REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEURE ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE DE MEDEA

FACULTE DES SCIENCES



Mémoire

Présenté pour obtenir le diplôme de **Master**

En chimie

Spécialité : Chimie pharmaceutique

Par :

LAKHDARI Fatiha
NEGGAZI Kadidja

Thème :

OPTIMISATION DE LA PRODUCTION ET LA CARACTERISATION BIOCHIMIQUE D'UNE ENDOENZYME.

Soutenu publiquement le : 20 /06 /2019, Devant le jury composé de :

Dr. GASMI Sara Nawel	M C B	Université : de MEDEA	Présidente
Dr. EULDJI Amel	M A B	Université : de MEDEA	Examinatrice
Dr. KIRDI Rachida	M A B	Université : de MEDEA	Encadreur

Année universitaire : 2018/2019

Remerciements

Avant tout, nous remercions Allah le tout miséricordieux, l'unique, le puissant, maitre des cieux et de la terre pour nous avoir guidé, protégé, aidé et permis de mener à bien ce travail. C'est avec un grand plaisir que nous réservons ces lignes en Signe de gratitude et de reconnaissance à ceux qui ont contribué de prés ou de loin à L'elaboration de ce travail:

Ce travail a été réalise au sein du laboratoire de biologie de l'universite nous remercions touts équipes de laboratoire.

Nous remercions Notre responsable de formation Madame ***Dr. Kirdi Rachida,*** *encadreur de notre mémoire, pour son aide, ses conseils, la correction du manuscrit, et pour sa patience, sa confiance, son encouragement, et son œil critique qui nous a été très précieux pour la structure de travail et pour améliorer la qualité des différentes sections de notre mémoire , merci pour tout*

Nous remercions également tous les membres du jury d'avoir accepté de lire ce manuscrit et d'évaluer ce modeste travail ; la Présidente de jury ***Dr. GASMI S,*** *et examinatrice :* ***Dr. EULDJI A,*** *de l'Université de Médéa*

Enfin, un grand merci à tous ceux qui Ont contribué de prés ou de loin à la réalisation de ce travail

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail



A ma très chère mère «fatna » Affable, honorable, aimable : tu représentes pour moi le symbole de la bonté par excellence, la source de tendresse et l'exemple du dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager et de prier pour moi.



A mon très cher père « Mohammed »Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime, le dévouement et de le respect que j'ai toujours eu pour toi, rien au monde ne vaut les efforts fournis jour et nuit pour mon éducation et mon bien être.



A mon cher frère «Hossin, Kamel et Islam » Mes anges gardiens .Je vous dédie ce travail avec tous mes vœux de bonheur, de santé et de réussite.



A mes chers Sœurs «Akila, Zahia, Ratiba, Amel, Ahlem, Siham», Je vous t'exprime à travers ce travail mes sentiments de fraternité et d'amour.



A mes cher ami (e) s «Hamraoui Wafa, Sid Ali Habiche, warda,Asma,Amina ,Siham,Hadjer ,soad ,fatiha,fatima ,Hayat ,Imen , Nadia ,Karima , et spécialement ma causine Asia .



A mes adorable camarades : Sara, Nessrine, Hada, Yasmin, Djihid, Messaouda, Zahra Hannan .....merci pour le bon moment qu'on a passé enssemble.

fatiha



Je dédie ce modeste travail

A mon père

Pour son amours, sa patience, ses considérable sacrifies

Pour parvenir à ce niveau

A ma mère

Pour son grand amour, ses sacrifices et toute l'affection

Qu'elle m'a toujours offert

A mon mari

Pour son grande confiance et amour et son grande aider

A mes frères

Pour leur soutien moral et leur affection

A toute ma famille, mes amis de quartier et tous ceux que

J'aime et qui m'aiment

Khadidja

الملخـص

الأميلازهـي مـن بـين أكثـر الانزيمـات اسـتخداما فـي الصـناعة .تعمـل هـذه الأنزيمـات علـى اماهـة جزيئـات النشـاء لأعطـاء مركبـات وحـدات الجلوكـوزوالتي يمكـن ان تكـون لـديهم تطبيقـات محتملـة فـي عـدد كبيـر مـن العمليـات الصـناعية . نحـن مهتمـون فـي هـذا العمـل لتحديـد الظـروف المثلـى للتركيـب الحيـوي لنشـاط الأميليـز والكتلـة الحيويـة مـن فيوزاريـوم المعزولـة سـابقا و تحديـدها . إن وقـت الحضـانة ، ودرجـة الحموضـة فـي الوسـط ، وتركيـز الركيـزة ، وحجـم البـوغ التـي تـم تلقيحهـا هـي المعلمـات فـي هـذه الدراسـة. تظهـر نتائجنـا أنـه يـتم الحصـول علـى الظـروف المثاليـة مـع حجـم بـوغ مـن 1.75 مـل (105 جـراثيم / مـل)، ودرجـة الحموضـة 6 مـن وسـط المغـذي، وتركيـز النشـا بنسـبة 1.5 ٪ خـلال 4 أيـام مـن الحضـانة. وقـد لـوحظ تـأثير درجـة الحموضـة فـي درجـة الحـرارة علـى النشـاط الأنزيمـي لأمـيلاز الأقصـى (970 وحـدة دوليـة / مـل) عنـد درجـة حـرارة 50 درجـة مئويـة ودرجـة الحموضـة 5 تـم الحصول على الثوابت الحركية لالفا- الاميليزالتالية : 5,459 M et 5,065 min/µM (k_m ,V_m)

الكامات المفتاحية : الفا-الاميليز , الفوزاريوم , ركيزة النشاء , التخمر

Résumé

Les amylases sont parmi les enzymes les plus utilisée dans l'industrie .Ces enzymes hydrolysent les molécules d'amidon pour donner des composés d'unités de glucose .Elles ont des applications potentielles dans un grand nombre de procédés industriels (panification, biscuiterie amidonnerie..). Nous nous somme intéressés dans ce travail à la détermination des conditions optimales de la biosynthèse de l'activité amylasique et la biomasse à partir de *Fusarium sp* . Préalablement isolé et identifié. Le temps d'incubation, le pH du milieu, la concentration du substrat et le volume de spore étudiés inoculé sont les paramètres dans cette étude. Nos résultats montrent que les conditions optimales sont obtenues avec un volume de spore de 1,75 ml (10^5 spores /ml), pH 6 du milieu de culture, concentration d'amidon de 1,5 % pendant 4 jours d'incubation. L'effet du pH et de la température sur l'activité enzymatique de l'anylase de l'extrait enzymatique brute ont été également étudies. L'activité enzymatique de l'anylase maximale (970UI/ml) a été observée à une température de 50 °C et à un pH de 5. Les constantes (Km et Vm) de la cinétique d'α-amylase ont également été obtenues sont respectivement : 5,459 M et 5,065 min/µM.

Mots clés : α- amylase, *Fusarium sp,* substrat d'amidon, fermentation.

Abstract

Amylases are among the most widely used enzymes in the industry. These enzymes hydrolyze the starch molecules to give glucose unit compounds. They have potential applications in a large number of industrial processes (panification, biscuit factory, starch factory). We are interested in this work to determine the optimal conditions for the biosynthesis of amylase activity and biomass from Fusarium sp. Prior to isolate and identify. The incubation time, the ph of the medium, the concentration of the substrate and the spore volume studied inoculated are the parameters in this study. Our results show that the optimal conditions are obtained with a spore volume of 1.75 ml (105 spores / ml), pH 6 of culture medium, starch concentration of 1.5% during 4 days of incubation. The effect of pH of temperature on the enzymatic activity of maximum amylase (970 IU / ml) was observed at a temperature of 50 ° C and a pH of 5. The constants (Km and Vm) of the α-amylase kinetics were also obtained respectively: 5.459 M and 5.065 min / µM

Key words : α- amylase, Fusarium sp, starch substrate, fermentation.

Sommaire

Introduction générale …… **1**
Chapitre I : Synthèse Bibliographique

I.1. Les enzymes …… 4

I.1.1. Généralités sur les enzymes …….. **3**
I 1.2. Classification des enzymes ……... **3**
I.1.3. Les sources des enzymes …….. **4**
I.1.3. 1. Source microbienne……..……..…… **4**
I.1.3. 2. Source végétale ……..……..…….. **4**
I.1.3. 3. Source animal ……..……..……. **5**
I.1.4. Marché des enzymes …….. **5**
I.1.5. Application des enzymes ……... **6**
I.2. α- amylase…… 7
I.2.1. α- amylase ……..….. **7**
I.2.1.1. Nomenclature d'alpha- amylase ……. **7**
I.2.1.2. Structure l'α- amylase……..……..…… **7**
I.2.2. Caractéristiques de L'α-amylase …… **9**
I.2.2.1. Masse moléculaire …….. **9**
I.2.2.2. PH optimum. ……..…….. **9**
I.2.2.3. Température optimum……..……. **9**
I.2.2.4. Ions métalliques ……..……... **10**
I.2.3. Propriétés de L'α-amylase ……. **11**
I.2.4. Les différentes sources et origines de l'α- amylase …….. **12**
I.2.4.1- origine animale …….…….. **12**
I.2.4.2- origine végétale …….…….. **13**
I.2.4.3- origine microbienne ……. **14**
I.2.5. Mécanisme d'action…….…… **17**
I.2.6. Hydrolyse de l'amidon…….……. **18**
I.2.6.1. Généralités …….……. **18**
I.2.6.2. hydrolyse enzymatique de l'amidon ……..... **19**
I.2.7. Les applications industrielles et biotechnologiques de l'alpha- amylase … **19**
I.2.7.1. Utilisation des α-amylases dans les industries Agro-alimentaires…….…….. **20**
a.Glucoserie……. **20**
b. sucrerie…… **20**
C. Panification et biscuiterie …… **20**
d. Industrie des boissons …….. **20**
e. Hydrolyse de l'amidon …… **21**
f. industrie de détergent……... **22**
g. Désencollage des textiles…….. **22**
h. Industrie du papier …….. **22**
k. industrie de biocarburant …… **22**
I.2.7.2. Autres applications des alpha- amylases …….. **23**
a. Dans le domaine médical …….. **23**
b. Dans le domaine pharmaceutique……. **23**

I.2.8. Production de α- amylase ……. **23**
I.2.9. Les facteurs influençant la production de L'α-amylase ……. **24**
I.2.9.1. Composition du milieu de culture …… **24**
I.2.9.2. La Température …… **24**
I.2.9.3. Le PH …… **24**
I.2.9.4. Le temps d'incubation …… **25**
I.2.9.5. Effet des ions Calcium …… **25**
I.3. Les moisissures …… **25**
I.3.1. Généralités …… **25**
I.3.2. Le genre *Fusarium sp* ……... **25**
I.3.3. Taxinomie …… **26**
I.3.4. Caractéristiques générales ……... **26**
I.3.5. Principales espèces ……. **28**
I.3.6. Identification morphologique …… **32**

Chapitre II : Matériel et Méthodes Experimentale

II.1. Matériel et produits utilise …….. **34**
II.1.1. Matériels …… **34**
II.1.2. produits …….. **36**
II.2. Isolement et purification de la souche isolée de *Fusarium sp* …… **37**
II.2.1. Isolement de la souche de *Fusarium* …… **37**
II.2.2. Purification de la souche *Fusarium* …… **37**
II.3. Mise en évidence de l'activité amylasique…….. **38**
II.4.Identification macroscopique et microscopique de *Fusarium sp* …… **38**
II.5. Sporulation de la souche sélectionne et préparation de l'inoculum……. **40**
II.6. Préparation du milieu de culture ……... **40**
II.6.1. Séparation de la biomasse ……. **40**
II.6.2. Dosage de protéines …….. **41**
II.6.3. Détermination d'activité enzymatique …… **41**
II.7. Optimisation des conditions de culture …… **42**
II.7.1. Effet du temps d'incubation …….. **42**
II.7.2. Effet de pH de milieu …… **42**
II.7.3. Effet de la concentration d'amidon du substrat …… **43**
II.8. 4. Volume des spors inoculées …… **43**
II. 8. Préparation et caractérisation d'extrait enzymatique brut …… **43**
II.8.1. Effet PH sur l'activité amylasique …… **43**
II.8.2. Effet température sur l'activité amylasique …… **43**
II.8.3. Détermination des constantes cinétiques de l'α- amylase …… **44**

Chapitre III : Résultats et discussion

III.1. Isolement et caractérisation micro-macroscopique de la souche isolée de *Fusarium sp*…… **45**
III.2. Mise en évidence de l'activité amylasique …….. **46**
III.3. Optimisation des conditions de culture …….. **47**
III.3. 1. Temps d'incubation…….. **47**

III.3.2. PH de milieu …… **48**
III.3.3. Concentration de l'amidon ……... **48**
III.3.4. Volume des sopors……. **49**
III.5. caractérisation d'extrait enzymatique brut ……. 50
III.5.1. Effet PH …….. **50**
III.5.2. Effet température…… **51**
III.5.3. **Détermination des constants de cinétique enzymatique (K_m. V_m) ……** **52**
***Conclusion et perspectives*……** **53**
***Références Bibliographiques*……** **54**

Liste
Des Figures
Des Tableaux
Des Abréviations

Liste des figures

Synthèse Bibliographique

Figure 1. Représentation schématique de la structure primaire d'une protéine…. **3**

Figure 2. Distribution des ventes des enzymes …… **5**

Figure 3. Structure tridimensionnelle de l'α– amylase……..... ….. **8**

Figure 4. Biosynthèse de l'α- amylase …… **14**

Figure 5. Mécanisme catalytique …… **17**

Figure 6. Structure de l'amylose et l'amylopectine…… **18**

Figure 7. Schéma général de transformation enzymatique de l'amidon…… **21**

Figure 8. Les différentes espèces du genre *Fusarium sp* …….. **26**

Figure 9. Terminologie pour décrire la morphologie du genre *Fusarium*……. **27**

Figure 10. Aspect macroscopique et microscopique du genre *Fusarium* sous microscope optique grossissement X 40…….. **28**

Figure 11. *Fusarium culmorum* (Caractères morphologiques: a: macrophialides et macroconidies; b: macroconidies; c: chlamydospores)…….. **29**

Figure 12. *Fusarium graminearum* (Culture de 7 jours sur milieu PDA à 28°C et caractères microscopiques: A: macrophialides et macroconidies; b: macroconidies; c: asqueoctosporé)……. **30**

Figure 13. *Fusarium oxysporum* (Culture de 7 jours sur milieu PDA à 25°C et aspect microscopique)…… **30**

Figure 14. *Fusarium verticillioides* Sin. F. moniliforme (Culture de 7 jours sur milieu PDA à 28°C et aspect microscopique)…… **31**

Figure 15. Caractérisation de Fusarium solani…….. **32**

Figure 16. Aspect microscopique de *Fusarium solani* (a : conidiophores avec monophialides ; b : chlamydospores ; c: micro et macroconidies)……. **33**

Figure 17. Aspect macroscopique de *Fusarium solani* (Recto: gauche ; revers : droit ; après 7 jours de culture sur milieu PDA à 28°C)…… **33**

Matériel et Méthodes

Figure 18. Repiquage des boites au centre sur milieux PDA..... **38**

Figure 19. Méthode de l'identification microscopie..... **39**

Figure 20. Séchage de la biomasse…… **40**

Figure 21. Dosage de protéine……... **41**

Figure 22. Dosage de l'activité amylasique……..... **42**

Résultats et discussion

Figure 23. L'aspect microscopique de *Fusarium sp* ……. **46**

Figure 24. Test de sélection de souches amylolytiques sur gélose à l'amidon à 2% d'amidon (Après 120 h d'incubation à 28°C)……. **46**

Figure 25. L'activité amylasique et la masse selon nombre des jours……. **47**

Figure 26. Effet de la variation du pH sur l'activité amylasique et la biomasse... **48**

Figure 27. L'effet de la concentration de l'amidon sur la production de l'activité …… . **49**

Figure 28. L'effet de volume de pores sur l'activité amylasique et sur la biomasse…….. **50**

Figure 29. L**'**influence du pH sur l'activité amylasique…… **51**

Figure 30. Influence de la température sur l'activité amylasique……. **51**

Figure 31. Représentation de Michalis : Étude de l'évolution de la vitesse de la réaction enzymatique en fonction de la concentration en substrat. Température: 37°C, vitesse d'agitation : 500 rpm……. **52**

Liste des Tableaux

Synthèse bibliographique	
Tablea 1. Les différentes classes d'enzymes……..	**4**
Tableau 2. Applications industrielles des enzymes……	**6**
Tableau 3. Exemples de production de l'α-amylase par des microorganismes et leur Propriétés physico-chimiques……	**11**
Tableau 4. Les différentes origines de l' L'α-amylasemicrobienne…….	**15**
Tableau 5. Différentes α-amylases microbiennes et leur action…….	**16**
Tableau 6. Classification taxinomique de *Fusarium solani*……..…..	**32**
Matériel et méthodes	
Tableau 7. Appareillage utilisé……	**35**
Tableau 8. Produits utilisés dans la partie expérimentale……	**36**
Résultats et discussion	
Tableau 9. L'aspect macroscopique selon nombre des jours……	**45**

Symboles

λ: Longueur d'onde

V: Volume

R^2 : Coefficient de corrélation

Tween 80: Polyoxyethylene Sorbitane mono- oléate

Abréviations

DE: équivalent dextrose

E.L : Extrait de levure

Do : densité optique

ED : Eau distillée

GOD : Glucose –oxydase

I.U.B : International Union of Biochemistry

POD : peroxydase

PDA : Potatos Dextrose Agar

PH : Potentiel hydrogène

rpm : rotation par minute

***sp* :** espèce

U/ml : Unité par millilitre

Introduction Générale

Introduction générale

Les enzymes sont les outils-clés des biotechnologies car elles offrent de nombreuses possibilités d'applications dans différents domaines en : industries agroalimentaires (industries laitières, brasseries, biscuiteries, panification, charcuterie, pâtisserie, industrie des glaces...), en industries chimiques (détergents, textiles et tannerie), en clinique (enzymes réactifs, enzymes de diagnostic, enzymothérapie par des protéines recombinantes) en recherches (Protéomique et en Génomique) et autres **(little ,2004)** .

En effet, le marché mondial des enzymes est représenté par 80% des hydrolases, particulièrement les amylases et les protéases **(Morvan ,2010),** les enzymes d'origine microbiennes présentent des propriétés et des spécificités diverses, et présentent de nombreux avantages par rapport à celle d'origine animale et végétale **(Burhan et al ; 2003).** Sont largement utilisées dans les procédés industriels en raison de leur faible coût, grande productivité, protection de l'environnement et la grande disponibilité. Ces propriétés reflètent de plus en plus leurs utilisations dans divers domaines d'applications. Environ 40% des enzymes industrielles sont d'origine fongique **(Morvan ,2010)**.

L'α- amylase est une enzyme en agissant, hydrolyse en mode endo les liaisons α (1-4) et conduit à la formation d'oligosaccharides linaires et dextrines. L'α-amylase est une macromolécule appartenant à la classe des protéines globulaires de type endoglycanase de la classe des hydrolases. Les amylases sont parmi les enzymes celles qui occupent une place de choix, ce qui constitue une classe d'enzymes industrielles ayant approximativement 25-30 % du marché des enzymes **(Rajagopalan et Krishnan ; 2008)**.

Dans la plupart des cas, la production industrielle d'enzymes amylolytiques se fait à partir de souches bactériennes ou de souches fongiques. Cependant, les moisissures sont considérées comme les microorganismes les plus importants en biotechnologies pour leur fort potentiel de développement. La production d'α- amylase par des procédés biotechnologiques (fermentations), nécessite non seulement l'identification microorganismes amylolytiques, mais également l'optimisation des paramètres culturels et des conditions de production, pour l'améolration du rendement de l'enzyme amylasique produit par voie microbienne **(Sicard, 1982).**

Pour réaliser cet objectif, la présente étude est divisée en deux parties, dont la première est une étude qui concerne la synthèse bibliographique, Organisée en trois chapitres :

- Le premier chapitre qui conseme des généralités sur les enzymes (définition, classification, leurs sources, leur marché, et finalement quelques applications industrielles des enzymes).
- Le deuxième chapitre est consacré pour les α- amylases (Définition, Nomenclature de l'α- amylase, structure l'α- amylase, caractéristiques de l'alpha -amylase**,** leurs Propriétés, les sources d'α- amylase, mécanisme d'action …et quelque application dans déférents domaines industriels.
- Le troisième chapitre étudie les moisissures (généralités, et le genre *Fusarium sp,* taxonomie et quelques caractérisations générales, principales espèce et leur identification macro-microscopique).

Un deuxiéme chapitre (étude experimentale) organisée en deux chapitres qui représentent notre travail pratique (Matériels et méthodes, résultats et discussion). Les objectifs de cette partie sont :

- L'isolement et la purification des souches fongiques (*Fusarium sp).*
- l'identification macroscopique et microscopique de la souche fongique amylolytique.
- La production de L'α-amylases par la souche amylolytique sélectionnée sur milieu à base de pomme de terre.

Ce travail est enfin clôturé par une conclusion générale qui récapitule les résultats de ce travail .

.

Synthèse Bibliographique

I. 1.1. Généralités sur les enzymes

Les enzymes sont les catalyseurs du monde biologique. Ce sont des macromolécules de haute masse moléculaire (10 à 100 kDa) dans lequel sont arrangés les acides aminés, constitue ce que l'on appelle la structure primaire des protéines **(Vincent, 1996)** présentes dans les cellules de tous les organismes vivants où elles jouent un rôle essentiel en contrôlant les procédés métaboliques permettant aux nutriments d'être transformés en énergie et en matériaux cellulaire **(Bergmeyer *et al* ; 1979 ; Pelmont , 1995; Drouin, 2005).**

Elles sont constituées de plusieurs acides α-aminés de la série *L* unis entre eux par une liaison formée par condensation entre le groupement carboxyle d'un acide aminé et le groupement amine d'un autre acide aminé afin de former une liaison amide.

