Université des Frères Mentouri 1

Faculté des Sciences de la Nature et de la vie

Département de Microbiologie

Master 1 : Biotechnologie des Mycètes

Matière :

**TP : Enzymes à utilités fongiques**

Par :

Docteur ALMI H.

Docteur BENKAHOUL M.

2016-2017

***Objectifs de l’enseignement :***

A la fin de ce tp vous serez capable de :

1. Réaliser une fermentation à échelle laboratoire
2. Mettre en évidence l’activité protéolytique.
3. Evaluer l’effet de variations de concentration du substrat sur la production de la protéase.

***Prérequis :***

Cet enseignement nécessite quelques connaissances de base en :

1. Enzymologie.
2. Microbiologie.

Université des Frères Mentouri 1

Faculté des Sciences de la Nature et de la vie

Département de Microbiologie

Master 1 : Biotechnologie des Mycètes

**Matière : Enzymes à utilités Biotechnologiques.**

**TP1: Préparation des milieux de cultures**&

**TP2: La mise en évidence de l’activité protéolytique**

**But**

Préparation de deux milieux de culture l’un solide et l’autre liquide :

* Solide à base de lait écrémé pour la mise en évidence de l’activité protéolytique.
* Liquide à base de lactosérum pour la production d’enzyme par fermentation.
* Mise en évidence de l’activité protéolytique de quelques souches fongique.

**Principe**

Un milieu de culture doit satisfaire les exigences nutritives des micro-organismes (la source de carbone, d’azote, besoins en ions minéraux, facteurs de croissance….). Le pH et la force ionique doivent être voisins des valeurs optimum. Les milieux de cultures sont de deux types : solide à base d’agent de solidification tel que l’agar-agar ou liquide.

**Matériel**

|  |  |
| --- | --- |
| *Non consommable* | *Consommable* |
| * Balance
* Autoclave
* pH mètre
* Plaque d’agitation
* Barreau magnétique
* Erlen-meyers de 250 ml
* Pipettes stériles de 1ml
* Coton cardé
* Papier d’aluminium
* Eprouvettes de 50 ml
* Entonnoirs
* Papier filtre (Whatman n°1)
* Tubes à bouchons
* Boites de Pétri / Flacons
* Etuve
 | * Lait écrémé
* Agar
* Lactosérum
* Extrait de levure
* Caséine
* Tampon phosphate/phosphate 0.1 M pH6
* Solution NaOH 0.1 N
* Solution HCl 0.1 N
* Suspension de spores (106 spores/ml)
 |

**Composants des milieux de culture**

|  |  |
| --- | --- |
| *Milieu solide (Gélose au Lait)* | *Milieu liquide (fermentation)* |
| * Lait écrémé
* Agar
 | * Lactosérum
* Extrait de levure
* Caséine
* Tampon phosphate 0.1 M pH6
* Solution NaOH 0.1 N
* Solution HCl 0.1 N
 |

**1-Préparation des milieux de culture :**

1. **Gélose au Lait**
* Stériliser le lait dans un flacon à l’autoclave ;
* Préparer 4 flacons contenant chacun 180 ml du milieu gélosé (180 ml d’eau distillée + 4g d’agar) puis stérilisés à l’autoclave ;
* Ajouter aseptiquement 20 ml de Lait stérile dans le milieu a surfusion (45°C).
1. **Milieu de fermentation**
* Répartir le lactosérum dans les Erlenmeyers à raison de 40 ml/flacon ;
* Enrichir le milieu de base par l’extrait de levure (0.4%) et la caséine (0.1%) ;
* Rajouter le tampon phosphate (10ml) ;
* Mélanger sur plaque d’agitation à l’aide d’un barreau magnétique ;
* Mesurer et ajuster le pH du milieu par les solutions de NaOH et de HCl à pH6 ;
* Fermer les Erlenmeyers avec le coton cardé et du papier aluminium ;
* Stériliser dans l’autoclave à 120°C pendant 20min.

