



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique

Université des frères Mentouri Constantine
Faculté des Sciences de la Nature et de Vie

جامعة الإخوة منتوري قسنطينة
كلية علوم الطبيعة والحياة

قسم الميكروبيولوجيا

Département de Microbiologie

Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de Vie

Option : Biotechnologie des mycètes /fermentation et production de substances fongiques

Intitulé

Production de l'alpha amylase par certaines souches fongiques sur différents substrats

Présenté et soutenu par : KOLLI Narimane

ZATOUT Rokaya

Jury d'évaluation :

Président du jury : Mr.KACEM CHAOUCHE N

(Prof. UFM Constantine).

Rapporteur : Melle.KARA ALI M

(Dr. UFM Constantine).

Examineur : Melle. BEN SAREDJ W

(Dr. UFM Constantine).

Année Universitaire

2014-2015

Remerciement

On remercie dieu le tout puissant de nous avoir donné la santé et la volonté d'entamer et de terminer ce mémoire.

Tout d'abord, ce travail ne serait pas aussi riche et n'aurait pas pu avoir le jour sans l'aide et l'encadrement de Mme KARA ALI MOUNIRA, on vous remercie pour la qualité de votre encadrement exceptionnel, pour ta patience, ta rigueur et ta disponibilité durant notre préparation de ce mémoire.

*Notre remerciement s'adresse à tous les doctorants du laboratoire **LaMyBAM** pour son aide pratique et son soutien moral et ses encouragements.*

Nous sommes conscientes de l'honneur que nous a fait Mr KACEM CHOUECHE N en étant président du jury et Melle BENSERADJ W d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Nos remerciement s'adresse également à tout nos professeurs pour leurs générosités et la grande patience dont ils ont su faire preuve malgré leurs charges académiques et professionnelles.

Nos profonds remerciements vont également à toutes les personnes qui nous ont aidés et soutenue de près ou de loin principalement.

Table des matières

1- Introduction.....	1
2- Revue bibliographique.....	2
2.1- les enzymes	2
2.1.1- Généralité.....	2
2.1.2- Classification des enzymes.....	4
2.1.3- Marché des enzymes	4
2.2- L'alpha -amylase	4
2.2.1- Définition	4
2.2.2- Nomenclature.....	5
2.2.3- Caractéristiques et propriétés des alpha- amylases.....	5
2.2.4- Les différentes sources et origines de l'alpha-amylase	6
2.2.4.1- L'origine animale.....	6
2.2.4.2 L'origine végétale.....	7
2.2.4.3 L'origine microbienne.....	7
2.2.5- Mécanisme d'action	9
2.2.6- Production d'alpha-amylase	9
2.2.7- Applications industrielles	10
2.3- Les champignons	11
2.3.1- Les moisissures.....	11
2.3.1.1- Généralités.....	11
2.3.1.2- Croissance	12
2.3.1.3- Conditions de croissance.....	12
2.3.2- <i>Alternaria</i>	13
2.3.2.1- Définition	13
2.3.2.2- Aspect macroscopique d' <i>Alternaria</i>	13
2.3.2.3- Aspect microscopique d' <i>Alternaria</i>	13

2.3.2.4- Habitat.....	14
2.3.2.5-Classification taxonomique	14
2.4 - Déchets Agricoles.....	14
2.4.1- Déchets d'orange.....	15
2.4.2- Déchet de pomme de terre.....	16
3- Matériels et méthodes.....	18
3.1- Echantillonnage.....	18
3.2- Isolement des souches fongiques.....	19
3.1.1- Dilutions.....	19
3.1.2- Ensemencement	20
3.3- Purification des souches fongiques.....	20
3.3.1- Purification des moisissures.....	20
3.3.2- Purification des levures	20
3.4 - Sélection d'une souche à activité amylasique.....	20
3.5- Identification de l'isolat fongique sélection.....	21
3.5.1- Observation macroscopique.....	21
3.5.2- Observation microscopique.....	21
3.6- Production d' α -amylase	22
3.6.1- Préparation des milieux de fermentation	22
3.6.1.1- Préparation du milieu de fermentation à base de déchets d'oranges....	22
3.6.1.2-Préparation du milieu de fermentation à base de pelure de pomme de terre	22
3.6.2- Inoculation	23
3.7- Méthode analytique.....	23
3.7.1- Extraction de l'enzyme à partir des milieux solides SSF.....	23

3.7.2- Détermination de l'activité amylasique.....	24
4-Résultats.....	25
4.1- Isolement des souches fongiques.....	25
4.2- Sélection de souches amylolytiques	28
4.3- Identification de la souche amylolytique BD9.....	30
4.3.1- Identification macroscopique.....	30
4.3.2- Identification microscopique.....	30
4.4- Etude de l'activité amylolytique de l'isolat	31
4.4.1- Fermentation solide (SSF).....	31
4.4.1.1- Cinétique de la production de l'alpha amylase par <i>Alternaria alternata</i> sur milieu à base de déchet d'orange.....	32
4.4.1.2- Cinétique de la production de l'alpha amylase par <i>Alternaria alternata</i> sur milieu à base de déchet de pomme de terre.....	32
Discussion	34
Conclusion	36
Abstract.....	37
المخلص.....	38
Références bibliographique.....	39

Annexe

Liste des figures

Figure 1 Représentation schématique de la structure primaire d'une protéine.....	2
Figure 2 Représentation schématique de la structure secondaire d'une protéine.....	2
Figure 3 Représentation schématique de la structure tertiaire d'une protéine.....	3
Figure 4 Représentation schématique de la structure quaternaire d'une protéine.....	3
Figure 5 Mécanisme catalytique des hydrolases glycosyliques.....	9
Figure 6 Aspect macroscopique d' <i>Alternaria</i>	13
Figure 7 Aspect microscopique d' <i>Alternaria</i>	14
Figure 8 Coupe longitudinale et schéma descriptif de l'orange.....	15
Figure 9 Coupe longitudinale d'un tubercule de pomme de terre.....	17
Figure 10 composition chimique d'un tubercule de pomme de terre.....	17
Figure 11 Localisation géographique des régions d'échantillonnages.	18
Figure 12 Site d'échantillonnages d' Ouargla.....	19
Figure 13 Site d'échantillonnages de Biskra.....	19
Figure 14 Milieu de fermentation à base de déchets d'oranges.....	22
Figure 15 Milieu de fermentation à base de pelures de pommes de terre.....	23
Figure 16 Aspect macroscopique et cultural de la souche BD9.....	30
Figure 17 Aspect microscopique de la souche BD9 (Grossissement x 100) après 5 jours de croissance à 28°C sur milieu PDA	31
Figure 18 Cinétique de la Production de l'alpha amylase par <i>Alternaria alternata</i> sur milieu à base de déchet d'orange.....	32
Figure 19 Evaluation de l'activité amylolytique développée <i>Alternaria Altenata</i> sur milieu à base de déchet de pomme de terre.....	33

Liste des tableaux

Tableau 1 Classification des enzymes	4
Tableau 2 Les différentes origines de l' L'alpha -amylase microbienne.....	8
Tableau 3 Différents application des alpha-amylases.....	11
Tableau 4 Les Isolats fongiques obtenus à partir des échantillons de sol de différente régions.....	25
Tableau 5 Test de sélection des isolats fongiques amylolytiques.....	28

Introduction

1- Introduction

Le marché mondial des enzymes est représenté par 80% des hydrolases, particulièrement les amylases et les protéases (Morvan ,2010). Les α -amylases sont parmi les plus importantes enzymes à l'échelle industrielle, ce qui les rendent l'un des outils-clés des biotechnologies (Little, 2004).

Les amylases, proviennent de différentes sources (plantes, animaux et microorganismes), cependant celles d'origine microbienne sont les plus utilisées industriellement (Burhan *et al.*, 2003).

La culture des champignons pour la production d'enzymes s'effectue soit sur substrat solide, soit en culture submergée comme c'est le cas pour la production de la plupart des métabolites d'origine microbienne. Au cours des trente dernières années, un nombre important de ces fermentations est réalisé sur des déchets agroalimentaires pour produire principalement des hydrolases. Le recyclage des résidus agro-alimentaires tels que le lactosérum, les déchets d'oranges, le corn steep liquor...etc, contribue, d'une part à réduire la pollution de l'environnement et d'autre part, à produire par le biais des biotechnologies, des métabolites à haute valeur ajoutée, en particulier des enzymes. Différentes recherches ont été menées pour valoriser les déchets industriels pour une utilisation en tant que source de carbone. Parmi ces travaux, citons la production de pectinase (Fonseca *et al.*, 1994), la production d'alpha-amylase (Djekrif, Dakhmouche *et al.*, 2006), la production de polygalacturonase (Hart *et al.*, 1991), la production des protéases (Nouadri *et al.*, 2005), et la production de single cell proteine (Naomici *et al.*, 1981).

La détermination des conditions optimales d'inoculation de producteur microbien et la composition du milieu nutritif est préalable pour atteindre une haute activité enzymatique (Adamsen A.K *et al.*, 1995 ; Bocchini *et al.*,2002) .

L'objectif principal de ce travail est :

- 1- L'isolement et la purification des souches fongiques à partir des différents échantillons.
- 2- La sélection et l'identification de la souche fongique amylolytique.
- 3- La production de l'alpha amylases par la souche amylolytique sélectionnée sur milieu à base de déchet d'orange et sur milieu à base de pomme de terre.

Revue
Bibliographique

2- Revue bibliographique

2.1- Les enzymes

2.1.1- Généralités

Les enzymes sont des macromolécules de nature protéique. 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. Les enzymes sont donc des polypeptides de masses moléculaires élevées entre 10 à 1 000 kDa dans lequel sont arrangés les acides aminés, constitue ce que l'on appelle la structure primaire des protéines (Vincent, 1996) (figure 1).

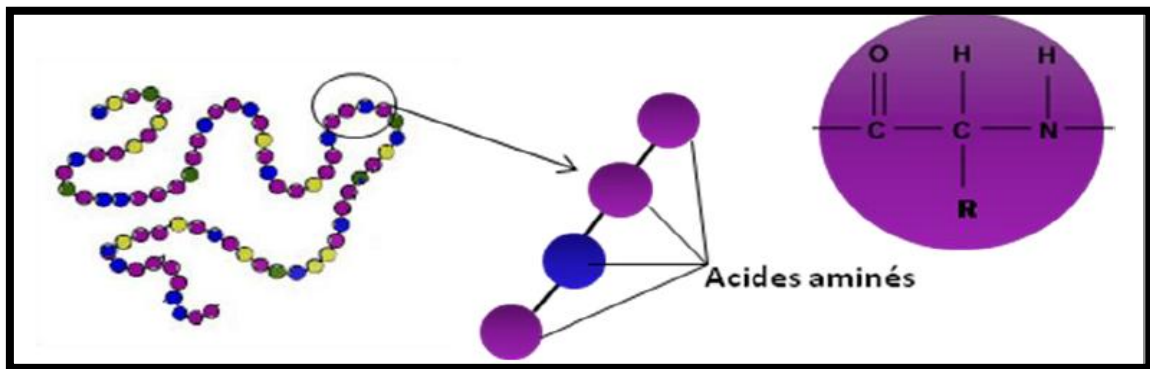


Figure 1 Représentation schématique de la structure primaire d'une protéine (Vincent, 1996).

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 (figure 2), cette structure est stabilisée grâce à la génération de liaisons hydrogènes.

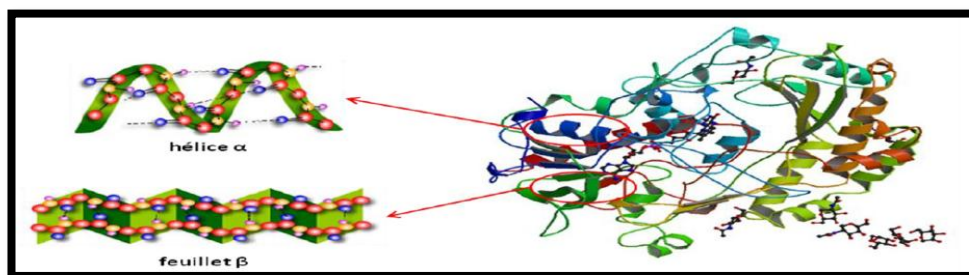


Figure 2 Représentation schématique de la structure secondaire d'une protéine (Vincent, 1996).

L'arrangement de ces structures secondaires les unes par rapport aux autres forme une structure tertiaire qui, elle, sera stabilisée par des ponts disulfures (figure 3).

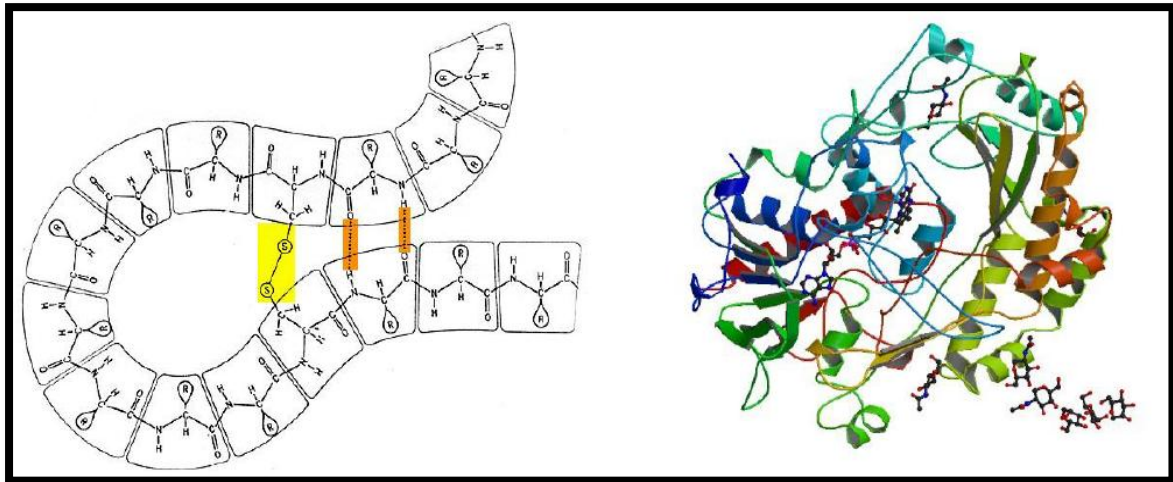


Figure 3 Représentation schématique de la structure tertiaire d'une protéine (Vincent ,1996).

