

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



جامعة الإخوة منتوري قسنطينة I
Frères Mentouri Constantine I University
Université Frères Mentouri Constantine I

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Microbiologie

كلية علوم الطبيعة والحياة
قسم الميكروبيولوجيا

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

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Microbiologie, Option : Mycologie et Biotechnologie Fongique

N° d'ordre :
N° de série :

Intitulé :

**Modélisation des conditions de culture pour la production de l'enzyme alpha-amylase
par *Aspergillus niger* en fermentation solide**

Présenté par : Bouldjedj Rania
Beghriche Hind
Makhelfi Kaouther

Le 01/06/2022

Jury d'évaluation :

Encadreur : Benkahoul Malika MCA - Université Frères Mentouri, Constantine 1.
Examineur 1 : Meziani Meriem MCB - Université Frères Mentouri, Constantine 1.
Examineur 2 : Abdelaaziz Ouided MCB - Université Frères Mentouri, Constantine 1.

**Année universitaire
2021 - 2022**

Résumé

Résumé

La présente étude porte sur la modélisation, la production et la caractérisation d' α -amylase par *Aspergillus niger* en fermentation à l'état solide. Pour la première expérience quarante souches fongiques ont été isolées à partir de différents échantillons de sol ont fait d'abord un criblage qualitatif sur milieu gélosé à l'amidon, et un criblage quantitatif a été effectué en fermentation en milieu solide. Une souche d'*Aspergillus niger* montrant une production maximale d'enzyme a été sélectionnée (432 ± 0.9 U/ml/min) et le code BTM-26 lui a été attribué. Le rendement de son de blé s'est avéré être le meilleur substrat pour la production d'alpha amylase. La production maximale d'enzyme a été obtenue à 30°C, pH 5 et une taille d'inoculum de 1ml et la vitesse de fermentation maximale a été obtenue après 72 heures d'inoculation. L'ajout de 1.5 % de lactose comme source de carbone, de 0.2% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ et de 0.3% d'extrait de levure comme sources d'azote inorganique et organique respectivement, a permis de donner une production d'enzyme (990 ± 0.81 U/ml/min). Pour la deuxième expérience on utilisant des déchets alimentaires comme substrat pour un rendement maximal en α -amylase. L'activité maximale de l'enzyme (1262.27 ± 2.11 U/g) a été enregistrée après 72 h d'incubation à 30°C, pH 5 avec un taux d'humidité et une taille d'inoculum de 5%. Parmi les différentes sources d'azote et de carbones évalués, la peptone (1.5%), NH_4NO_3 (0.75%) et l'amidon soluble (1.25%) ont donné une production maximale d' α -amylase, dans toutes les conditions de culture optimisées, la production maximale d'enzyme a été (1298.12 ± 2.14 U/g).

Mots clés: Alpha amylase, *Aspergillus niger*, Fermentation à l'état solide, Modélisation.

Abstract

Abstract

The present study deals with the modelization, the production and characterization of α -amylase by *Aspergillus niger* in solid-state fermentation. For the first experiment forty fungal strains were isolated from different soil samples were first qualitatively screened on starch agar medium, and a quantitative screening was done in solid medium fermentation. A strain of *Aspergillus niger* showing maximum enzyme production was selected (432 ± 0.9 U/ml/min) and assigned the code BTM-26. The yield of wheat bran was found to be the best substrate for alpha amylase production. Maximum enzyme production was obtained at 30°C, pH 5 and an inoculum size of 1 ml. The maximum fermentation rate was obtained after 72 hours of inoculation. The addition of 1.5% lactose as carbon source, 0.2% (NH₄)₂SO₄ and 0.3% yeast extract as inorganic and organic nitrogen sources respectively, gave an enzyme production (990 ± 0.81 U/ml/min). For the second experiment we used food waste as substrate. Maximum enzyme activity (1262.27 ± 2.11 U/g) was recorded after 72 h of incubation at 30°C, pH 5 with 5% moisture level and inoculum size. Among the different nitrogen and carbon sources evaluated, peptone (1.5%), NH₄NO₃ (0.75%) and soluble starch (1.25%) gave maximum α -amylase production under optimized conditions, under all optimized culture conditions, the maximum enzyme production was (1298.12 ± 2.14 U/g).

Key words: Alpha amylase, *Aspergillus niger*, Solid state fermentation, Modelization.

تركز الدراسة الحالية على إنتاج ونمذجة Alpha-amylase بواسطة *Aspergillus niger* بالتخمير في وسط صلب . في التجربة الأولى تم عزل أربعين سلالة فطرية من عينات تربة مختلفة حيث أجري فحص نوعي على وسط أجار النشاء، و فحص كمّي بالتخمير في وسط صلب . سلالة من *Aspergillus niger* تظهر أقصى إنتاج للإنزيم (0.9 ± 432 وحدة/مل / دقيقة) وعيّنت 26-BTM كشيعة لها. ووجد أن نخالة القمح هي أفضل ركيزة لإنتاج Alpha-amylase. تم الحصول على أقصى إنتاج للإنزيم عند 30 درجة مئوية، ودرجة الحموضة 5، وحجم لقاح 1 مل و تم الحصول على أقصى معدل تخمير بعد 72 ساعة من التلقيح. بإضافة 1.5% لكتوز كمصدر كربونية، 0.2% $(NH_4)_2SO_4$ و 0.3% مستخلص خميرة كمصادر نيتروجين عضوية وغير عضوية على التوالي سمح بإنتاج إنزيم (0.81 ± 990 وحدة / مل / دقيقة). بالنسبة للتجربة الثانية، استخدم مخلفات الطعام كركيزة للحصول على أقصى إنتاجية من Alpha-amylase. سجّل أقصى نشاط للإنزيم (2.11 ± 1262.27 وحدة / جم) بعد 72 ساعة من الحضارة عند 30 درجة مئوية، ودرجة الحموضة 5، بمستوى الرطوبة وحجم لقاح بنسبة 5%. من بين مصادر النيتروجين والكربون المختلفة التي تم تقييمها ، أعطى البيبتون (1.5%) ، NH_4NO_3 (0.75%) والنشاء القابل للذوبان (1.25%) أقصى إنتاج ل Amylase-Alpha تحت الظروف المثلى. في جميع ظروف الاستزراع الأمثل ، كان الحد الأقصى لإنتاج الإنزيم (2.14 ± 1298.12 وحدة/جم).

الكلمات المفتاحية : *Aspergillus niger* ، Alpha-amylase ، تخمير في وسط صلب ، النمذجة .

Dédicace

*Grace à Allah et avec sa faveur, j'ai pu réaliser ce travail
qui je dédie avec joie, fierté et respect*

*À mes chers parents ma mère : Assia et mon père : Abd el
hack pour tous leurs sacrifices, leur amour, leur tendresse,
leur soutien et leurs prières tout au long de mes études*

À ma grand-mère (Allah yerhmha) : khroufa

*À mon cher frère Abd el Djalil et mes chères sœurs Hadil et
Tassnime*

À toute ma famille

À mes proches amies Asma, Nesrine et Abir

*À mes trinômes Kaouther et Hind on a passé des bons
moments ensemble et on a gardé des bonnes souvenirs*

Du fond de mon cœur je vous dédie ce travail

Rania

*Je dédie ce travail à toutes les personnes qui m'ont poussée
et qui m'ont*

accompagnée tout au long de ces 5 ans.

À ma très chère mère

*Quoi que je fasse ou que je dise, je ne saurai point te
remercier comme il se doit. Ton affection me couvre, ta
bienveillance me guide et ta présence à mes côtés a toujours
été ma source de force pour affronter les différents obstacles.*

À mon très cher père

*Tu as toujours été à mes côtés pour me soutenir et
m'encourager. Que ce travail traduit ma gratitude et mon
affection.*

À ma chère Sœur Kinda et mon Frère Karim,

*À mes chères amis Hind et Rania, pour votre patience et
votre gentillesse.*

*À toute ma famille pour leur soutien tout au long de mon
parcours universitaire.*

Kaouther

*Un grand merci à mes chers parents : ma mère DOUNIA et
mon père : MOUHAMED SALLEH pour tous leurs*

sacrifices, leur amour,

Leur soutien et leurs prières tout au long de mes études.

À mes chers frères HOUSSEME et mon petit prince

NEDJME EDDINE, pour leurs encouragements

permanents, et leur soutien moral,

À ma grande sœur : LINA pour leur soutien et toutes la

famille : BEGHRICHE

Je remercie mes collègues Hayet, Kaouther et Rania pour

leurs efforts dans Ce travail pour le mener à bien de la

meilleure façon

Merci d'être toujours là pour moi

À tous ceux qui, par un mot, m'ont donné la force de

continuer ...