**2-La mise en évidence de l’activité protéolytique**

* Après un léger refroidissement du milieu de culture (Gélose au Lait), couler stérilement dans les boites de Pétri à raison de 15 ml/ boite.
* Laisser le milieu de culture se gélifié pré du Bec Bunsen.
* A l’aide d’un emporte-pièce ou d’une pipette pasteur prélever dans des conditions aseptique un disque de mycélium à partir des cultures de moisissures à testées.
* Déposer le disque au centre de la boite de Pétri contenant le milieu de culture Gélose au Lait.
* Incuber les boites dans une étuve à 30°C pendant 3 jours.
* Après incubation, noter la présence ou pas d’une plage de lyse signalant ainsi la présence ou pas de l’activité protéolytique (l’hydrolyse enzymatique des protéines du lait)
* Mesurer le diamètre de chaque plage de lyse et comparer pour définir le microorganisme qui présente le plus grand diamètre et donc la plus grande activité protéolytique qui serra retenu pour la fermentation

Université des Frères Mentouri 1

Faculté des Sciences de la Nature et de la vie

Département de Microbiologie

Master 1 : Biotechnologie des Mycètes

**Matière : Enzymes à utilités Biotechnologiques.**

**TP 3 : Production d’une protéase fongique sur milieu à base de Lactosérum**

**But**

La mise en culture d’une moisissure localement isolée dans un milieu à base de Lactosérum (sous-produit de l’industrie fromagère), afin de produire une protéase à utilités biotechnologique.

**Principe**

Ce TP consiste à réaliser une fermentation par une souche fongique sur milieu liquide à base de sous-produits agro-industriels (déchets de dattes, déchets de tomates, déchets d’oranges, lactosérum…). En effet, la croissance microbienne s’accompagne par la production de différents métabolites en particulier les enzymes hydrolytiques telles que les amylases et les enzymes. Après trois jours d’incubation à 30°C dans bain-marie agitateur, les cultures sont filtrées afin de récupérer l’extrait enzymatique et la biomasse.

**Matériel**

|  |  |
| --- | --- |
| *Consommable* | *Non consommable* |
| * Suspension de spores (106 spores/ml)
 | * Plaque d’agitation
* Pipettes stériles de 1 ml
* Papier filtre (Whatman n°1)
* Tubes à vise
* Etuve
* Réfrigérateur
 |

**1-Milieu de culture :**

Le milieu de culture qui sert pour fermentation est le milieu à base de lactosérum (voir TP 1).

**2-Conduite de la fermentation :**

* Après refroidissement des milieux, ensemencer stérilement les milieux de cultures à l’aide de pipettes stériles (1ml/ erlenmeyer).
* Placer les erlenmeyers dans le bain-marie à 30°C sous agitation à 150 rpm, pendant 3 jours.

**3-Récupération de l’enzyme :**

* Peser le papier filtre destiné à la récupération de la biomasse
* Récupérer les erlenmeyers, et noter l’aspect de la moisissure
* Filtrer les cultures sur le papier filtre pour récupérer l’extrait enzymatique brut
* Mesurer le pH à la fin de la fermentation et discuter ces variations
* Stocker l’enzyme dans les tubes à vise au réfrigérateur, pour les dosages
* Secher la biomasse dans une étuve réglée à 105°C pendant 24h.

Université des Frères Mentouri 1

Faculté des Sciences de la Nature et de la vie

Département de Microbiologie

Master 1 : Biotechnologie des Mycètes

**Matière : Enzymes à utilités Biotechnologiques.**

**TP 4 : Dosage de l’activité d’une protéase**

**But**

Le but de ce TP est de mesurer l’activité d’une enzyme protéolytique. Celle-ci est mise en évidence dans le milieu exo cellulaire d’une culture de moisissure.

**Principe**

Les protéases hydrolysent les protéines. Les molécules non hydrolysées sont précipitées par le TCA. Les acides aminés et les peptides simples se trouvent dans la phase soluble. L’activité est donc mesurée par le dosage colorimétrique des groupements de la tyrosine à l’aide du réactif de Folin-Ciocalteu.