Une structure quaternaire peut même être décrite pour les très grosses enzymes (figure 4). Cette structure tridimensionnelle de l'enzyme lui donnera sa spécificité permettant à celle-ci de reconnaître un substrat en particulier *via* une région distincte de l'enzyme, appelée le site actif.

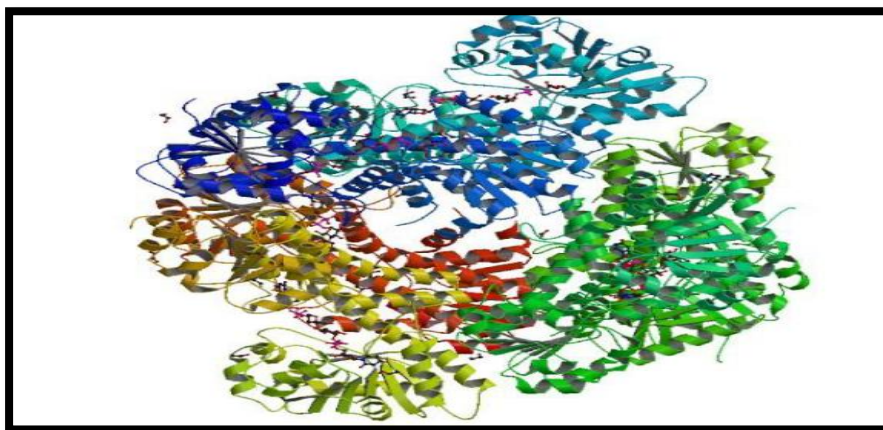


Figure 4 Représentation schématique de la structure quaternaire d'une protéine (Vincent, 1996).

2.1.2- Classification des enzymes

Le pouvoir catalytique des enzymes permet de produire de nouvelles substances et de l'énergie, indispensables au bon fonctionnement des organismes vivants. C'est en fonction de leur activité catalytique que celles-ci sont classées. Une nomenclature a été proposée par la commission des enzymes de l'union internationale de biochimie divisant les enzymes en six grandes classes (Vincent, 1996). (Tableau 1).

Tableau 1 Classification des enzymes (Vincent, 1996).

E.C (classe)	Classification	Type de réaction catalysée
E.C.1	Oxydoréductases	Oxydo-réduction
E.C.2	Transférases	Transfert de groupements fonctionnels
E.C.3	Hydrolases	Hydrolyse
E.C.4	Lyases	Elimination de groupement et formation de double liaisons
E.C.5	Isomérases	Isomérisation
E.C.6	Ligases	Formation de liaisons couplées à l'hydrolyse de l'ATP

2.1.3- 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. 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). Suivi par les alpha -amylases qui sont les plus commercialisées à cause de la diversité de leur application (amidonnerie, glucoserie, brasserie) (Pandey *et al.*, 2000).

2.2- L'alpha -amylase

2.2.1- Définition

L'alpha amylase est une enzyme ubiquitaire, synthétisée dans tous les genres de la vie (Janecek 1994, 1997). Elle appartient à la famille des glycosides hydrolases nommée GH13 ; regroupant maintenant plus de 1700 enzymes (Coutinho et Henrissat, 1999).

Elle hydrolyse, les liaisons osidiques de l'amylose, de l'amylopéctine, de l'amidon, du glycogène et d'autres polysaccharides contenant plus de trois liaisons α (1,4) D-Glucose (Keating *et al.*, 1998 ; Dauter *et al.*, 1999 ; Franco *et al.*, 2000). En effet, elle attaque les chaînes de l'amylose en coupant les liaisons α (1,4) tous les 6 glucoses, maltose et surtout d' α -dextrines (Franco *et al.*, 2000).

2.2.2- Nomenclature

- **Nom codifié :** EC 3.2.1.1
- **Nom commun :** alpha -amylase
- **D'autres nom (s):** glycogénase, α -amylase; endoamylase; Taka-amylase A, maxilase.
- **Nom systématique:** 1,4 – alpha -D-glucane-4-glucano hydrolase (Schamburg et Slzmann, 1991 ; Brozowski et Davies, 1997 ; Dauter *et al.*, 1999).

2.2.3- Caractéristiques et propriétés des alpha- amylases

2.2.3.1- Poids moléculaire

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 et Salzmann, 1991). Celui des α - amylases levuriennes, s'échelonne entre 40.000 et 70.000 daltons (Panchal, 1990).

2.2.3.2- Température optimum

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'alpha amylase bactérienne est réputé pour sa grande thermostabilité, 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'optimum de l'alpha amylase fongiques se situe entre 50°C et 70°C (Sicard, 1982 ; Panchal, 1990).

2.2.3.3- pH optimum

L'alpha -amylase est très sensible au pH. Par conséquent, le choix du pH optimum est très essentiel pour la production de cette enzyme (McMahon *et al.*, 1999). Selon

Kindle, (1983), l'optimum d'activité peut être obtenu à des pH compris entre 4 et 8. Les α -amylases bactériennes, ont un optimum supérieur à la neutralité, alors que les fongiques, ont des pH optimum compris entre 4 et 6 (Larpent *et al.*, 1992). Pour les levures, l'enzyme requiert selon les espèces des pH entre 4 et 6 (Panchal, 1990 Avwioroko, 2015).

2.2.3.4- Effecteurs

Toutes les L'alpha amylases, exigent la liaison à au moins un ion calcium, pour le maintien de leur intégrité et leur stabilité structurale (Vallee *et al.*, 1959, Steer et Levitzki, 1973). Cependant, à une concentration supérieure à 20mM, le calcium devient inhibiteur (Boel *et al.*, 1990).

2.2.3.5- Spécificité du substrat

Le substrat naturel de l' L'alpha -amylase est l'amidon (Pandey *et al.*, 2000 ; Alais *et al.*, 2008). Dans la molécule d'amidon, les unités de glucose sont reliées par des liaisons osidiques α (1- 4) en formant ainsi des chaînes hélicoïdales d'amylose, sur lesquelles de courtes chaînes de même constitution se branchent par des liaisons osidiques α (1-6) (Mercier, 1985). La production d' α -amylase par certaines souches fongiques (*Aspergillus* sp., *Rhizopus* sp. Et *Penicilium* sp.) est contrôlée par l'amidon; il s'agit d'une induction de l'enzyme par son substrat naturel (Leveau et Bouix, 1993; Nouadri 2011).

2.2.4- Les différentes sources et origines de l'alpha-amylase

Les alpha-amylases sont abondantes dans tous les règnes, elles ont été isolées par extraction à partir des tissus végétaux et animaux ou par fermentation par des cellules microbiennes (Haq *et al.*, 2003 et Srinivasa Rao *et al.*, 2004).

2.2.4.1- L'origine animale

Les amylases d'origine animale sont généralement extraites à partir de la salive et du pancréas des mammifères (French, 1975). Les L'alpha -amylase animales sont

incapables d'hydrolyser la liaison α (1 \rightarrow 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).

2.2.4.2- L'origine végétale

Les L'alpha-amylases végétales possèdent une importance primordiale dans le métabolisme glucidique où elles participent à la conversion de l'amidon en le réduisant en sucres réducteurs qui sont la source énergétique nécessaire à la germination et elles sont généralement incapable d'hydrolyser le maltose (Octávio *et al.*, 2000). Ces enzymes végétales sont synthétisées par un mécanisme cellulaire compliqué, 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 al.*, 1993).

2.2.4.3- L'origine microbienne

- ***L'alpha -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 α (1 \rightarrow 4) (Nadirman *et al.*, 2006).

- ***L'alpha -amylase fongique***

La production industrielle d'enzymes à partir des microorganismes fongiques existe

depuis longtemps du fait que la première production de L'alpha-amylase a été réussie par Takamine en 1894. Les producteurs principaux de l'alpha-amylase sont les moisissures des genres *Aspergillus* et *Rhizopus* (tableau 2) En plus des moisissures, les levures participent également à la production de l'alpha- amylase (Bouix et Leveau, 1999) (tableau 2).

Tableau 2 Les différentes origines de l' L'alpha -amylase microbienne.

Enzymes microbiennes	Références
Bactéries	
<i>Bacillus licheniformis</i>	(Kandra <i>et al.</i> , 2002).
<i>Bacillus steorothermophilus</i>	(Dauter <i>et al.</i> , 1999).
<i>Bacills circulans</i>	(Dey <i>et al.</i> , 2002).
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	(Uiger et çurakoglu ,2001).
<i>Bacills coagulans</i>	(Babu et Satyanaray, 1993).
<i>Thermomonospora fuska</i>	(Bush et Stutzenberger,1997).
<i>Alteromonas haloplinktis</i>	(Feller <i>et al.</i> , 1992).
<i>Termus filiformis</i>	(Egas <i>et al.</i> , 1998).
<i>Streptomyces rimosus</i>	(Vukelié <i>et al.</i> , 1992).
Moisissure	
<i>Aspergillus oryzae</i>	(Agger <i>et al.</i> ,1998).
<i>Aspergillus niger</i>	(Botton <i>et al.</i> , 1990).
<i>Aspergillus flavus</i>	(Aidoo <i>et al.</i> ,1981 ; Khoo, 1994 ; Abou Zeid, 1997).
<i>Aspergillus sojae</i>	
<i>Rhizopus oryzae</i>	(Lucio <i>et al.</i> , 1996 ; Cuveillier, 1999).
<i>Rhizopus sp.</i>	(Socol <i>et al.</i> , 1994 ; Cuveillier, 1991).
<i>Penicillium griseoroseum</i>	(Ray, 2001).
Levure	
<i>Saccharmyces cerevisiae</i>	(Ruohonen <i>et al.</i> , 1991 ; Wang et Kuo, 2001).
<i>Canadida</i>	
<i>Pichia</i>	
<i>Endomycopsis</i>	(Bouix et Leveau, 1999).
<i>Lipomyces</i>	

2.2.5- Mécanisme d'action

L'activité catalytique de l'enzyme implique la participation des trois acides aminés du site actif : Asp 231 (nucléophile catalytique), Glu 261 (donneur catalytique de l'hydrogène) et Asp 328 (l'aide de catalyse) (Mc carter et Withers, 1996 et Uitdehaag *et al.*, 1999). En effet, la réaction catalytique est réalisée en trois étapes (figure 5) :

- 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 .
- Activation d'une molécule d'eau, vrai semblablement par le maintien du Glu 261 déprotonné .
- Régénération de l'état initial et libération de l'autre fragment du substrat, par hydrolyse du lien covalent entre l'oxygène nucléophile de l'Asp 231 et le C1 de résidu du sucre en position 1 (Davies *et al.*, 1999 ; Nielson *et al.*, 2001).

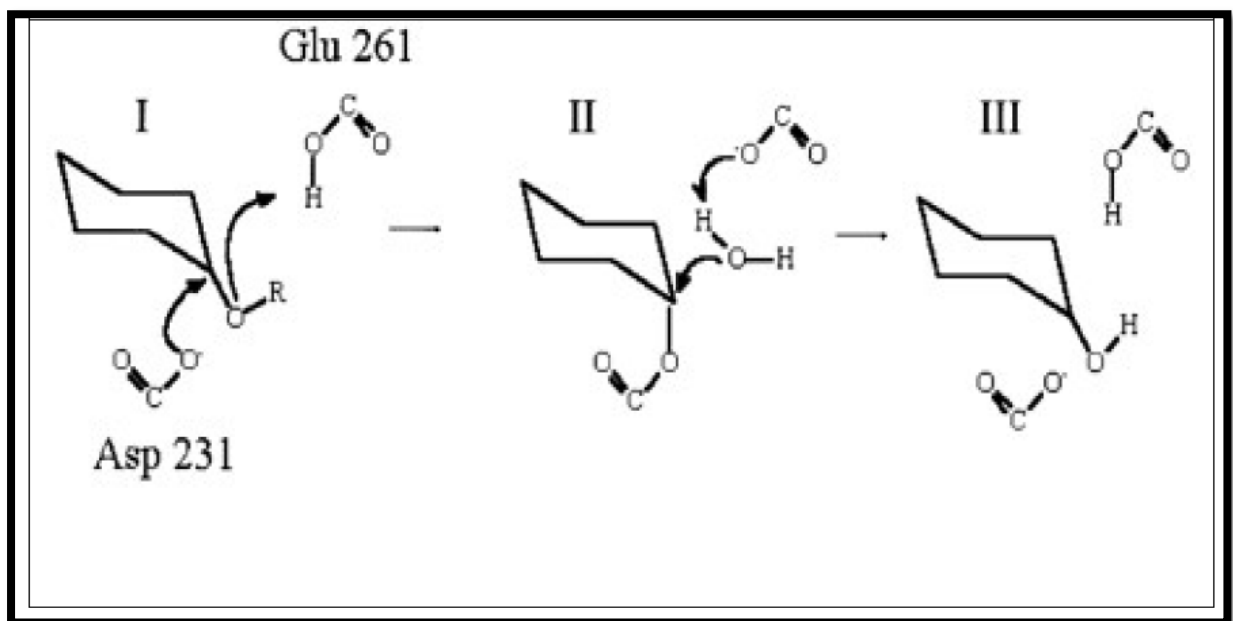


Figure 5 Mécanisme catalytique des hydrolases glycosyliques (Nielsen *et al.*, 2001).