Hind

Remerciements

Nous tenons tout d'abord à remercier Dieu tout-puissant, qui en son nom et avec sa protection, nous avons réussi à réaliser ce travail.

*Nous remercier également toute l'équipe pédagogique de département de la microbiologie et nous adressons nos sincères remerciements à tous les professeurs, intervenants par leurs paroles, leurs écrits, leurs conseils et leurs critiques ont guidé nos recherches. En particulier notre encadrante de mémoire madame **Benkahoul Malika** pour sa patience, sa disponibilité, et surtout pour le temps qu'elle nous a accordé pour notre encadrement orientation, aide et conseils.*

Nous tenons aussi à présenter nos vifs remerciements et notre respect au jury pour l'honneur qu'il nous a fait en acceptant de juger ce mémoire :

*Mme **Abdelaziz Widade** en tant que présidente de jury*

*Mme **Meziani Meriem** en tant qu'examinatrice.*

Sommaire

Abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction générale	1
Partie 1 : revue bibliographiques	
Chapitre 1 : L'alpha-amylase	
1. Introduction.....	5
2. Structure	5
3. Source.....	6
4. Mécanisme d'action... ..	6
5. Applications industrielles.....	7
Chapitre 2 : <i>Aspergillus niger</i>	
1. Généralités sur les champignons.....	9
2. Généralités sur le genre <i>Aspergillus</i>	10
3. <i>Aspergillus niger</i>	10
4. Taxonomie	11
5. Caractères cultureux / Aspect macroscopique.....	12
6. Morphologie microscopique	13
7. Production d'enzyme par <i>Aspergillus niger</i>	14
Chapitre 3 : Fermentation sur milieu solide	
1. Définition.....	16
2. Les étapes suivies en fermentations solides.....	17
2. 1. La préparation du substrat carboné.....	17
2. 2. L'inoculation du milieu de culture.....	18
3. Optimisation de la température, de la teneur en eau, du pH et de l'aération de la culture.....	18
4. Avantages de la FMS	20
5. Inconvénients de la FMS	20
6. Applications de la fermentation solide.....	21
Partie 2 : matériel et méthodes	
1. méthode suivie par Roheena <i>et al.</i> (2014) concernant l'optimisation des conditions de culture pour la production de l'alpha amylase par <i>Aspergillus niger</i> (BTM-26) sur	

FMS	
1. Isolement des microorganismes.....	24
2. Inoculum	24
3. Fermentation à l'état solide	24
4. Essai enzymatique.....	25
5. Analyse statistique.....	25
2. Méthode suivie par Shahzad, M. et al. (2016) concernant l'optimisation de la production de l'amylase par <i>Aspergillus niger</i> sur la peau de pomme de terre	
1. Analyse chimique du substrat	27
2. Préparation de l'inoculum	27
3. Fermentation à l'état solide :	27
4. Optimisation des paramètres du processus.....	27
5. Activité alpha-amylase	28
6. Analyse statistique.....	28
Partie 3: Résultats et discussions	
1. Travaux de Roheena et al. (2014) concernant l'optimisation des conditions de culture pour la production d'alpha amylase par <i>Aspergillus niger</i> (BTM-26) sur FMS	
1. Isolement et sélection des isolats	29
2. Sélection du meilleur milieu pour la production de l'enzyme	31
3. Effet de la concentration du substrat sur la production de l'enzyme.....	31
4. Effet du temps d'incubation.....	32
5. Effet de la température.....	33
6. Effet du pH	34
7. Effet de l'inoculum.....	35
8. Sélection des meilleures sources de carbone.....	36
9. Effet des différentes sources d'azote organique et inorganique.....	37
2. Travaux de Shahzad, M. et al. (2016) concernant l'optimisation de la production de l'amylase par <i>Aspergillus niger</i> sur la peau de pomme de terre	
1. Analyse chimique des pelures de pommes de terre	41
2. Effet de la période d'incubation	41
3. Effet de la température d'incubation	42
4. Effet du pH.....	43
5. Effet du niveau d'humidité.....	44

6. Effet de l'inoculum.....	44
7. Effet des sources de carbone	45
8. Effet des sources d'azote.....	46
9. Comparaison entre les résultats.....	48
Conclusion	52
Références bibliographiques	
Annexes	

Liste

Des abréviations

Des figures

Des tableaux

Les abréviations

FMS : la fermentation en milieu solide

SSF : solid-state fermentation

SMF : submerged fermentation (fermentation submergée)

KDa : kilo dalton, (unité de mesure de masse moléculaire)

Aw : activité de l'eau

pH : potentiel d'hydrogène

M2S5 : Milieu salé aux extraits de malt et de levures

M2 : Milieu aux extraits de malt et de levures

µm : micromètre (mesure de longueur)

mm : Un millimètre (une unité de longueur)

Ca²⁺ : l'ions calcium

ml : millilitre, (unité de mesure de volume).

UFC : une unité formant colonie

rpm : Rotation Per Minute : Le tour par minute (une unité pour mesurer la vitesse de rotation)

mg : milligramme (Unité de mesure de masse)

min : minute (unité de temps)

DNS : L'acide 3,5-dinitrosalicylique

MSM : milieu de sel minéral

g/l : La concentration en grammes par litre

g : gramme (Unité de masse)

Pvt: Pepsicola International

AOAC: Association of Official Analytical Chemists

FB RC: Food and Biotechnology Research Center

PCSIR: Pakistan Council of Scientific & Industrial Research

PDA : Potato-Dextrose-Agar

UI : Unité internationale (une unité de mesure pour la quantité d'une substance)

BSA : l'Albumine Sérum Bovine

SPSS: Statistical Package for the Social Sciences

ANOVA: Analysis Of Variance

USDA: The *United States Department of Agriculture*

U/g : unité de masse atomique

H : heure (une unité de temps)

ET : l'écart type

°C : Degrés Celsius

Liste des figures

Figure	Titre	Page
Revue bibliographiques		
1	structure d' α -amylase	5
2	<i>Aspergillus niger</i> sur milieu M2S5 (a) et <i>Aspergillus niger</i> sur milieu M2 (b)	12
3	Tête conidienne d' <i>A. niger</i> (a) et représentation schématique de conidiophore d' <i>Aspergillus niger</i> (b).	13
4	Modèle de développement d'un champignon filamenteux en FMS	17
Résultat et discussion		
5	Effet de différents milieux de culture sur la production d'alpha amylase par <i>Aspergillus niger</i> (BTM-26) Période de fermentation 72h, pH 6, température d'incubation 30°C.	31
6	Effet de différentes concentrations de son de blé sur la production d'alpha amylase par <i>Aspergillus niger</i> (BTM-26) Période de fermentation 72h, pH 6, température d'incubation 30°C	32
7	Effet de différents temps d'incubation sur la production d'alpha amylase par <i>Aspergillus niger</i> (BTM- 26) Température d'incubation 30°C, pH 6,0.	33
8	Effet de la variation des températures d'incubation sur la production d'alpha amylase par <i>Aspergillus niger</i> (BTM-26) Temps de fermentation 72h, pH 6.0	34
9	Effet de différents pH sur la production d'alpha amylase par <i>Aspergillus niger</i> (BTM-26) Température d'incubation 30°C, Temps de fermentation 72h.	35
10	Influence d'inoculum sur la production d'alpha amylase par <i>Aspergillus niger</i> (BTM-26) Période de fermentation 72h, pH 5, température d'incubation 30°C	36
11	Influence des différentes sources de carbone sur la production de alpha amylase par <i>Aspergillus niger</i> (BTM-26) Période de fermentation 72h, pH 5, température d'incubation 30°C	37
12	Effet de différentes concentrations de lactose sur la production d'alpha amylase par <i>Aspergillus niger</i> (BTM-26) Période de fermentation 72h, pH 5, température d'incubation 30°C	37
13	Effet de différentes sources d'azote organique sur la production d'alpha amylase par <i>Aspergillus niger</i> (BTM-26) Période de fermentation 72h, pH 5, température d'incubation 30°C	38