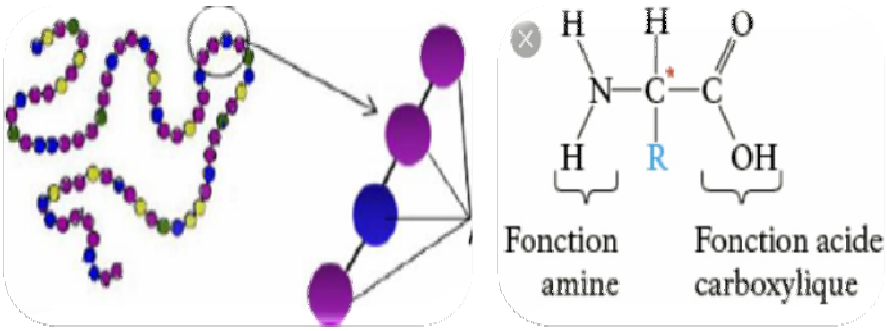


Figure 1. *Représentation schématique de la structure primaire d'une protéine* ***(Vincent, 1996).***

Ces protéines vont avoir tendance à se replier sur elles-mêmes afin de former des arrangements secondaires principalement en hélices α et en feuillets β, cette structure est stabilisée grâce à la génération de liaisons hydrogènes.

I. 1.2. Classification des enzymes

Selon la commission des enzymes de l'I.U.B. (*International Union of Biochemistry*) **(Bergmeyer, 1979)**, les enzymes se répartissent en six classes (Tableau 1). Environ 75% des enzymes industrielles sont des hydrolases **(Rao et *al* ; 1998; Assamoi *et al* ; 2009).**

Tableau 1. *Les différentes classes d'enzymes* **(Vincent, 1996).**

Classes	Réactions catalytiques
Oxydoréductases ***(EC 1.x.x.x)***	Réactions de transfert d'électrons (ou d'atome d'hydrogène)
Transférases ***(EC 2.x.x.x)***	Transfert de radicaux (Groupements phosphates, amines, méthyle, etc.)
Hydrolases ***(EC 3.x.x.x)***	Réactions d'hydrolyse (bris d'un lien chimique par addition d'une molécule d'eau)
Lyases ***(EC 4.x.x.x)***	Addition de doubles liaisons à une molécule et enlèvement de groupements chimiques sans hydrolyse
Isomérases ***(EC 5.x.x.x)***	Réactions d'isomérisation (réaction où un composé est transformé en un de ses isomères) (ex : conversion d'un acide aminé L en acide aminé D)
Ligases ***(EC 6.x.x.x)***	Formation de liens C-C, C-S, C-O et C-N lors de réactions de condensation couplés avec la rupture d'ATP)

I. 1.3. Source d'enzyme

L'étape initiale de la production de toute enzyme concerne le choix de la source. Dans certains cas où l'activité catalytique souhaitée n'est disponible que dans une source unique, bienque dans la plupart des cas où l'activité souhaitée peut être obtenue à partir de plusieurs sources **(Walsh et Headon ; 1994).**

I. 1.3.1. Source microbienne

De nombreuses protéines sont obtenues à partir de microorganismes. Un nombre limité de microorganismes sont considérés comme des producteurs appropriés des protéines destinées à des fins appliquées. Les microorganismes les plus fréquemment utilisés comme producteurs d'enzyme comprennent des bactéries et des champignons, Les microorganismes représentent une source attrayante d'enzymes car ils peuvent être cultivés en grande quantité dans un délai relativement court selon les méthodes de fermentation (**Walsh *et* Headon ; 1994).**

I. 1.3.2. Source Végétale

Les plantes ne sont généralement pas considérées comme des sources attrayantes d'enzymes d'importance industrielle. La nature saisonnière et la géographie de la croissance des plantes et le fait que la plupart des protéines végétales sont intracellulaires milite également contre leur utilisation généralisée comme sources d'enzymes **(Walsh *et* Headon ; 1994).**

I. 1.3.3. Source Animale

Un nombre d'enzymes d'une importance considérable ont été traditionnellement obtenus à partir des tissus d'animaux ou de leurs substances sécrétées. L'une des enzymes dérivées d'animaux les plus importantes sur le plan industriel est rennin, également connu sous le nom de Chymosine Cette protéase aspartique trouve une application industrielle principalement dans la production de fromages, bien qu'il ait également été utilisé thérapie en tant qu'une aide digestive (**Walsh *et* Headon ; 1994).**

I. 1.4. Marché des enzymes

Le marché global des enzymes industrielles et de spécialité conserve une forte croissance. Estimé à plus de 1,5 milliards US$ en l'an 2000. Il est prévu qu'en 2011, il atteindra 6 milliards de dollars **(Kumar *et al* ; 2008b)**. Parmi les enzymes industrielles, les protéases occupent la part majeure des ventes des enzymes, soit environ 60% **(García-Gómez *et al* ; 2009; Rai et Mukherjee ; 2010)** (Figure 2). Suivi par les α- amylases qui sont les plus commercialisées à cause de la diversité de leur application (amidonnerie, glucoserie, brasserie) **(Pandey *et al ;* 2000).**

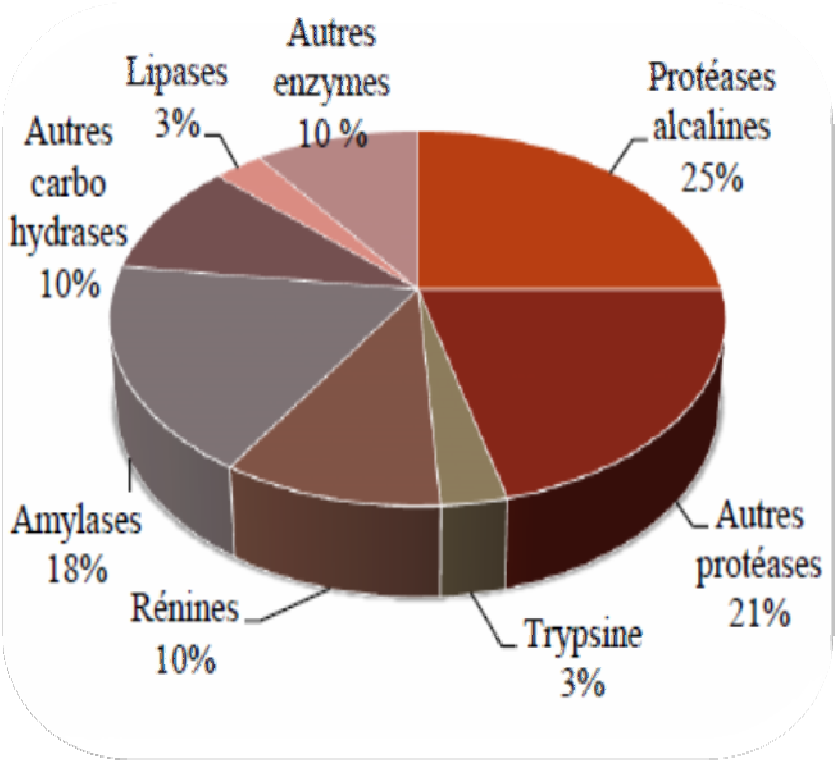


Figure 2. *Distribution des ventes des enzymes* ***(Rao et al ; 1998).***

I. 1.5. Application des enzymes

Le marché des enzymes industrielles, quant à lui est en plein croissance grâce, notamment à l'apparition de nouveaux domaine d'application ; l'industrie des détergents où on utilise les protéases et les lipases, l'agroalimentaire on utilise par exemple l'alpha acétolactate oxydase **(Ben ameur villain, 2012).** et le domaine pharmaceutique où on utilise plusieurs enzymes comme l'α- amylase pancréatique **(Bustos, 2013).**

Tableau 2. *Applications industrielles des enzymes.*

Enzyme	Application
Amylases bactérienne et fongique	Hydrolyse de l'amidon en dextrines. maltose et glucose
Protéases bactérienne et fongiques	Attendrissement de la viande et préparation du fromage
Présure fongique	Caillage du lait
Lipase	Activation digestive
Pectinase fongique	Clarification du jus et de vins
Hémicellulose fongique	Hydrolyse des hémicellulose des céréales et légumes
Cellulase fongique	Hydrolyse de la cellulose en glucose
Inulase bactérienne et fongique	Hydrolyse de l'inuline en glucose
Invertase	Production de sucre inverti à partir du saccharose
Glucose isomérase bactérienne	Fabrication du sirop de fructose

L'α- amylase comme toutes les enzymes est une macromolécule appartenant à la classe des protéines globulaires, dont le rôle biologique est de catalyser l'hydrolyse de l'amidon. De type de la classe des hydrolases qui agit sur les liaisons alpha (1- 4) de l'amidon. Elle est largement représentée chez les animaux, les végétaux et les micro-organismes. Bien que l'α-amylase de différentes origines ait très peu de séquences d'acides aminés identiques, leur structure tridimensionnelle et l'organisation de leur site actif sont similaires **(Mercier, 1985)**. Leur chaîne polypeptidique est organisée en trois domaines formé chacun d'un tonneau de huit segments bêta entourés par huit hélices alpha. Leurs sites actifs sont constitués d'un ensemble de sous-sites pouvant accueillir chacun un résidu glucose dont le nombre varie selon l'origine de l'enzyme **(Scriban, 1993)**.

L'α- amylase et les protéases sont les plus utilisés en bio-industrie **(Scriban, 1993; Wallach, 1997)**. Par ailleurs, la part du marché mondial prise par les enzymes est de 59% pour les protéases et 28 % pour les glucanases dont 13% pours l'α- amylase **(larpent- Gourgaud *et* sanglier ; 1992)**.

I. 2.1. α–amylase

L'α- amylase [α-(1,4)-D-glugane glucanohydrolase (E.C.3.2.1.1)] est une endoenzyme appartenant à la famille glycosides hydrolases nommée GH13 ; regroupant maintenant plus de 1700 enzymes. **(Mercier., 1985 *et* Keating *et al*; 1998; Coutinho *et* Henrissat ; 1999)**. Elle hydrolyse au hasard, les liaisons osidiques de l'amylose, de l'amylopéctine, de l'amidon, du glycogène et d'autres polysaccharides contenant plus de trois liaisons alpha (1,4) D-Glucose **(Keating *et al* ; 1998 ; Dauter *et al* ; 1999 ; Franco *et al* ; 2000)**. **(Ait Kaki-el-Hadef *et al* ; 2012)**. En effet, elle attaque les chaines de l'amylose en coupant les liaisons alpha (1,4) tous les 6 glucoses, maltose et surtout d'α-dextrines **(Franco *et al* ; 2000)**.

Chez les mammifères, La valeur normale est inférieure à 90 UI/L dans le sang **(Cooley *et al* ; 1990)**. Celle d'origine microbienne (bactéries, moisissures et levures) est exo cellulaire, exceptées certaines espèces comme *Bacillus subtilis* et *Pishia burtonii* **(Moulin *et al* ; 1978 et Mantsala *et al* ; 1979)**. Bien que l'α- amylase de différentes origines ait très peu de séquences d'acides aminés identiques, leur structure tridimensionnelle et l'organisation de leur site actif sont similaires **(Mercier, 1985)**.

I. 2.1.1. Nomenclature d'α– amylase

Les différentes nomenclatures de alpha – amylase **(Mercier, 1985)**

- ✓ **Nom codifié :** EC 3.2.1.1
- ✓ **Nom recommandé:** α–amylase
- ✓ **D'autre nom(S) :** glycogénase, α–amylase ; endoamylase ; Taka-amylase A, maxilase ; takatherm ; thermolase ; amylotherm ; clarase ; amylopsin ; spitase CP1, G995, kleistaseL1; THC250 ; Maxamy ; ptyalin
  (Graber, 1989)
- ✓ **Nom systématique:** 1,4 – alpha -D-glucane-4-glucano hydrolase **(Schamburg *et* Slzmann ; 1991 ; Brozozowski *et* Davies ; 1997 ; Dauter *et al ;* 1999).**

I. 2.1.2. Structure l'α- amylase

L'α-amylase a une structure tridimensionnelle capable de se lier au substrat , et par l'action des groupes catalytiques hautement spécifiques, favorise la rupture des liaisons glycosidiques. Ce sont des glycoprotéines renfermant 478 acides aminés repartis en deux domaines globulaires appelés A (1 à 380 résidus) et B (381 à 478 résidus) ; ces domaines sont associés

Par une chaine polypeptides constitué principalement de résidus hydrophobe.

La partie glucidique est formée essentiellement de mannose, le résidu constituant le site de fixation du substrat.

Ce sont des métallos enzyme à calcium (un ion calcium par molécule). **(Chiba *et al* ; 1988),** Ces ions sont nécessaires à l'activité enzymatique et au maintien de la stabilité de la structure en acides aminés de l'enzyme qui varie d'une souche à l'autre. **(Fogarty *et al* ; 1980)**

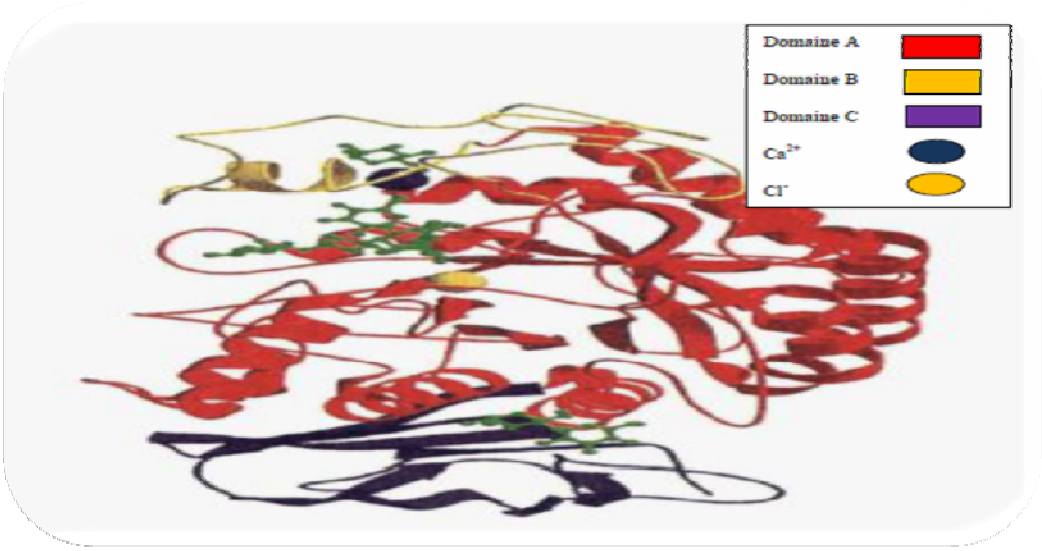


Figure 3. *Structure tridimensionnelle de l'α – amylase d'après* ***(Kraulis, 1991)***

- Le domaine A de couleur rouge est le plus grand, le domaine C de couleur violette.
- Le domaine B de couleur jaune.
- Le domaine C lié au domaine A par une chaîne de polypeptide simple et semble être un domaine indépendant avec une fonction inconnue.
- Le site actif (site de liaison) de l'α- amylase se situe dans une longue fente située entre l'extrémité carboxyle du domaine A et B.
- Le calcium (Ca^{2+}) est situé entre les domaines A et B (sphère bleu) et peut agir dans la stabilisation de la structure.
- Le site de liaison au substrat contient 5 sous-sites avec le site catalytique positionné au sous-site 3. Le substrat peut se lier au premier résidu de glucose dans le sous-site 1 ou 2, ce qui permet au clivage de se produire entre le premier et le deuxième ou le deuxième et le troisième résidu de glucose.

I. 2.2. Caractéristiques de l'α-amylase

I. 2.2.1. Masse moléculaire

Malgré la grande différence de caractéristiques des α-amylases microbiennes, leurs masses moléculaires sont généralement dans la même gamme de 40 à 70 kDa **(Gupta *et al* ; 2003)**. Il a été rapporté que l'α- amylase de *Chloroflexus aurantiacus* possède le poids moléculaire le plus élevé des α- amylases avec 210 kDa (**Ratanakhanokchai *et al* ; 1992)**. **(Gupta *et al* ; 2003)**, ont signalé que l'α- amylase de *Bacillus caldolyticus* a un poids moléculaire de 10 kDa représentant la valeur la plus faible. Cette masse moléculaire peut être augmentée en raison de la glycosylation comme dans le cas de l'enzyme de *T. vulgaris* qui atteint 140 kDa **(Omar *et* al ; 2011)**. En revanche, la protéolyse diminue la masse moléculaire. L'alpha -amylase de *T. vulganis* 94-2A (AmyTV1) est une protéine de 53 kDa **(Hofemeister *et al* ; 1994)**.

Le poids moléculaire des α- amylases varie d'une origine à l'autre et d'une espèce à l'autre. Il est compris entre 40.000 et 90.000 daltons **(Schombury ; Salzmann ; 1991)**. Celui des alpha- amylases levuriennes, s'échelonne entre 40.000 et 70.000 daltons **(Panchal, 1990)**.

I. 2.2.2. PH optimum

Les α- amylases sont généralement stables dans une gamme de pH de 4 à 9, avec un optimum Variant de 4 à 5 pour les α- amylases fongiques, et un optimum supérieur à la neutralité, soit 6 à 8.5 pour les α- amylases bactériennes **(Larpent *et* Sanglier ; 1992).** Selon **Lucio *et al* (1996)**, l'α- amylase de la souche *Rhizopus orysae* a un pH optimal se situant entre 4 et 6,5.

Pour les levures, l'enzyme requiert, selon les espèces, des pH entre 4 à 6 **(Panchal, 1990)**.

I. 2.2.3. Température optimum

Les amylases microbiennes, quant à elles, ont une forte thermostabilité (30°C–60°C) et leur température optimale peut être plus élevée, se situant entre 40°C et 70°C et **(Park et al ; 1997)**.

Selon l'origine et les espèces, les alpha- amylases ont des températures optimales comprises entre 40°C et 90°C (**Schombury *et* Salzmann ; 1991)**. En effet, l'α-amylase bactérienne est réputée pour sa grande thermo-stabilité, celle de *Bacillus amyloliquefaciens* est caractérisée par un optimum de température qui, selon les applications va de 70°C à 90°C ,

alors que L'α-amylase fongique est d'une thermo-stabilité assez faible, son optimum se situe entre 50°C et 55°C **(Nouadri , 2011)**.

L'α-amylase levurienne a des optimums de température, allant de 40°C à 60°C et parfois même 70°C pour certaines espèces comme *Lipomyces starkeyi* **(Panchal, 1990)**.

I. 2.2.4. Ions métalliques

Les α- amylases sont des métalloprotéines absolument dépendantes du Ca^{2+}, qui est vrai semblablement un activateur allostérique **(Egas *et al* ; 1998).** Le calcium ne participe pas directement à la formation du complexe enzyme-substrat, mais il maintient l'enzyme dans une conformation optimale pour un maximum d'activité et de stabilité vis à vis de la dénaturation thermique **(Savcheko *et al* ; 2002 ; Peixoto-Nogueira *et al* ; 2008)** et de la dénaturation par protéolyse **(Nigam *et al* ; 1995 ; Mc tigue *et al* ; 1995)**.

L'activité enzymatique de l'α- amylase n'est pas modifiée par les ions K^+, Na^+, NH_4^+**,** mais elle est fortement inhibée par l'éthylène diamine tétra acétate (EDTA) et les métaux lourds **(Igarashi *et al* ; 1998; Talamond *et al* ; 2002)**.

Les ions Cu^{2+}, Hg^{2+}, Ag^{2+} et Zn^{2+} diminuent l'activité de l'α- amylase de la levure *Cryptococcus sp.* **(Iefuji *et al* ; 1996)**, alors que les ions Mg^{2+}, Ca^{2+}, Na^+ et l'EDTA n'ont aucun effet sur l'activité de l'enzyme de la même levure.

Tableau 3. *Exemples de production de l'α-amylase par des microorganismes et leur Propriétés physico-chimiques*

Microorganisme	*T° OPT.*	*pH OPT.*	*P.M. (DALTON)*	*Références*
Bactéries				
Bacillus sp	60	11-12	96.000	**(Kim *et al* ; 1995)**
Bacillus Subtilis	-	-	59.000	**(Brumm *et al* ; 1991)**
Moisissures				
Aspergillus awamori	50	4.8-5.0	54.000	**(Bhella *et* altosar ; 1985)**
Aspergillus flavus	55	6.0	52.500	**(Khoo *et al* ; *1994)***
Fusarium sp	30	-	-	**(Bhatti *et al* ; 2007)**
Aspergillus fumigatus	40	5.5	65.000	**(Planchot et colonna, 1995)**
Aspergillus oryzae	50	4.5-5.0	59.000	**(Kundu *et* Das ; 1970)**
Levures				
lSaccharomycopsis cerevisiae	60	5	-	**(Olasupo *et al* ; 1996)**

I. I.2.3. Propriétés de L'α-amylase

Selon **Boel et al (1990)** Les ions calciums sont indispensables pour le maintien de leurs stabilités et intégrités structurelle cependant il peut devenir un inhibiteur à une concentration supérieur à 20 mM.

Beaucoup de travaux ont étudié les propriétés des enzymes amylolytiques. Cependant la caractéristique la plus recherchée est la thermostabilité.

Pour l'industrie de transformation de l'amidon, il est souhaitable que les α- amylases soient actives à des températures élevées de gélatinisation (100-110 °C) et de liquéfaction (80-9°C). Ces dernières années, beaucoup de recherches ont été faites sur la production d'amylases par les microorganismes thermophiles. **(Gomes *et al* ; 2007)**

Les enzymes thermostables isolées à partir d'organismes thermophiles ont trouvé un certain nombre d'applications commerciales en raison de leur stabilité. Comme la liquéfaction enzymatique et la saccharification de l'amidon sont effectuées à des températures élevées *Bacillus subtilis, Bacillus stearothermophilus, Bacillus licheniformis, Bacillus Amyloliquefaciens* sont connus pour être de bons producteurs d'alpha amylase thermostable. **(Haq *et al* ; 2002).**

Aujourd'hui, le marché annuel des enzymes thermostables représente environ 250 millions de dollars et les α- amylases thermostables en occupent une bonne part. **(Prakash *et al* ; 2010)**

L'hydrolyse de l'amidon est surtout réalisée au niveau industriel par l'utilisation des amylases de *B. amyloliquefasciens* et *B. licheniformis*. Dans ce dernier cas, l'enzyme présente une stabilité plus grande en présence d'empois d'amidon, son activité résiduelle est importante même à 110°C et surtout si le milieu renferme du calcium (20 à 80 ppm) qui stabilise la structure. L'enzyme de *B. licheniformis* est utilisée car elle permet d'obtenir la liquéfaction de l'amidon. Dans le cas de l'enzyme de *Bacillus amyloliquefaciens* ; on ne peut pas dépasser la température de 95 °C.

I. 2.4. Les différentes sources et origines de l'α- amylase

L'α- amylase est une enzyme produite par des plantes, des animaux et des micro-organismes. Cependant, les sources microbiennes sont les plus préférées pour la production à grande échelle **(Haq *et al* ; 2002).**

I. 2.4.1. l'origine animale

Les amylases d'origine animale sont généralement extraites à partir de la salive et du pancréas des mammifères, tels que les porcs et les veaux **(Bertheau *et al* ; 1985; Chatterton *et al* ; 1996)**.