2.2.6- Production d'alpha-amylase

Plusieurs auteurs travaillent au criblage des microorganismes pour la production d'enzymes, l'isolement et la production des alpha-amylases extracellulaires (Jensen *et*

al., 1987 ; Haasum *et al.*, 1991), ainsi que la purification et la caractérisation de ces dernières (Nguyen *et al.* 2000). Des alpha-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'alpha-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 (Diomi *et al.*, 2008 ; Mahmoud *et al.*, 1998 ; Hart *et al.*,1991), 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).

2.2.7- Applications industrielles

Les alpha-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 alpha-amylases ont la part principale du marché mondial d'enzymes, dont plusieurs différentes préparations d'alpha-amylase sont disponibles avec de divers fabricants d'enzymes pour utilisation spécifique dans diverses industries (Aehle et Misset, 1999). Le tableau 3, rapporte en bref les divers domaines d'application des alpha-amylases.

Tableau 3 Différentes applications des alpha-amylases.

Industries	Application
Glucoserie	Solubilisation de l'amidon ,accompagné d'une importante de la viscosité(liquéfaction) (Alais <i>et al.</i> ,2008) .
sucerie	Réduction de la viscosité des sirops de canne a sucre , en hydrolysants les contaminants amylicé pour assuré le processus de cristallisation (van der <i>et al.</i> ,2002) .
Biscuiterie et panification	Amélioration des propriétés rhéologique et fermentaires de la pate ,ainssi que le volume de la mie et la coloration de la croute (Pandey <i>et al.</i> ,2000).
Industrie textile	Desencollage textile,qui permet d'éliminer la colle de l'amidon qui enduit les fibres et le protégés au cours du tissage (Hendriksen <i>et al.</i> ,1999).
papeterie	Liquéfaction de l'amidon pour préparer la sauce de couchage permettant d'éliminerles irrégularités superficielles de la feuille (Tolan.,1996).
détergent	Dégradation des taches a base d'amidon,les oligosaccharides et les dextrines libérés de l'action hydrolitique sont soluble,ce qui'il facilite le découpage physique de la tâche (Kotwitz <i>et al.</i> ,1994).
Industrie pharmaceutiq ue	Traitement de diabète et de l'obeisité (Niélson <i>et al.</i> ,2001).

2.3- Les champignons

2.3.1- Les moisissures

2.3.1.1- Généralités

Les moisissures sont des microorganismes hétérotrophes filamenteux et immobiles, dont la structure cellulaire est celle d'une cellule eucaryote classique (Nicklin *et al.*, 2000). 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).

2.3.1.2- Croissance

La croissance des champignons mycéliens est assurée par des hyphes qui sont constitués de cellules hétérocaryotiques (Ascomycota et Basidiomycota) ou coenocytiques (Zygomycota et Glomeromycota). Leur extension est restreinte à l'apex. Après division, l'article apical nouvellement formé peut se séparer du reste du mycélium par une cloison (mycélium septé) ou non (mycélium siphonné) (Jennings & Lysek, 1996). Les hyphes vont se brancher en réseau, déterminant en partie la morphologie macroscopique du thalle (Carlile et Watkinson, 1994). La croissance et la nutrition vont se faire de façon concomitante ; la croissance sera réalisée par une extension de la paroi à l'apex, par un apport continu de chitine. Dans le même temps, au niveau de l'apex également, des enzymes hydrolytiques seront déversées dans le milieu extérieur (Carlile et Watkinson, 1994).

2.3.1.3- Conditions de croissance

➤ *Éléments nutritifs*

Les moisissures sont des microorganismes hétérotrophes, elles exigent donc la présence des éléments nutritifs de base carbone, azote et ions minéraux dans le milieu qui assure leur croissance. Les moisissures possèdent une panoplie enzymatique extrêmement riche qui leur permet d'utiliser plus efficacement encore que les bactéries les substrats les plus complexes.

Leur digestion doit commencer dans le milieu extérieur par des enzymes excrétées (extracellulaires) ou liées à la paroi, car seules les molécules de taille relativement petite peuvent franchir les parois et gagner le cytoplasme (Davet, 1996).

➤ *Source de carbone et d'énergie*

Pratiquement tous les composés organiques peuvent être utilisés comme source de carbone et d'énergie par les moisissures. La plupart d'entre elles peuvent métaboliser le glucose et le saccharose avec quelques polysaccharides comme l'amidon et la

cellulose (Boiron, 1996 ; Nicklin et *al.*, 2000). Certaines d'entre elles produisent des lipases extracellulaires capables d'hydrolyser les lipides en glycérol et acides gras qui peuvent être assimilés par beaucoup d'espèces fongiques.

2.3.2- *Alternaria*

2.3.2.1- Définition

Alternaria est un champignon filamenteux cosmopolite ubiquiste. Communément isolé à partir de plantes, de sols, de nourriture corrompue ainsi que de l'air ambiant des habitations.. *Alternaria* est un Pathogène de végétaux ; se comporte surtout comme un parasite de faiblesse et se développe sur des plantes sénescents, sur des légumes, sur des débris organiques divers, sur le sol, sur des produits alimentaires et sur le papier (Criquet et *al.*, 2008).

2.3.2.2 - Aspect macroscopique d'*Alternaria*

Les colonies d'*Alternaria* ont une croissance rapide et aspect cotonneux. La surface des colonies est souvent hétérogène, présentant des zones blanches constituées exclusivement d'hyphes aériennes et des zones sombres rasantes renfermant les spores asexuées mélanisées. (Criquet et *al.*, 2008) (figure 6).

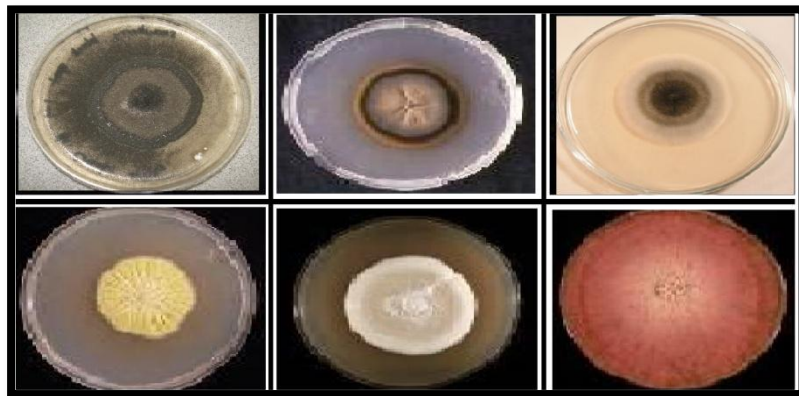


Figure 6 Aspect macroscopique d'*Alternaria* .

2.3.2.3 - Aspect microscopique d'*Alternaria*

Les hyphes sont septées. Les conidiophores sont bruns, et ont souvent l'aspect de « zigzags ». Ils portent des conidies simples ou ramifiées. Les conidies présentent des cloisonnements transversaux et longitudinaux et sont caractéristiques du genre *Alternaria*. Des tubes germinateurs peuvent également être observés à la surface des conidies Principaux champignons allergisants (figure 7).

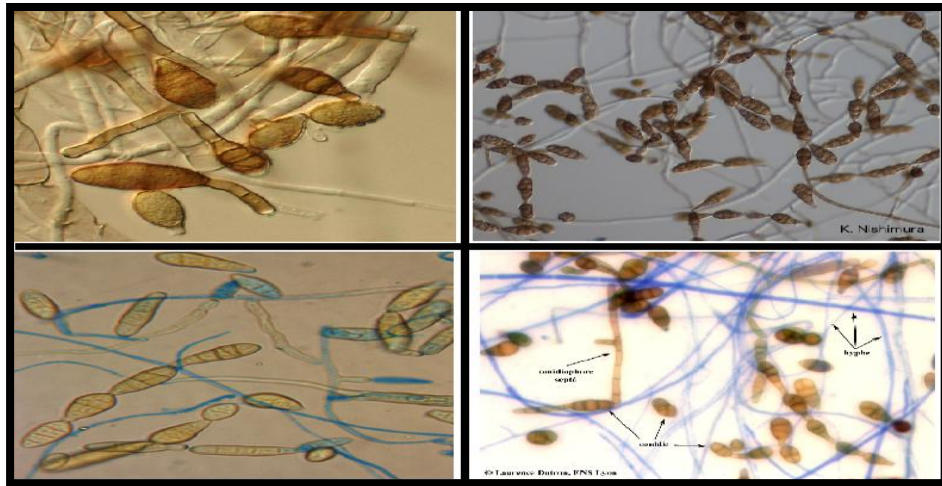


Figure 7 Aspect microscopique d'*Alternaria*.

2.3.2.4- Habitat

Ce genre a été isolé de substrats et habitats divers, comme le bois, le caoutchouc, les matières synthétiques, le papier, les plantes, les produits alimentaires (fruits, légumes, céréales, noix), le sol et le textile (coton, laine). La croissance de *Alternaria* a été mise en évidence sur de nombreux substrats. Plus de 50 % des prélèvements de poussières de matelas de logements humides en contiennent (Breton *et al.*, 1985; Botton, 1990).

2.3.2.5- Classification taxonomique

La classification taxonomique du Genre *Alternaria* selon **catalogue of life 2015** est la suivante :

Règne	Fungi
Division	Ascomycota
Classe	Dothideomycetes
Ordre	Pleosporales
Famille	Pleosporaceae
Genre	<i>Alternaria</i>

2.4 - Déchets Agricoles

Le terme déchets est défini par celui qui représente un tonnage important, de prix bas, concentré géographiquement et représentant des sources énergétiques non négligeables (Sauvant,

1984). Les déchets des activités agricoles et des industries agro-alimentaires sont considérés actuellement comme matière premières dans le but d'une valorisation.

2.4.1- Déchets d'orange

➤ Définition

L'orange possède une peau épaisse et assez rugueuse. C'est un fruit juteux, sucré, excitant et il contient de la vitamine C. Les déchets d'oranges riches en sucres solubles (glucose et saccharose), insolubles (pectine, cellulose) et en source minérale (principalement Ca, K, P et Si) (Nishio et Nagai, 1981 ; Mahmood *et al.*, 1998).

➤ Structure morphologique de l'orange

D'après Robert *et al.*, (1999) elle est constituée de l'extérieur vers l'intérieur de : **L'écorce, la pulpe et les pépins** (représentent 0 à 4 % du fruit et ont une teneur élevée en huile) (figure 8).

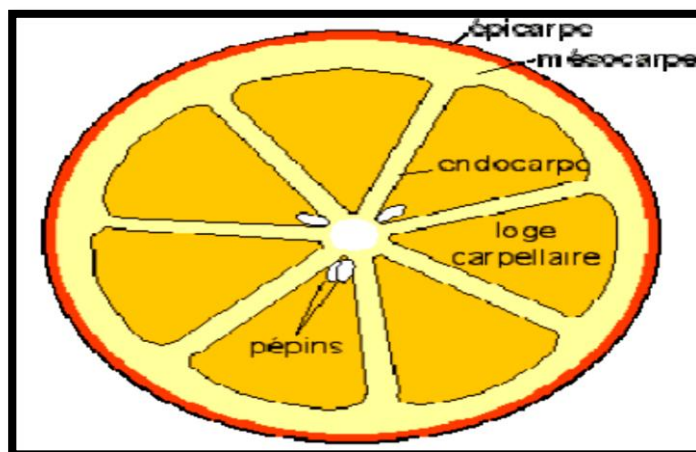


Figure 8 Coupe longitudinale et schéma descriptif de l'orange.

(Beton J.C., Brochard G. 1993).

➤ Composition biochimique de l'orange

• Les glucides

La teneur en sucres est de 8,5 à 12 % dans les fruits matures, les glucides sont représentés par le saccharose (40 %), le fructose et le glucose, ce sont des sucres assimilés qui fournissent rapidement de l'énergie à l'organisme (Beton J.C., Brochard G. 1993).

- ***Les acides organiques***

Ils représentent 1,2 %, essentiellement de l'acide citrique et un peu d'acide malique qui apportent à l'orange sa saveur acidulée.

- ***Autres composant énergétiques***

Les lipides sont concentrés dans les pépins et la pulpe qui n'en renferment que des traces, enfin, comme tous les fruits, l'orange contient peu de protéines, c'est pourquoi elle est classée comme fruit peu énergétique avec en moyenne 45 calories pour 100 g (Beton J.C., Brochard G. 1993).

2.4.2- Déchet de pomme de terre

➤ ***Définition***

La pomme de terre est une plante tubéreuse, herbacée, cultivée, ses tubercules riches en amidon et possédant des qualités nutritives, originaire d'Amérique du Sud. Elle appartient à la famille des Solanacées, qui sont des plantes à fleurs. Les tubercules font l'objet d'un commerce international important. C'est une plante qui se propage par multiplication végétative et qui est cultivée comme une espèce annuelle (Rousselle *et al.*, 1992).

➤ ***Structure morphologique de la pomme de terre***

➤ **Structure externe**

Le tubercule de pomme de terre est une tige souterraine avec des entre-nœuds courts et épais.

Il a deux extrémités :

Le talon (ou hile) rattaché à la plante- mère par le stolon.

La couronne (extrémité apicale opposée au talon)

➤ **Structure interne**

Sur la coupe longitudinale d'un tubercule arrivé à maturité, on observe de l'extérieur vers l'intérieur:

Le périderme, connu plus communément sous le nom de la peau. Elle est une bonne protection contre les micro-organismes et la perte d'eau (Bernhards, 1998).

Les lenticelles assurent la communication entre l'extérieur et l'intérieur du tubercule. L'examen au microscope optique montre que les cellules des parenchymes périvasculaires sont petites et contiennent de très petits grains d'amidon (Bernhards, 1998). Les cellules du parenchyme cortical, Le tissu de revêtement (le périderme) renferment de grains d'amidon (Bernhards, 1998). La zone péri-médullaire présente les plus gros grains d'amidon (Bernhards, 1998).