14	Effet de différentes sources d'azote inorganique sur la production d'alpha amylase par <i>Aspergillus niger</i> (BTM-26)période de fermentation 72h, pH 5, température d'incubation 30°C	38
15	Effet de différentes concentrations de sulfate d'ammonium sur la production d'alpha amylase par <i>A.niger</i> (BTM-26) Période de fermentation 72h, pH 5, température d'incubation 30°C	39
16	Effet de différentes concentrations d'extrait de levure sur la production d'alpha amylase par <i>Aspergillus niger</i> (BTM-26) Période de fermentation 72h, température d'incubation 30°C	40
17	Effet du période d'incubation sur l' α -amylase et la production totale de protéines par <i>Aspergillus Niger</i>	42
18	Effet de la température d'incubation sur l' α -amylase et la production totale de protéines par <i>Aspergillus Niger</i>	43
19	Effet du pH initial sur l' α -amylase et la production totale de protéines par <i>Aspergillus niger</i>	43
20	Effet de l'humidité sur l' α -amylase et la production totale de protéines par <i>Aspergillus niger</i>	44
21	Effet de la taille de l'inoculum sur α -amylase et la production totale de protéines par <i>Aspergillus niger</i>	45
22	Effet des sources de carbone sur l' α -amylase et la production totale de protéines par <i>Aspergillus niger</i>	46
23	Effet des sources d'azote organique sur l' α -amylase et la production totale de protéines par <i>Aspergillus niger</i>	47
24	Effet de la source d'azote inorganique sur la α -amylase et la production totale de protéines par <i>Aspergillus niger</i>	47

Liste des tableaux

Tableau	Titre	Page
Revue bibliographiques		
1	Position systématique d' <i>Aspergillus niger</i>	11
2	production d'enzyme par <i>Aspergillus niger</i>	14
3	Principales applications des procédés FMS dans différents secteurs économiques	22
Matériel et méthode		
4	Composition des milieux pour la production d'alpha-amylase	26
Résultat et discussion		
5	Isolement et criblage de souches fongiques pour la production d'alpha amylase	29
6	Comparaison entre les résultats	48

Introduction

INTRODUCTION

Les amylases sont des enzymes ayant reçu une grande attention en raison de leur importance technologique et leurs avantages économiques. En effet, L'alpha-amylase trouve de nombreuses applications dans différents secteurs (pharmaceutiques, cliniques, médicinales et chimie analytique) (Battle *et al.*, 2000 ; Khan et Yadav, 2011), textile, confiserie, boulangerie, brasserie, les aides digestives, les détergents, le traitement des eaux usées et bien d'autres domaines (Sivaramakrishnan *et al.*, 2006 ; Dhanya *et al.*, 2009 ; Lokeswari, 2010).

L'alpha-amylase (α -1,4-D- glucan glucanohydrolase) (E.C. 3.2.1.1) est une enzyme qui hydrolyse l'amidon en clivant de manière aléatoire les liaisons α - 1,4- D- glucosidiques. Elle libère des oligosaccharides à chaîne courte. Elle est extracellulaire et peut donc être facilement séparée.

Cette enzyme peut être obtenue à partir d'animaux, de plantes et de micro-organismes. Cependant, la quantité d'enzyme synthétisée pour la production industrielle par les plantes et les animaux est si faible qu'elle ne peut pas répondre à la demande du marché. En revanche, une quantité appréciable d'alpha-amylase peut être obtenue de sources microbiennes (fongiques et bactériennes) (Shibuya *et al.*, 1992 ; Ivanova *et al.*, 2001), en raison de certains avantages tels que le faible coût, la fiabilité, le temps et l'espace réduits nécessaires pour la production d'enzymes (Burhan *et al.*, 2003).

Aujourd'hui, le nouveau potentiel de l'utilisation des microorganismes comme sources biotechnologiques d'enzymes d'intérêt industriel a suscité un regain d'intérêt pour l'exploration de l'activité enzymatique extracellulaire de plusieurs microorganismes.

Parmi les genres filamenteux de champignons qui produisent des niveaux élevés d'alpha- amylase, l'*Aspergillus* c'est le plus important. De nombreuses espèces d'*Aspergillus* en particulier *Aspergillus niger* est utilisé pour la production commerciale d'alpha-amylase.

Les champignons filamenteux, sont les microorganismes les plus appropriés pour la fermentation à l'état solide. Ceci est dû à leurs caractéristiques morphologiques qui leur permettent de coloniser et de pénétrer le substrat solide de la manière la plus efficace et à une bonne tolérance à une faible disponibilité en eau. La fermentation en milieu solide a été de plus en plus utilisée pour la production de l' α -amylase en raison de ses avantages : technique simple, productivité supérieure, faible coût, un faible besoin en énergie et une meilleure récupération du produit (Pandey *et al.*, 2000 ; Gangadharan *et al.*, 2006).

INTRODUCTION

Les substrats utilisés jouent un rôle clé dans la production d'alpha-amylase. Divers substrats ont été testés par plusieurs travaux tels que : son de blé, tourteau d'huile de moutarde, son de gramme, drêches de brasserie, son de riz, tourteau de noix de coco, tourteau de gingembre, les déchets végétaux, les peaux de bananes, etc.

L'objectif de l'étude réalisée par les auteurs des deux publications utilisées dans notre mémoire était la modélisation de différents paramètres de processus pour la production d'alpha-amylase par *Aspergillus niger* par fermentation solide.

Le présent travail se résume en ces étapes :

- Dont la première partie, une synthèse bibliographique mettant au point l'alpha amylase et ses applications, *Aspergillus niger* productrice de cette enzyme, la fermentation sur milieu solide et ses avantages.
- La deuxième partie expérimentale mettant au point le matériel et les méthodes utilisées pour la production et la modélisation enzymatique.
- La troisième partie, en se basant sur les résultats des deux travaux pour résoudre les conditions culturelles optimales de la production de l'enzyme.

Partie 1

Revue bibliographique

Chapitre 1

l'alpha amylase

Chapitre 1

Les enzymes appartenant à la famille des hydrolases telles que, les alpha-amylases sont parmi les plus importantes enzymes à l'échelle industrielle, ce qui les rendent l'un des outils-clés des biotechnologies (Little, 2004). L' α -amylase est une macromolécule appartenant à la classe des protéines globulaires, de type endoglycanases, de la classe des hydrolases. Elle hydrolyse l' α -1,4-glycosidiques internes de l'amidon et donne : glucose, maltose et maltotriose (Gupta *et al.*, 2003 ; Rajagopalan et Krishnan,2008). Les enzymes α -amylases sont toutes α -1,4-glucane 4-glucanohydrolases (C.E.3.2.1.1) (Ramachandran *et al.*, 2004 ; Sivaramakrishnan *et al.*, 2007 ; Erdal et Taskin , 2010).

1. Structure

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) .

L' α -amylase possède trois domaines A, B et C dans la structure spatiale, (figure1) :

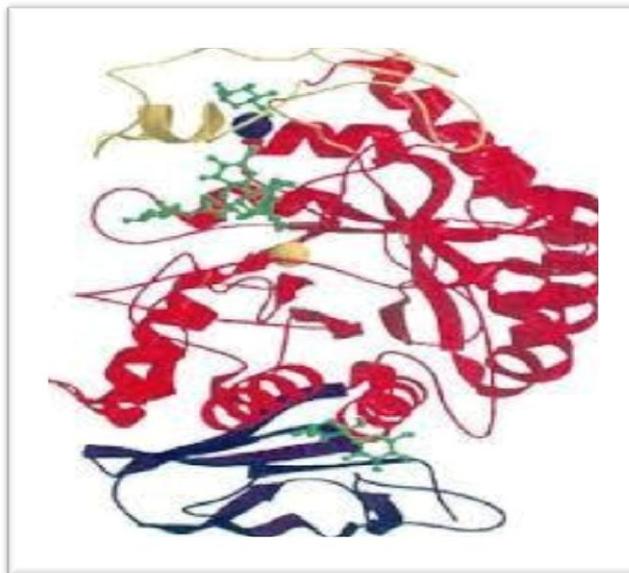


Figure1 : structure d' α -amylase (De Souza et Oliveira, 2010)

Chapitre 1

- Le domaine A est le plus long et renferme le site actif et le site de fixation, du substrat. Il a la forme d'un cylindre appelé cylindre TIM (Banner *et al.*, 1975 ; Mobini-Dehkoedi et Javan, 2012).
- Le domaine B a une structure irrégulière (riche en feuillet β) et variable (Jespersen *et al.*, 1997)
- Le domaine C, coté C- terminal et a une structure dite en sandwich de feuillet (Brayer *et al.*, 1995 ; Qian *et al.*, 1993).