Les α- amylase animales sont incapables d'hydrolyser la liaison alpha (1→ 6) de l'amylopectine ou du glycosyl oligosaccharides, l'hydrolyse complète de l'amylose et de l'amylopectine par les α- amylases animales donne respectivement du maltose et du D-glucose pour l'amylose et du glucose, maltose et des dextrines limites pour l'amylopectine **(Coolbear *et al* ; 1992)**.

I. 2.4.2. l'origine végétale

L'α- amylase joue chez les plantes un rôle important dans le métabolisme glucidique, où elle participe à l'hydrolyse de l'amidon en produisant des sucres réducteurs (glucose et maltose) directement assimilables **(Badot *et* Merlin ; 1984)**.

Cette enzyme végétale est généralement obtenue par extraction à partir des céréales, notamment le blé, l'orge, le son ou le riz **(Srinivasa Rao *et al* ; 2004)**. Elle est souvent formée au cours de la germination des graines, qui requiert une activité enzymatique très importante pour la mobilisation des réserves et le développement de l'embryon **(Brawn *et* Kelly ; 1993 ; Charles *et al* ; 2003)**.

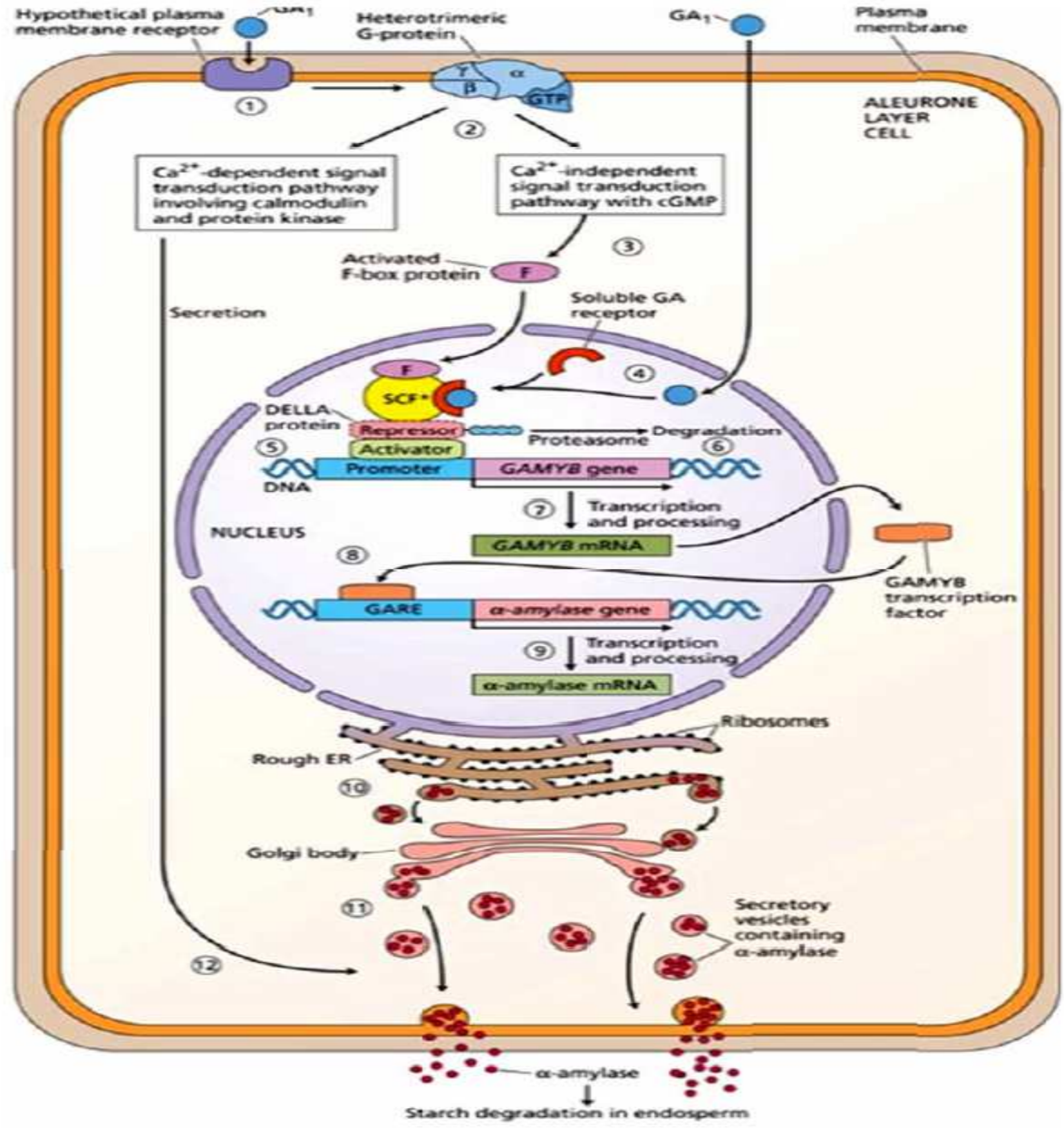


Figure 4. *Biosynthès de l'α- amylase* ***(Brawn et al ; 1993)***.

I. 2.4.3. L'origine microbienne

❖ ***L'α -amylase bactérienne :***

Ce type d'enzyme est obtenu principalement par fermentation de *Bacillacées* **(Milner *et al* ; 1997)**. Historiquement la première enzyme a été produite à partir de souches de *Bacillus amyloliquefaciens, B. licheniformis* **(Bousseboua, 2002)** ou *B. subtilis* **(Mctigue *et al* ; 1995)**. Cependant d'autres espèces, produisant également cette enzyme telle que *Thermobifida fusca* **(Chao-Hsun Yang *et* Wen-Hsiung Liu ; 2004)**, *Streptomyces sp.* **(Samrat Chakrabortya *et al* ; 2009)**.

De nombreuses amylases aux propriétés industrielles ont été découvertes chez des bactéries acidophiles, alcalinophiles et thermophiles. Ces enzymes interviennent dans la transformation de l'amidon par fragmentation rapide en clivant les liaisons alpha (1→4) **(Nadirman *et al* ; *2006*)**.

❖ ***L'α -amylase fongique :***

La production industrielle d'enzymes à partir des microorganismes fongiques existe depuis long temps du fait que la première production de L'α- amylase a été réussie par Takamine en 1894.

L'α- amylase fongique est d'une thermostabilité assez faible, son optimum d'action se situe entre 50°C et 55°C **(Fogarty *et al* ; 1994).** Les producteurs principaux de l'α- amylase sont les moisissures des genres *Aspergillus* et *Rhizopus.* En plus des moisissures, les levures participent également à la production de l'α- amylase **(Bouix et Leveau ; 1999)**.

Tableau 4. *Les différentes origines de L'α-amylasemicrobienne.*

Enzymes microbiennes	**Références**
Bactéries	
Bacillus licheniformis	**(Kandra *et al* ; 2002).**
Bacillus steorothermophilus	**(Dauter *et al* ; 1999).**
Bacills circulans	**(Dey *et al* ; 2002).**
Bacillus amyloliquefaciens	**(Uiger *et* çurakoglu ; 2001).**
Bacills coagulans	**(Babu *et* Satyanaray ; 1993).**
Thermomonospora fuska	**(Bush *et* Stutzenberge ; 1997).**
Alteromonas haloplinktis	**(Feller *et al* ; 1992).**
Termus filiformis	**(Egas *et al* ; 1998).**
Streptomyces rimosus	**(Vukelié *et al* ; 1992).**
Moisissure	
Aspergillus oryzae	**(Agger *et al* ; 1998).**

Aspergillus niger	**(Botton *et al* ; 1990).**
Aspergillus flavus	**(Aidoo *et al* ; 1981 ; Khoo, 1994 ; Abou**
Aspergillus sojae	**Zeid, 1997).**
Rhizopus oryzae	**(Lucio *et al* ; 1996 ; Cuveillier, 1999).**
Rhizopus sp	**(Soccol *et al* ; 1994 ; Cuveillier, 1991).**
Penicillium griseoroseum	**(Ray, 2001).**
Fusarium sp	**(Bhatti *et al* ; 2007)**
Levure	
Saccharmyces cerevisae	**(Ruohonen *et al* ; 1991 ; Wang *et* Kuo ;** **2001).**
Endomycopsis	**(Bouix *et* Leveau ; 1999).**

Tableau* 5.** *Différentes α-amylases microbiennes et leur action* ***(Liese et al ; 2000).

Enzyme	***Source***	***Action***
α-amylase	*Bacillusamyloliquefaciens* *Bacillus lichenformis* *Aspegillus* *Saccharomyces*	Hydrolyse des liaisons alpha-(1,4) au hasard à l'intérieur de la chaine, en donnant de l'alpha-dextrine, de maltose et de glucose.

α-amylase saccharifiante	*Bacillus subtilis*	Comme la précédente, sauf qu'elle produit jusqu'à 50% du glucose.

I. 2.5. Mécanisme d'action

L'activité catalytique de l'enzyme impliquée 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 ; Withers ; 1996 *et* Uitdehaag *et al* ; 1999)**. En effet, la réaction catalytique est réalisée en trois étapes:

- Protonation de l'oxygène glucosidique 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 **(Davies *et al* ; 1999)**.
- Activation d'une molécule d'eau, vraisemblablement par le maintien du Glu 261 de protonné **(Nielson *et al* ; 2001)**.
- Régénération de l'état initial et libération de l'autre fragment du substrat, par hydrolyse du lien covalent entre l'oxygène nucliophile de l'Asp 231 et le C1 de résidu du sucre en position1 **(Nielson *et al* ; 2001 *et* Benaouida ; 2008)**.

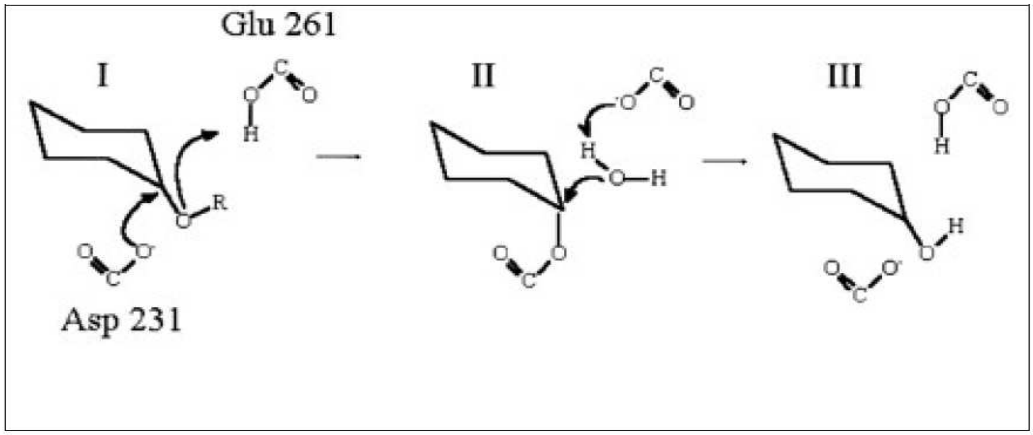


Figure 5. *Mécanisme catalytique* ***(Merabti, 2006)***.

I. 2.6. Hydrolyse de l'amidon

I. 2.6.1. Généralités

L'amidon est après la cellulose la principale substance glucidique présente dans le monde végétale, il est synthétisé sous forme de réserve, par les végétaux supérieur à partir de l'énergie solaire, il constitue une source énergétique indispensable à l'alimentation des êtres vivants et de l'homme en particulier.

Il est composé de deux composants principaux ; l'amylose et l'amylopectine dans les proportions 20 et 80%, de sa polyvalence et de sa disponibilité, l'amidon natif ou modifié est probablement le polysaccaride le plus important dans l'industrie alimentaire, il est constitué de petits grains ou granules dont la taille et la forme dépendent de l'origine végétale.

Le grain de l'amidon à une structure macromoléculaire comportant des zones cristallines et des zones amorphe, lorsque le granule d'amidon est visualisé au microscope sous la lumière polarisé, une croix noire est visible, ce phénomène est appelé biréfringence et s'explique par la nature cristalline des granules.

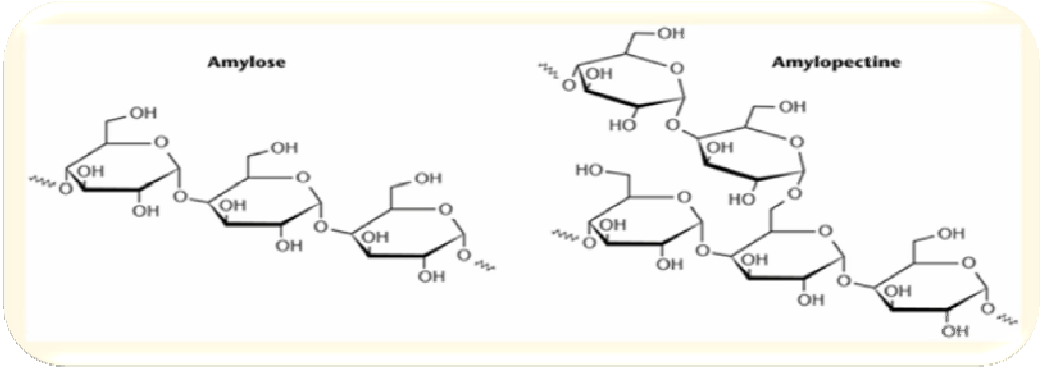


Figure 6. *Structure de l'amylose et l'amylopectine.*

L'amylose est une macromolécule linaire constitué de résidus D glucose relié entre eux par des liaisons α (1-4), une extrémité porte un groupement réducteur, l'autre un groupement non réducteur.

L'amylose est une molécule de haut poids moléculaire ; de 150 - 600 k DA suivant l'origine botanique.

La structure de l'amylose est hélicoïdale et l'intérieur de l'hélice est hydrophobe et lipophile ce qui permet à l'amylose de former des complexes hydrophobes avec d'autres éléments tel que l'iode, dont sa complexassions avec l'iode est utilisé pour détecter l'amidon.

L'hélice est formée de 6 résidus et stabilisé par des fortes liaisons hydrogènes intermoléculaire.

L'amylopectine est une macromolécule fortement ramifié ; il formé de résidu de D-glucose qui sont reliés entre elles par des liaisons α (1-4), ces chaines linaires sont reliés entre elle par des ramifications α(1-6). Son poids moléculaire est de 10000 à 500000.DA

La capacité de fixation de l'iode de l'amylopectine est quasiment nulle.

I. 2.6.2. L'hydrolyse enzymatique de l'amidon

L'hydrolyse de l'amylose abouti à la formation du maltose puis ce dernier sera hydrolysé à son tour.

L'hydrolyse de l'amylopectine se déroule en deux étapes ; La formation du glucose, maltose, et alpha dextrine, ces dernières possèdent au minimum 4 molécules de glucose et présentent des liaisons glucoosidiques α (1-6) ensuite l'hydrolyse lente des dextrines. **(Fogarty *et* Kelly ; 1980).**

L'hydrolyse enzymatique de l'amidon permet non seulement d'avoir des composés purs mais aussi par un choix judicieux de l'enzyme ; une gamme de produits aux propriétés physicochimique bien caractérisées.

L'α-amylase est une endoamylase qui hydrolyse spécifiquement les liaisons glucosidiques α (1 – 4) de l'amylose et l'amylopectine, elle n'est pas capable de dégrader les liaisons α (1– 6) et s'arrête jusqu' où elle rencontre une ramification.

Les produits finaux de l'action des α- amylases sont des oligosaccharides qui constituent un mélange de maltose, et oligosaccharides ramifiée de 6-8 unités de glucose qui contiennent à la fois des liaisons α-(1,4) et α-(1-6) **(van der Maarel *et al* ; 2002)**,

L'action conduit à une diminution de la viscosité de la solution. Elles sont utilisées dans la phase initiale de l'hydrolyse ou liquéfaction.

I. 2.7. Les applications industrielles et biotechnologiques de l'α- amylase

Les α- amylases sont parmi les hydrolases les plus importantes pour toutes les industries à base d'amidon, et leur commercialisation est la plus ancienne, avec première utilisation en 1984 comme aide pharmaceutique pour le traitement de désordres digestifs.

Aujourd'hui, les α-amylases trouvent l'application dans tous les processus industriels, avec une dominance des α-amylases microbiennes qui ont complètement remplacé, non

seulement l'hydrolyse chimique dans les industries de transformation d'amidon, mais également dans les industries chimiques pharmaceutiques et autres **(Bennett, 1998)**.

Les α- amylases ont la part principale du marché mondial d'enzymes, dont plusieurs différentes préparations d'α-amylase sont disponibles avec de divers fabricants d'enzymes pour utilisation spécifique dans diverses industries **(Aehle et Misset, 1999)**.

I. 2.7.1. Utilisation des α- amylases dans les industries Agro-alimentaires

I. a. Glucoserie

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

I. b. La sucrerie

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

I. c. Panification et biscuiterie

L'usage de L'α-amylase « améliorant de panification » est devenue une pratique de fabrication machinal dans l'industrie panaire, non seulement pour améliorer la qualité du pain mais aussi pour contrôler le processus, de fabrication ce qui conduit à un gain en temps et en énergie.

Cette industrie emploie les alpha- amylases fongiques d'*A. Oryzae* pour la régulation des activités diastasiques des farines en dégradant l'amidon en maltose. Cette opération favorise la formation de la mie souple en boulangerie et améliore la texture des gâteaux pâtissiers et des biscuites **(Malhotra *et al* ; 2002)**.

I. d. Industrie des boissons

Dans ce secteur l'α- amylase fongique intervient essentiellement dans la fabrication d'alcool éthylique, de boissons sucrées non alcoolisées, de jus de fruits **(Mamo *et al* ; 1999)**. En brasserie, elle permet d'obtenir des bières sans dextrines, dites bières à basses colories.

I. e. Hydrolyse de l'amidon

L'amidon est utilisé dans la production de fructose et les sirops de glucose, Ce processus comporte trois étapes: gélatinisation, Liquéfaction et saccharification. La gélatinisation implique la dissolution des granules d'amidon dans l'eau pour former une suspension d'amidon visqueux. L'amylose et l'amylopectine sont dispersées dans l'eau lors de la dissolution.

La Liquéfaction de l'amidon est une hydrolyse partielle en petites dextrines dont l'α-amylase entraîne une réduction de la viscosité de la suspension d'amidon.

La Saccharification est la production de glucose et le sirop de fructose par hydrolyse supplémentaire. **(Nielsen *et* Borchert ; 2000)**

L'α -amylase utilisée dans l'étape de liquéfaction peut être réalisée à partir de diverses sources microbiennes. Les amylases thermostables peuvent être utilisées pour l'hydrolyse à une température élevée. ; *Bacillus stearothermophilus, Bacillus amyloliquefaciens, Bacillus licheniformis et Pyrococcusfuriosus* sont quelques-unes

D'après **Gupta *et al* (2003)** de nombreuses sources microbiennes utilisées pour produire l'α- amylase utilisé dans la conversion d'amidon.

Dans un premier temps, l'α- amylase *de Bacillus amyloliquefaciens* a été utilisé, mais il a été remplacé par l'α- amylase de *Bacillus stearothermophilus* ou *Bacillus licheniformis.* **(Van der Veen *et al* ; 2002).**

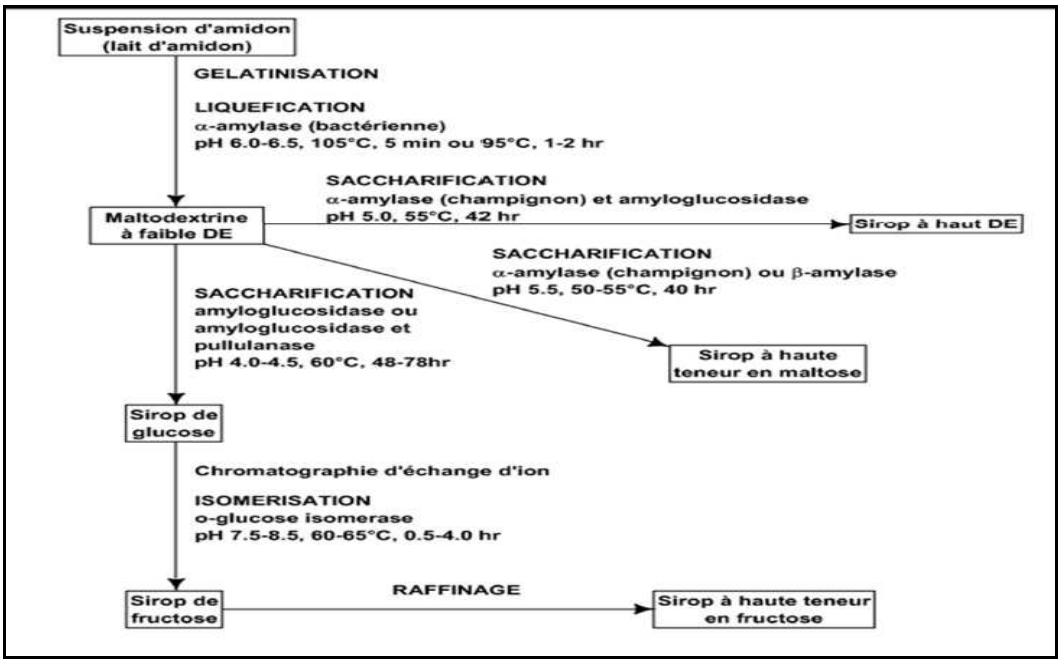


Figure 7.*Schéma général de transformation enzymatique de l'amidon.*

I. f. L'industrie de détergent

L'utilisation d'enzymes dans les détergents a augmenté avec les méthodes changeantes de la vaisselle et la lessive. Les consommateurs préfèrent utiliser de l'eau froide et des conditions douces.

Plus tôt les produits chimiques utilisés dans les détergents ont causé des dommages en cas d'ingestion et les conditions de la vaisselle étaient très dures. Cependant les enzymes ont montré à l'industrie un chemin alternatif. Les enzymes sont sûrs et le travail sera dans des conditions douces. **(Mitidieri *et al* ; 2006).**

L'α- amylase est utilisée pour dégrader l'amidon en plus petits oligosaccharides solubles dans l'eau Par conséquent, l'élimination de l'amidon est également importante de maintenir la blancheur du linge.