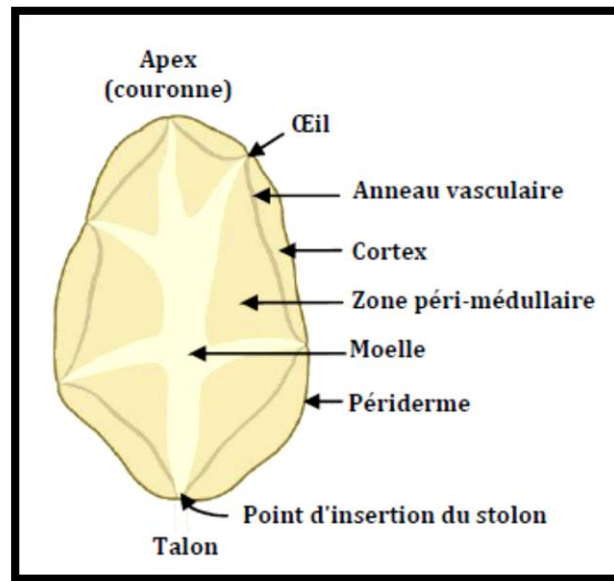


Figure 9 Coupe longitudinale d'un tubercule de pomme de terre

➤ *Composition chimique de pomme de terre*

Le tubercule est constitué, principalement, d'eau (environ 75% du poids). Le reste est formé par la matière sèche : acides aminés, protéines, amidon, sucres (saccharose, glucose, fructose), vitamines (C, B1), sels minéraux (K, P, Ca, Mg), acides gras et organiques (citrique, ascorbique).

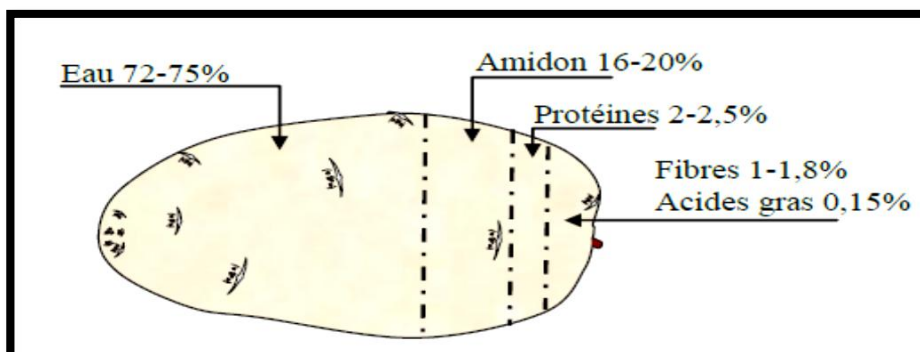


Figure 10 Composition chimique d'un tubercule de pomme de terre

*Matériel et
Méthodes*

3- Matériel et méthodes

Le présent travail porte sur l'isolement de souches fongiques à partir du sol des milieux arides (sol sahariens) et la sélection des isolats les plus performants pour la production de l'alpha amylase sur différents substrats.

3.1- Echantillonnage

Les échantillons de sol utilisés dans le présent travail sont prélevés à partir de deux régions de zones arides : Biskra et Ouargla situées dans l'Est Algérien (figure 11) et considérées comme des écosystèmes extrêmes (Température élevée). Après avoir écarté les cinq premiers centimètres de la couche superficielle du sol des deux régions, une quantité de ce dernier est prélevée à partir d'une profondeur de 10 cm à l'aide d'une spatule stérile et est introduite dans une seringue stérile afin de la transporter jusqu'au laboratoire.

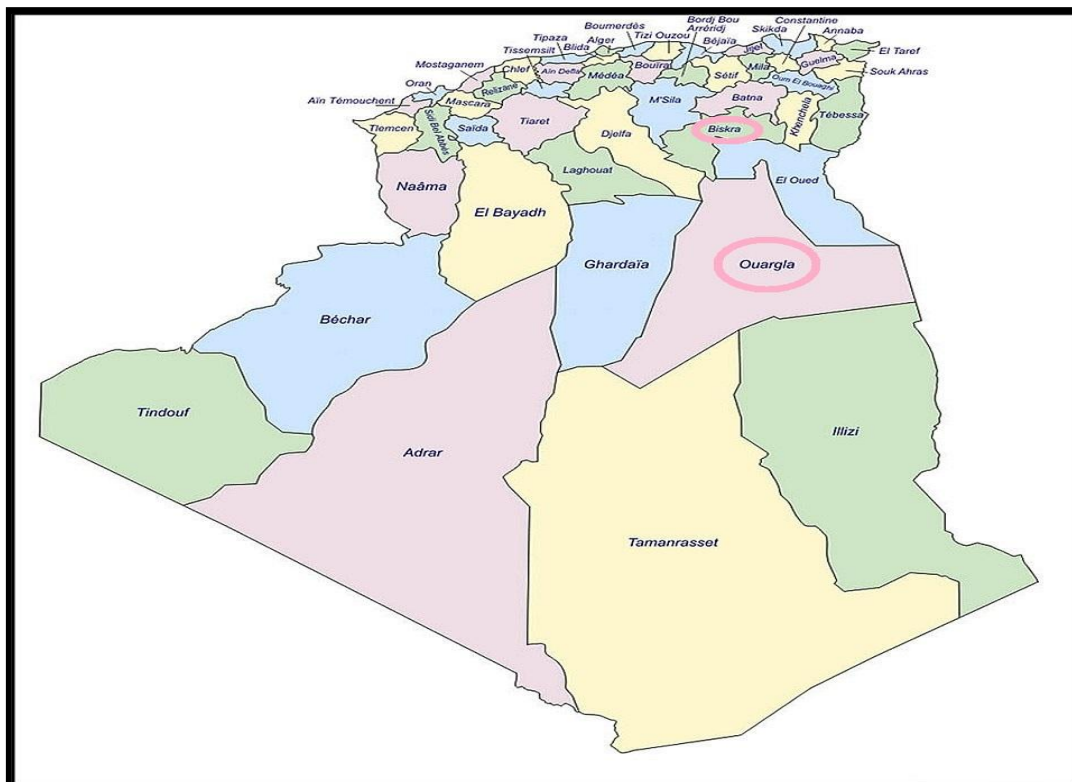


Figure 11 Localisation géographique des régions d'échantillonnages.



Figure 12 Site d'échantillonnages de Ouargla.



Figure 13 Site d'échantillonnages de Biskra.

3.2- Isolement des souches fongiques

3.2.1- Dilutions

La préparation des dilutions consiste, tout d'abord, à préparer la solution mère du sol en mettant 1g du sol dans 9 ml d'eau physiologique stérile, suivie d'une agitation pendant 3 min en suite, la préparation est laissée se décanter. La solution obtenue a servi à préparer des dilutions décimales par l'ajout successif de 1ml de la solution précédente à 9 ml d'eau physiologique stérile jusqu'à l'obtention de la dilution de 10^{-4} (Jerome *et al.*, 2004).

3.2.2- Ensemencement

Un volume de 0.1 ml de chacune des dilutions indiquées est déposée sur des boîtes de Pétri contenant le milieu gélosé PDA, puis étalé uniformément avec un étaloir stérile par un mouvement de balayage et de rotation sur l'ensemble de la surface de la gélose. Enfin, les boîtes sont incubées à 30°C pendant 5 jours, durée nécessaire pour l'apparition des colonies de souches fongiques (Tortora *et al.*, 2003).

3.3- Purification des souches fongiques

3.3.1- Purification des moisissures

La purification des moisissures est effectuée par piqûre centrale à partir des boîtes d'isolement, cette purification est réalisée sur milieu PDA (Annexe 01), l'incubation des boîtes est faite à 30°C pendant 5 jours.

3.3.2- Purification des levures

La purification des levures est effectuée par la méthode des stries qui consiste à tracer des stries avec l'anse contenant la levure sur la surface d'YPGA (Annexe 2). L'incubation des boîtes est effectuée à 30°C pendant 72h (John et Michael, 2007).

3.4 - Sélection d'une souche à activité amylasique

La recherche de souches amylolytiques est réalisée sur les souches précédemment isolées, selon la méthode décrite par Tatsinkou et al (2005). La sélection est effectuée sur milieu PDA additionné d'amidon (Annexe 3). Les boîtes sont incubées à 30°C pendant 5 jours pour les moisissures et 72h pour les levures. Après la période d'incubation, une solution de lugol (Annexe 4) est versée sur la surface de la boîte, afin de mettre en évidence l'activité amylasique. Les souches à halo clair sur le pourtour, sont considérées comme productrices d'amylases. Le diamètre des zones de lyse, est pris en considération pour la sélection de la souche amylolytique la plus performante.

3.5- Identification de l'isolat fongique sélectionné

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

3.5.1- Observation macroscopique

Cette observation permet de déterminer les quatre caractères culturels suivants : la vitesse de croissance, la texture et la couleur du thalle, la couleur du revers de la culture et l'odeur (Harrigan et McCance, 1976 ; Rinaldi et *al.*, 1998 ; Botton et *al.*, 1999).

3.5.2- Observation microscopique

L'identification microscopique des champignons repose sur plusieurs méthodes, les deux méthodes utilisées sont celle du scotch (test du drapeau) pour les cultures filamenteuses et poudreuses et la méthode du lactophéno-bleu de coton (Chabasse et *al.*, 2002).

3.5.2.1- Scotch

Un petit morceau de scotch est appliqué par la face collante sur la colonie à l'aide d'une pince puis déposé sur une lame porte -objet (Chabasse et *al.*, 2002).

3.5.2.2- Lactophéno

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, recouvert d'une lamelle couvre-objet qui écrase la préparation (Chabasse et *al.*, 2002).

3.6- Production de l'alpha-amylase

3.6.1- Préparation des milieux de fermentation

3.6.1.1- Préparation du milieu de fermentation à base de déchets d'oranges

La préparation de farine de déchets d'oranges débute par un séchage des morceaux de ce dernier dans un four à 70°C pendant 3 jours puis un broyage (broyeur Moulinex), de façon à réduire les déchets en fines particules. La poudre est conservée dans des boîtes dans un endroit frais et sec. 20 grammes de poudre et 2 grammes d'amidon sont introduits dans des Erlenmeyers de 250 ml le milieu est humidifié par l'ajout de 100ml d'eau distillée. Le contenu de chaque flacon doit être bien mélangé à l'aide d'une tige. Les milieux préparés sont stérilisés à 121°C pendant 20 min (figure 14).



Figure 14 Milieu de fermentation à base de déchets d'oranges.

3.6.1.2- Préparation du milieu de fermentation à base de déchet de pomme de terre

Les déchets de pommes de terre sont utilisés comme substrats organiques contenant de l'amidon. Les déchets de pomme de terre sont séchés au four (WISECUBE TM, Daihan scientifique. WON-050, Corée) à 70 °C pendant 24 h, et ensuite sont broyées en poudre. Le milieu de fermentation est préparé par l'ajout de 20g de la poudre dans des erlenmeyers de

250ml, le milieu est humidifié par l'ajout de 100ml d'eau distillée contenant les sels minéraux suivants : $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1,10 g, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,61 g, 0,30 g de KCl, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,30 g puis stérilisé à 121°C pendant 20 min (Ramesh et Lonsane ,1989) (Figure 15).



Figure 15 Milieu de fermentation à base de déchets de pommes de terre.

3.6.2- Inoculation

Les milieux de cultures précédemment préparés sont inoculés par 10ml de la suspension sporale (10^6 cellules/ml) de l'isolat fongique sélectionné, ensuite les fioles sont incubées à 30°C pendant 5 jours.

3.7- Méthode analytique

3.7.1- Extraction de l'enzyme à partir des milieux solides SSF

Un gramme de culture solide est prélevé chaque 24 h et mélangé avec 10 ml d'eau distillée. Le mélange est homogénéisé à l'aide d'un vortex puis une filtration est réalisée à l'aide d'un papier filtre n°4. Le filtrat obtenu représente l'extrait enzymatique brut.

3.7.2- Détermination de l'activité amylasique

Un volume de 0,5 ml de l'extrait enzymatique est additionné de 0,5mL de substrat contenant 1% d'amidon dans du tampon phosphate de sodium 100 mM à pH 6,5 (mélange réactionnel) (Annexe 05), l'incubation est opérée dans un bain marie à 40°C pendant 30 minutes. La réaction est arrêtée par l'addition de 1 ml d'acide 3, 5-dinitrosalicylique (DNSA) suivi d'un chauffage à 100°C pendant 10 minutes. Après refroidissement dans un bain de glace, 10ml d'eau distillée sont ajoutées. La densité optique est mesurée à 575 nm. La quantité des sucres réducteurs est déterminée sur une droite d'étalonnage préparée avec des solutions de maltose de différentes concentrations (Annexe 6).