2. Source

Les α -amylases peuvent avoir différentes origines : plantes, animaux et micro-organismes, mais pour la production industrielle les sources microbiennes (fongique et bactériennes) sont utilisées, en raison de certains avantages tels que le faible coût, la fiabilité, le temps et l'espace réduits nécessaire pour la production d'enzyme (Burhan *et al.*, 2003). Les α -amylases microbiennes se rencontrent chez de nombreuses bactéries des genres *Bacillus* (*B.stearothermophilus*, *B.subtilis*...) et *Clostridium*, de nombreuses moisissures des genres *Aspergillus* et *Rhizopus*, ainsi que chez quelques levures des genres *Candida*, *Pichia*, *Endomycopsis*, *Lipomyces* et *Schwanniomyces*. *Aspergillus niger* qui est un groupe clé de micro-organismes, qui domine la production d'enzymes industrielles.

3. Mécanisme d'action

L' α -amylase hydrolyse au hasard des liaisons α (1-4) des chaînes d'amylose et d'amylopectine. On l'appelle encore (endo-amylase) et amylase (liquéfiante) ou (dextrinisante). Le produit principal formé est un oligoholoside de 6 à 7 résidus, accompagné de maltose. Notons que cette enzyme attaque également l'amidon à l'état granulaire. Selon son origine, le pH optimal d'activité varie entre 4.7 et 5.9 et la température optimale d'action se situe vers 50-55°C. À relever que certaines α -amylases d'origine bactérienne ont été modifiées génétiquement pour être actives à des températures supérieures à 90°C (Scriban, 1999).

L' α -amylase extracellulaire coupe de façon aléatoire les liaisons 1,4- α -D-glucosidiques entre les molécules de glucose dans la chaîne d'amylose linéaire et produit

éventuellement gamme de produits tels que le glucose et le maltose (Ramachandran *et al.*, 2004 ; Sivaramakrishnan *et al.*, 2007 ; Erdal et Taskin, 2010).

4. Applications industrielles

Les α -amylases sont utilisées dans les industries de transformation de l'amidon pour l'hydrolyse de polysaccharides tels que l'amidon en constituants simples du sucre, comme l'ont rapporté (Akpan *et al.*, 1999 ; Haq *et al.*, 2002).

Les alpha-amylases sont largement utilisées dans les textiles, la confiserie, la boulangerie, la brasserie, le sucre, l'alcool, le couchage du papier, l'amidon, les produits pharmaceutiques, l'industrie des sirops, les aides digestives, les détergents et le traitement des eaux usées (Sivaramakrishnan *et al.*, 2006 ; Dhanya *et al.*, 2009 ; Lokeswari, 2010).

Chapitre 2

Aspergillus niger

1. Généralités sur les champignons

Les champignons ou fungi (du latin) ou mycètes (du grec mukès) constituent un groupe d'organismes hétérotrophes, non photosynthétiques. Ils se répartissent en deux grands groupes : les levures et les moisissures. Les champignons de formes mycéliennes sont appelés moisissures, alors que les levures sont dépourvues de mycélium et sont des organismes souvent associés en agrégats de plusieurs cellules. Il existe également des champignons dimorphes qui, selon les conditions du milieu peuvent alternativement exister sous forme de levure ou de moisissure. Les champignons sont pour la plupart saprophytes et dégradent au profit de leur croissance toutes sortes de débris organiques.

Les mycètes sont capables de vivre dans un environnement rude. En effet, les mycètes se développent à pH légèrement acide (entre 3 et 7) et à une température optimale comprise entre 20 et 30°C. Cependant certaines espèces sont psychrophiles et se développent à des températures très basses (<15°C) ou même parfois négatives. La reproduction des champignons se caractérise par des formes et des mécanismes très divers et complexes, répartis en deux types : la reproduction asexuée et la reproduction sexuée. Se reproduisent par des spores, selon un mode asexué (imparfait ou végétatif) et/ou sexué (parfait).

En effet, relativement peu de microorganismes ont une application industrielle. Les microorganismes utilisés en industrie sont la plupart du temps des champignons par l'exploitation de leurs aptitudes métaboliques (enzymes et acides organiques). La littérature a montré que les enzymes tels que les amylases, qui ont un intérêt industriel majeur, peuvent être facilement obtenues à partir des genres fongiques, en particulier : *Aspergillus* (Hasnaoui *et al.*, 2020).

2. Généralités sur le genre *Aspergillus*

Décrit pour la première fois il y a près de 300 ans par le prêtre et botaniste Antonio Micheli, *Aspergillus* tire son nom de la ressemblance de sa structure asexuée formant des spores avec le goupillon, un instrument utilisé pour disperser l'eau bénite dans certains services liturgiques chrétiens (Gibbons *et al.*, 2013) *Aspergillus* est donc le nom qui décrit le cycle asexué du genre de champignon imparfait (Deutéromycètes) qui comprend environ 180 espèces, réparties en 18 sections (ESIAB, 2019). Les formes parfaites (téléomorphes) de certaines d'entre elles sont connues, et appartiennent à l'embranchement des Ascomycota (genres *Eurotium* et *Emericella* notamment). Les *Aspergillus* sont des champignons filamenteux, de type moisissure, caractérisés par la présence de conidiophores dressés, terminés par une vésicule supportant (ESIAB, 2019). Ce sont des contaminants fréquents de nombreux substrats, tels que les grains et les produits dérivés (farines, aliments composés pour animaux, etc.). Certains d'entre eux sont pathogènes, et/ou produisent des métabolites toxiques pour les mammifères.

3. *Aspergillus niger*

Aspergillus niger est un représentant cosmopolite des champignons filamenteux microscopiques. Les *Aspergillus* noirs font partie d'un groupe d'espèces appelé « section Nigri » et autrefois connu sous le nom de « *Aspergillus niger* groupe » : toutes les espèces de la section ont des têtes de conidies noires (Marie-Alix d'Halewyn et Pierre chevalier, 2019). Bien que la principale source de cette souche soit le sol, elle se produit fréquemment dans diverses autres sources. La capacité d'*Aspergillus niger* à produire des substances de divers types, telles que des acides organiques de faible poids moléculaire (gluconique, citrique, itaconique, oxalique, malique, acétique, lactique et autres), des enzymes (amylase, aryl-phosphatase, β -glucosidase, cellulase, lipase, et autres) ainsi que d'autres produits du métabolisme, a une grande utilisation non seulement dans les industries alimentaires, médicales, pharmaceutiques et chimiques, mais aussi dans la biotechnologie minérale (Simonovicova *et al.*, 2021).

4. Taxonomie

En raison de son importance économique, l'*Aspergillus* est l'un des genres les mieux décrits du point de vue taxonomique parmi les champignons filamenteux. Al-Musallam, (1980) a révisé la taxonomie du groupe d'*Aspergillus niger* en prenant essentiellement les caractéristiques morphologiques en compte (Kaassis *et al.*, 2019). Récemment, plusieurs méthodes ont été utilisées dans cette section. La classification des espèces dans le groupe varie selon les traitements taxonomiques. La position systématique d'*Aspergillus niger* est résumée dans le tableau 1 comme suivant (Kaassis *et al.*, 2019).

Tableau 1 : Position systématique d'*Aspergillus niger* (Kaassis *et al.*, 2019).

Règne	Mycètes
Embranchement	<i>Amastigomycota</i>
Sous-embranchement	<i>Deuteromycotina</i>
Classe	<i>Deutoromycètes</i>
Ordre	<i>Moniliales</i>
Famille	<i>Moniliaceae</i>
Genre	<i>Aspergillus</i>
Espèce	<i>Aspergillus niger</i>

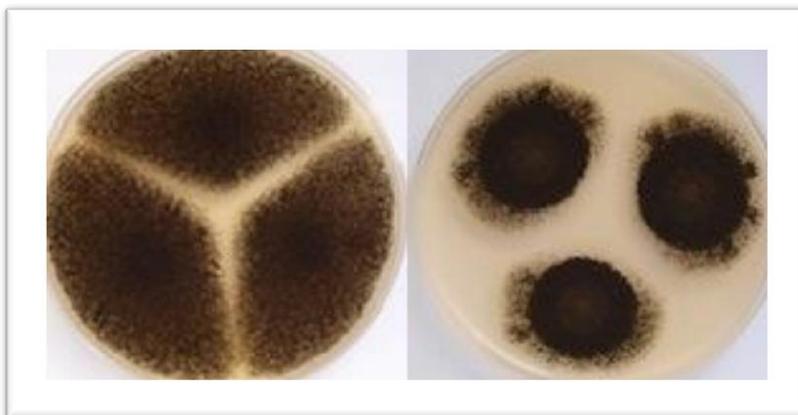
5. Caractères cultureux / Aspect macroscopique

Aspergillus niger se développe sur la matière organique en conditions aérobie (Marie-Alix d'Halewyn et Pierre Chevalier, 2019) est une espèce xérophile, pouvant vivre dans un milieu assez pauvre en eau. Elle peut germer dans un milieu ayant une activité d'eau de $A_w=0,77$ à la température de 35°C . C'est pourquoi elle est fréquemment isolée dans les fruits secs et les noix. Elle peut aussi vivre dans un environnement très humide (90 à 100 %) *A. niger* peut croître à un pH de 2 (acide) à haute activité a_w (Wiki, 2021).