I. g. Désencollage des textiles

L'amidon est un agent d'encollage préféré car il est facilement disponible, moins coûteux. La couche de l'amidon est soumise à une hydrolyse dans le procédé de désencollage où l'α- amylase est utilisée pour cliver des particules d'amidon au hasard en composants solubles dans l'eau qui peuvent être éliminés par lavage. L'enzyme agit spécifiquement sur les molécules d'amidon seul, en laissant les fibres non affecté **(Ahlawat *et al* ; 2009).**

I. h. Industrie du papier

Le papier est également traité avec des agents d'encollage pour le protéger contre les contraintes mécaniques au cours du traitement. (**Bruinenberg *et al* ; 1996).**

Le dimensionnement contribue également à une meilleure qualité du papier en termes de résistance, la douceur, et l'écriture.

L'amidon est couramment utilisé comme agent d'encollage. Le rôle de la α-amylase dans l'industrie du papier, est l'hydrolyse partielle de l'amidon pour le rendre moins visqueux dans un procédé discontinu ou un procédé continu étant donné que la nature très visqueuse d'amidon naturel le rend impropre pour le revêtement sur le papier. (**Fogarty *et al* ; 1999).**

I. k. L'industrie de biocarburant

L'amidon est un produit de départ économique, il est utilisé pour la production d'éthanol en tant que biocarburant. **(Moraes *et al* ; 1997).**

Ceci est réalisé dans une série d'étapes. Tout d'abord, l'amidon est soumis à une gélatinisation pour former une suspension d'amidon visqueux. Ceci est suivi par le processus de saccharification, où l'amidon est hydrolysé par l'α- amylase pour obtenir les sucres fermentescibles pour produire de l'éthanol. **(Chi *et al* ; 2005).**

I. 2.7. 2. Autres applications des α- amylases

I. a. Dans le domaine médical

L'augmentation du taux des α- amylases dans le sang peut témoigner d'une pancréatite aiguë et se rencontre également dans certains cancers digestifs et dans les oreillons **(Lo *et al* ; 2001)**, elles sont donc employées en diagnostic médical pour détecter certaines maladies.

I. b. Dans le domaine pharmaceutique

Les α- amylases fongiques sont utilisées comme :

- ❖ Aide digestif pour éviter les dyspepsies et les fermentations intestinales par exemple: Danilase (**Yihan *et al* ; 2010)**.
- ❖ Agent anti-inflammatoire en soutenant le traitement antibiotique **(Lo *et al*; 2001)**.

I. 2.8. Production de l'α- amylase

Plusieurs auteurs travaillent au criblage des microorganismes pour la production d'enzymes,

L'isolement et la production des α- amylases extracellulaires **(Jensen *et al* ; 1987 ; Haasumet *et al* ; 1991)**, ainsi que la purification et la caractérisation de ces dernières **(Nguyen *et al* ; 2000)**. Des α- amylases microbiennes sont maintenant industriellement produites, par des espèces de *Bacillus*, *Aspergillus* et *Rhizopus*, par fermentation submergée ou semi solide **(Niehaus *et al* ; 1999; Bel'en *et al* ; 2006)**.

Actuellement, la production d'α- amylase met en jeu des procédés biotechnologiques à moindre coût, utilisant comme substrat de fermentation des déchets organiques, tels que la pulpe de betterave **(Baldwin *et al* ; 1986)**, les déchets d'oranges **(Hart *et al* ; 1991 ; Mahmoud *et al* ; 1998 ; Diomi *et al* ; 2008)**, les produits céréaliers **(Pascal *et* Thomas ; 1990)** , les rebuts des dattes **(Açourène *et* Ammouche ; 2011)** et le lactosérum **(Ait Kaki *et al* ; 2012).**

Le milieu de fermentation contient en général l'amidon, considérée comme meilleur inducteur de l'α- amylase bactérienne (*Lanuginosus thermomyces*) et fongique (*Aspergillus* et *Penicillium*) **(Leveau *et* Bouix ; 1993)**.

I.2.9. Les facteurs influençant la production de L'α-amylase

La Composition des saccharides obtenue après hydrolyse de l'amidon est fortement dépendante de l'effet de la température, les conditions d'hydrolyse ; l'origine de l'enzyme, spécificité, thermo stabilité et le pH.

I. 2.9.1. Composition du milieu de culture

Le milieu de fermentation pour la production de l'enzyme alpha amylase doit présenter une composition permettant de maximiser le rendement et cela en tenant compte du système de régulation de la synthèse de l'enzyme. **(Ingle *et* Boyer ; 1972).**

Une source de carbone est indispensable ; elle provient de l'amidon ou d'une autre source telle que le maltose, le lactose. **(Coleman *et* Elliot ; 1962).**

La production de L'α-amylase de *Bacillus* peut être réprimée par le glucose et tout autre sucre de faible poids moléculaire cependant cette répression n'est pas observée chez *Bacillus amyloliquefaciens*. **(Colman *et* Grand ; 1966).**

L'azote est notamment une source importante pour la production de L'α-amylase et il peut être fourni sous forme de sel d'ammonium ou d'une source organique complexe. **(Elliot, 1962)**

Il a été rapporté que l'extrait de levure a aussi été une bonne source organique pour la synthèse d'alpha amylase de *Bacillus amyloliqufacien* **(Magee *et* Kosaric ; 1987).**

I. 2.9.2. La température

D'après **Lin *et al* (1998)** La croissance microbienne et la production d'enzyme est maximal entre 37 °C et 40 °C notamment pour la souche de *Bacillus amyloliquefaciens*.

Une large gamme de température (35 – 80) °C a été rapportée pour une croissance optimale et la production d'α- amylase à partir des bactéries. **(Burhan *et al* ; 2003 ; Castoro *et al* ; 1993)**

La production d'α- amylase était maximale à la température de 37 °C par *Bacillus amyloliquefaciens.* **(Haq et al ; 2010).**

I. 2.9.3. Le pH

Nustrat *et* Rahman (2007) Ont rapporté que la production d'α- amylase à un PH de 7.0 par *B amyloliquefaciens* est maximale. Une autre étude menée par **(El Tayeb, 2007)** a montré que la production d'alpha amylase par *Bacillus amyloliquefaciens* en fermenteur était la plus élevé à pH 6,0

I. 2.9.4. Le temps d'incubation

Abate *et al* (1999) Ont rapporté que la production d'α-amylase de *Bacillus amyloliquefaciens* commence au début de la phase de croissance exponentielle pour atteindre le niveau maximum après 24 heures et après cela, le niveau d'α- amylase diminue de façon drastique ; probablement en raison de l'accumulation d'un niveau élevé de protéase concomitante avec à la fin de la phase de croissance exponentielle.

Des résultats similaires ont été rapportés sur *Bacillus amyloliquefaciens* Par **(Burhan *et al* ; 2003).**

I. 2.9.5. Effet des ions Calcium

Selon **Fogarty *et* Kelly (1980)** l'enzyme nécessite au moins quatre ions calcium par molécule, les α- amylases hautement purifié sont inactive à une température au-dessus de 50°C et sensible à des pH extrêmes mais la présence d'ions calcium réduit cette inactivation et augmente leur résistance au pH.

I. 3. Les moisissures

I. 3.1. Généralités

Les moisissures peuvent être définies comme des microorganismes hétérotrophes filamenteux et immobiles, dont la structure cellulaire est celle d'une cellule eucaryote classique **(Nicklin et *al* ; 2000)**. Certaines vivent en symbiose avec des végétaux, d'autres sont des parasites des végétaux ou des animaux, d'autres enfin sont des saprophytes se développant aux dépens de substrats inertes ou en voie de décomposition **(Bourgeois, 1989 ; Leveau *et* Boui ; 1993).**

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

Les genres les plus importants de point de vue économique et médical sont les *Fusarium sp* qui représentent les contaminants les plus fréquents des aliments. On les retrouve

principalement dans les céréales, mais aussi dans de nombreux autres produits végétaux et d'origine animale.

I. 3.2. Le genre *Fusarium sp*

Ce genre inclue des champignons imparfaits appartenant à la classe des *Deutéromycètes*. Les formes parfaites ou téléomorphes de quelques espèces de Fusarium sp sont connues, et appartiennent à la classe des *Ascomycètes* (ordre des *Hyphocreales*, famille des *Nectriaceae*, genres *Gibberella, Calonectria* et *Nectria*). Pour plusieurs espèces de *Fusarium sp,* le stade parfait n'est pas connu. Le genre comprend près de 40 espèces souvent largement répandues **(Nelson *et al* ; 1983).**

Sur le plan économique le genre *Fusarium sp* est très important parce qu'il regroupe beaucoup d'espèces phytopathogènes, susceptibles d'induire des maladies (fusarioses) chez de nombreuses plantes. De plus, beaucoup d'espèces saprophytes sont capables de se développer en tant que pathogènes secondaires sur des tissus végétaux sénescents.

Les espèces du genre *Fusarium sp* peuvent ainsi attaquer les céréales (maïs, blé, orge, avoine), des légumes, les plantes ornementales et beaucoup d'arbres fruitiers.

La majorité des espèces de *Fusarium sp* sont susceptibles de produire des mycotoxines et sont ainsi impliquées dans des intoxications chez les animaux d'élevage.

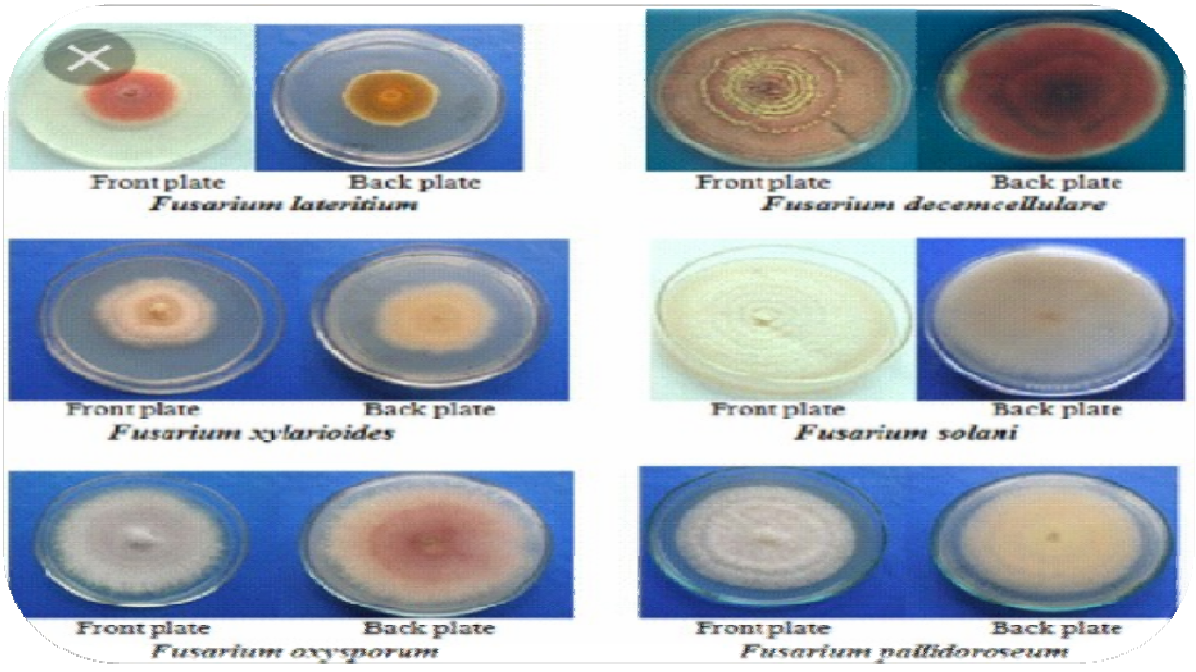


Figure 8 .*Les différente espèces du genre Fusarium sp* **(Nelson et al ; 1983).**

I. 3.3. Taxinomie

La taxinomie ou taxonomie a pour objet de décrire les organismes vivants et de les regrouper en entités appelées taxons afin de les identifier, les nommer et enfin les classer. Depuis la seconde moitié du XXème siècle, une nouvelle approche conceptuelle de ces classifications est possible grâce à la biologie moléculaire.

La taxinomie en mycologie est donc en constante évolution suite aux données recueillies lors des différentes approches phylogénétiques. Ce remodelage des classifications s'applique également pour le genre *Fusarium sp.* **(De Hoog *et al* ; 2011)**

Le genre *Fusarium sp* appartient au phylum des *Ascomycota*, à la classe des *Ascomycètes* et à l'ordre des *Hyphocreales*. Il s'agit d'un genre polyphylétique à la taxinomie complexe. Par exemple, *Fusarium solani* et *Fusarium verticillioides* possèdent des formes sexuées (téléomorphes) appartenant respectivement aux genres *Nectria* ou *Gibberella* alors que *Fusarium oxysporum* n'est actuellement connu que sous sa forme asexuée (anamorphe). La taxinomie du genre autrefois basée sur les aspects morphologiques ou l'adaptation à un substrat particulier, a été revue en profondeur avec l'avènement des techniques de phylogénie moléculaire. **(Summerbell *et al.*, 2002)**



Figure 9. *Terminologie pour décrire la morphologie du genre Fusarium sp* ***(Nelson et al ; 1983).***

I. 3.4. Caractéristiques générales

Les *Fusarium sp* poussent sur milieu Sabouraud, mais se développent mieux sur gélose au malt ou sur milieu PDA (potato-dextrose-agar). Leur température optimale de croissance est comprise entre 22 et 37°C. Sur les milieux de culture, les *Fusarium sp* forment des colonies duveteuses ou cotonneuses de couleur variable (blanche, crème, jaune, rose, rouge, violette ou lilas) selon les espèces. Le revers peut être crème, rouge à pourpre, lilas ou violet (Figure 10). Les pigments diffusent souvent dans la gélose **(Chermette et Bussieras, 1993).**

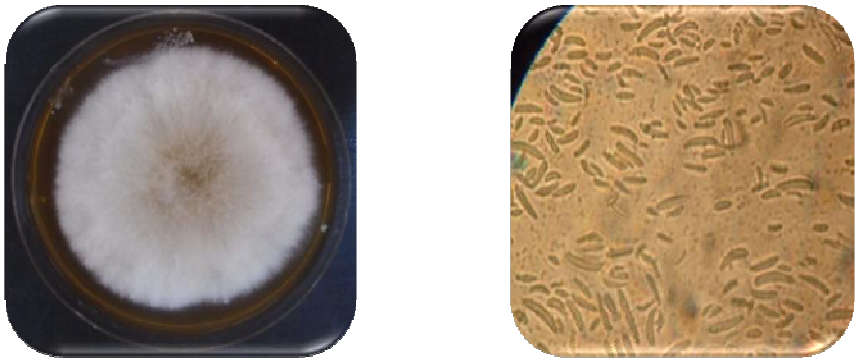


Figure 10. *Aspect macroscopique et microscopique du genre Fusarium sp sous microscope optique grossissement X 40.* ***(Tabuc, 2007).***

Le principal caractère morphologique des *Fusarium sp* est la présence de macroconidies fusiformes et cloisonnées (le nom de *Fusarium sp* vient du latin « *fusus* » car les spores de ces moisissures sont en forme de fuseau). Dans la [**Figure 12 ; I.13 ; I.14 ; I.15**] sont présentés les principaux caractères morphologiques de genre *Fusarium sp.*

✓ Les conidiophores, parfois très ramifiés, forment sur le thalle des coussinets (sporodochies) et portent des masses de spores.

✓ Les phialides, plus ou moins allongées, présentent, le plus souvent, un site de bourgeonnement unique (monophialide) situé à l'extremité d'un col allongé (*F. solani*) ou court et trapu (*F. oxysporum*). Chez d'autres espèces comme *F. proliferatum*, les phialides présentent plusieurs sites de bourgeonnement (polyphialides). Les phialides produisent deux types de conidies :

- microconidies – uni- ou bicellulaires, piriformes, fusiformes, cylindriques ou ovoïdes, isolées, solitaires ou groupées, disposées en verticille ou plus rarement en chaînettes (*F. verticilloides*).
- macroconidies – conidies pluricellulaires à cloisons seulement transversales, souvent groupées en paquets. Les macroconidies sont fusiformes, souvent courbées, avec une cellule basale pédicellée, formant un sort de talon plus ou moins visible. Les chlamydospores, sont parfois présentes, en position terminale ou intercalaire **(Roquebert, 1998).**

I. 3.5. Principales espèces

Compte tenu de leur fréquence dans les différents substrats, notamment les céréales, de leur potentiel toxinogène et de leur pouvoir pathogène, les principales espèces de *Fusarium* sont : *F. culmorum, F. graminearum, F. oxysporum et F. verticilloides* (*F. moniliforme*).

➢ ***Fusarium culmorum :*** cette moisissure pousse rapidement sur géloses PDA et au malt. Les colonies sont duveteuses, d'abord blanches à jaunâtres ou roses puis ocracées à rouges brunâtre. Le revers est rouge à pourpre. Morphologiquement**,** Les phialides, courtes et larges, formées sur le mycélium aérien, sont groupées en sporodochies. Les microconidies sont absentes. Les macroconidies sont fusiformes, courbées et septées (5 cloisons en moyenne, 3-8). La cellule apicale est courte et pointue (26-50 x 4-7 µm). Les chlamydospores, intercalaires ou terminales, formées par le mycélium ou par les conidies, sont sub-globuleuses, brunâtres, lisses ou verruqueuses (9-14µm de diamètre). Dans la **[Figure 11]** sont présentés les principaux caractères morphologiques de *F. culmorum*.

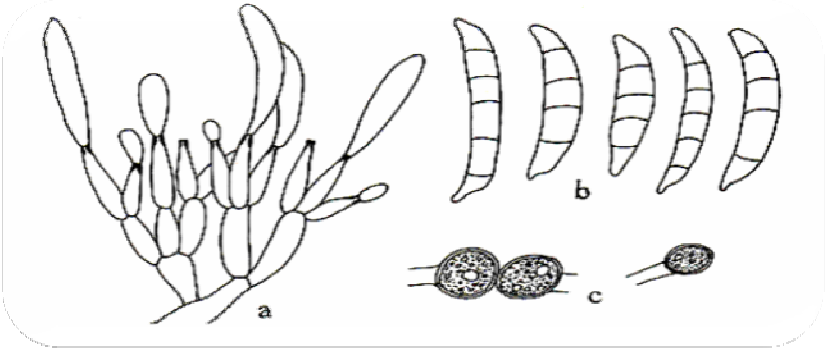


Figure *11.* *Fusarium culmorum* ***(Tabuc ,2007)***
(Caractères morphologiques: a: macrophialides et macroconidies; b: macroconidies; c: chlamydospores).

➢ ***Fusarium graminearum*** (forme parfaite: ***Gibberella zea :*** ce champignon se développe vite sur les géloses PDA et au malt. Les colonies, floconneuses, sont au début roses grisâtres ou rouges à pourpres, puis deviennent brun vineux. Le revers est rouge à pourpre. Le pigment diffuse dans la gélose. Du point de vue microscopique, les phialides (10-14 x 3,5-5 µm) peuvent s'agréger en sporodochies. Les microconidies sont absentes. Les macroconidies sont fusiformes, courbées, et présentent 3 à 7 septum. La cellule terminale est longue et pointue (25-62 x 2,5-5 µm). Les chlamydospores, intercalaires, formées par le mycélium rarement dans les conidies, sont globuleuses, hyalines à brun pâle (8-12 µm en diamètre) [**Figure 12]**.

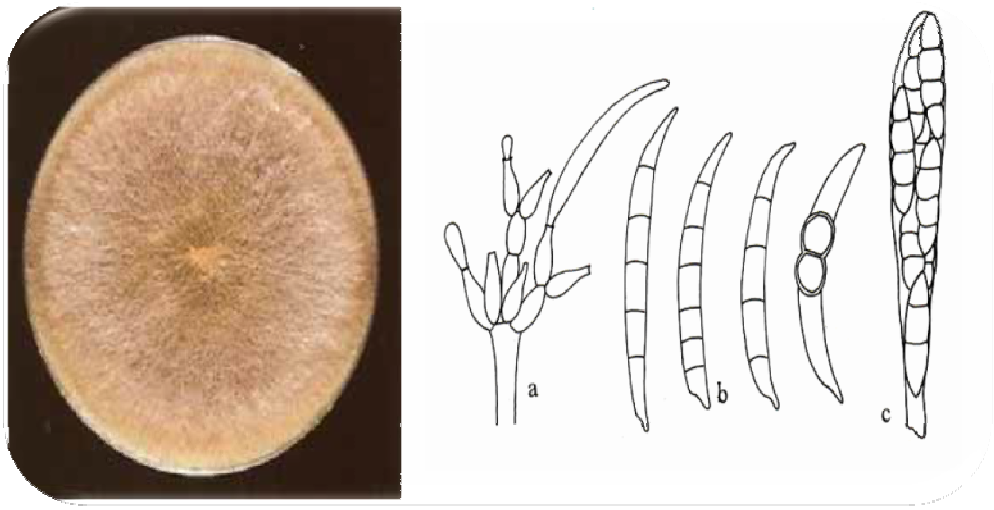


Figure 12. *Fusarium graminearum* ***(Tabuc ,2007)***
(Culture de 7 jours sur milieu PDA à 28°C et caractères microscopiques:
A: macrophialides et macroconidies; b: macroconidies; c: asque octosporé).

➢ ***Fusarium oxysporum :*** il a une vitesse de croissance modérée sur les milieux de culture utilisés au laboratoire. Les colonies, sont blanches, pêches, roses saumon à violet. Le revers est pourpre **[Figure 13].**

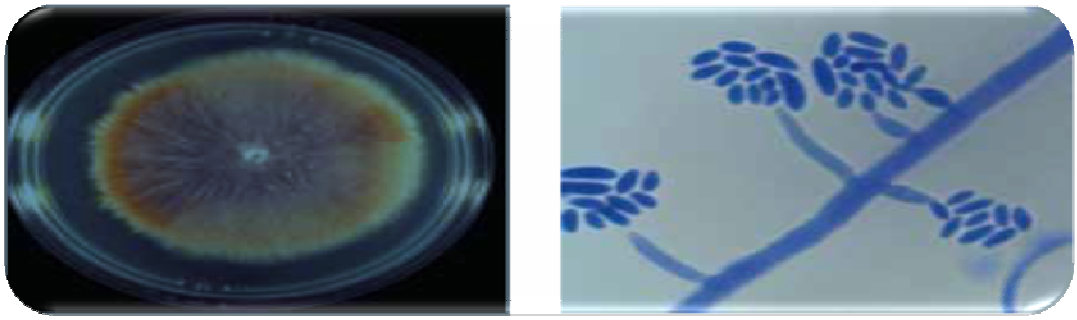


Figure 13. *Fusarium oxysporum* ***(Tabuc ,2007)***
(Culture de 7 jours sur milieu PDA à 28°C et aspect microscopique).