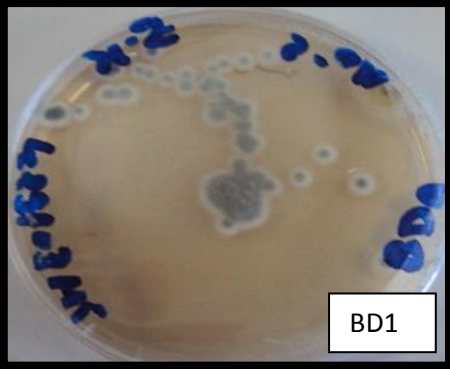
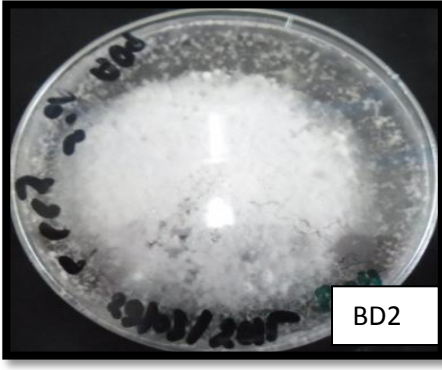
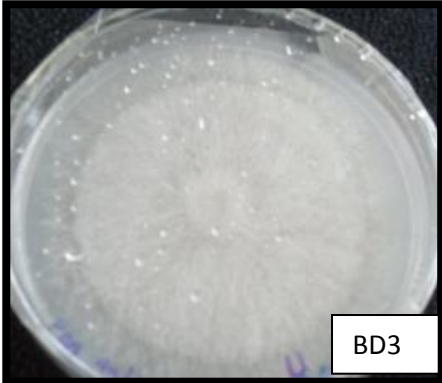
*Résultats et
Discussion*

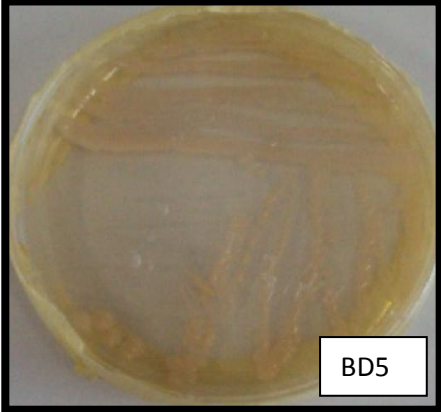
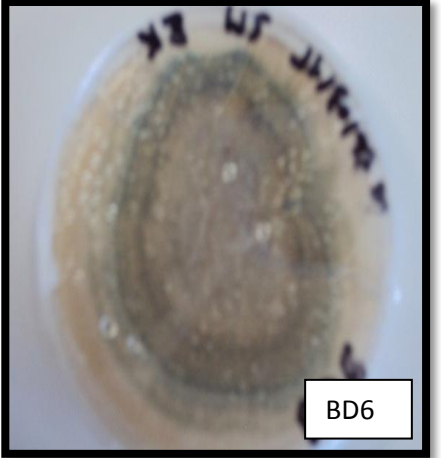
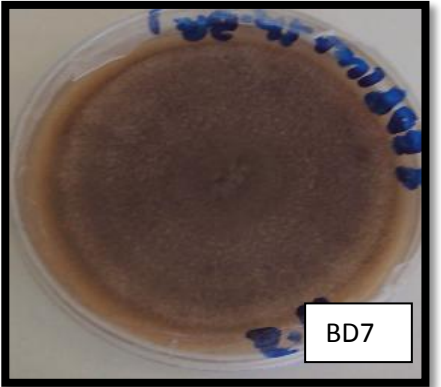
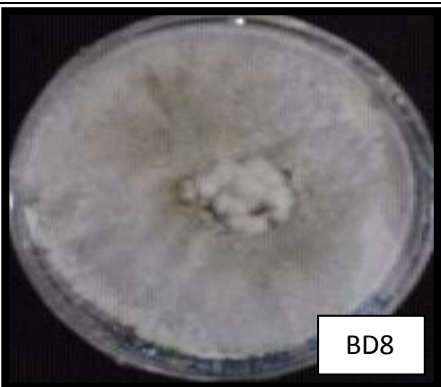
4-Résultats

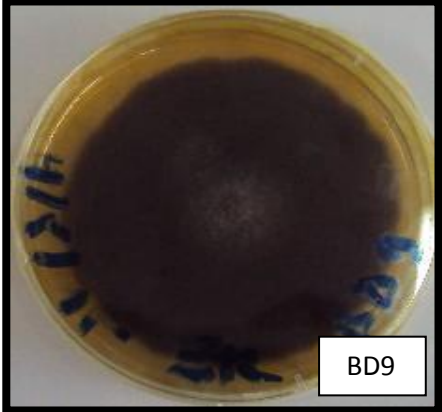
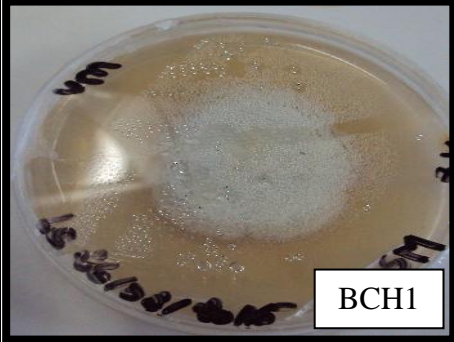

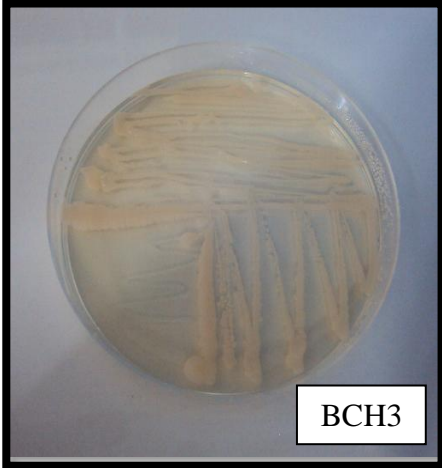
4.1- Isolement des souches fongiques

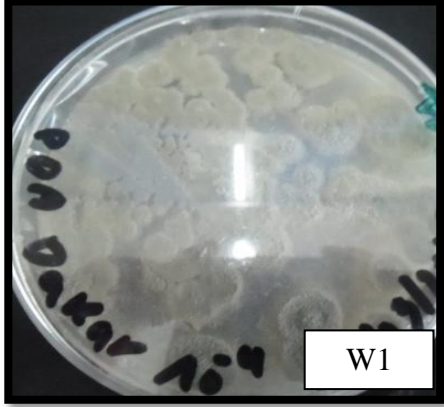
L'isolement des souches fongiques, à partir des échantillons de sol des différentes régions, a permis de répertorier 12 isolats. Le tableau 12 récapitule les différents aspects cultureux des isolats.

Tableau 4 Les Isolats fongiques obtenus à partir des échantillons de sol de différentes régions.

Région	Site	Couleur et Contour	Forme et Texture	Isolat
Biskra	Droua	Verte avec contour blanc et présence des exsudats	Lobée et Veloutée	
		Blanche avec contour blanc	Ronde et Cotonneuse	
		Blanche	Ronde et fibreux	

		Beige	Colonies rondes et lisses	 <p>BD5</p>
		Vert avec contour jaune et blanc	Lobée Veloutée	 <p>BD6</p>
		Marron clair avec contour blanc	Ronde et Veloutée	 <p>BD7</p>
		Colonies blanches	Croissance lente Cotoneuses	 <p>BD8</p>

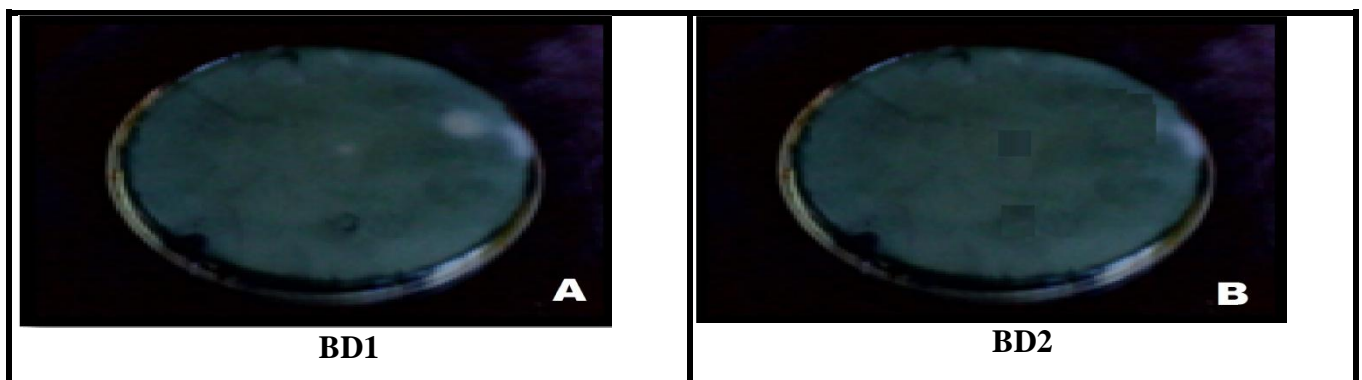
		Brune grise à noir	Ronde et veloutée	 <p>BD9</p>
Biskra	Chetma	Blanche	Ronde Poudreuse	 <p>BCH1</p>
		Orangé	Colonies rondes et laisses	 <p>BCH2</p>
		beige	Colonies rondes et laisses	 <p>BCH3</p>

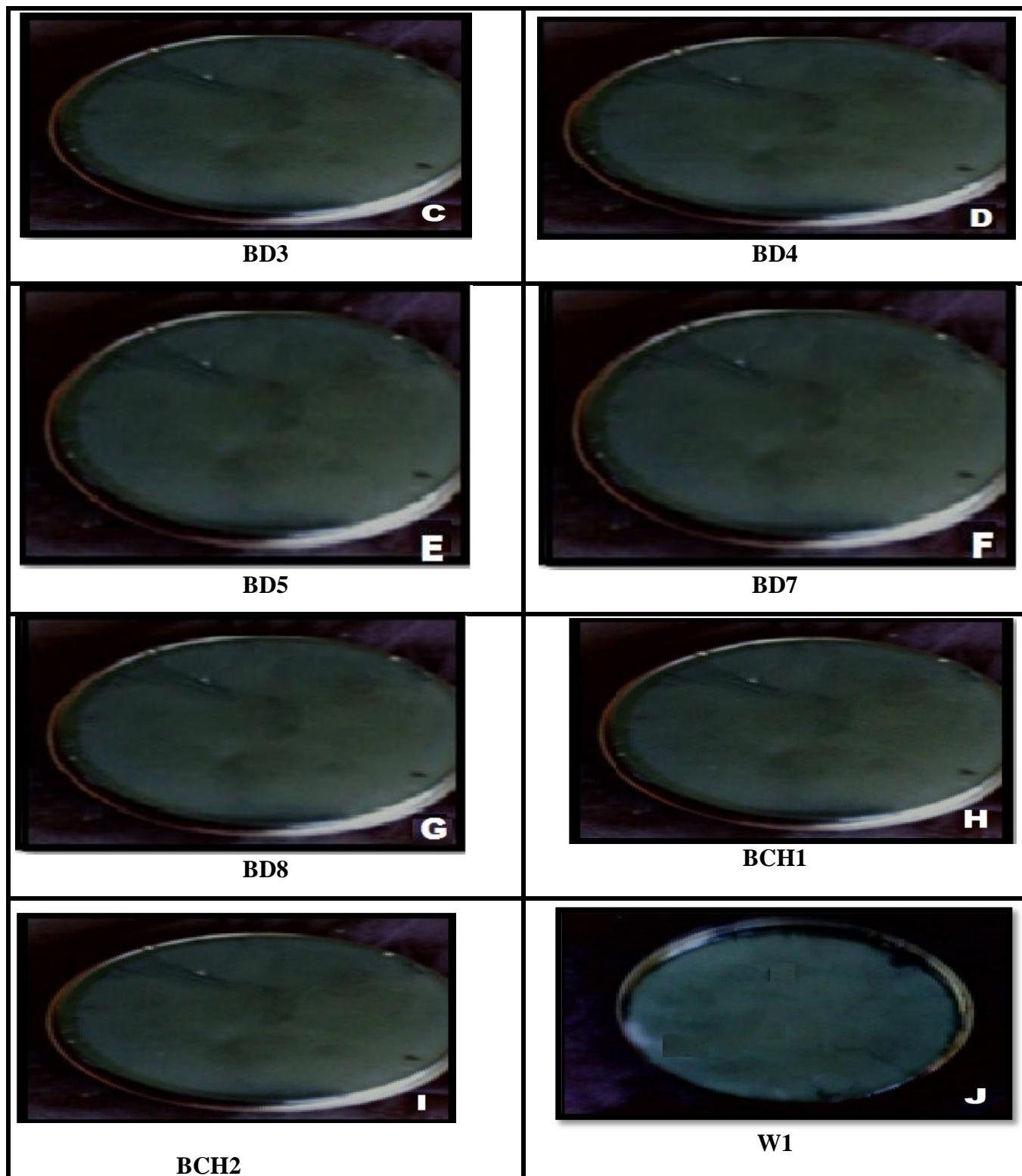
Ouargla	Bala	Colonie verts olivier	Lobée et poudreuse	
---------	------	-----------------------	--------------------	---

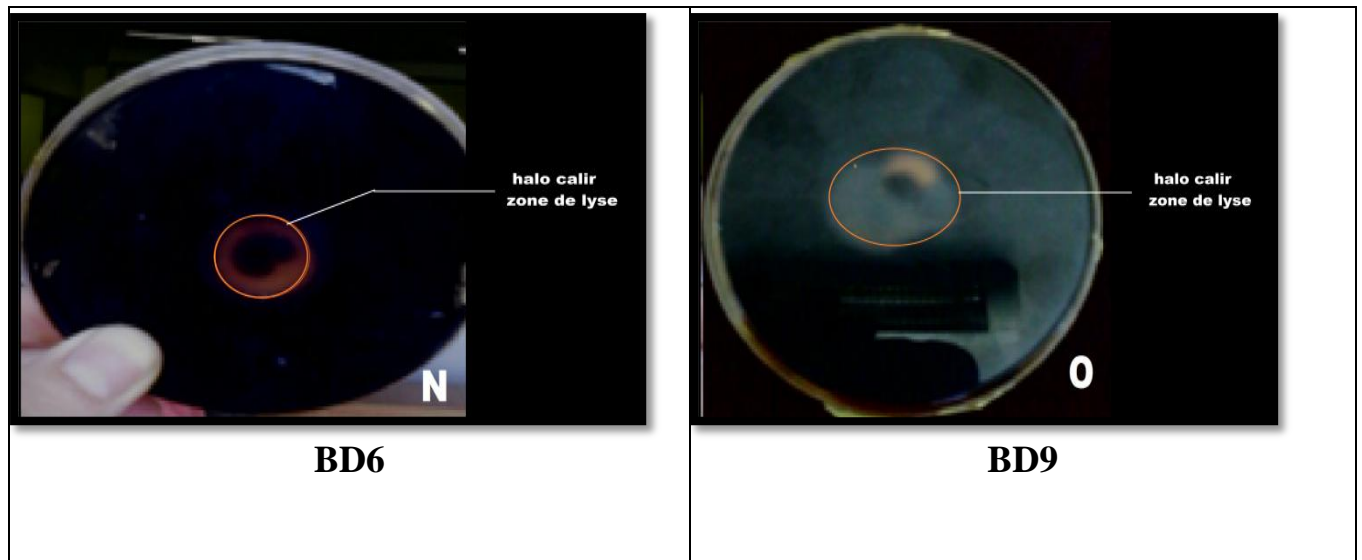
4.2- Sélection de souches amylolytiques

Parmi les 12 souches fongiques isolées, la recherche s'est orientée vers la sélection de la souche la plus performante, pour la production de l' α -amylase (tableau 5). Pour ce faire, ces souches, sont testées sur milieu PDA à 1% d'amidon. Les souches BD9 et BD6 ont développé des zones de lyse (halo clair) sur ce milieu sélectif, en revanche, le reste de souches fongiques n'ont révélé aucune couronne attestant la sécrétion de l'enzyme. De ce fait, les deux souches BD9 et BD6 sont considérée comme étant amylolytiques, en signalant que la souche BD9 se distingue par une activité amylolytique très élevée par comparaison à BD6.