Aspergillus niger est une espèce mésophile : sa température de croissance optimale est de $20-40^{\circ}\text{C}$, avec une bonne croissance à 37°C . Il peut survivre à 60°C (Marie-Alix d'Halewyn et Pierre Chevalier, 2019).

L'identification des *Aspergillus* se fait par une culture en boîte de Petri, sur des milieux de culture classiques. Les *Aspergillus* peuvent être isolés à l'aide de clés utilisant la coloration de la colonie, la pigmentation et la forme de la tête aspergillaire et l'aspect des spores.

Aspergillus niger forme des colonies atteignant 4 à 5 cm de diamètre en 7 jours sur milieu Czapek incubé à 25°C , de couleur noire. La température optimale de croissance se situe entre 25 et 30°C mais il peut croître jusqu'à la température de $47-48^{\circ}\text{C}$. La colonie est d'abord blanche et translucide puis devient noire en sporulant. Le pH du milieu reste inchangé (pH final 5.5) (Wiki, 2021). Colonies formées par un mycélium compact blanc à jaunâtre recouvert par une couche dense de conidiophores noirs (parfois bruns), à bordure blanche. Revers généralement incolore (ESIAB, 2019). (Figure 2)



(a)

(b)

Figure 2 : *Aspergillus niger* sur milieu M2S5 (a) et *Aspergillus niger* sur milieu M2 (b) (ESIAB, 2019).

6. Morphologie microscopique

Têtes conidiennes brun foncé à noires, radiées à l'état jeune puis se séparant en colonnes plus ou moins bien définies à maturité, et pouvant atteindre un diamètre de 700 à 800 μm .

Conidiophore lisse, de 1.5 à 2 mm de long, hyalin ou brunâtre dans leur moitié supérieure.

Vésicule globuleuse de 25 à 75 μm , supportant deux séries de stérigmates sur toute sa surface.

Phialide 7-9.5 x 3-4 μm formées sur des métules généralement brunes 20-30 x 5-6 μm , fréquemment septées.

Conidies brunes globuleuses et ornementées (échinulées à très verruqueuses), 3.5-4.5 μm .

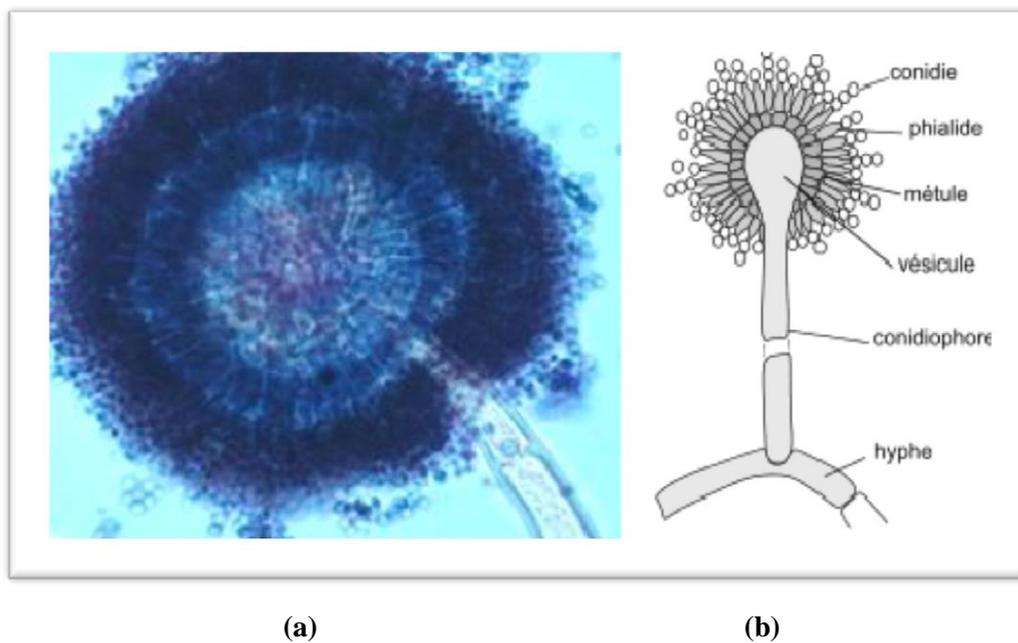


Figure 3: Tête conidienne d'*Aspergillus niger* (a) et représentation schématique de conidiophore d'*Aspergillus niger* (b) (ESIAB, 2019b).

7. Production d'enzyme par *Aspergillus niger*

Aspergillus niger est largement utilisé dans la production des enzymes Commerciales vues les hautes productivités enzymatiques qui peuvent être atteintes (Kaassi *et al.*, 2019) (Tableau 2).

Tableau 2 : Production d'enzyme par *Aspergillus niger* (Kaassi *et al.*, 2019).

Enzyme	Microorganisme	Substrat/Milieu	Référence
Protéase	<i>Aspergillus niger</i>	Son de blé	Villegas <i>et al.</i> , 1993.Demain et Davies , 1999.Ikram –UI-Haq <i>et al.</i> ,2003
Glucoamylase	<i>Aspergillus niger</i>	Son de blé + son de riz + cellulose	Rajoka et Yasmeen ,2005.
Alpha amylase	<i>Aspergillus niger</i> ATCC16404	D'échets d'organe en poudre	Djekrif-Dakhmouche <i>et al.</i> , 2006.
Xylanase	<i>Aspergillus niger</i> XY-1	Son de blé	XU <i>et al.</i> , 2008.
Cellulase	<i>Aspergillus niger</i>	Son de blé	Demain et Davies ,1999.
Lipase	<i>Aspergillus niger</i>	Son de blé +L'huile d'olive	Mahadik <i>et al.</i> . 2002.
Polygalactorunase	<i>Aspergillus niger</i>	Son de blé	Fantana <i>et al.</i> , 2005.
Pectinase	<i>Aspergillus niger</i>	Son de blé+ Cosse de riz	Akhter <i>et al.</i> , 2011.

Chapitre 3

Fermentation sur milieu solide

1. Définition

La fermentation solide (fermentation de substrats solides, fermentation humide, culture solide, etc. et en anglais : solid-state fermentation ou SSF) est généralement définie comme une croissance microbienne sur des particules solides humides en l'absence d'eau libre (Pandey, 2003 ; Gervais *et al.*, 2003 ; Rahardjo *et al.*, 2006), elle diffère de la fermentation en milieu liquide, où le milieu nutritif est complètement solubilisé dans un grand volume d'eau, et de la fermentation en milieu submergé où le milieu nutritif est par exemple sous forme d'une suspension de fines particules dans la phase liquide (Pandey, 2003).

La FMS offre de nombreuses possibilités dans le traitement des résidus agro-industriels. Cela s'explique en partie par le fait que les procédés à l'état solide sont moins gourmands en énergie, produisent moins d'eaux d'usées et sont respectueux de l'environnement car ils résolvent le problème de l'élimination des déchets solides (Pandey, 2003).

De façon simplifiée, les microorganismes se développent dans un système à trois phases : une matrice solide, une phase liquide qui lui est liée et une phase gazeuse prise au piège dans les particules ou entre celles-ci. Rahardjo *et al.* (2006) expliquent la diffusion des moisissures filamenteuses dans le substrat solide humide. Selon les substrats considérés, l'apparition d'eau libre se manifeste pour des teneurs en eau comprises entre 12 et 90% soit 0.65 et 0.98 d'activité d'eau (Mathot, 1996 ; Gervais *et al.*, 2003).

Dans la FMS, les microorganismes peuvent se développer entre les fragments du substrat, c'est-à-dire à l'intérieur de la matrice du substrat, ou sur la surface du substrat. La biomasse microbienne consomme substrats et sécrète des métabolites et des enzymes.

Les champignons filamenteux sont fréquemment utilisés en FMS en raison de leur potentiel élevé d'excrétion d'enzymes hydrolytiques, leur tolérance relativement élevée

Chapitre 3

aux faibles activités de l'eau et leur morphologie. Après la germination, les champignons filamenteux forment des hyphes tubulaires qui s'allongent à leur extrémité et forment en même temps de nouvelles branches le long des hyphes. Leur morphologie permet aux champignons filamenteux de coloniser la surface du substrat et de pénétrer dans la matrice du substrat à la recherche de nutriment (figure 4).