Les microphialides (10-14 x 3,5-5 µm) peuvent s'agréger en sporodochies. Les microconidies sont ellipsoïdales, isolées ou potées par des conidiophores courts et ramifiés.

Les microconidies sont abondantes, ovoïdes. Les macrophialides sont éparses ou groupées en sporodochies .Les macroconidies sont fusiformes, plus ou moins courbées, pointues aux deux extrémités, présentant 3 à 5 septum. Elles mesurent 27-65 x 3-5 µm. Les chlamydospores, terminales ou intercalaires, formées dans le mycélium et dans les conidies, sont sub-globuleuses et hyalines (5-15 µm de diamètre).

➢ ***Fusarium verticillioides*** (anciennement *F. moniliforme*) (forme parfaite: ***Gibberella Fujikuroi***) : ce champignon se développe rapidement sur les milieux classique de culture

(PDA et gélose au malt). Le thalle, d'abord blanc à pêche ou rose saumun, devient vinacé à violet. Le mycélium aérien est dense, floconneux d'aspect poudreux. Le revers peut être violet foncé, lilas, vinacé ou crème.



Figure 14. *Fusarium verticillioides Sin. F. moniliforme* ***(Tabuc ,2007)***
(Culture de 7 jours sur milieu PDA à 28°C et aspect microscopique).

Les microphialides, subulées, sont formées sur le mycélium aérien (20-30 x 2,5-4 µm). Les microconidies ellipsoïdales sont disposées en chaînes. Elles ont un aspect fusiformes, unicellulaires ou parfois uniseptées. Leur taille est d'environ 5-12 x 1,5-2,5 µm.

Les macrophialides sont groupées par 2 ou 3 sur une ramification courte. Les macroconidies sont rares, en fuseau allongé, avec 3 à 7 cloisons. Les chlamydospores sont absents. Les périthèces, qui peuvent être formés lors du développement de cette espèce sur des végétaux morts, sont superficiels, bleu noir, globuleux, et mesurent 250-350 µm. Les asques, clavés contiennent 4-8 ascospores hyalines, elliptiques, le plus souvent uniseptées, parfois triseptées.

- ***Fusarium* solani**

La classification taxinomique complète, actuelle et corrigée d'espèce par exemple Fusarium solani est la suivante :

***Tableau* 6**. *Classification taxinomique de Fusarium solani.*

Genre	***Nectria***
Famille	Nectriaceae
Ordre	*Hypocreales*
Sous classe	*Hypocreomycetidae*

Classe	*Sordariomycetes*
Division	*Ascomycota*
Règne	*Fungi*

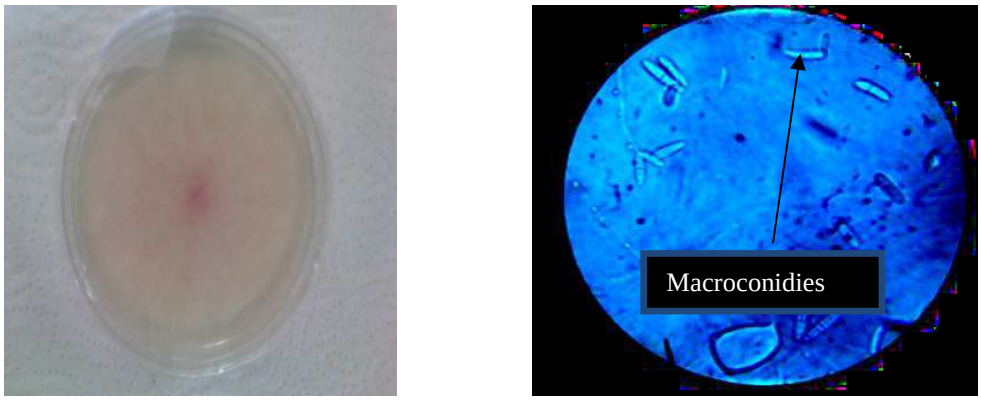


Figure 15. *Caractérisation de Fusarium solani* ***(Tabuc ,2007)***

I. 3.6. Identification morphologique

L'identification des genres fongiques repose sur des critères morphologiques :

- **Aspect *microscopique***

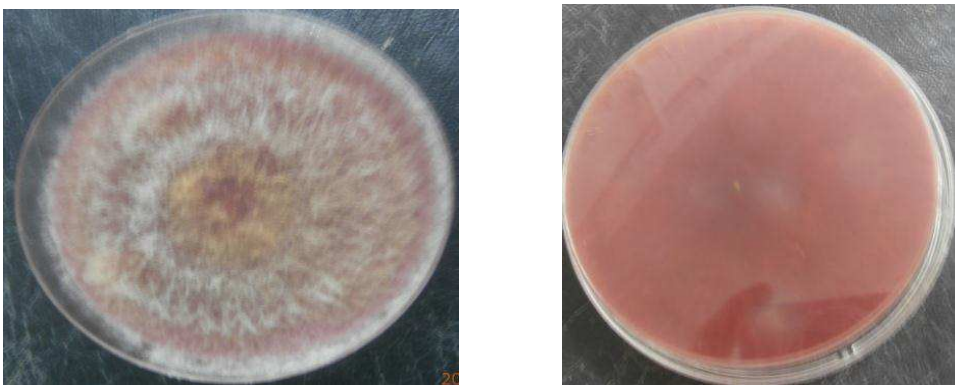
Des structures reproductrices (le thalle, les spores, aspect des spores, modes de formation des conidies, mode de groupement des conidies, mode d'implantation des cellules conidiogènes, présence de structures protectrices issues de la reproduction asexuée ou sexuée, présence des chlamydospores).



Figure 16. *Aspect microscopique de Fusarium solani* ***(Tabuc, 2007).***

- **Aspect *macroscopique***

Du mycélium (aspect, couleur, le relief, la taille et odeur des colonies, ainsi les structures de fructification).



Recto **verso**

Figure 17. *Aspect macroscopique de Fusarium solani* ***(Tabuc, 2007)***
(Recto: gauche ; revers : droit ; après 7 jours de culture sur milieu PDA à 28°C)

Matériel Et Méthodes

Cette étude expérimentale, réalisée au sein du laboratoire biologie au niveau de la faculté des sciences (Université de Médéa), a été consacrée pour isolement et la purification de la souche isolée et production d'α- amylase à partir de souche *Fusarium sp* et optimisation des conditions de culture (Temps d'incubation, pH, concentration de l'amidon, volume de spores).

Pour ce faire, notre étude expérimentale comporte trois parties :

1) La première partie est consacrée pour :
   - L'isolement et la purification de la souche (*Fusarium sp).*
   - L'identification macroscopique et microscopique de la souche fongique (*Fusarium sp).*
   - La production de L'α-amylases par la souche (*Fusarium sp)* sélectionnée sur milieu à base de l'amidon de pomme de terre.
2) La deuxième partie est dédiée à l'optimisation des conditions de culture :
   - PH de milieu.
   - Concentration de l'amidon du substrat.
   - Volume des spores inoculées.
   - Temps d'incubation

3) La troisième partie est dédiée la caractérisation biochimique d'extrait enzymatique brut:
   - Effet PH sur l'activité amylasique.
   - Effet températeur sur l'activité amylasique.
   - Détermination des constantes de cinétique enzymatique K_m, V_m.

II. 1. Matériels et produits utilisés

II. 1.1. Matériels : L'ensemble du matériel utilisé pour la réalisation de cette étude est résumé dans le **(Tableau 7).**

Tableau 7 .*Appareillage utilisé.*

Appareillage	Marque	**Image**
Balance électrique	**KERN ALS 220-4N**	
Agitateur magnétique	**AGIMATIC - N SELCTA**	
pH-mètre	**pH -2005 PH METER SELECTA**	
Spectrophotomètre UV-Vis	**ETER UV 2005 SELICTA**	
Microscope optique	**OPTIKA**	
incubateur thermo- Agitateur	**TR100-G IVYMEN**	
pied à coulisse	**LUTRON**	
Etuve d'incubation	**MEMMERT**	

Bec bunsen	**STORE NO : 631337**	

Incubateur	**ZTICTENG**	
Autoclave	**OTO12-NIVVE**	
Bain Marie	**MEMERT**	

II. 1.2. Produits

Les différents produits utilisés au cours de cette étude sont regroupés dans le (**Tableau 8**).

Tableau 8. *Produits utilisés dans la partie expérimentale.*

Produit	Pureté (%)
Extrait de levure	**60%**
Sulfate d'ammonium(NH_4SO_4)	**99.5%**
Hydroxyde de sodium (NaOH)	**98.8%**
Amidon de pomme de terre ($C_6 H_{10} O_5$) n	**20.5%**
Chlorure de calcium ($CaCl_2$)	**77-94%**
Acide chlorhydrique (HCl)	**36.5 -38%**
Chlorure de potassium (KCl)	**99%**
Phosphate de potassium (KH_2PO_4)	**99%**
Saccharose ($C_{12}H_{22}O_{11}$)	**99.9%**
Agar $(C_{12}H_{18}O_9)_2$	**95.7%**
Acide acétique (CH_3COOH)	**99.9%**
Bleu de coomasse brillant G-250	**99%**
Acide phosphorique(H_3PO_4) 85%	**85-88%**
Éthanol (C_2H_5OH)	**95 %**
Sulfate de magnésium ($MgSO_4$)	**99.1%**
Sulfate de zinc ($ZnSO_4$)	**98%**
Chlorure de cobalt (II) ($COCl_2$)	**98%**

Sulfate de manganèse (II)($Mn SO_4$)	**98%**
sulfate de fer ($FeSO_4$)	**98.5%**
Réactif glycose	**99.5%**

II. 2. Isolement et purification de la souche de *Fusarium sp* :

Dans notre étude, nous avons utilisé le milieu de culture PDA (Potato Dextrose Agar) qui a servi à la fois à l'ensemencement et à la purification des souches fongiques. Ce milieu est largement employé et il fournit les nutriments nécessaires à la croissance mycélienne des champignons.

II. 2. 1. Isolement de la souche de *Fusarium*

L'échantillon de courge rouge (préalablement contaminé par *Fusarium sp)* a été collecté puis le champignon été isolé. L'espèce *Fusarium* est reconnue en se basant sur la couleur des spores. Ces spores ont été étalées sur PDA et incubés à 28 °C jusqu'à sporulation. Les cultures pures obtenues ont été maintenues sur des tubes slants de PDA (pendant 15 jours avec un couleur brique rouge) pour une identification supplémentaire (**Bhatti *et al* ; 2007)**.

II. 2.2. Purification de la souche

La purification des souches contaminées est effectuée par prélèvement puis cultivée sur un milieu PDA. La souche s'ensemence au centre de la boite grâce à une coudrons et le prélèvement aura lieu lorsque le développement de la souche dévenu est suffisant. Par la suite, la souche est incubé à 28 °C jusqu'à développement suffisant de la cette dernière pour qu'elle soit prélevée pour faire l'objet de plusieurs repiquages permettant l'obtention d'une culture pure représentée par une seule espèce.

Après un bon développement des mycelium (colonis pour bacteries), on effectue des repiquages de chaque colonie pour purifier les champignons et minimiser les risques de contamination, jusqu'à ce qu'on arrive à isoler sur chaque boite de pétri une seule colonie d'un champignon.

Le repiquage se fait par prélèvement d'un fragment de colonie à l'aide d'une anse stérilisée, tout en évitant son contact avec les autres colonies avoisinantes de la même boite sur milieux PDA. Ce fragment est déposé au centre d'une nouvelle boite sur laquelle on indique la date du repiquage. Le repiquage se fait aseptiquement près du bec Bunsen et les boites sont incubées à 28°C pendant sept jours jusqu'à obtention des souches pures.

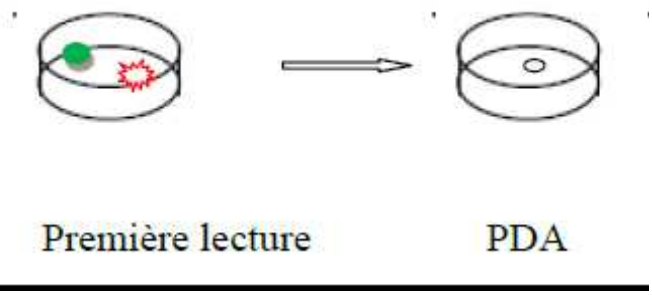


Figure 18. *Repiquage des mycelium au centre des boites sur milieux PDA.*

II. 3. Mise en évidence de l'activité amylasique

La recherche de souches amylolytiques est réalisée sur les souches précédemment isolées. La sélection est effectuée sur milieu PDA additionné d'amidon **(Annexe 1).** Les boites sont incubées à 28°C pendant 5 jours pour les moisissures. Après la période d'incubation, une solution de lugol est versée sur la surface de la boite, afin de mettre en évidence l'activitéamylasique. Les souches à halo clair sur le pourtour, sont considérées comme productrices d'amylases.

II. 4. Identification de la souche Fusarium

L'identification d'une souche représentative est effectuée par deux techniques classiques : une observation macroscopique et une étude microscopique des souches, pour déterminer le genre des moisissures isolées.

II. 4.1. Etude macroscopique

Les caractères morphologiques et culturaux sont déterminés après ensemencement des souches pures sur les milieux de cultures spécifiques. L'identification se fait à l'œil nue, et à l'aide de la loupe binoculaire elle se base essentiellement sur les caractères suivants:

1. l'aspect de la colonie (couleur de la surface et du revers de la boite, texture de la surface des colonies, topographie…).
2. l'aspect des bordures des colonies.
3. La couleur du mycélium aérien.
4. Présence ou absence de gouttelettes sur le mycélium.
5. Production de pigment diffusible
6. Vitesse de croissance (diamètre de la colonie à 7 jours : rapide ≥ 3 cm ; modérée : entre 1 et 3 cm et lente ≤ 1 cm).

II. 4.2. Etude microscopique

L'identification microscopique des champignons repose sur la méthode de lactophénole bleu de coton .Ces méthodes sont décrites ci- dessous.

- Lactophénole bleu de coton : un fragment de la colonie est prélevé à l'aide d'une anse de platine et déposé sur une lame porte-objet dans une goutte de colorant, ensuite recouvrir avec une lamelle couvre – objet qui écrase la préparation

L'observation microscopique est effectuée par microscope optique aux différents grossissements (GX10, GX40) ainsi qu'à l'immersion (GX100).

L'observation des caractères porte sur les paramétres suivants :

1. Hyphes : septes ou non, c'est-à-dire cloisonnés ou non
2. Conidiophores : absents, simples, ramifiés
3. Cellules conidiogènes : annélide, phialide...
4. Conidies : uni- ou pluricellulaires, solitaires, en amas ou en chaînes, forme (ronde, ovale, en massue...)
5. Organes de fructification : périthèces, cléistothèces (sexué), pycnides (asexué)
6. Mycélium diffus, épais, coloré ou incolore,
7. Présence de types de spores sexuelles ou asexuées.
8. Type et apparence du système sporale.
9. Présence de type de structure particulière.

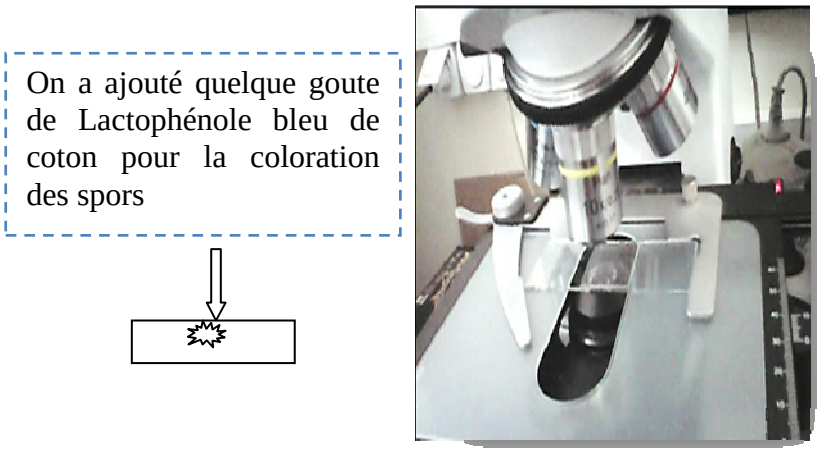


Figure 19 .*Méthode de l'identification microscopie.*

II. 5. Sporulation de la souche sélectionnée et préparation de l'inoculum

- **Préparation de l'inoculum**

L'inoculum sont prépares à partir des cultures sur le milieu PDA en deux répartitions les colonies sont inondée avec 10 ml de l'eau distillée stérilisée contenant 0.01% de tween 80 comme agent mouillant, la concentration en spores est déterminée par microscopée à l'aide du technique dénombrement puis ajustée à 10^5spors/ml **(Brame et flood ; 1983)**

II. 6. Préparation du milieu de culture

Le milieu de culture utilisé pour l'isolement est un milieu semi-synthétique contenant l'amidon comme seule source de carbone, avec la composition suivante par litre :

Dans un erlenmeyer on prépare un milieu de culture (solution oligo-élément) : le milieu de fermentation contient (g l^{-1}) : (NH_4) SO_4 1.4 ; $CaCl_2$ 0.3 ; KH_2PO_4 2 ; $MgSO_4 .7H_2O$ 0.3 ; Extrait de levure (E.L) 10 ; Amidon 20 ; 1ml/L de la solution minirale.
La solution de composés minérals contient (g l^{-1}) : $FeSO_4$ 5 ; $MnSO_4$ 1.6 ; $COCl_2$ 2 ; $ZnSO_4 .7H_2O$ 1.4 ; Tween 80 2, les cultures sont réalisées dans des erlenmeyers de 250 ml à raison de 50ml de milieu de culture par erlenmeyers. Après la stérilisation (15min à 121 °C), l'ensemencement a été fait par la prise 1ml de la suspension des spores. Les cultures sont incubées à 25 °C pendant 4 jours à 100 rpm.

II. 6.1. Séparation de la biomasse

A la fin d'incubation, la biomasse est séparée par filtration sur papier Wattman N°2. Le poids sec est déterminé après rinçage à l'eau distillé et séchage dans une étuve réglé à 105°C jusqu'à poids constant.

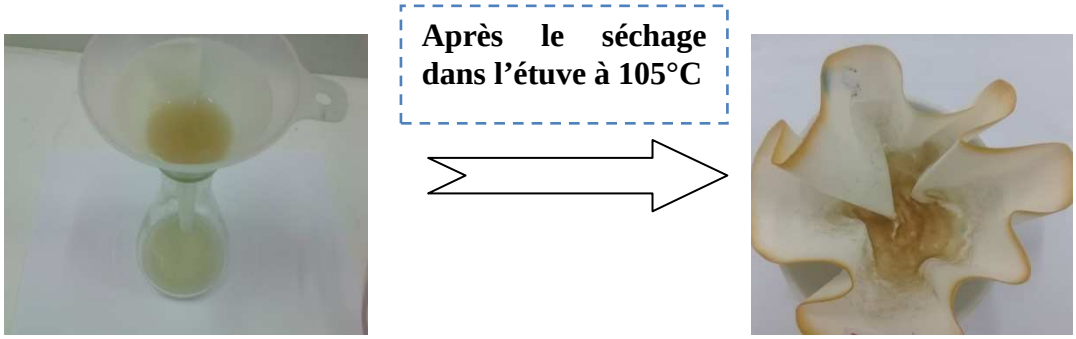


Figure 20. *Séchage de la biomasse.*

II. 6.2. Dosage de protéines

Le dosage des protéines des extraits enzymatiques a été réalisé selon la méthode de (**Bradford ; 1997)**, c'est une méthode colorimétrique qui permet la détermination des concentrations d'une solution protéique.

- **Principe**

La méthode de Bradford est un dosage colorimétrique, basé sur le changement d'absorbance (la mesure se fait à 595nm), manifestant par le changement de la couleur du bleu de coomassie G-250 après liaison (complexation) avec les acides aminés basiques et les résidus hydrophobes des acides aminés présents dans la ou les protéines. La technique de Bradford utilise la fixation du bleu de coomassie sur les protéines, ce colorant existe sous 3 forme: une forme anionique colorée en bleu (λ max =595nm), une forme cationique rouge (λ max =470nm), et une forme neutre verte (λ max =650nm) C'est la forme anionique qui se fixer préférentiellement aux protéines grâce à des interactions électrostatiques avec les groupements cationique des protéines (plus particulièrement les groupements fonctionnels basiques et /ou aromatiques).

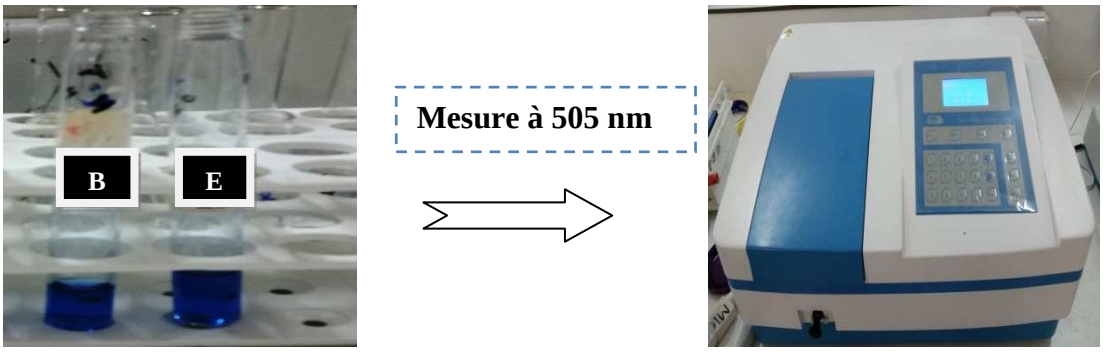


Figure 21. *Dosage de protéine.*

II. 6.3. Détermination de l'activité enzymatique

L'activité amylasique a été estimée selon la méthode enzymatique (GOD-POD) (**annexe 3)**. Le principe de cette méthode est basé sur la mesure du pouvoir réducteur du glucose libéré lors de l'hydrolyse enzymatique de l'amidon.

La réaction est colorimétrique et l'intensité de la coloration est proportionnelle à la quantité du glucose libéré. Ce principe est détaillé en (**annexe 3).**

L'activité enzymatique est exprimée par unité internationale (µmol/ml), correspondant à une µ mole du glucose libéré par millilitre du milieu à 37°C et à pH 6,3.