Tableau 5: Test de sélection des isolats fongiques amylolytiques.







4.3- Identification de la souche amylolytique BD9

4.3.1- Identification macroscopique

L'identification macroscopique du genre de la souche fongique, isolée à partir du sol de la région de Biskra (Droua), est basée sur les clefs déterminatives de Botton, (1990).

La figure 6 présente l'aspect macroscopique des colonies; la surface, la consistance, la couleur du revers, ainsi que la présence ou l'absence de pigments.

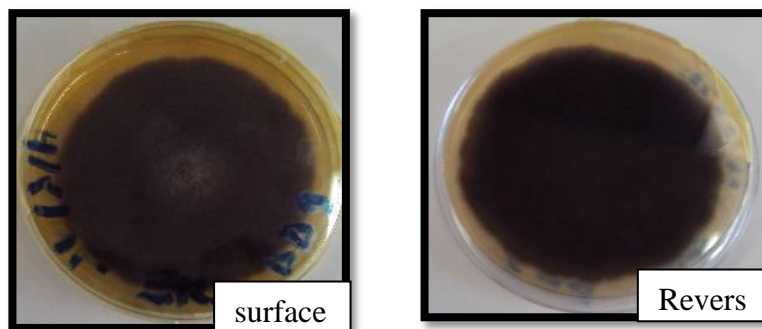


Figure 16 Aspect macroscopique et cultural de la souche fongique.

4.3.2- Identification microscopique

L'étude microscopique porte sur l'observation des structures caractéristiques de la souche fongique sélectionnée en particulier, le type de mycélium et la nature de la fructification asexuée (figure 7).

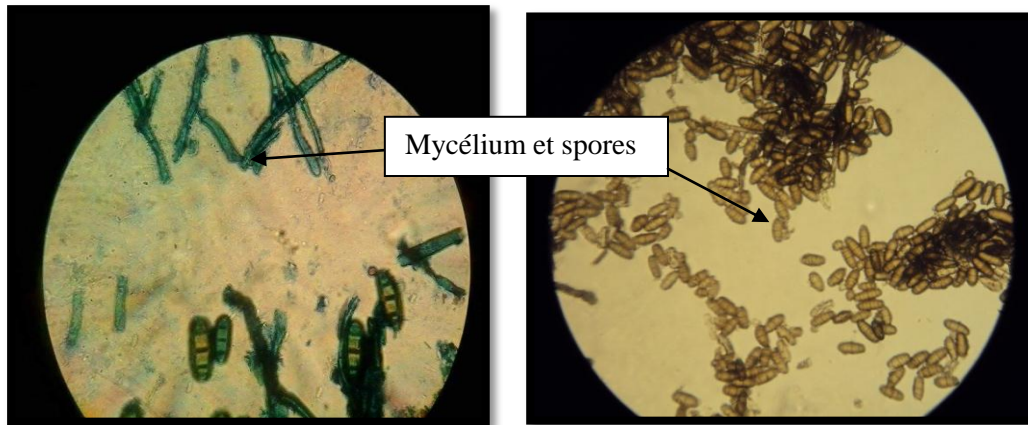


Figure 17: Aspect microscopique de la souche fongique (Grossissement x 100) après 5 jours de croissance à 28°C sur milieu PDA.

L'observation des figures 7 et 8 permet de mettre en exergue les points suivants caractérisant l'isolat :

- La colonie veloutée et rase de couleur brun-grise à noire avec une périphérie blanche et le revers est marron foncé à noir.
- La croissance aérienne de ce champignon est presque entièrement constituée de chaînes de spores.
- Les conidiophores sont à 1 - 3 septes, lisses, droits ou flexueux, noirs et ont une croissance sympodiale.
- Les conidies pluricellulaires de couleur brunes à jaune-brun, en forme de massue avec un rostre apical.

Ces observations correspondent au genre *Alternaria* et l'espèce *A. alternata*, suivant (Raty 1994).

4.4- Etude de l'activité amylolytique de l'isolat

4.4.1- Fermentation solide (SSF)

La production de l'amylase par *Alternaria alternata* a été testée, en premier lieu, sur un milieu solide à base de déchet d'orange (SSFO) et en second lieu, sur un milieu solide à base de déchet de pomme de terre (SSF PT).

4.4.1 .1- Cinétique de la production de l'alpha amylase par *Alternaria alternata* sur milieu à base de déchet d'orange

La production de l'alpha amylase sur milieu solide à base de déchet d'orange a montré que la cinétique de l'activité enzymatique augmente progressivement pendant le temps pour atteindre sa valeur maximale estimée à **83U/mg** après **72 heures** de fermentation, Au-delà de cette période, la concentration de l'alpha l'amylase a diminué pour atteindre une valeur de **18U/mg** et ce, à la fin de la période requise pour la fermentation (figure 9).

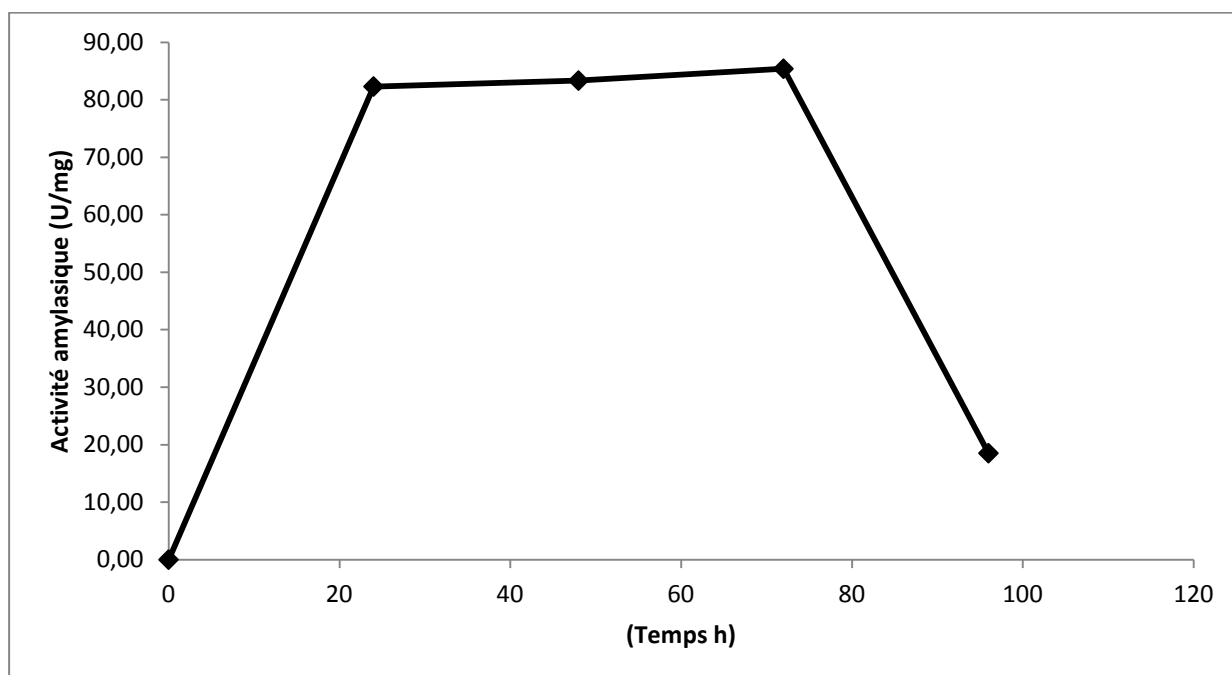


Figure 18 Cinétique de la Production de l'alpha amylase par *Alternaria alternata* sur milieu à base de déchet d'orange

4.4.1.2- Cinétique de la production de l'alpha amylase par *Alternaria alternata* sur milieu à base de déchet de pomme de terre

L'activité amylolytique maximale de l'enzyme sur le milieu solide à base de pomme de terre a été observée après **48H** atteignant **19U/mg**. Après cette période, la croissance se ralentit, puis diminuer pour arriver a la fin de fermentation à **14U/mg**. La figure 10 montre l'évolution de l'activité amylolytique au cours du temps de la fermentation.

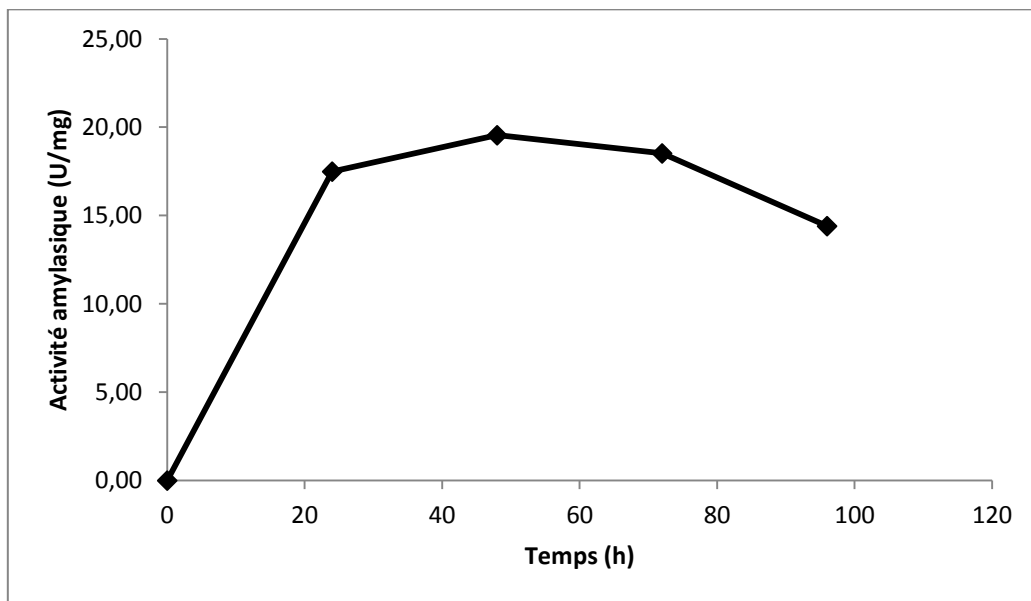


Figure 19: Evaluation de l'activité amylolytique développée *Alternaria Altenata* sur milieu à base de déchet de pomme de terre.

Il ressort des ces résultats que la production sur milieu à base de déchet d'orange est plus importante que sur le milieu à base de déchet e pomme de terre.

Par ailleurs il est à signaler que l'estimation de la biomasse n'a pas été réalisée à cause l'utilisation de déchet solide non totalement soluble.

5- Discussion

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 (Sicard, 1982). Il est basé sur un critère écologique (recyclage des sous-produits industriels pour lutter contre la pollution de l'environnement) et sur la production d'une substance à haute valeur ajoutée avec un procès pas onéreux (Nouadri, 2011). 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 les déchets d'agricoles. C'est dans cette dernière optique que s'inscrit l'objectif de notre travail qui est amorcé par les points de recherche suivants :

- 1- L'isolement et la purification des souches fongiques à partir des différents échantillons.
- 2- La sélection et l'identification de la souche fongique amylolytique.
- 3- La production de l'alpha amylase par la souche amylolytique sélectionnée sur milieu à base de déchet d'orange et sur milieu à base de pomme de terre.

L'exploration des échantillons du sol a abouti à l'isolement de 12 isolats fongiques. Ce nombre reste très négligeable par rapport à l'énorme diversité en souches fongiques d'un écosystème où les conditions climatiques et physicochimiques sont optimales (Phaff et Starmer, 1987). Cette faible diversité, peut être liée au pH relativement basique (7,64) du sol, favorisant, plutôt, la croissance des populations bactériennes (Allen et Ahearn, 1987 ; Larpent et Gaurgaud, 1997). Par ailleurs, Il a été établi que les zones arides, en général, sont peu riches en espèces biotiques, néanmoins, elles abritent de nombreuses espèces indigènes animales, végétales et microbiennes, ayant élaborées des stratégies particulières pour s'adapter aux conditions environnementales extrêmes (LeBerre et Ramousse, 2001).

Le test de sélection effectué, sur milieu PDA additionné par 1% de l'amidon, a permis de sélectionner l'isolat fongique BD9. L'étude réalisée par Tatsinkou *et al*; (2005). a décrit la capacité de certaines souches fongiques productrices de l'alpha amylase dans les mêmes conditions expérimentales empotées dans ce travail.

L'identification de l'isolat BD9, basée sur l'étude macroscopique et microscopique, a révélé qu'il s'agit de l'*Alternaria alternata*.