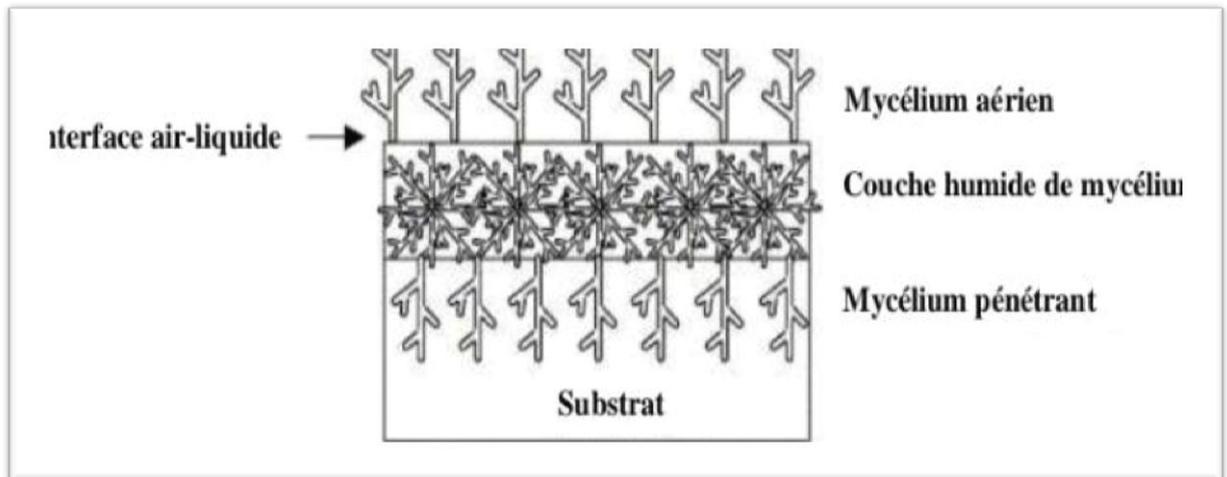


Figure 4 : Modèle de développement d'un champignon filamenteux en FMS (Rahardjo *et al.*, 2006).

2. Les étapes suivies en fermentations solides

Les différentes étapes suivies au cours d'une fermentation solide (Assamoi *et al.*, 2009) sont : d'abord, la préparation du substrat ou du milieu de culture, ensuite la stérilisation facultative du milieu (généralement à 121°C pendant 21 minutes) suivie par le refroidissement de celui-ci et enfin l'inoculation du milieu de culture en maintenant dans la mesure du possible les conditions environnementales optimales (température, pH, teneur en eau).

2.1. La préparation du substrat carboné

Les substrats carbonés utilisés en fermentation solide proviennent essentiellement des résidus agricoles et agroalimentaires. Ce sont les substrats lignocellulosiques (sous forme de paille, de son, de bagasse, de pulpe, etc.), les féculents (résidus de banane, de soja, les graines, etc.), les supports synthétiques (mousse de polyuréthane, résine

polymérique, etc.). La préparation du substrat carboné vise à lui faire subir divers traitements physique, chimique ou biologique (enzymes) afin de favoriser une grande accessibilité des constituants aux microorganismes. Le traitement physique peut se faire soit mécaniquement (broyage, concassage, hachage, aplatissage), soit thermiquement (chauffage, autoclavage, traitement à la vapeur), soit par irradiation. Le traitement chimique se fait par la voie des alcalis, acides, oxydants, gaz et solvants.

2.2. L'inoculation du milieu de culture

L'inoculation du milieu de culture se fait le plus souvent à partir d'une suspension de spores (Mathot, 1996). Les spores étant moins sensibles aux conditions externes et se conservent plus facilement. La quantité optimale de spores à inoculer diffère selon les cas. Un excès de spores peut parfois inhiber la germination. Les spores sont cependant métaboliquement dormantes, impliquant que la dégradation du substrat ne peut s'installer qu'après la germination. Pour minimiser cet inconvénient, une pré-germination des spores est parfois envisagée. Des inoculums (spores + mycélium + substrat) de production peuvent être utilisés également.

3. Optimisation de la température, de la teneur en eau, du pH et d'aération de la culture

À l'échelle industrielle, les contrôles de la température de culture et de l'humidité du milieu sont très importants pour le Scaling up (Bellon-Maurel *et al.*, 2003). La faible conductibilité thermique des substrats utilisés et leur faible teneur en eau réduisent le transfert de chaleur, qui lui-même dépend de la taille des particules de la couche solide. Une élévation de la température dans la masse fermentable due à un dégagement de chaleur métabolique peut aller jusqu'à atteindre 80° C, causant un assèchement de la culture et une baisse de l'Aw et de la disponibilité en nutriments. La mesure de la température se fait souvent dans la couche solide et dans la phase gazeuse entrant et sortant du réacteur grâce à des thermo senseurs, ou des sondes métaboliques. La température de la culture à l'échelle industrielle est généralement régulée par l'injection d'air forcé, l'agitation du réacteur ou par le phénomène d'évaporation. Au laboratoire, la température du milieu de culture est

Chapitre 3

généralement régulée par un bain d'eau thermostatisée ou par une simple régulation de la température de la pièce où se trouve le bioréacteur (Bellon-Maurel *et al.*, 2003).

Chapitre 3

L'eau est impliquée dans la croissance cellulaire et les réactions métaboliques, les activités enzymatiques, les transports des éléments nutritifs, des métabolites extracellulaires et des gaz au cours de la fermentation solide (Bellon-Maurel *et al.*, 2003 ; Gervais *et al.*, 2003).

Les variations de la teneur en eau sont dues à l'évaporation causée par la chaleur métabolique, à l'hydrolyse du substrat et aux productions d'eau. La teneur en eau est habituellement déterminée par les mesures de la matière sèche, laquelle, cependant, ne différencie pas l'eau disponible pour les activités microbiennes (c'est-à-dire l'activité d'eau A_w) de l'eau liée au substrat indisponible aux microorganismes. À l'échelle du laboratoire, l'activité d'eau est contrôlée en plaçant le bioréacteur dans une chambre de culture dont l'humidité de l'atmosphère est régulée par des solutions salines saturées. À grande échelle, le bioréacteur est généralement aéré avec de l'air saturé en eau. Des variations de valeur du pH résultent d'une consommation en substrat (exemple de l'hydrolyse des protéines) et/ou des synthèses métaboliques (exemple des acides organiques).

Les variations de pH sont des indicateurs des changements dans les activités métaboliques (Bellon-Maurel *et al.*, 2003). En fermentation solide, il n'existe pas d'électrode pouvant enregistrer le pH des milieux solides à cause de l'absence d'eau libre. Certains auteurs utilisant d'électrodes potentiométriques ou une électrode à pH standard, après suspension de l'échantillon dans de l'eau distillée. Il est ainsi difficile de contrôler le pH efficacement en fermentation solide. Lorsque cela est nécessaire, la méthode standard est de tamponner le milieu de culture avec un mélange adéquat de composés azotés (urée, sels ammoniacaux), des sels de Ca^{2+} ou des solutions alcalines. Pendant la fermentation, le pH peut être régulé par l'addition d'acides ou de bases à l'eau de refroidissement de la masse fermentable. L'aération des cultures solides joue quatre fonctions, à savoir le maintien des conditions d'aérobies, l'élimination du dioxyde de carbone, la régulation de la température de culture et la régulation de la teneur en eau (Raimbault, 1998). En fermentation liquide, l'aération est souvent le facteur limitant de la croissance microbienne à cause de la faible solubilité de l'oxygène dans l'eau. L'aération en fermentation solide est plus facile qu'en fermentation liquide à cause d'une part, de la diffusion rapide de l'oxygène dans le film humide entourant les particules de substrat, et d'autre part à cause aussi des grandes surfaces de contact entre la phase gazeuse, le substrat et les mycéliens aériens. Généralement, l'oxygène ne constitue pas un facteur limitant en fermentation solide lorsque le substrat est particulaire.