- **Protocole expérimental**

0.1 µl de l'enzyme est ajouté à 5 ml de la solution du substrat (amidon 5 g/L dans le tampon phosphate pH 6.3), après agitation le mélange est incubé à 37°C pendant 15 min avec un tube témoin représenté par le blanc. A la fin de la réaction 10 µl de milieu ont été prélevé et ajouté à 1 ml de réactif de glucose suivi d'une incubation à 37°C pendant 5 minutes pour le développement de la couleur. L'absorbance est déterminé à 505 nm contre le blanc. La concentration des sucre réducteur correspondant est déterminée à partir d'un étalon établie de concentrations du glucose de 1 mg/ ml.

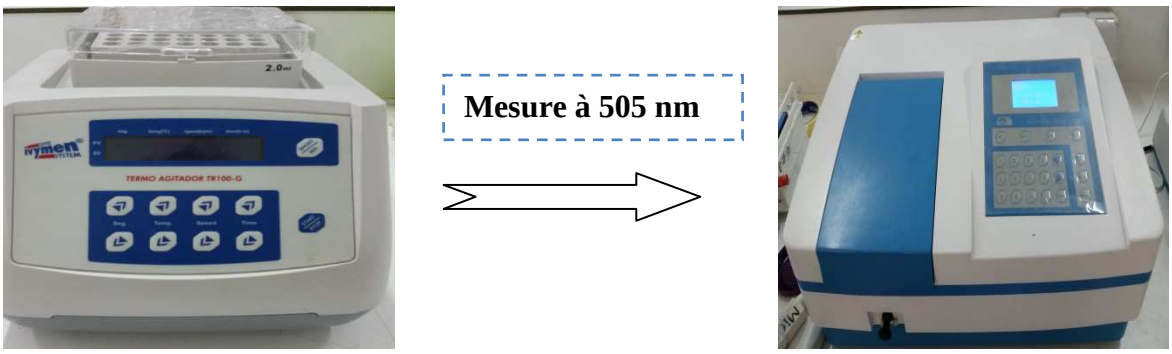


Figure 22 .*Dosage de l'activité amylasique.*

II. 7. Optimisation des conditions de culture

Les conditions de culture et la composition du milieu de la fermentation ont une influence importante sur la biomasse, les protéines et la production de l'α- amylase produites par la souche de *Fusarium.* Ainsi les effets de quelques facteurs ont été étudiés :

II. 7.1. Effet de temps d'incubation

Pour déterminer le meilleur temps d'incubation, des cultures ont été réalisées dans des Erlenmeyers de 250 ml contenant chacun 50 ml du milieu de production. Après stérilisation à 115°C pendant 15mn les milieux sont ensemencés avec 1ml spores, puis sont agités à 100 rpm dans un incubateur à 25°C, à un pH 6 pendant 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168,192 heures. La biomasse est séparée par filtration sur papier Wattman N°2. Le filtrat est réservé au dosage de l'activité alpha-amylasique.

II. 7.2. Effet de pH de milieu

L'effet du PH initial est testé sur le milieu de production à des pH initiaux de 4, 5, 5, 5, 6, 6, 5,7, 7,5 .L'incubation est réalisée en milieu liquide à 25°C sous agitation rotative pendant 96 h (4 jours) à 100 rpm. L'ajustement du pH initial est réalisé par une solution de HCl 0,1 N pour les PH inférieurs à 5 et de NaOH 16 N pour les pH supérieurs **(Afnor ,1986).** Le pH initial et final sont mesurés par un pH-mètre.

II. 7.3. Effet de la concentration d'amidon du substrat

Pour permettre une bonne croissance mycélienne de la souche *Fusarium sp* et aussi une production maximale en α- amylase, plusieurs concentrations (1 ; 1.5 ; 2.0 ; 2.5 %) de amidon ont été testées dans ce travail. **(Nouadri T.** ***2011)***

II. 7.4. Effet du volume des spores inoculées

Ce facteur nous renseigne sur la quantité de la biomasse récoltée et également sur la production d'enzyme. Il s'agit de 6 volumes sont : 0,5 ; 0, 75 ; 1 ; 1, 25 ; 1, 75 ; 2 ml de spores, incubées dans le milieu de base 25°C pendant 96 heures. **(Nouadri T.** ***2011)***

II. 8. Préparation et caractérisation d'extrait enzymatique brut

II. 8.1. Effet du pH sur l'activité amylasique

Pour la détermination du pH optimum, préparer des tubes Contenant un mélange réactionnel constitué de 0.5 ml de l'extrait enzymatique et 0.5 ml d'une solution d'amidon à 1% dans du tampon phosphate à pH 5, 6, 7, et 8 dans du tampon acétate à pH 2, 3,4 et dans du tampon citrate à pH 4.

Les incuber pendant 15 min à une température de 37 °C, L'activité amylasique des extraits enzymatiques est alors mesurée.

La préparation des solutions tampon est décrite en **(annexe 02**) **(Promita et al ; 2013)**

II. 8.2. Effet de la température sur l'activité amylasique

Pour la détermination de la température optimale de l'enzyme, des tubes contenant un mélange de 1ml d'enzyme avec 1ml d'une solution d'amidon à 0.5% dans du tampon phosphate à pH 6.6 sont préparés et incubés pendant 30 min à des températures allant de 30°C à 80°C avec un intervalle de 10°C, L'activité amylasique des extraits enzymatiques est mesurée **(Promita et al ; 2013).**

II. 8.3. Détermination des constantes cinétiques de l'α- amylase

Les paramètres cinétiques **(*Km et Vmax*)** de l'α- amylase dans l'extrait enzymatique brut sont déterminés par la représentation de Lineweaver-Burk. L'amidon soluble avec différentes concentrations de 1 à 8 % est utilisé comme substrat naturel de l'enzyme.

Résultats

Et

Discussion

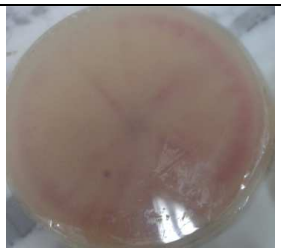
L'α- amylase est l'une des plus importantes hydrolases actives sur l'amidon dont les domaines d'application s'élargirent de plus en plus. La production de cette enzyme a été réussie par certaines bactéries, levure et certains genres de moisissures. Dans ce travail, la souche microbienne *Fusarium sp,* a été utilisée pour la production de l'α- amylase.

III.1. Isolement et caractérisation de *Fusarium sp.*

- **Etude de l'aspect macroscopique**

Après 3 jours de culture sur milieu P.D.A, l'isolat *Fusarium sp,* présente un mycélium blanc et dense plus ou moins cotonneux. Après 6 à 7 jours cet isolat se pigmente en rouge clair. Cette couleur s'intensifie pour devenir rouge brique après 10 jours.

Tableau 23. *L'aspect macroscopique selon nombre des jours.*

La souche *Fusarium sp*	Les jours d'incubation
	3 Jours
	7 Jours
	10 Jour

- **Etude de l'aspect microscopique**

Nous observons microconidies elliptiques à ovales, abondantes **(Tivolo ; 1988; Bouhot *et al* ; 1972).** Ce champignon possède uniquement des macroconidies en forme arqué et allongées, pas de cloison mais avec de fausse tête. Vue la difficulé de diffrencier entre plusieur genres de cet espèce, ce travail sera donc suivi par une identification moléculaire.

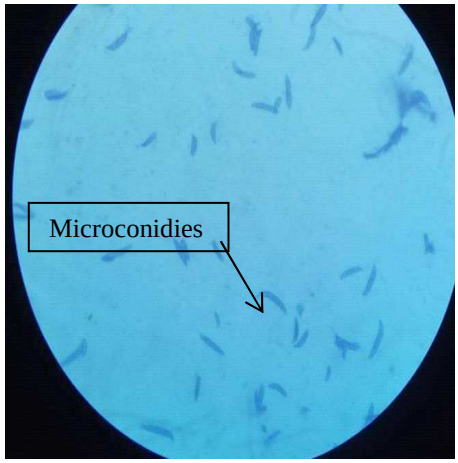


Figure 24. *L'aspect microscopique de Fusarium sp.*

2. Mise en évidence de l'activité amylasique

Pour la mise en évidence de l'activité amylasique chez les isolats, nous avons utilisé un milieu gélose à l'amidon à 2% d'amidon (milieu sélectif), l'amidon se colore en bleu par l'iode. Lorsque l'amidon est hydrolysé, les produits de dégradation (dextrines, maltose, et glucose) ne donnent plus de réaction. **[Figure 25].** Après incubation à 28°C pendant 120h, les cultures son recouvertes avec 5 à 10 ml de solution iodée. Nous observons des zones de lyse, ces zones claires sont les témoins d'une activité α- amylase obtenue par la souche *Fusarium sp*

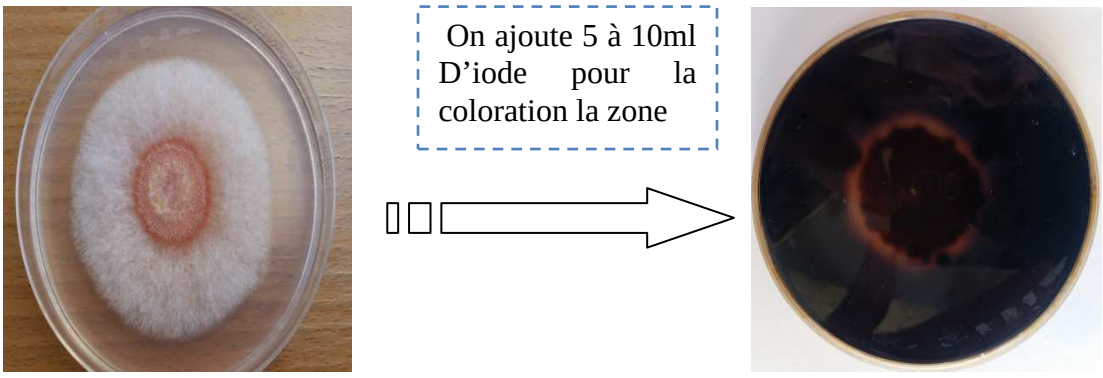


Figure 25. *Test de sélection de souches amylolytiques sur gélose à l'amidon à 2% d'amidon (Après 120 h d'incubation à 28°C)*

III.3. Optimisation des conditions de culture

L'effet des facteurs choisis (Temps d'incubation, pH de milieu, concentration d'amidon du substrat, Volume de la solution de spore inoculée) sur la production de la biomasse et l'activité α- amylase, a fait l'objet de ce travail.

III.3.1. Effet de temps d'incubation

Pour étudiée l'effet du temps d'incubation, on a utilisé un milieu de culture liquide, à PH 6, et incube à température 25°C et 100 rpm, aprés avoir, chaque jour, récupérer la biomasse et le filtrat qui représente l'extrait enzymatique, on a effectué l'activité enzymatique et mesuré les masses, pour les résultats augmentation de l'activité amylasique (910,1UI/ml) par la souche *Fusarium sp* jusqu'à 4 jours et après fixation des valeurs, et augmentation de la masse (poids de mycélium) (0,43505g) par la souche *Fusarium sp* jusqu'à 3 jours et après fixation des valeurs.

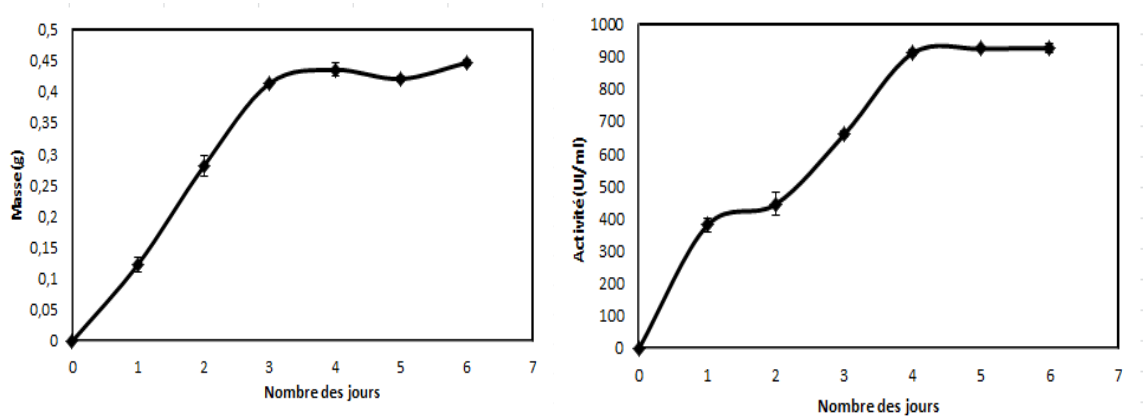


Figure 26. *L'activité amylasique et la masse selon nombre des jours.*

Après une phase de latence de 48 heures (durée de prégermination et d'adaptation de la souche de *Fusarium sp* au milieu de culture) la croissance cellulaire augmente progressivement et le poids sec du mycélium atteint une valeur maximale de (0,43505g). Cette fixation de l'activité enzymatique après 4 jours d'incubation est due à la consommation du substrat dan le milieu **(Bancerz *et al* ; 2005)**

III. 3.2. L'effet du pH de milieu

Les paramètres physico-chimiques du milieu jouent un rôle prépondérant sur la croissance, le développement et la physiologie des champignons **(Lagzouli *et al* ; 2007).** La plupart des champignons se développent normalement à pH compris entre 3 et 8 **(Boiron, 1996)**. Outre la croissance, le pH joue un rôle primordial dans la production de métabolites.

Les variations de pH sont indicatrices de changements dans les activités métaboliques du microorganisme **(Bellon-Maurel *et al.* 2003).**

Dans notre étude nous avons testé des milieux de différents pH, pour déterminer le pH optimum de la production d'α- amylase par *Fusarium sp.* **[Figure 27].** Après 96 heures d'incubation, l'activité maximale de 905UI/ml est obtenue avec un milieu à pH 6. Le même pH donne une biomasse optimale de 0.435 g.

Lorsque le pH du milieu augmente à 7 l'activité amylasique diminue à 855 UI/ml ; de même que le poids de biomasse 0.412 g **[Figure 27].** Cette baisse de l'activité enzymatique est due certainement à la variation de pH optimal de production.

L'étude de **Dubey *et al* (2000)** indique un pH optimum de 5 pour la croissance et la production de l'activité amylasique de la moisissure *Aspergillus niger*, des bactéries *Thermobifida fusca* **(Yang *et al* ; 2004). De mot *et al* ; (1985) et Taylor *et al* ; (1995)** ont détecté deux formes d'amylases produites par la moisissure *Humicola lanuginosa* avec des optima de pH de 4,9 et de 6,6.

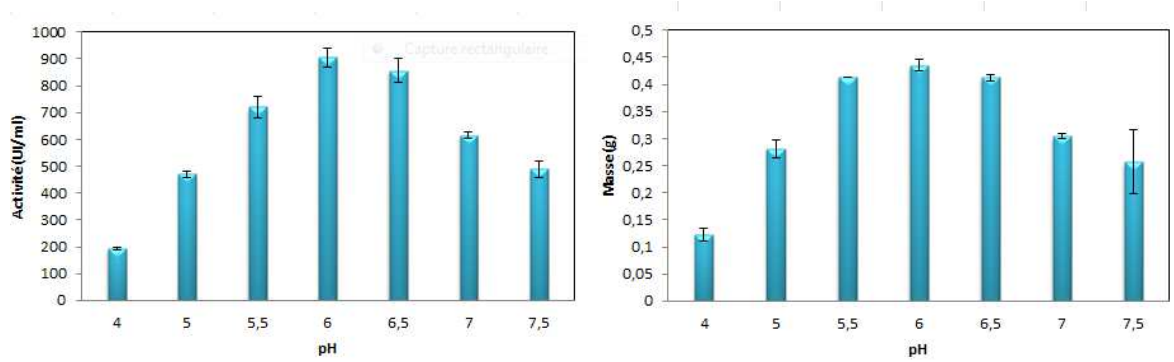


Figure 27. *Effet de la variation du pH sur l'activité amylasique et la biomasse.*

III. 3.3. Effet de la concentration de l'amidon du substrat

Les substrats carbonés servent à la fois comme source de croissance et d'énergie aux moisissures **(Krasniewski I. *et al* ; 2006 ; Burhan, 2008)**. Plusieurs exemples établissent l'amidon et le glycérol comme d'excellents inducteurs de la synthèse des amylases et les xylanases de moisissures et le glucose comme un puissant répresseur **(Tonukari *et al* ; 2002 ; Bakri, 2003 ; Collins *et al* ; 2005)**. La forte production de l'α- amylase (990UI/ml), observée en présence d'une concentration de 1.5% de l'amidon ; de même que le poids de biomasse 0.7258g **[Figure 28].** Suggère que l'α- amylase est une enzyme fortement induite par son

substrat **(Bakri, 2003).** Lorsque la concentration de l'amidon augmente à 2.5% l'activité amylasique diminue à 845 UI/ml ; de même que le poids de biomasse 0.304 g.

Cela montre que Nos résultats corroborent ceux de **Bennamoun *et al* (2004),** qui ont trouvé que l'amidon soluble stimule la production de L'α-amylase *Fusarium sp.* En effet, l'efficacité de l'amidon soluble dans la synthèse de l'α- amylase en tant que substrat idéal de son induction, a été démontré par plusieurs auteurs **(Dercova *et al* ; 1992; Cruz *et al* ; 1997 ; Uriyo et Eigel ; 1999 ; Chen *et al* ; 2000 ; González *et al* ; 2008).** Selon **Vallier*et al* ; 1977; Aguilar *et al* ; (2000)** la présence d'amidon soluble dans les milieux de culture stabilise et protège l'enzyme.

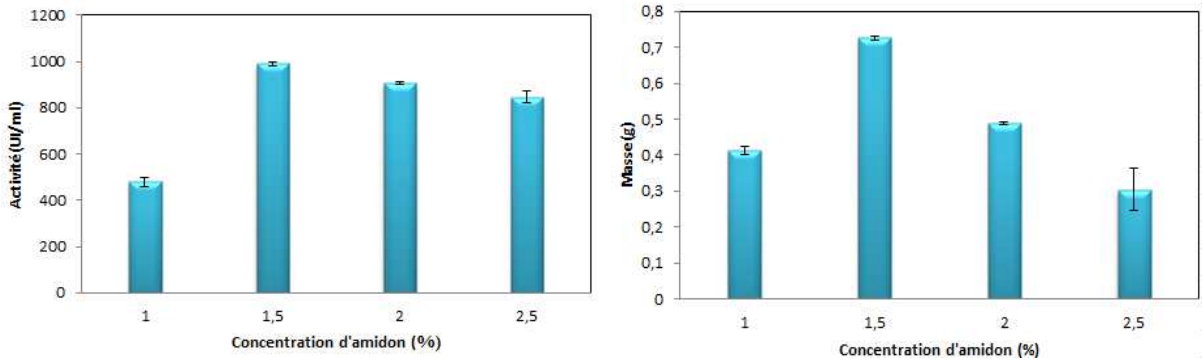


Figure 28. *L'effet de la concentration de l'amidon sur la production de l'activité amylasique et la biomasse.*

III. 3.4. Effet de volume de la solution des spores inoculées

La capacité de développement de la moisissure est reliée à la concentration de spores **(Lim et Park, 2005),** la **[Figure 29]** montre que un volume de 1.75 ml (10^5 spores /ml) est nécessaire pour la production de l'α- amylase avec une activité enzymatique maximale de 990 UI/ml **[Figure 29].**

Nos résultats montrent que les conditions optimales sont obtenues avec un volume de spores de 1.75 ml (10^5 spores /ml) pour une biomasse de 0,752 g. Ce phénomène pourrait être lié au potentiel de germination **(Barrios-Gonzalez *et al* ; 1989 ; Mazen *et al* ; 2002).** Les productions optimales de l'α- amylase et de la biomasse de *Fusarium sp.* Nécessitent donc le même volume de spores de1.75 ml (10^5 spores /ml) **[Figure 29].**

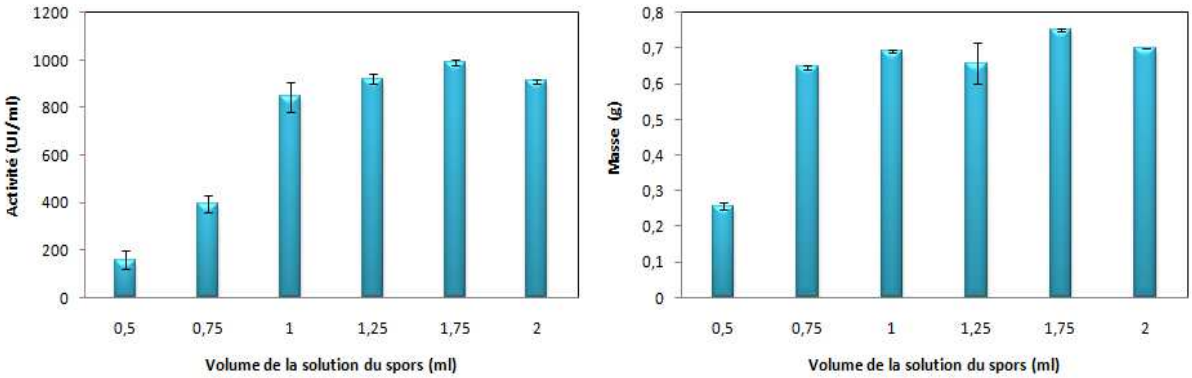


Figure 29. *L'effet de volume de* pores *sur l'activité amylasique et sur la biomasse.*

III. 4. Caractérisation d'extrait enzymatique brut et purifié

Toute production d'un métabolite microbien est influencée par des paramètres environnementaux : les conditions physiques ; température ; pH ; agitation ; la composition du milieu, concentration et nature du substrat**. (Scriban, 1999).** Dans cette étape ; nous avons étudié l'effet du pH, température, sur l'activité de l'extrait amylasique.

La production de l'extrait enzymatique brute a été effectuée dans les conditions optimales déjà trouvées. Les cultures sont réalisées dans des erlen-meyers de 250 ml contenant 50 ml du milieu de production après une stérilisation à 110°C. Les milieux sont ensemencés avec 1.75 ml de 10^5 spores /ml, puis sont agitées à 100 rpm dans des incubateurs à 28°C, à un pH 6 pendant 96 heures. La biomasse est séparée par filtration sur papier Wattman N°2. Le filtrat est réservé au dosage de l'activité alpha-amylasique et des protéines. Le dosage de protéine a été effectué par la méthode de Bradford **(Annexe 6)** la concentration de protéine est de 80 mg/ml.