Dans cette étude, les deux milieux de fermentation (déchets d'oranges et déchets de pomme de terre), qui sont utilisés pour la production de l'alpha amylase par *Alternaria alternata* sont choisis selon les critères suivants :

- la production de la pomme de terre est possible toute l'année, sa culture est aisée, son potentiel de rendement est important (20 à 30 t/ha), elle est très appréciée par les populations (l'Algérie consomme 60 kg de pommes de terre par personne et par an) et elle constitue une culture de rente pour de nombreux agriculteurs.
- Les déchets d'oranges sont considérés comme un milieu très riche en source de carbone et d'azote (Nishio et Nagai, 1981 ; Mahmood et al., 1998) en effet, beaucoup de travaux de recherches se sont orientés vers l'utilisation de déchets d'orange comme substrat fermentescible : production polygalacturonase par *Rhizopus oryzae* (Hart et al., 1991), de pectinase par *Tubercularia vulgaris* (Fonsec et Said, 1994) des protéase alcalines et neutres de polygalacturonate-lyase et d' α -amylase par *Bacillus subtilis* (Mahmood et al., 1998) et par l'*Aspergillus niger* (Djekrif-Dakhmouche et al. 2006 ; Mukesh et al., 2010), *Trichoderma reesei* (Momein et al., 2003) et *Aspergillus oryzae* (Raviyan et al., 2003)

La culture solide est appliquée à large échelle dans les processus industriels, elle possède un grand potentiel de production d'enzymes ; sa particularité est l'utilisation directe du produit fermenté brut comme une source d'enzyme (Pandey et al., 1999). C'est ainsi que différents types des amylases peuvent être produites par la culture solide en utilisant différents résidus agroindustriels.

Dans cette étude, Les résultats de la cinétique de production de l'enzyme par *Alternaria alternata* ont montré que cette souche est capable de produire des quantités importantes de l'alpha amylase, atteignant **83 U/mg** sur milieu solide à base de déchets d'oranges et **19 U/mg** sur milieu solide à base de déchets de pomme de terre, et ce, après 72 h et 48 h de culture respectivement. L'étude réalisée par Oghenetega . J. A et al., (2015), ont montré que la production de l'alpha amylase par *Aspergillus sp.* est de l'ordre de 10 U/mg.

Conclusion

6-Conclusion et perspectives

Dans cette étude, une caractérisation des souches fongiques isolées à partir du sol d'un milieu aride Algérien a été effectuée, dans le but de sélectionner des souches ayant la capacité de produire l'alpha amylase sur différents substrats bon marché.

Le test de sélection effectué sur milieu PDA additionné de 1% d'amidon a permis de sélectionner l'isolat BD9 comme étant le plus performant.

Il a été conclu de cette partie, que l'isolat sélectionné (BD9) a la capacité de dégrader l'amidon en glucose ou maltose. L'identification préliminaire de cet isolat, qui a fait l'objet de la suite de ce travail, a révélé qu'il s'agit d'*Alternaria alternata*.

Cette souche possède la capacité de produire une grande quantité d'alpha amylase sur milieu solide à base de déchet d'orange atteignant **83 U/mg** après 72 h, cette production considérée appréciable en comparaison avec la production de la même enzyme par la même souche sur milieu à base de déchet de pomme de terre estimée à **19U/mg après 48h**. Cette production est obtenue grâce à la capacité de l'isolat à sécréter de l'alpha amylase, enzyme responsable de la dégradation de l'amidon. De nombreuses perspectives découlent de cette recherche. En fait, des études plus approfondies sont nécessaires visant plusieurs points, à savoir :

- 1- L'étude de l'effet de température et du pH sur l'activité amylolytique.
- 2- L'optimisation du milieu de production de l' α -amylase, à base de déchet de pomme de terre et de déchets d'orange, afin d'augmenter le rendement en enzyme.
- 3- La purification de l'enzyme pour une éventuelle utilisation en industries alimentaires et/ou pharmaceutique

7-Abstract

The exploration of soil samples taken from the soil arid region, Beskra and Ouargla (South Algeria) allowed the obtaining of 12 strains. One of the isolates (BD9) was selected for its ability to produce alpha amylase by different substrate. Preliminary identification of the isolate (BD9) based on macroscopic, microscopic its membership to *Alternaria alternata*. The production of alpha amylase in 250 mL, vials, this fungal strain grown on solid medium Oranges waste-based supplemented by starch to 1% (inducing substrate) and another solid medium of potato waste. The results of the kinetics production amylase by *Alternaria alternata* showed that this strain is capable to produce large quantities of this enzyme reaching 83 U/mg on solid waste of oranges and 19U/mg on solid waste of potato, and this after 72h of culture respectively

Key words: alpha amylase, *Alternaria alternata*, orangewaste, waste of potato and Saharan soil.

8-ملخص

يتناول هذا العمل عزل سلالات فطرية من تربة بيئات القاحلة (التربة الصحراوية) واختيار العزلة الأكثر كفاءة لإنتاج الالفا الأميلاز على اوساط مختلفة .

الاستكشاف لعينات التربة التي جمعت من منطقة بسكرة وورقله (الجنوب الجزائري) أسفرت عن 12 عزلة فطرية. وتم اختيار BD9

كعزلة واحدة لقدرتها على انتاج انزيم الالفا اميلاز (انزيم ذو اهمية صناعية وغذائية وصيدلانية) على وسط مضاف اليه 1% نشاء كمحفز واستنادا لدراسة الاولية العيانية و المجهرية تبين ان العزلة BD9 هي *Alternaria alternata*. لإنتاج الالفا أميلاز في قارورة 250 مل، تم زرعها في وسط يتكون من بقايا البرتقال مضاف اليه 1 % نشاء ووسط يتكون من بقايا البطاطا .

أظهرت النتائج الحركية لإنتاج الإنزيم بواسطة *Alternaria altarnata* ان هذه السلالة قادرة على انتاج كميات كبيرة من الالفا اميلاز تصل الى 83U/mg على الوسط الصلب المتكون من قشر البرتقال والى 19U/mg على الوسط الصلب المتكون من بقايا البطاطا وذلك بعد 72 ساعة و48 ساعة على التوالي.

الكلمات المفتاحية: الالفا اميلاز, *Alternaria alternata*, بقايا البرتقال, بقايا البطاطا و الارض الصحراوية

Références
Bibliographiques

9-Références bibliographiques

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.

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 A., Leghlimi H., Dakhmouche S., Bennamoun L. et Meraihi Z.(2012). Utilisation de la planification expérimentale pour l'optimisation de la production de l' α amylase par *Rhizopus oryzae*. *Rev. Microbiol. Ind. San et Environn.* Vol 6, (1), pp. 1-17.

Alais C., Linden G. et Miclo L. (2008). *Biochimie alimentaire*, DUNOD. 6ème édition, paris, pp.67-71.

Albrigo L. G. et Carter D. (1970). *Citrus science and technology*. Ed Nagy.

Babu K. R. et Satyanarayana T. (1993). Extracellular calcium inhibited α -amylase of *Bacillus coagulans* B49. *Enzyme Microbiol. Technol.* 15, 1066-1069.

Baldwin P., Van E. C., Istasse L. et Bienfait J.M. (1986). Fermentation en silos de laboratoire de pulpes de betteraves sucrières. *Belgian Journal of Food Chemistry and Biotechnology.* (98), pp.792-797.

Bennett J.W. (1998). *Mycotechnology: the role of fungi in biotechnology*. *J. Biotechnol.*, (66), pp.101-107.

Beton J. C. et Brochard G. (1993). Paris : L'aventure de l'orange. 19-45.

Boel E., Brady L., Brzozowski A., Derewenda Z., Dodson G., Jensen V., Petersen

- S., Swift H., Thim L .et Woldike., H. (1990).** Calcium binding in α -amylases: an Xray diffraction study at 2.1-Å resolution of two enzymes from *Aspergillus*. *Biochemistry*; 29,p :6244–6249.
- Boileau C. H. et Giordan L. (1980).** La culture des agrumes. Rd. Tacussel. Marseille.
- Boiron P. (1996).** Organisation et biologie des champignons. Nathan. Paris. P. 19-79.
- Botton B. Breton A., Fèvre M., Gauthier S., Guy P., Larpent J.P., Reymond P., Sanglier J.J., Vayssier Y .et Veau P.(1990).** Moisissures utiles et nuisibles, Importance industrielle, 2ème Ed. Masson collection biotechnologies. 5-10.
- Bouix M. et Leveau J. Y. (1999).** Production des enzymes. In Scriban R (Ed) : *Biotechnologie* Ed. Lavoisier. 344-400.
- Bourgeois C M. Mescle J.F.et Zucca J. (1989).** Microbiologie alimentaire. Aspect microbiologique de la sécurité et de la qualité des aliments. Lavoisier. Paris. P. 216-244.
- Bousseboua H. (2002).** Eléments de Microbiologie Générale. Programmes de graduation. Editions de l'Université Mentouri.Constantine Algerie p.230-231.
- 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), 2614–2621.
- Brich GG, Parker K. J. et Worgan J T. (1976).** Food from waste. Applied Science publishers Ltd, Barking, Essex.
- Références bibliographiques
- Chabasse D. (2002).** Les moisissures d'intérêt médical. Cahier N°25 de formation de biologie médicale, pp. 25-27.
- Chao-Hsun Y.et Wen-Hsuing L. (2004) .**Purification and properties of a maltotriose-producing Alpha amylase from *Thermobifida fusca*, Institute of Microbiology and Biochemistry, National Taiwan University; *Enzyme and Microbial Technology*. (35):254-59.
- 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.

Crotti LB, Jabor Va, Chellegatti Ma, Fonseca Mj .et Said S. (1999). Studies of pecticenzymes produced by *Talaromyces flavus* in submerged and solid substratr cultures. *J Basic Microbial* 039 (4) : 227-235.

Criquet S. et Calvert V. (2008). IMEP UMR CNRS 6116. Planche Tp mycologie publié sur internet le 03/03/2008.

Cuveillier G. F. (1999). Réacteurs enzymatiques à enzymes libres. In Scriban R. (Ed) :*Biotechnologie*. Ed. Lavoisier. 401-425.

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 1.7Å resolution. *Biochem*. (38): 8385-8392.

Davet P. (1996). Vie microbienne du sol et production végétale. INRA. Paris. P. 52-57.

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.

Djekrif-Dakhmouche S., Gheribi-Aolmi Z., Meraihi Z.et Bennaoum L. (2006). Application of a statistical design to the optimization of culture medium for α amylase production by *Aspergillus niger* ATCC 16404 grown on orange waste powder. *J. Food Eng.* (73):190-197.

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.

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.

- Feller G., Lonhienne T., Deroanne C., Libioule C., Van beeumen J. et Gerday C. (1992).** Purification, Characterisation and nucleotide sequence of the thermolabile α -amylase from the Antarctic psychrotroph *Alternomonas haloplanctis* A23. *J. Biol. Chem.* 267(8) : 5217-5221.
- Fogarty W. M. et Kelley, C. T. (1994).** *Microbial Enzymes and Biotechnology*. Applied Science, London, New York. (43):71-132.
- Fonseca M.J.V. et Said S. (1994).** The pectinase produced by *Tubercularia vulgaris* in submerged culture using pectin or orange-pulp pellets as inducer. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* (42): 32–35.
- Franco O. L., Rigden D. J., Melo F. R., Bloch C., Silva J. C. P. et Crossi de Sa M. F. (2000).** Activity of wheat amylase inhibitors towards bruchid α -amylase and structural explanation of observed specificities. *Eu. J. Biochem.* 267 : 2166-2173.
- Janecek S. (1994).** Sequence similarities and evolutionary relationships of microbial, plant and animal α -amylase. *Eur. J. Biochem.*, 224, p: 519-524.
- J. E. et Stutzenberger F. J. (1997). Amylolytic activity of *Thermomonospora fusca*. *World J. of Microbiol ET Biotechnol.* 13 (6) : 637-642.
- 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.
- Jennings D.H., et Lysek G. (1996).** *Fungal biology: understanding the fungal lifestyle*. (Bios Scientific publishers eds).
- Jerome J.P., James T. S et Stephen L. (2004).** *Microbiologie*, (edn) DUNOD. Paris
- JJ., Vayssier Y. et Veau P. (1999).** *Moisissures utiles et nuisibles. Importance industrielle*.
- 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.
- Halonen M., Stern DA. et Wright AL . (1997) .** *Alternaria* as a major allergen for

asthma in children raised in a desert environment. Am. J. Respir. Crit. Care Med.155:1356-1361.

Harrigan W.F. et McCance. M.E. (1976). Laboratory methods in food and dairy microbiology. Academic press. London. P. 21-277.

Hart H.E., Parish M.E., Burns J.K. , Wicker L. (1991). Orange finisher-pulpe as substrat polygalacturonase production by *Rhizopus oryzae*. J. of food sciences. (55):480-83

Inoue M . (1994). Fungal contamination of paint film and plastic wall covering. Ed. Garg KL, Garg N & Mukerji KG, Recent advances in biodeterioration and biodegradation. Vol 2.Biodeterioration and biodegradation of natural and synthetic products. Calcutta : Nay a PROKASH, 71-80.

Gargas A., DePriest P.T., Grube M.et Tehler A. (1995). Multiple origins of lichen symbioses in fungi suggested by SSU r DNA phylogeny. Science. 268: 1492-1495.

Ghose TK. (1977) .Bioconversion of cellulosic substances into energy, chemicals and microbial protein. A room purie at Thomson Press, India.

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.

Kindle K . L . (1983). Appl .Biochem . Biotechnol . 8, p : 153 -170 .

Kottwitz B., Upadek H.et Carrer G.(1994). Applications and benefits of enzymes in detergent. Chim Oggi, 12, pp.21-4.

Kwon-Chung, K. J. et Bennett J.E. (1992). Medical My cology . Lea & Febiger, Philadelphia and London.Lavoisier. Paris. P. 26-42.

Larpent G .M et Sanglier J. J. (1992). Biotechnologies. Principes et méthodes. P : 574-581.

Leveau J.Y. et Bouix M.(1993). Les moisissures. In : Florent J. Ed. Microbiologie industrielle. Les micro-organismes d'intérêt industriel. Edition Tec et Doc .Lavoisier .Apria, pp.110-170.