4. Avantages de la FMS

Selon Assamoi *et al.* (2009), les avantages des fermentations solides sont nombreux ceux-ci incluent :

- La simplicité de cette technologie (applicable en milieu rural) et ne nécessitant pas d'équipements sophistiqués pour les contrôles permanents des paramètres environnementaux (facultatifs). Le coût des équipements et des opérations est donc faible.
- L'absence d'eau libre permet de réduire considérablement le volume des installations de fermentation et les contaminations bactériennes.
- Ne nécessitant pas obligatoirement une stérilisation énergétique du substrat de culture et requiert un faible espace.
- De plus, les opérations de mélange étant facilement modulables, il n'y a pas de production de mousses lors des fermentations solides, contrairement aux fermentations liquides. Étant donné que la plupart des procédés de fermentation solide mettent en œuvre des moisissures, ils ne nécessitent pas de stérilisation préalable du substrat, ce qui réduit le coût énergétique nécessaire.
- En calibrant bien les particules du substrat (hachage, broyage, tamisage, etc.), l'aération peut être assurée passivement et/ou sans agitation ou par agitation discontinue. En cas d'aération active ou forcée, une porosité bien étudiée facilite le passage de l'air qui entre facilement en contact avec les moisissures installées en surface des particules.
- En revanche, les moisissures filamenteuses rendent souvent les milieux liquides, fortement visqueux. Ce qui entraîne des problèmes à l'agitation et au transfert d'oxygène (Assamoi, *et al.*, 2009).

5. Inconvénients de la FMS

Bien que la fermentation à l'état solide présente de nombreux avantages, ce procédé présente également des inconvénients (Assamoi *et al.*, 2009) :

Chapitre 3

- Les microorganismes utilisés sont limités. En effet, seuls les microorganismes se développant bien aux basses humidités peuvent être employés.
- Les connaissances physiologiques et technologiques de la croissance des microorganismes sur milieux solides sont faibles.
- Les problèmes de transfert d'oxygène et de chaleur rendent difficile l'augmentation d'échelle des procédés. En effet, la faible quantité d'eau ralentit les échanges de chaleur, pouvant créer des problèmes de surchauffe lorsque des masses importantes sont mises en fermentation. L'évaporation compense partiellement cet échauffement, mais en réduisant l'eau disponible.
- L'évacuation des calories métaboliques peut donc poser un problème qu'il s'agit de résoudre lors du passage de petits essais de laboratoire aux applications en vraie grandeur.
- Il est pratiquement difficile d'assurer une distribution parfaitement homogène de substances ajoutées au substrat et donc du milieu de culture. Ce qui rend le contrôle on line des paramètres de culture tels que le pH, l'humidité et la concentration des nutriments, assez aléatoire.
- Les microorganismes étant inséparables du substrat, l'estimation de la biomasse est délicate.
- La forte concentration des métabolites obtenus, des produits inhibiteurs générés par les microorganismes peuvent s'accumuler.

6. Applications de la fermentation solide

De manière générale, les applications de la fermentation solide concernent l'alimentation humaine (fromages, production de champignons comestibles, koji, choucroute et saucissons secs), le compostage et l'ensilage, la bio-filtration de gaz malodorants, la production d'aliments riches en protéines pour l'alimentation animale, la production d'enzymes (amylases, cellulases, xylanases, etc.) et de métabolites spécifiques (éthanol, acides organique, citrique, etc.) (Assamoi *et al.*, 2009). (Tableau 3)

Chapitre 3

Tableau 3 : Principales applications des procédés FMS dans différents secteurs économiques (Raimbault, M, 1998)

Secteur économique	Application	Exemples
Industrie agro-alimentaire	Fermentations alimentaires traditionnelles	Koji, Tcznpch, Rae, Attickc, Fromages fermentés
	Production de champignons et frai	Agaricus, Pleurotus, Shn-take
	Bioconversion Sous-produits	Pulpe de sucre Bagass Pulpede café' Compostage de l'ensilage, désintoxication
Agriculture	Additifs alimentaires	Arômes. Colorants. Graisses essentielles
	Biocontrôle, Bioinsecticide	Beauveria Metarhizium, Trichoderma
	Croissance des plantes, Hormones	Gioberellines, Rhizobium, Inchoderma
	Mycorhization, Champignons sauvage	Inoctiation des plantes
	Production d'enzymes	Amylases, Cellulases Protéases, Pectinases, Xylanases
Industriel Fermentation	Production d'antibiotiques	Pénécilline, aliments pour animaux et probiotiques
	Production d'acide organique	Acide cirique Acide fumarique Acide gallique Acide lactique
	Ethanol Production	Schwanniomyces sp. Sbrch Maltage et brassage
	Métabolites fongiques	Hormones Alcaloïde

Partie 02

Matériel et méthode

1. méthode suivie par Roheena *et al.* (2014) concernant l'optimisation des conditions de culture pour la production de l'alpha amylase par *Aspergillus niger* (BTM-26) sur FMS

1. Isolement des microorganismes

L'isolement des souches fongiques, s'est fait à partir de différents habitats. Chacun de ces échantillons a subi une série de dilution (10^5 - 10^7) (Clark *et al.*, 1958). 0.5 ml de la suspension de sol a été transférée dans les boîtes de Pétri et incubées à 30°C pendant 3 à 4 jours pour le développement de la moisissure. Ensuite, les colonies ayant formées des zones claires d'hydrolyse de l'amidon ont été prélevées pour déterminer leurs caractéristiques morphologiques afin de les identifier (Onion *et al.*, 1986). Les conidies du champignon isolées ont été transférées de manière aseptique sur les géloses contenant un milieu gélosé à l'amidon. Les géloses ont ensuite été incubées à 30°C pendant 3-5 jours pour une croissance maximale du maximum du champignon et stockés dans un réfrigérateur à 4°C pour le maintien de la culture. Le criblage de toutes les cultures sélectionnées pour la production d'alpha amylase a été effectué par fermentation en milieu solide.

2. Inoculum

Des conidies provenant de cultures en pente âgées de 3-4 jours ont été utilisées pour l'inoculation. Le nombre de conidies a été compté à l'aide d'un hématimètre. Chaque millilitre de la suspension contenait $3,6 \times 10^6$ UFC (Haq *et al.*, 2002).

3. Fermentation à l'état solide

Différents milieux de culture ont été testés pour la production d'alpha-amylase par la souche sélectionnée (Tableau 4). Dix grammes de substrat solide tel que du son de blé humidifié avec une solution minérale. Les milieux de culture sont déposés dans des Erlenmeyer d'une contenance de 250 ml. Ces flacons sont stérilisés à 121°C pendant 15 minutes. Après refroidissement, 1 ml de la suspension de spores est ajouté à chaque flacon et ensuite incubés à 30°C pendant 72 heures. Toutes les expériences sont réalisées en trois

Matériel et méthode

exemplaires. Après incubation, 100ml d'eau distillée ont été transférés dans chaque flacon contenant du son fermenté. Les flacons ont été placés dans un incubateur à 160 rpm pendant une heure. Après une heure, le contenu des flacons a été filtré et le filtrat a été utilisé pour l'estimation de l'activité de l'enzyme (Haq *et al.* , 2002).

4. Essai enzymatique

L'estimation de l'alpha amylase a été effectuée selon la méthode de Rick et Stegbauer (1974). Un ml d'enzyme a été incubé avec 1,0 ml de solution d'amidon soluble à 1% de d'amidon soluble de Litner pendant 30 minutes à 40°C. Le sucre réducteur a été mesuré par la méthode DNS (Miller 1959).

5. Analyse statistique

Les résultats sont regroupés dans le tableau 5 et l'analyse statique (écart type et erreur type) est réalisée par Minitab version 15.

Matériel et méthode

Tableau 4 : Composition des milieux pour la production d'alpha-amylase.

Milieux	Composition	Références.
M1	5 g de Son de blé, 8ml (MSM) (6.2 mg/l Zn SO ₄ .7 H ₂ O ; 6.8 mg/l de FeSO ₄ .7 H ₂ O; 0.8mg Cu SO ₄ .7H ₂ O; 1000 ml Eau distillée.	(Varalakshmi <i>et al.</i> , 2009)
M2	5 g Tourteau d'huile de coco, 2 ml solution salée (2g/l KH ₂ PO ₄ ; 5g/l NH ₄ NO ₃ ; 1.0g/l NaCl; 1.0g/l MgSO ₄ .7 H ₂ O, 1000 ml eau distillée.	(Ramachandran <i>et al.</i> , 2004)
M3	5g Son de riz, 10 ml solution de sel minéral contenant 2g/l KH ₂ PO ₄ ; 5 g/l NH ₄ NO ₃ ; 1.0 g/l NaCl; 1.0 g/l MgSO ₄ .7H ₂ O ; 1000 ml Eau distillée.	(Anto <i>et al.</i> ,2006)
M4	Pelure de pomme de terre 20 g, MSM (0.8 g/l NaCl; 0.1 g/l KCl; 2.0 g/l CaCl ₂ ; 0.2 g/l Na ₂ HPO ₄ ; 8.0 g/l FeSO ₄ ; 2.0 g/l Glucose; 2.0 g/l NH ₄ Cl.	(Khan et Yadav, 2011)
M5	5 g Son de blé ; 5ml eau distillée	(Balkan <i>et al.</i> , 2011)
M6	10 g Son de blé ; 10 ml tampon acétate.	(Haq <i>et al.</i> , 2002)

2. Méthode suivie par Shahzad M. *et al* (2016) concernant l'optimisation de la production de l'amylase par *Aspergillus niger* sur la peau de pomme de terre

1. Analyse chimique du substrat

La peau de pomme de terre utilisée comme substrat a été obtenue auprès de Lays, Pepsicola International (Pvt) Ltd, Lahore, Pakistan. Les teneurs en humidité, en cendres, en azote et en matières grasses de la peau de pomme de terre ont été déterminées selon les méthodes standards décrites dans AOAC, (2005).