III.1 Effet du PH sur l'activité amylasique

L'α-amylase de *Fusarium sp* est très sensible aux variations de pH. Une très faible activité observée à pH 3 et 4 pour l'extrait enzymatique brut comme le montre la **[Figure 30]**. Le pH influe sur le degré d'ionisation du substrat et de la molécule enzymatique dont cet effet dépend des groupements ionisables participant à la fixation du substrat et au maintien des structures secondaire et tertiaires de la protéine

D'après la **[Figure 30]** l'activité amylasique optimale obtenu à un de pH 5 (906 UI/ml) et diminue pour atteindre 616 UI /ml à pH 8. Nous constatons aussi que l'extrait enzymatique a été beaucoup plus affecté à pH 2 et 4. Cette sensibilité est variée selon la source d'enzyme,

des études antérieures par **Gupta et al (2003)** sur les alphas amylases d'origine microbienne ont montré une activité amylasique considérable à pH 9.

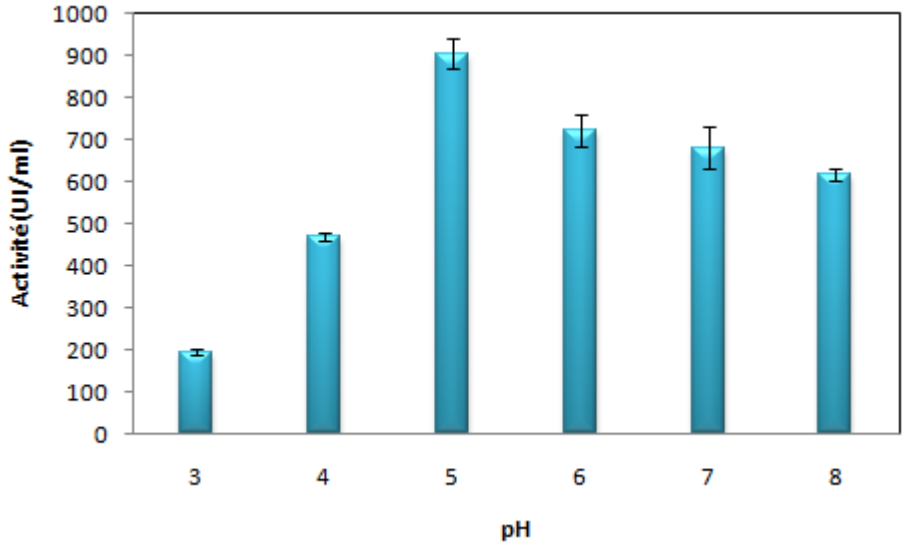


Figure 30. *L'influence du pH sur l'activité amylasique*

III.2. Effet de la température sur l'activité amylasique

L'effet de la température sur l'activité amylasique nous renseigne sur la stabilitéde la protéine enzymatique **(Neilsen *et al* ; 2003).** L'influence de la température sur l'activité amylasique a été testée dans une gamme de 30 à 80 °C à un intervalle de 10°C pendant 30 minutes. Pour l'extrait enzymatique brut, l'activité amylasique maximale (970UI/ml) a été observé à une température de 50 °C et à partir de là, elle diminue progressivement jusqu'à atteindre sa valeur de (616 UI/ml) à une température de 80 °C comme le montre la **[Figure 31]** :

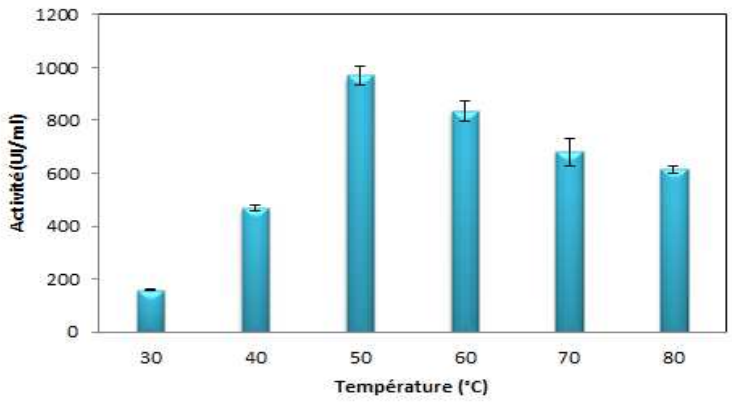


Figure 31. *Influence de la température sur l'activité amylasique.*

Ce profil est similaire à celui de **(Ramachandran, (2016).**quoi que les valeurs de l'activité amylasique sont légèrement supérieures et cette différence est due probablement à l'origine des espèces et aux conditions environnementales qui font que les souches développent des mécanismes spécifiques à leur niche écologique.

Werner (2010) observe que les amylases bactériennes sont plus thermostables que les amylases fongiques. L'amidon est un substrat stabilisant de l'enzyme à l'égard de la dénaturation thermique car son remplacement par d'autres éléments comme le glucose et le lactose n'a pas cet effet. Selon **Fogarty (1980).** L'enzyme nécessite au moins quatre ions calcium par molécule, les α- amylases hautement purifiées sont inactives à une température au-dessus de 50 °C.

III. 3. Constantes cinétiques de l'α- amylase

L'activité de l'enzyme est testée sur des concentrations variables d'amidon soluble. La **[Figure 32]** indique un comportement Michaelien. Son tracé en coordonnées inverses de Lineweaver et Burk (1934) est linéaire. Les valeurs de K_m et V_{max} sont respectivement Km=5,065 Met 5.459 min /µM à 30°C et un pH optimal (un tampon phosphate 0.1 M).

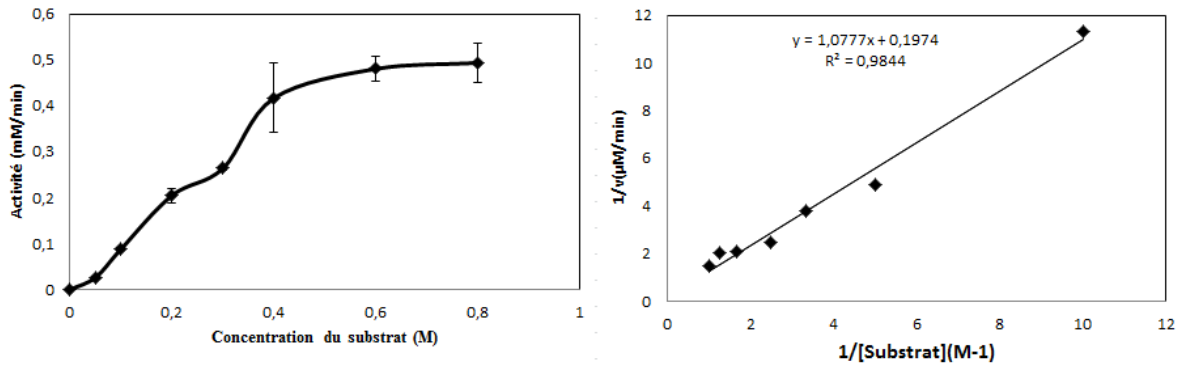


Figure 32. *Représentation de Michalis : Étude de l'évolution de la vitesse de la réaction enzymatique en fonction de la concentration en substrat. Température: 37°C, vitesse d'agitation:500 rpm.*

Conclusion

Et

Perspectives

Conclusion et Perspectives

La production industrielle d'enzymes amylolytiques, se fait à partir de souches bactériennes ou de souches fongiques. Cependant, les moisissures sont considérées comme les microorganismes les plus importants en biotechnologies pour leur fort potentiel de développement**.** Il est basé sur un critère écologique et sur la production d'une substance à haute valeur ajoutée avec un procès pas onéreux**.** Le choix du milieu approprié de fermentation est essentiel pour les microorganismes, aussi bien pour la croissance que pour la production d'enzymes. La production d'enzymes amylolytiques par les souches fongiques s'est considérablement améliorée par l'utilisation de différents milieux de base comme l'amidon. C'est dans cette dernière optique que s'inscrit l'objectif de notre travail. Dans ce travail, nous nous sommes intéressés à la l'optimisation de la synthèse d'activité amylasique microbienne, extracellulaire, à partir de *Fusarium sp.* Préalablement isolé et identifié et à la caractérisation l'extrait enzymatique brut.

L'optimisation de la production de la bomasse et de l'activité amylasique a été effecté, differentes parametre ont été etudier à savoir ; le temps d'incubation, le pH du milieu, la concentration du substrat et le volume inoculé de spore. Nos résultats montrent que les conditions optimales sont obtenues avec un volume de spore de 1.75 ml (10^5 spores /ml), pH 6 du milieu de culture, concentration d'amidon de 1.5 % pendant 4 jours d'incubation.

L'effet de PH et la température sur L'activité amylasique de l'exratait enzymatique brute ont été également étudie. L'activité amylasique maximale (970UI/ml) a été observée à une température de 50 °C et à un de pH 5.

Les constantes (Km et Vm) de la cinétique d'alpha amylase sont également été détermine qui sont respectivement : 5,459 M et 5,065 min/µM.

Dans le but de poursuivre ce travail, nous envisageons les perspectives suivantes :

- Effectuer l'identification moléculaire de la souche *Fusarium sp.* isolée à patir la courge rouge.
- Utiliser un substrat de fermentation à faible coût d'une part, et convenable en point de vu composition en élément nutritifs nécessaires au développement des microorganismes et la production d'α- amylase, d'autre part.
- Purifier l'extrait enzymatique obtenu pour avoir une activité spécifique importante.

Références Bibliographique

A

- **Abate C., Castro NGR., Sineriz F ., Callieri DAS.1999** Production of Amylolytic enzymes by Bacillus amyloliquefaciens in pure culture and in co-culture with Zymomonas mobilis. Biotechnol Lett.; 21: 249–252. Doi : 10.1023/A : 1005477505683.
- **Açourene S., Buelguedj M., Tama M., et Taleb B. 2001.** Caractérisation, évaluation de la qualité de la datte et identification des cultivars rares de palmier dattier de la région des Ziban. Revue Recherche Agronomique, N° 8, Ed. INRAA, pp.19-39.
- **Aehle W., et Misset O. 1999.** Enzymes for industrial applications. In: Rehm H.J., Reed G., editors. Biotechnology, 2nd ed. Germany: Wiley-VCH, pp.189-216.
- **Agger T., Sphor A B., Carlesen M., et Nielsen J. 1998.** Growth and product formation of Aspergillus oryzae during submerged cultivations verification of morphologically structured model using fluorescent probes. Biotechnol. bioeng. 57, 321-329.
- **Aguilar G., Mordon-Guyot J., Trejo-Aguilar B., et Guyot. J. P. 2000**. Purification and characterization of an extracellular alphaamylase produced by *Lactobacillus manihotivorans*LMG1801 (T), an amylolytic lactic acid bacterium. Enzyme and *Microbial* Technology, 27(6), pp.406-413.
- **Aidoo E. F., Herdey R.et Wood B. J. B. 1981.** Estimation of fungal growth in a solid state fermentation system. European J. Appl. Microbiol. Biochem. 33, 6284-6294.
- **Ait kaki- El-Hadef El-Okki H., Leghlimi2 S., Dakhmouche L., Bennamoun., Z Meraihi. 2012-** utilisation de la planification experimentale pour l'optimisation de la production de l' α - amylase par rhizopus oryzae. Rev. Microbiol. Ind.San et Environn. Vol 6, N°1: 1-17.
- **Alais C., Linden G., et Miclo L. 2008**. Biochimie alimentaire, DUNOD. 6ème édition, paris, pp.67-71.
- **Assamoi A.A., Destain J., Thonart P. 2009.** Aspects microbiologiques de la production par fermentation solide des endo-β-1,4-xylanases de moisissures : le cas de Penicillium canescens. Biotechnol. Agron. Soc. Environ., 13(2); 281–294.

B

- **Babu K. R., et Satyanarayana T. 1993.**Extracellular calcium inhibited α-amylase of Bacilluscoagulans B49. Enzyme Microbiol. Technol. 15,1066-1069.
- **Badot R.M., et Merlin D., 1984.** Métabolisme énergétique et mouvement révolutif chez le haricot (Phaseolus vulgaris). Ann. Sci. Uni. Franche-Comté, Biol.Veg. (4), pp.7-12.

- **Bakri y., Jacques PH., et Thonart Ph. 2003.** Xylanase production by *Penicillium canescens 10-10c* in solidstate fermentation. *Appl. Biochem. Biotechnol*. (108):737-748.
- **Baldwin P., Van E. C., Istasse L.et Bienfait J.M. 1986.** Fermentation en silos de laboratoirede pulpes de bettraves sucrières. Belgian Journal of Food Chemistry and Biotechnology. (98), pp.792-797.
- **Bancerz T.M., Attila -Angelis D., Carvalhoa.F.A. DASILVA R. E. 2005**. Production of sacharogenic and dextrinogenic Enzymes by *P. camemberti* A 13.36, *Journal of Microbiology* (Korea), (43):561-568.
- **Bennamoun L., Meraihi Z., Dakhmouche S., 2004**. Utilisation de la planification Expérimentale pour l'optimisation de la production de l' α-amylase par *Aspergillus oryzae* Ahlburg (Cohen) *1042.72* cultivé sur milieu à base de déchets d'oranges, *Journal of Food Engineering*. (64), pp.257- 264.
- **Bel´en O., Juliana K., Ana M., Pedregos A., Inmaculada F. Monistro L., Fernando L. et Carmen S.E., 2006.** Bacterial biofilm removal using fungal enzymes, Enzyme and Microbial Technology, (40), pp.51-56.
- **Bellon-maurel V., Orliac O., et Christen P. 2003.** Sensors and measurements insolid-state fermentation: A review. *Process Biochem.* (38): 881-896.
- **Ben Ameur Villain. S. 2012.** Conception et Etude d'un réacteur enzymatique à membrane fonctionnant en milieu supercritique : Application à la synthèse enzymatique d'esters. Thèse de doctorat. Génie des procèdes : Ecole Nationale Supérieure de chimie de Montpellier, p131.
- **Bennett J.W. 1998.** Mycotechnology: the role of fungi in biotechnology. J. Biotechnol., (66), pp.101-107.
- **Bertheau Y., Kotoujansky A., et Colenoa A. 1985.** Sources actuelles et potentielles d'enzymes d'hymolyses et de dépolymérisation. In : Mouranche A. et Coste C. (Ed) : Hydrolyses et dépolymérase enzymes, d'intérêt industriel. Ed. Gautier-Villard, pp.47-108.
- **Bergmeyer H.U., Gawekn K., et al. 1979.** Principes de l'analyse enzymatique. Tech. et Doc. Lavoisier. Paris. pp. 17.
- **Bhatti H.N., Rashid, M.H., Nawaz, R., Asgher. M., Pervee. R. et Jabbar, A. 2007**, Optimization of media for enhanced glucoamylase production in solid- state fermentation by Fusarium solani. Food Technol. Biotechnol., 45, 51–56.
- **Bhella R.S., Altosaar I. 1985.** Purification and some properties of the extracellular alphaamylasefrom Aspergillus awamori. Can J. Microbiol.149-153.

- **Boiron P. 1996.** Organisation et Biologie des champignons. Edition Nathan p.149.
- **Bouhot d., rouxel f., et louvet j. 1972**deux techniques de détermination du pouvoir pathogène de *fusarium oxysporum*.ann phytopathologie, 2(3) ; pp 187-191
- **Bouix M. et Leveau J. Y. 1999.** Production des enzymes. In Scriban R (Ed) : Biotechnologie Ed. Lavoisier. 344-400.
- **Bousseboua H. 2002.** Eléments de Microbiologie Générale. Programmes de graduation. Editions de l'Université Mentouri.Constantine Algerie p.230-231.
- **Bradford MM. 1997** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantitation of microgram of protein utilizing the principale of protein-Dye-binding. Anal Biochem; 72 : 248-254.
- **Brame .C, Flood .J.1983.**Antagonisme of Aureobasidium pullulans to wards Alterniria solani transactions of the British My cological Society .81(3) :621-624
- **Brawn S.H. et Kelly R.M. 1993.** Characterization of amylolytic enzymes having both (alpha)-1,4 and (alpha)-1,6 hydrolytic activity from the thermophilic archea Pyrococcus furiosus and Thermococcus litoralis Applied and Environmental Microbiology; 59; (8), pp.2614-2621.
- **Bruinenberg P.M., Hulst A.C., Faber A., Voogd R.H. A .1996** process for surface sizing or coating of paper. In: European Patent Application.
- **Brumm P.J., Hebeda R.E., Teaugue W.M. 1991.** Enzymes in food industry. P. 306-351. In Suckling C.J. Enzymes chemistry impact and application. Ed. Chapman H. London.
- **Burhan A., Unaldi N., Coral G., Colak O., Aygan A., Gulnaz O. 2003.** Enzymatic properties of a novel thermostable, thermophilic, alkaline and chelator resistant amylase from an alkaliphilic Bacillus sp.Isolate ANT-6. Process Biochemistry. (38): 1397-1403.

C

- **Castro PML., Hayter PM., Ison AP., Bull AT. 1993.** Application of statistical design to the optimization of culture medium for recombinant interferon-gamma production by Chinese hamsterovary cells. Appl Microbiol Biotechnol. ; 38(1):84– 90. doi: 10.1007/BF00169424
- **Chao-Hsun Y.et Wen-Hsuing L. 2004 .**Purification and properties of a maltotrioseproducing Alpha amylase from Thermobifida fusca, Institute of Microbiology and Biochemistry, National Taiwan University; Enzyme and Microbial Technology. (35):254-59.
- **Chatterton J-R., VogelsongK-M., Lu Y- Ellman A-B. et Hudgens G-A. 1996.** Salivaryamylase as a measure of endogenous adrenergic activity. Clin. Phisiol. J. 16 (4), pp.344-348.

- **Chen D. C., Wang B. D., Chou P. Y., et Kuo, T. T. 2000**. Aspargine as a nitrogen sourcefor improving the secretion of mouse α- amylase in *Saccharomyces cerevisiae* protease Adeficient strains.*Yeast*, 16(3), pp.207-217.
- **Chermette R., Bussieras J. 1993.** Parasitologie vétérinaire. Mycologie, Edité par le Service de Parasitologie de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Maisons-Alfort.
- **Chiba S., 1988** Amyloglycosidase. In: Handbook of Amylases and relatedenzymes (The Amylase Research Society of Japan, éd.). Pergamum Press, Oxford, U.K. pp 104-116
- **Chi M., Chen Y., Wu T., Lo H., Lin L.2005** Engineering of a truncated α- amylase of Bacillus sp. strain TS-23 for the simultaneous improvement of thermal and oxidative stabilities. J. Biosci. Bioeng.
- **Collins *S.* Diomi M., Elisavet K., Paul C. 2005.** Fungal multienzyme production on industrial by-products of the citrus-processing industry, Biotechnology Technology. (3):23–38.
- **Colman et Elliot W.H .1962** studies on alpha amylase formation by bacillus subtilis biochim .J.83 : 256- 263
- **Colman G et Grand ., M.A 1966** characteridtic of alpha amylase formation by bacillus subtilis nature london .211 : 306-307
- **Coolbear T., Daniel R.M.et Morgan H.W. 1992.** The enzymes from extreme thermophils:bacterial sources, thermostabilities and industrial relevance. Advanced biochemistry and Engineering Biotechnology. (45): 57–97.
- **Cuveillier G. F. 1999.** Réacteurs enzymatiques à enzymes libres. In Scriban R. (Ed) : Biotechnologie. Ed. Lavoisier. 401-425.

D

- **Dauter. Z., Dauter. M., Brzozowski .A.M., Christensen .S. Borchert T.V., Beier .L., Wilson K.S.et Davies G.J. 1999.** X-ray structure of Novamyl, the five-domain "maltogenic" alphaamylase from Bacillus stearothermophilus: maltose and acarbose complexes at 1.7A resolution. Biochem. (38): 8385-8392.
- **Delgado-Jarana J., Rincon A. M. et Benitez T., 2002.** Aspartyl protease from Trichoderma harzianum CECT 2413: cloning and characterization. Microbiology. (148), pp.1305-1315.
- **Dercova K., Augustin J. et Krajcova, D., 1992.** Cell growth and amylase production characteristics of Bacillus subtilis. Folia Microbiologica, 37(1), pp. 17–23.

- **Dey G., Palit S., Banerjee R. et Maiti B. 2002.** Purification and characterization of maltooligosacharides forming amylase from Bacillus circulans GR 9313. Ind. Microbiol.biotechnol. 4,193-200.
- **Diomi M., Elisavet K. et Paul C. 2008.** Fungal multienzyme production on industrial byproducts of the citrus-processing industry, Biotechnology Laboratory.Technology.
(99), pp.2373-2383.
- **Drouin M., 2005.** Etude de production de protéases alcalines par Bacillus licheniformis en utilisant des boues d'épuration municipales comme substrat. Mémoire de Maître és sciences (M.Sc.). Canada
- **Dubey A.K., Suresh C., Kavitha R., Karanth N.G., Umesh-Kumar S. 2000.** Evidence that the glucoamylase and α-amylase secreted by *Aspergillus niger*are proteolytically processed products of a precursor enzyme, *Journal of Basic Microbial* **.**471(2):251-255.

E

- **Egas M. C., Da Cota M. S., Cowman D. A. et Pieres E. M. 1998.** Extracellular α-amylase from Thermus Filiformis ork A2 : purification and biochemical characterization. Extremophiles. 2(1) : 23-32.
- **Elliot W.H .1962** studies on alpha amylase formation by bacillus subtilis biochim .J.83 : 256- 263
- **El Tayeb O., Mohammed F., Hashem A., Abdullah M. 2007** Optimization of the industrial production of bacterial alpha amyalse in Egypt. IV. Fermentor production and characterization of the enzyme of two strains of Bacillus subtilis and Bacillus amyloliquefaciens. Afr J Biotechnol. ; 7(24):4521–4536.

F

- **Feller G., Lonhienne T., Deroanne C., Libioulle C., Van beeumen J. et Gerday C. 1992.** Purification, Characterisation and nucleotide sequence of the thermolabile α-amylase from the Antarctic psychrotroph Alternomomonas haloplanctis A23. J. Biol. Chem. 267(8) : 5217-5221.
- **Fogarty W.M., Kelly C.T. 1980** Amylase, amyloglucosidase and related glucanases. In Rose (A.H.) Ed. Economic microbiology, microbial enzymes and bioconversion. London: Academic Press.5, p : 115-170.268.
- **Fogarty W. M. et kelly. C. T. 1994.** Microbial Enzymes and Biotechnology .Applied Science, London, New York. (43):71-132.

