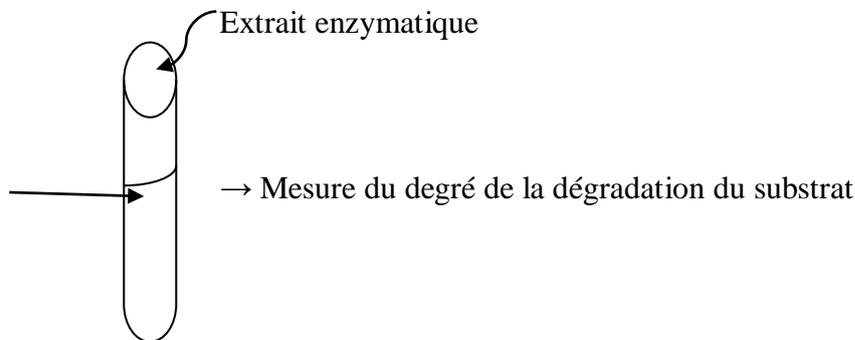
- Utilisation de gélose tamponnée contenant le substrat de l'enzyme.
- Creuser des puits diamètre 4 mm.
- Remplir les puits avec 10 µl d'extrait enzymatique (un témoin négatif : tampon)
- Incubation 24 H à TC°
- Zones claires autour des puits : cellulose dégradée= présence de cellulases
(Ou bien recouvrir les boites avec la solution au rouge Congo (halos oranges sur fond rouge= présence de cellulases)

Milieu utilisé :
2% Cellulose
1,5% Agar
16 H à 40°C

N.B : cette technique prouve que l'enzyme est extra cellulaire (nature de l'enzyme).

❖ **Milieu liquide :**

→ Avantage = mesure de l'activité



▪ **Exemple : activité amylasique**

- 100µl extrait enzymatique + 100µl solution d'amidon à 1,5% dans un tampon phosphate (0,1 M ; pH 6).
- Incubation à 70°C (enzyme thermostable) pendant 20-30 min dans un bain marie.
- Arrêt de la réaction (Glace : inhiber la réaction enzymatique).
- Dosage glucose / spectrophotomètre à 625 nm en se référant à une courbe étalonnage.
- Quantité d'enzyme → UE (unité enzymatique) = Quantité d'enzyme qui libère 1 µmol glucose/ min.

Cas des enzymes intracellulaires : ex. Invertase, Lactase, Phosphatase.

Méthodes de destruction des cellules (lyse des cellules) :

1. **Moyens mécaniques :** traitement aux ultrasons, broyage, congélation / décongélation, choc osmotique...
2. **Chimiques ;** utilisation de certains détergents.
3. **Enzymatiques :** préparation des protoplastes ; de telles cellules seront préparés en traitant ces dernières avec des enzymes (telle la lyticase) qui détruiront la paroi sans briser la membrane plasmique.