Leveau S. B. et Bouix M. (1993). Les microorganismes d'intérêt industriel. Lavoisier Apria. P. 110-163.

Lucio de Souza E., Erika M. E. H., Castilho V. M., Delima A., Bellini M. Z., Cruz D. et Cruz Z. R. (1996). Purification and characterization of α -amylase from *Rhizopus* sp. *Arq. Biol. Technol.* 39 (4), 831-839.

Lutzoni F., Kauff F et al. (2004). Assembling the fungal tree of life: progress, classification, and evolution of subcellular traits. *American Journal of Botany.* 91: 1446–1480.

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.

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.

Mcmahon E .M., Kelly C.T. et Fogarty W.M. (1999). High maltose producing amyolytic system of a *Streptomyces* species. *Biotechnology Letters.* 21, p: 23-26.

Mercier C (1985). Les enzymes amyolytiques. In : Mouranche A. Coste C. hydrolases et dépolymérases. Ed Gauthier-Villars., pp.110-140.

Milner J.A., Martin D.J. et Smith A. (1997). Two-stage inoculate for the production of alphaamylase by *Bacillus amyoliquefaciens*. *Enzyme and Microbial Technology.* (21):382–386.

Momen H. El-Katanty, Ahmed M. Hetta, Gehan M. Shaban et Hesham M.

Elkomy. (2003). Improvement of Cell Wall Degrading Enzymes Production by Alginate Encapsulated *Trichoderma* sp. *Food Technol. Biotechnol.* 41(3):219-225.

Raviyan., Juming T. et Barbara A.R. (2003). Thermal stability of α -amylase *Aspergillus oryzae* entrapped in polyacrylamide gel. *J. Agric Food Chem.* (51):62-69.

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.

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.

Nicklin J., Graeme-Cook K., Paget T. et Killington R. (2000). L'essentiel en microbiologie. Berti. Paris. P. 210-216.

Niehaus F., Bertoldo C., Kahler M. et Antranikian G. (1999). Extremophiles as a source of novel enzymes for industrial application. *Applied Microbiology and Biotechnology.* (50),pp.711-729.

Nielson J-E., Borchert T-V et Vriend G. (2001). The determinant of α -amylase pH-activity profiles. *Protein Engineering.* Oxford University Press. 14(7), p: 505-512.

Nishio N. et Nagai S. (1981). Single cell protein production from mandarin orange peel.

Nouadri T.(2011). L' α -amylase de *Penicillium camemberti* PL21: Production, Purification,Caractérisation et immobilisation. Thèse de Doctorat d'Etat ; Option Biochimie Biotechnologies. Université Mentouri-Constantine, 125p.

Octaveo L. F., Danial J.R., Francslete R. M., Carlos Bloch J.R., Carlos P. S.,et Maria F. G. (2000). Activity of wheat α -amylase inhibitors towards birched α -amylases and structural explanation of observed specificities. *Eur. J. Biochem.* 2(67):66-73

Oghenetega Jonathan Avwioroko, Nyerhovwo John Tonukari, Samuel Ogheneovo Asagba. (2015). Biochemical Characterization of Crude α -Amylase of *Aspergillus* spp. Associated with the Spoilage of Cassava (*Manihot esculenta*) Tubers and Processed Products in Nigeria 3(1): 15-23..

Oteng-Gyang K. (1984). Introduction à la microbiologie alimentaire dans les pays chaud.

Panchal C.J. (1990). Yeasts strain selection. Marcel Dekker (ed) USA, p: 189.

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 state

culture. African Journal of Biotechnology., 6(5), p: 576-581.

Ramesh, M.V.et Lonsane., B.K. (1989).Solid state fermentation for production of higher titres of thermostable alpha-amylase with two peaks for pH optima by *Bacillus licheniformis* M27. Biotechnology Letters 1, 49–62.

Raty K .(1994). Biological activities of Actinomycetes and fungi isolated from the indoor air of problem houses. International biodeterioration and biodegradation . 34 (2), 143-154.

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.

Rinaldi C., Sutton A. et Fothergill S. R. (1998).The morphology of fungi. Appl. Environ.Microbial. 67: 123-129.

RinaldiM. G. (1989). Emerging opportunists. Infectious Disease Clinics of North America. 3: 65-76.

Robert J. et Braddok A. (1999). Handbook of citrus, by products and processing technologie. 103-105.

Rousselle P., Robert Y., Crosnier J.C.(1996). La pomme de terre, INRA Paris.

Ruohonen L., Penttilä M. et Keränen S. (1991). Optimisation of *Bacillus* α -amylaseproduction by *Saccharomyces Cerevisiae*. Biotechnol. 7(4) : 337-346.

Sauvant, D. (1984). Les pulpes de citrus. ITEB, centre d'information sur les sous produits.

Schomburg D and Salzmann M. (1991). Enzyme Hand book 4. Classe 3: Hydrolases Springer-Verlag (ed). Berlin Heidelberg. Germany. p: 1-12.

Sicard P. (1982). Applications industrielles des enzymes ; In : Les enzymes, production et utilisationindustrielles .Durand G., Monson P. Editions Gauthier .Villars, Paris.p.110-180.

Sicard P. (1982). Applications industrielles des enzymes . In : Les enzymes production et utilisations industrielles . Durand G., Monson P. Editions Gauthier – Villars, Paris.p:121-164.

SimonL., Bousquet J., Levesque R.C., Lalonde M. (1993). Origin and diversification of endomycorrhizal fungi and coincidence with vascular land plants. Nature. 363: 67-69.

Smith S.E.,Read D.J. (1997). Mycorrhizal Symbiosis. Academic Press, Cambridge.

Steer M and Levitzki A. (1973). The metal specificity of mammalian α -amylases as revealed by enzyme activity and structural probes. FEES Leu 31, p:89-92.

Tolan J-S. (1996). Pulp and paper. In: Godfrey T, West S., editors. Industrial enzymology, 2nd ed. New York: Stockton Press, pp.327-38.

Tortora J., Funk B.F. et Case CH.L. (2003). Introduction à la microbiologie, (edn) ISBN. Canada.

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.

Vallee B . L ., Stein E . A ., Summer W.N et Fisher E .H. (1959). Metal content of α -amylases of various origins. J Biol Chem. 234, p:2901-2929.

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, pp.137-55.

Vincent M.(1996). Blood glucose: Its measurement and clinical importance. Clinica Chimica

Vukelić B., Ritonja A., Renko M., Pokorny M., Vitale L. J. (1992). Extracellular α -amylase from *Streptomyces rimosus*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 37 : 202-204.

Fiche technique sur la pomme de terre. Disponible en ligne sur : www.inra.fr (date consultation le: 11/06/2015).

Catalogue of life 2015.

<http://www.catalogueoflife.org/col/details/species/id/8dc8e6e0919ede4ac7fd49edde9bb18>.

date de consultation : 18/06/2015.

Annexe

10- Annexes

Annexe 1 : Milieu PDA (Potato Dextrose Agar)

Extrait de pomme de terre

Glucose 20g

Agar 20g

L'agar et le Glucose sont dissous à chaud dans l'extrait puis le volume est complété à un litre d'eau distillée. Le pH est ajusté à 5. (Larpent, 1997).

Annexe 2 : Milieu YPGA (Yeast-extract-Peptone-Glucose-Agar)

Extrait de levure.....10g

Glucose20g

Peptone10g

Agar.....15- 20 g

Eau distillée.....1000ml

Le pH du milieu est ajusté à 5 (Guiraud, 1998).

Annexe 3 : Milieu de sélection (PDA à 1% d'amidon)

Extrait de pomme de terre1000ml.

Amidon10g.

Agar.....20g.

L'agar et l'amidon sont dissous à chaud dans l'extrait de pomme de terre. Compléter à un litre d'eau distillée, ajuster le pH à 5 et stériliser à 110°C, pendant 30 min.

Annexe 4 : Préparation du Lugol

Iodure de potassium20g.

Iode.....10g.

Eau distillée.....100ml.

Annexe5 : Tampon phosphate

Na H₂ PO₄3g/250ml d'eau distillée.

Na₂ H PO₄4.7g/250ml d'eau distillée.

Eau distillée.....500ml.

Le pH ajusté est 6,5

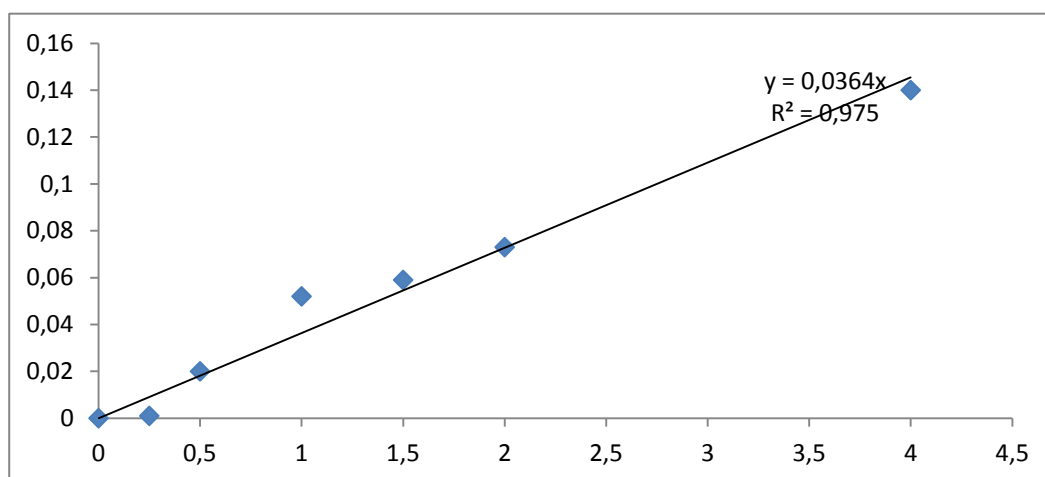
Annexe 6 : Préparation de l'acide dinitrosalicylic (DNS)

Dissoudre 1g d'acide dinitrosalicylic à 60°C dans 20mL de NaOH 2N et 50 mL d'eau distillée, après la solubilisation complète du DNS on ajoute 30g de tartrate double sodium potassium. Le volume final est ramené à 100mL par de l'eau distillée, la solution est conservée à l'abri de la lumière.

Annexe7 : Courbe d'étalonnage

Pour l'établissement de la droite d'étalonnage, les 0,5mL d'échantillon sont remplacés par 0,5 mL de solution fructose à différentes concentrations (0.25, 0.5, 1, 1.5, 2, 4 g/l). L'absorbance de ces concentrations est mesurée à 575 nm avec le spectrophotomètre, la relation linéaire entre l'absorbance et la quantité de sucres des solutions étalons permet d'établir une relation mathématique liant ces deux valeurs.

Cette méthode permet de déterminer la concentration en sucre réducteur présente dans les échantillons.



Courbe d'étalonnage du maltose.

Nom 1 : KOLLI NARIMAN Nom 2 : ZATOUT ROKAYA	Date de soutenance : 25/06/2015						
Thème Production de l'alpha amylase par certaines souches fongiques sur différents substrats							
<p>Résumé :</p> <p>Le présent travail porte sur l'isolement de souches fongiques à partir du sol des milieux arides (sol sahariens) et la sélection des isolats les plus performants pour la production de l'alpha amylase sur différents substrats.</p> <p>L'exploration des échantillons du sol prélevés de la région de Biskra et d'Ouargla (Sud est Algérien) a permis d'obtenir 12 isolats fongiques. Un des isolats (BD9) a été sélectionné pour sa capacité de produire de l'alpha amylase (une enzyme d'intérêt industriel, alimentaire et pharmaceutique) sur milieu PDA à 1% d'amidon comme inducteur. L'identification préliminaire de l'isolat (BD9), basée sur l'étude macroscopique et microscopique, a révélé qu'il s'agit de l'<i>Alternaria alternata</i>.</p> <p>Afin de tester la production de l'alpha amylase dans des fioles de 250 mL, cette souche fongique est cultivée sur un milieu solide à base de déchets d'oranges supplémenté par l'amidon à 1% (substrat inducteur) et un autre milieu solide à base de déchets de pomme de terre.</p> <p>Les résultats de la cinétique de production de l'enzyme par <i>Alternaria alternata</i> ont montré que cette souche est capable de produire des quantités importantes de l'alpha amylase, atteignant 83 U/mg sur milieu solide à base de déchets d'oranges et 19 U/mg sur milieu solide à base de déchets de pomme de terre, et ce, après 72 h et 48 h de culture respectivement.</p>							
<p>Mots clés : Alpha amylase, <i>Alternaria alternata</i>, déchet d'orange, déchet de pomme de terre et sol saharien.</p>							
<p>Laboratoire de recherche :</p> <p>Laboratoire de Mycologie, Biotechnologies et de l'Activité Microbienne (LaMyBAM), Université Frères Mentouri, Constantine</p>							
<p>Jury d'évaluation :</p> <table border="0" style="width: 100%;"> <tr> <td style="width: 50%;">Président de jury: KACEM CHAUCHE N.</td> <td style="width: 50%;">Prof. UFM Constantine.</td> </tr> <tr> <td>Rapporteur: Melle. KARA ALI M.</td> <td>Dr. UFM Constantine.</td> </tr> <tr> <td>Examineur Melle. BENSAREDJ W</td> <td>Dr. UFM Constantine .</td> </tr> </table>		Président de jury: KACEM CHAUCHE N.	Prof. UFM Constantine.	Rapporteur: Melle. KARA ALI M.	Dr. UFM Constantine.	Examineur Melle. BENSAREDJ W	Dr. UFM Constantine .
Président de jury: KACEM CHAUCHE N.	Prof. UFM Constantine.						
Rapporteur: Melle. KARA ALI M.	Dr. UFM Constantine.						
Examineur Melle. BENSAREDJ W	Dr. UFM Constantine .						