- **Fogarty W. M. et Kelly, C. T. 1999.**Microbial Enzymes and Biotechnology.Applied Science, London, New York. (43):71-132.

G

- **Galazzo Jorge L., Bailey J. E. 1990.** Purification and immobilization of dextranase,. Acta Biotechnol. 18 (1): 63-75.
- **García-Gómez M.J., Huerta-Ochoa S., Loera-Corral O., Prado-Barragán L.A. 2009.** Advantages of a proteolytic extract by Aspergillus oryzae from fish flour over a commercial proteolytic preparation. Food Chem., 112; 604–608.
- **Graber M. et Combes D. (1989).** Microbial α-amylases: Enzyme and Microbiol Technology. (2):663-687.
- **González C.F., Fariña J.I., Figueroa L.I.C. 2008.** Optimized amylolytic enzymes Production in Saccharomycopis fibuligera DSM -70554. An approach to efficient cassava starch utilization", Enzyme and Microbiol Technology. 4(**2**), pp.272-277.

H

- **Haasum I., Eriksen S. H., Jensen B. et Olsen J. 1991.** Growth and glucoamylase production by the thermophilic fungus, Thermomyces lanuginosus in a synthetic medium. Appl.Microbiol. Biotechnol., 34, pp.656–660.
- **Haq I.U., Rani S., Ashraf H. et Qadeer M.A. 2002.** Biosynthesis of alpha amylase by chemically treated mutant of Bacillus subtilis. J.Biol. Sci. 2 (**2**), pp 73-75.
- **Hart H.E., Parish M.E., Burns J.K., Wicker L. 1991.** Orange finisher-pulpe as substrat polygalacturonase production by Rhyzopus Roryzae. J. of food sciences. (55):480-83.
- **Headon, D., et Walsh, G. 1994.** The industrial production of enzymes. Biotechnology advances, (1994);12(4), 635-646.
- **Hoog S., Guarro J., Gené J ., Figueras M. 2011.** Atlas of Clinical Fungi.

I

- **Iefuji H.1996.** Chino M., Kato M. and Iimura Y. Raw – starch- digesting and thermostable α- amylase from the yeast Cryptococcus sp. S-2: Purification, characterization cloning and sequencing. Biochem. J, 318: 989-996.
- **Igarshi K., Hatada Y., Hagihara H., Saeki K., Takaiwa M., Ulmura T., Ara K., Ozaki K., Kawai S., Kobayashi T. et Ito S. 1998.** Enzymatic properties of novel liquefying amylase from an alkalophilic Bacillus isolated and entire nucleotides and aminoacids sequences .Appl. Environ. Microbiol., 64 (9), pp.3282-3289.

- **Ingle M.B et Bayer ., E.W. 1972** production of industrial enzymes by bacillus species.Devlopments industrial microbiologie 13 : 420 – 426
- **Issac S., Frankland J.C., Watling R., Whalley A.J.S. 1993.** Airworth and Bishys Dictionary of the Fungi (8 th Ed.). CAB International, Wallingford, United Kingdom. p:616.
- **Jensen B., Olsen J. et Allermann K. 1987.** Effect of media composition on the production of extracellular amylase from the thermophilic fungus, Thermomyces lanuginosus.Biotechnol. Lett., 9, pp. 313–316.

K

- **Khoo S. L., Amirul A. A., Kamaruzaman M., Nazalan N. et Azizan M. N. 1994.** Purification and characterization of α-amylase from Aspergillus flavus. Folia Microbiol. 39(5) :392-398.
- **Khoo S. L., Nazalan M. N., Razip M. S. and Azizan M. N. 1994.** Purification and properties of two forms of glucoamylase from Aspergillus niger.Folia Microbiol_ 41(2):65-74.
- **Kim O. R. 1995** Purification and characterization of extracellular amylolytic enzymes from the yeast Filobasidium Sp. Appl. Environ. Microbiol., 44(6):374-382.
- **Kumar D., Savitri., Thakur N., Verma R., Bhalla T.C. 2008b.** Microbial proteases and application as laundry detergent additive. Res. J. Microbiol., **3**(12); 661–672.
- **Kundu T., et Das S. 1970.** A thermostable a-amylase producing maltohexaose from a new isolated Bacillus sp. study of activity and molecular cloning of the corresponding gene. Enzyme and Microbial Technology. (24): 584–589.
- **Kwasniewski Isabelle., Pascal Molimard., Gilles F., Catherine V., Alain D.D., Jean-François CA., Pascale C. 2006.** Impact of solid medium composition on the conidiation in *Penicillium camemberti, Process Biochemistry*. 46(6):1318-1324.

L

Lagzouli M., Mennane Z., Aitounejjar A., el Kettani Y., Elyachoui m., Ouhssine M., BERNY E.H., Jadal M. 2007. Optimization of composition of media for the production of extracellular glucoamylase by *Candida guilliermendii*.*Pak. J. Biol. Sci*., 10(19):3322-3329.

- **Leveau S. B. et Bouix M**. **1993.** Les microorganismes d'intérêt industriel. Lavoisier Apria. P. 110-163.
- **Liese A., Seelbach S., Wandrey C. et Wileyu VCH. 2000.** Industrial biotransforrmations.

- **Lim J.S., et Park S.W. 2005.** Immobilization of *Penicillium citrinum* by Entrapping Cells in Calcium Alginate for the Production of Neo-Fructooligo saccharides. Journal of Microbiology and Biotechnology. 15(6): 17-22.
- **Lin L. L., Hsu W. H et Chu W. S. 1998**. A gene encoding for an α-amylase from thermophilic Bacillus sp. strain TS-23 and its expression in Escherichia coli. J Appl Microbiol.82,
- **Lo H.F., Lin L.L., Chen H.L., Hsu H.H., Chang C.T. 2001.** Enzymatic properties of a SDSresistant Bacillus sp. TS-23 A- amylase produced by recombinant Escherichia coli. Process Biochemistry. (36):743-750.
- **Lucio de Souza E., Erika M. E. H., Castilho V. M., Delima A., Bellini M. Z., Cruz D. etCruz Z. R. 1996.** Purification and characterization of α-amylase from Rhizopus sp. Arq. Biol.Technol. 39 (4), 831-839

M

- **Magee RJ ., Kosaric N. 1987** The microbial production of 2,3-butanediol. Adv Appl Microbiol. ; 32:89 – 161. doi: 10.1016/S0065-2164(08)700790.
- **Mahmoud A.U et Greenman J et Scragg A.I.I. 1998.** Orange and potato peel extracts.Analysis and use as Bacillus substrat for the production of extracellular enzymes in continuous culture.Enzyme and Microbial Technology.22 (2): 130-37.
- **Malhotra R., Noorwez S. M., Satyanarayana T. 2002.** Production and partial characterization of thermostable and calcium-independent α- amylase of an extreme thermophile Bacillus thermooleovorans NP54. Lett. Appl. Microbiol, 31(5):378-384.
- **Mamo G., Gessesse A. 1999**. Purification and characterization of two raw-starch-digesting thermostable a-amylase from a thermophilic Bacillus. Enzyme and Microbial Technology. (25): 433-438.
- **Martin M.T., Plou F.J., Alcade M., Ballasteros A. 2003.** Immobilization on Eupergit C of cyclodextrin glucosyltansferase (CGTase) and properties of immobilized biocatalyst, J. Mol. Catal. (21):299-308.
- **Mazen A., Abdel if A., Yves P. 2002.** Carbon and nitrogen substrates consumption, ammonia release and proton transfer in relation with growth of *Geotrichum candidum* and *Penicillium camembert*i on a solid medium, J. of Biotechnology. (95): 99-108.
- **MC Tigue, Kelley C.T., Doyle E.M.et Fogarty W.M. 1995.** The alkaline amylase of the alkalophilic Bacillus sp. IMD 370. Enzyme and Microbial Technology. (17):570-573.

- **Mercier C. 1985.** Les enzymes amylolytiques. In : Mouranche A. Coste C. hydrolases et dépolymérases. Ed Gauthier-Villars., pp.110-140. Moulin G et Glazy P., 1978- Z. Allg. Mikrobiol. 18, p : 269- 274.
- **Moraes L.M.P., Filho S.A., Ulhoa C.J. 1997** Purification and some properties of an α-amylase glucoamylase fusion protein from Saccharomyces cerevisiae. World J. Microbiol. Biotechnol. ; 15:561–564.

N

- **Nadirman H. et Yoshiyuki O. 2006.** Mechanism of Hydrolysis of the Treated Starch Granules by Raw Starch Digesting Amylase from Penicillium brunneum, Journal Starch Starke, (7): 25-28.
- **Nelson P.E., Toussoun T.A., Marasas W.F.O.1983.** Fusarium species: an illustrated manual for identification. Pennsylvania state Univ. Editor.
- **Nguyen Q.D., Rezessy-szab J.M. et Hoschke D. 2000.** Optimisation of composition of media for the production of amylolytic enzymes by Thermomyces lanuginosus ATCC 34626. Food Technol. Biotechnol. 38 (3), pp.229-234.
- **Niehaus F., Bertoldo C., Kahler M. et Antranikian G. 1999.** Extremophiles as a ource of novel enzymes for industrial application. Applied Microbiology and Biotechnology. (50), pp.711-729.
- **Nielsen J. E et Borchet T. V. 2000**. Biochim. Biophys. Acta. 1543, p: 253-274.
- **Nigam P. et Singh D., 1995.** Enzymes and microbial systems involved in starch processing. Enzyme Microb. Technol. 17 (9), pp.770-778.
- **Nouadri T. 2011-** L'α-amylase de Penicillium camemberti PL21: Production, Purification, Caractérisation et Immobilisation. Diplôme de Doctorat. Université Mentouri, Constantine (125.143) p.
- **Nustrat A., Rahman SR. 2007**. Comparative studies on the production of Extracellular α-amylase by three mesophilic Bacillus isolates. Bangladesh J Microbiol. 2007 ; 24 (2) : 129 – 132.

O

- **Olasupo M., Wisbeck E., Hoch I., Jonas R. 1996.** Production of glucose-fructose oxidoreductase and ethanol by Pseudomonas ATCC29191 in medium containing C.S.L. as source of vitamins Appl. Microbiol. Biotech. (55):116-122.

P

- **Panchal C. 1990.**Yeast strain selection. Marcel Dekker (ed.) USA. 189p.

- **Pandey A., Nigam P., Soccol C.R., Soccol V. T., Singh D. et Mohan R. 2000.** Advances In. Microbial amylases. Biotechnology. Appl. Biochem. (31), pp.135-152.
- **Pandey A., Nigam P., Soccol V.T., Singh D et Mohan R. 2000.** Production and characterisation of fungal amylase enzyme isolated from Aspergillus sp. JGI12 in solid stateculture. African Journal of Biotechnology., 6(5), p: 576-581.
- **Pascal B. et Thomas-Jeffries W. 1990.** Selective Production of Extracellular Peroxidases from chrysosporium in an Airlift Bioreactor, Journal of fermentation and Bioengineering. 70 (3), pp.158-163.
- **Pelmont J. 1995.** Enzymes : catalyseurs du monde vivant. Presse Universitaire de Grenoble. pp. 7; 621; 652–654.
- **Planchot, V., Colonna, P. 1995.** Purification and characterization of extracellular alphaamylase from Aspergillus fumigatus.Carbohydrate Research, (1): 97-109.
- **Promita D ., Saimon Ahmad T., Kaniz M., Palash Kumar et SM Abu saym .2013** ; Production and partial caracterization of extracellular amylase enzyme from bacillus amyloliquefaciens.

R

- **Rajagopalan G., Krishnan C. 2008**. Alpha-amylase production from catabolite derepressed *Bacillus subtilis* KCC103 utilizing sugarcane bagasse hydrolysate. Bioresour Technol. ; 99:3044–3050.
- **Rao M.B., Tanksale A.M., Ghatge M.S., Deshpande V.V. 1998.** Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. Microbiol. Mol. Biol. Rev., 62; 597–635.
- **Ray R. R. 2001.** Production of α-amylase and xylanase by an alkalophilic strain of Penicillium griseoroseum RR-99Acta Microbio. Pol., 50(3-4) : 305-309.
- **Roquebert M.F. 1998.** Taxonomie des moisissures ; Méthodes de culture et techniques d'observation ; Identification", in "Moisissures des aliments peu hydratés", Ed. Tec & Doc, 39-95.
- **Ruohonen L., Penttilä M. et Keränen S. 1991.** Optimisation of Bacillus α-amylaseproduction by Saccharomyces Cerevisiae. Biotechnol. 7(4) : 337-346.

S

- **Savcheko A., Vieille C., Kang S. et Zeikus J-C. 2002.** Pyrococcus -amylase is stabilised by calcium and zinc .Department of biochemistry and molecular biology. University east Lausing, pp.111-123.

- **Schomburg D et Salzmann M. 1991.** Enzyme Hand book 4. Classe 3: Hydrolases Springer-Verlag (ed). Berlin Heidelberg. Germany. p: 1-12.cité par Benaouida K. 2008.
- **Scriban S. 1993.** Biotechnologie 4eme edition .Techniques et Documentation Lavoisier. Paris; p. 225-250.
- **Scriban R. 1999.** Biotechnologie. 5ème édition. Techniques et Documentation – Lavoisier (éd.). p : 401-409.
- **Siso M.I., Murado. M.A, Franco. J.M, Miro N.J., Gonzalez .M.P. 1998.** Micro fungus yeast mixed cultures in the degradation of amylaceous wastes: Interactions affecting amylolytic activity .Biotechnology Letters. (10)6:431-436.
- **Srinivasa Rao M., Reddy G., Venkateswara Rao G et Sambasiva Rao K. R.S. 2004.** Studies on the extraction and characterisation of thermostable -amylase from pericarp of Borassus indica. Afirican Journal of Biotechnology. (4), pp.289-291.
- **Summerbell RC., Schroers H-J. 2002 .**Analysis of phylogenetic relationship of Cylindrocarpon lichenicola and Acremonium falciforme to the Fusarium solani species complex and a review of similarities in the spectrum of opportunistic infections caused by these fungi. J. Clin. Microbiol;40(8):2866‑ 2875.

T

- **Tivoli b., 1988-**guide d'identification des différentes espèces ou variétés de fusarium Rencontrées en france sur la pomme de terre et dans son environnement agronomie, 8 (3) ; pp 211-222.

U

- **Ülger C. et Çurakoğ Ç. 2001**.α-amylase production by Bacillus Subtilis and B.amyloliquefaciens in different PEG solution. W. J. Microbiol. Biotechnol. 17, 93-94.
- **Urbanek H., Yirdaw G. (1984).** Hydrolytic ability of acid protease of Fusarium culmorum and its possible role in phytopathogenesis. Acta Microbiol. Pol. 33 (2): 131.
- **Uriyo, M., et Eigel, W. E., 1999.** Duration of kilning treatment on α-amylase, β-Amylase andendo-(1, 3) (1, 4)-β-D-glucanases activity of malted sorghum (Sorghum bicolor). Process Biochemistry, 35, pp.433– 436.

V

- **Van Der Maarel MJ ., Van der Veen B., Uitdehaag J.C.M., Leemhuis H. et Dijkhuizen L. 2002.** Properties and applications of starch converting enzymes of alpha amylase family. Biotechnol; 94.

- **Vallier, P., Bata, J. et Colabert, L. 1977.** Optimal conditions of α- amylase Production by *Aspergillus oryzae* in liquid media. Annals of Microbiology (Paris), 128(3), pp.359–371.
- **Vincent M. 1996.** Blood glucose: Its measurement and clinical importance. Clinica Chimica
- **Vukelié B., Ritonja A., Renko M., Pokorny M., Vitale L. J. 1992.** Extracellular α-amylase fromStreptomyces rimosus. Appl. Microbiol. Biotechnol. 37 : 202-204.

W

- **Wallach J. (1997).** Les enzymes. Sciences 128. Editions Nathan. 7-9.
- **Werner ., J bauer ., et Rphael badoud ., Entournand .2010** science et technologie Des aliments 2010.ISBN 978.288.074754.p

Y

- **Yang C. H., Liu W. H. 2004.** Purification and properties of a maltotriose Producing α-amylase from Thermobifida *fusca*. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, (2-3): 254-260.
- **Yihan L., Fuping L., Guanqun C., Crystal L., Snyder J., Sun Yu L., Jianling W., Jing X. 2010.** High-level expression, purification and characterization of a recombinant mediumtemperature a-amylase from Bacillus subtilis. Biotechnology Lett. (32):119–124.

Annexe

Annexe 1. Milieu PDA (Potato Dextrose Agar) (Guiraud ,1998)

- **Préparation de l'extrait de pomme de terre**

Composition du milieu PDA :

- ✓ Pomme de terre ……..200g
- ✓ Saccharose ……..10g
- ✓ Agar ……15g
- ✓ Eau distillée ……...1000ml

200g de pomme de terre non pôles, laves et coupes en petites morceaux; mis en suite dans 300 ml d'eau distillé ,Puis portés à l'ébullition pendant 20 à 25 min ,Ils sont enfin écrasés et le volume est complété à 300ml litre de l'eau distillé puis L'agar et le saccharose sont dissous à chaud dans l'extrait de pomme de terre puis le volume est complété à un litre d'eau distillée. On laisse sur la plaque chauffante le mélange jusqu'à dissolution des produits Le pH est ajusté à 5 puis stérilise à 110 c° pendant 30 min.

Enfin le milieu est ainsi prêt à être coulé sue boites de pétri dans les conditions d'asepsie (Larpent, 1997).



Figure 33. *Préparation du milieu PDA*

Annexe 2. Tampon phosphate

$Na_2 H PO_4$ …...……...…….....…1g/1000ml d'eau distillée.

On à Le pH ajusté est 6,5.

Annexe 3. Principe de dosage par méthode enzymatique

La glucose-oxydase (GOD) catalyses l'oxydation du β-D-glucose en acide gluconique selon la réaction suivante:

$$\beta\text{-D-Glucose} + O_2 + H_2O \xrightarrow{GOD} \text{acide gluconique} + H_2O_2$$

Dans une deuxième réaction indicatrice, le peroxyde d'hydrogène formé réagit en suite en présence de peroxydase (POD) avec un chromogène pour donner un produit coloré, la quinonéimine qui absorbe à 505 nm.

$$2\ H_2O_2 + \text{amino-4-antipyrine} + \text{phénol} \xrightarrow{POD} \text{quinonéimine} + 4\ H_2C$$

- **Dosage du glucose**

Le dosage du glucose sera réalisé directement dans une série de microcuves spectrophotométriques, selon le protocole suivant:

- 10 µL de solution glucosée (étalons ou échantillons à doser)
- 1000 µL de réactif RTU®.
- Incuber 10 minutes à 37°C ou 20 minutes à 20-25°C
- Lire l'absorbance contre un blanc réactif à 505 nm.

Annexe 4. Dosage d'albumine

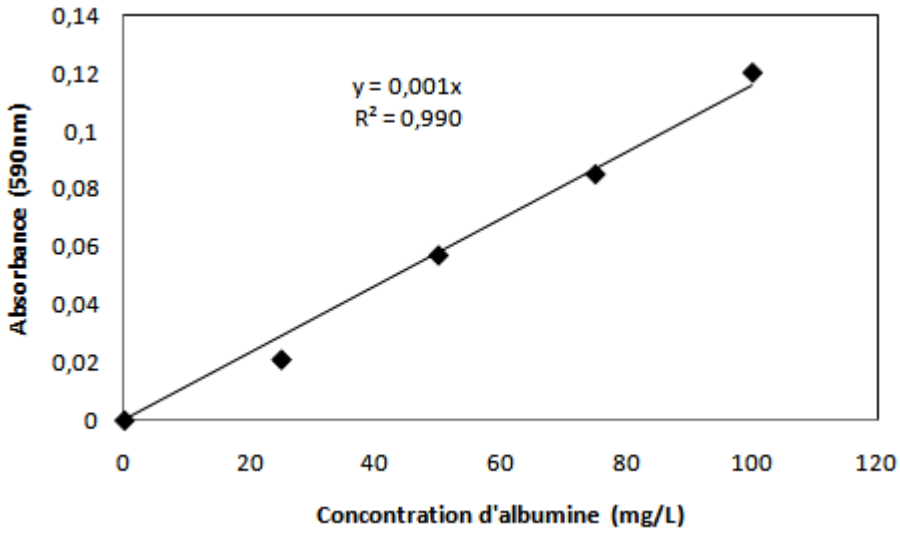


Figure 34. *Gamme étalon de l'absorbance en fonction de la concentration d'albumine*

Annexe 5. Dénombrement des spores

La souche de *Fusarium sp* est ensemencée sur 40 ml du milieu PDA. Après incubation de 6 à 12 jours à 25°C, les spores sont récupérées dans 50 ml d'eau distillée stérile par agitation. Le dénombrement des spores se fait par le comptage sur une cellule de Thoma (0.1mm, 1/400mm^2), l'observation optique a permis le dénombrement des spores. Une gamme de 1 x 10^5 à 8 x 10^5 spores/ml est établie pour un courbe étalon des spores. La densité optique des suspensions de spores est déterminée à 280 nm.

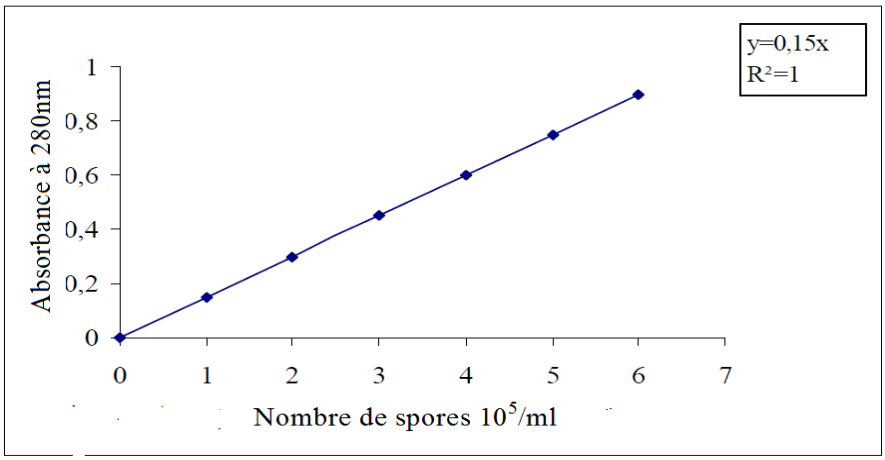


Figure 35. *Gamme étalon de l'absorbance en fonction de nombre de spores.*