**Matériel**

|  |  |
| --- | --- |
| *Consommable* | *Non consommable* |
| * Extrait enzymatique
* Tampon phosphate/citrate 0.2M, pH5
* Substrat : solution de caséine à 2.5% dans le NaOH 0.1N
* Réactif de Folin-Ciocalteu dilué à 50%
* solution NaCO3
 | * Spectrophotomètre
* Bain-Marie
* Agitateur VORTEX
* Tubes à essai
* Pipettes (1ml et 5ml)
* Béchers
* Entonnoirs
* Papier filtre (Whatman n°1)
 |

**Mode opératoire :**

La manipulation est réalisée en deux étapes :

**1-Etape 1 :Préparation du mélange réactionnel** (chaque essai doit être réalisé en double)

* Mélanger :
* 0.5 ml de l’extrait enzymatique
* 0.75 ml de tampon
* 1.25 ml de substrat
* Agiter et placer au bain-Marie à 50°C pendant 30 min.
* Pour la préparation du blanc, le TCA est rajouté avant le substrat sans incubation.
* La réaction est arrêtée par addition de 2.5 ml de solution de TCA, agiter et laisser reposer 10min sur paillasse puis filtrer. Le filtrat constitue la solution contenant le produit de la réaction.

**1-Etape 2 :Dosage de l’activité**

* Mélanger :
* 0.5 ml du filtrat
* 2.5 ml de solution NaCO3
* 0.25 ml de réactif de Folin-Ciocalteu
* Bien agiter et laisser reposer 30 min. lire l’absorbance à 750nm.
* Déduire la concentration correspondante par référence au courbe étalon de la tyrosine.
* Calculer l’activité de la protéase, sachant que l’activité protéolytique est exprimée rn U et que 1U= 1µg de tyrosine libéré par 1ml de l’extrait enzymatique par heure.

Université des Frères Mentouri 1

Faculté des Sciences de la Nature et de la vie

Département de Microbiologie

Master 1 : Biotechnologie des Mycètes

**Matière : Enzymes à utilités Biotechnologiques.**

**TP 5 : Effet de la concentration du substrat sur l’activité de la protéase**

**But**

Le but de ce TP est de mesurer l’activité d’une enzyme protéolytique à différentes concentration du substrat, afin de déduire les constantes cinétiques de l’enzyme : Vm et Km.

**Principe**

La réaction se fait selon le même principe que dans le TP précédant. Ar ailleurs, l’étude de la variation de la vitesse initiale d’une réaction enzymatique, en fonction de la concentration de substrat, est réalisée en maintenant constants tous les facteurs dont dépend la réaction enzymatique et en faisant varier la concentration du substrat dans le milieu réactionnel. Ici il s’agit de la caséine.

**Matériel**

|  |  |
| --- | --- |
| *Consommable* | *Non consommable* |
| * Extrait enzymatique
* Tampon phosphate/citrate 0.2M, pH5
* Substrat : solution de caséine (1%, 2% ; 3% et 4%) (w/v) dans le citrate de sodium 0.02M
* Solution de TCA à 4%
* Solution Na2CO3à 2% dans le Na OH 0.1N
* Réactif de Folin-Ciocalteu dilué à 50%
 | * Spectrophotomètre
* Bain-Marie
* Agitateur VORTEX
* Tubes à essai
* Pipettes (1ml et 5ml)
* Béchers
* Entonnoirs
* Papier filtre (Whatman n°1)
 |

**Mode opératoire :**

La manipulation est réalisée en deux étapes :

**1-Etape 1 :Préparation du mélange réactionnel**

* Mélanger :
* 1 ml de l’extrait enzymatique
* 1.5 ml de tampon
* 2.5 ml de substrat (un tube pour chaque concentration)
* Agiter et placer au bain-Marie à 50°C pendant 30 min.
* Pour la préparation du témoin, le TCA est rajouté avant le substrat sans incubation. Un témoin pour chaque concentration
* La réaction est arrêtée par addition de 5 ml de solution de TCA, agiter et laisser reposer 10min sur paillasse puis filtrer.

**1-Etape 2 :Dosage de l’activité**

* Mélanger :
* 0.5 ml du filtrat
* 2.5 ml de solution Na2CO3
* 0.25 ml de réactif de Folin-Ciocalteu
* Bien agiter et laisser reposer 30 min. lire l’absorbance à 750nm.
* Déduire la concentration correspondante à chaque concentration de substrat en UI
* Tracer le graphe : l’activité enzymatique (UI) en fonction des différentes concentrations de la caséine. Puis déduire Km et Vm par la méthode de Lineweaver-Burk.