2. Préparation de l'inoculum

Dix ml d'eau distillée stériles a été ajoutée à une culture sporulée vieille de 5 jours. Une aiguille à inoculum a été utilisée pour déloger les grappes de spores dans des conditions stériles, puis on l'a secoué soigneusement pour préparer une suspension de spores homogénéisée.

3. Fermentation à l'état solide

Vingt grammes de pelures de pommes de terre brutes amendées avec 2 ml de solution de sel minéral contenant 10g/l de KH_2PO_4 ; 2.0 g/l MgSO_4 ; 2,0 g/l NaCl et 0.5 g/l MnSO_4 dans un Erlenmeyer de 250 ml. La stérilisation se fait à 121°C pendant 15 minutes. Ensuite, le matériel de la fiole a été refroidi à température ambiante et inoculé avec 1 ml de suspensions de spores dans le flux d'air laminaire à l'aide d'une pipette stérilisée. Les flacons ont ensuite été incubés à 30°C pendant 5 jours.

4. Optimisation des paramètres du processus

Divers paramètres du processus ont été optimisés pour une production maximale d'enzymes, comme suit : période d'incubation (24-144 h), température d'incubation (20-50°C), pH initial (4-9), teneur en humidité initiale (0, 2.5, 5, 7.5, 10, 12.5, 15%), taille de l'inoculum (2.5, 5, 7.5, 10, 12.5, 15%). Des expériences ont également été réalisées pour

Matériel et méthode

évaluer l'influence de différentes sources de carbone sur la production d' α -amylase dans les conditions de fermentation optimisées (maltose, glucose, galactose, lactose, fructose, amidon soluble) et des sources d'azote (extrait de levure, peptone, etc.), (extrait de levure, peptone, tryptone, extrait de bœuf, $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$, NH_4NO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NH_4Cl et NaNO_3).

Après incubation, 50 ml de tampon de citrate (pH 5.0) ont été ajoutés dans chaque flacon contenant la matière fermentée et placés sur un agitateur à 200 rpm pendant 60 min. Ensuite, le mélange a été filtré et centrifugé à 8000 rpm pendant 15 min à 4°C, l'enzyme brute est ainsi obtenue pour doser l'activité de l' α -amylase.

5. Activité alpha-amylase

L'activité enzymatique a été mesurée en utilisant une procédure modifiée basée sur la méthode de Okolo et al. (1995). Le mélange réactionnel contenant 1ml d'extrait d'enzyme et 1 ml de solution d'amidon soluble (1%) a été incubé pendant 30 minutes à 50°C. Les sucres réducteurs libérés ont été estimés par la méthode de l'acide dinitrosalicylique (DNS) de Miller (1959) en utilisant le maltose comme standard. Le blanc contenait 1ml d'eau distillée au lieu de 1ml d'extrait enzymatique. Une unité (UI) d' α -amylase est définie comme la quantité d'enzyme qui libère 1 μg de sucre réducteur en tant que maltose par minute dans les conditions standard de l'essai.

6. Analyse statistique

Toutes les données obtenues à partir des expériences ont été analysées statistiquement par le logiciel SPSS pour l'analyse statistique. Le test ANOVA a été appliqué au niveau de signification de $p < 0.05$.

Partie 3

Résultat et discussion

Résultat et discussion

1. Travaux de Roheena *et al.* (2014) concernant l'optimisation des conditions de culture pour la production d'alpha amylase par *Aspergillus niger* (BTM-26) sur FMS

1. Isolement et sélection des isolats

Quarante souches fongiques différentes ont été isolées et identifiées selon Onion *et al.* (1986). Ces isolats ont été testés pour la production d'alpha-amylase par fermentation à l'état solide (tableau 5).

Tableau 5 : Isolement et criblage de souches fongiques pour la production d'alpha amylase

Nom de l'isolat	Code	Activité enzymatique (U/ml/min)
<i>Aspergillus niger</i>	BTM-1	235 ± 0.5
<i>Rhizopus sp.</i>	BTM-2	115 ± 0.3
<i>Aspergillus tamarii</i>	BTM-3	357 ± 0.5
<i>Trichoderma viridi</i>	BTM-4	134 ± 1
<i>Aspergillus niger</i>	BTM-5	342 ± 1
<i>Aspergillus flavus</i>	BTM-6	212 ± 0.7
<i>Fusarium sp.</i>	BTM-7	161 ± 0.8
<i>Aspergillus oryzae</i>	BTM-8	376 ± 1
<i>Aspergillus sp.</i>	BTM-9	274 ± 0.8
<i>Rhizopus sp.</i>	BTM-10	384 ± 0.6
<i>Aspergillus niger</i>	BTM-11	119 ± 0.6
<i>Aspergillus sp.</i>	BTM-12	213 ± 0.8
<i>Fusarium sp.</i>	BTM-13	124 ± 0.1
<i>Aspergillus oryzae</i>	BTM-14	332 ± 1
<i>Rhizopus sp.</i>	BTM-15	266 ± 0.8
<i>Aspergillus niger</i>	BTM-16	399 ± 1.5
<i>Rhizopus sp.</i>	BTM-17	258 ± 0.9

Résultat et discussion

<i>Aspergillus niger</i>	BTM-18	365 ± 0.7
<i>A. oryzae</i>	BTM-19	362 ± 0.8
<i>Rhizopus sp.</i>	BTM-20	377 ± 0.6
<i>Fusarium sp.</i>	BTM-21	281 ± 0.5
<i>Aspergillus niger</i>	BTM-22	406 ± 0.7
<i>Rhizopus oligosporous</i>	BTM-23	397 ± 0.9
<i>Fusarium sp.</i>	BTM-24	201 ± 0.3
<i>Rhizopus sp.</i>	BTM-25	309 ± 0.5
<i>Aspergillus niger</i>	BTM-26	432 ± 0.9
<i>A. oryzae</i>	BTM-27	303 ± 0.7
<i>Rhizopus sp.</i>	BTM-28	231 ± 0.5
<i>Aspergillus oryzae</i>	BTM-29	327 ± 0.8
<i>Fusarium sp.</i>	BTM-30	238 ± 0.7
<i>Aspergillus niger</i>	BTM-31	238 ± 0.9
<i>Aspergillus oryzae</i>	BTM-32	174 ± 0.9
<i>Aspergillus niger</i>	BTM-33	254 ± 0.8
<i>Aspergillus niger</i>	BTM-34	360 ± 0.7
<i>Trichoderma viridi</i>	BTM-35	200 ± 0.8
<i>Aspergillus niger</i>	BTM-36	269 ± 0.5
<i>Aspergillus oryzae</i>	BTM-37	183 ± 0.6
<i>Rhizopus sp.</i>	BTM-38	377 ± 0.7
<i>A. oryzae</i>	BTM-39	285 ± 0.9
<i>Aspergillus niger</i>	BTM-40	399 ± 0.9

La souche ayant reçu le code BTM-26 est l'isolat présentant l'activité maximale d' α -amylase (432U/ml/min±0.9) et a été sélectionné pour les tests ultérieurs. Il s'agit d'*Aspergillus niger*. L'hyperproducteur sélectionné (BTM-26) a été réservé pour une optimisation supplémentaire des conditions de culture pour la production d'alpha amylase.

2. Sélection du meilleur milieu pour la production de l'enzyme

Parmi les six milieux testés pour la production d' α -amylase par *Aspergillus niger* (BTM-26). Le milieu M5 a présenté le meilleur résultat (Figure 5), La raison pourrait être que l'aptitude du son de blé pour une production optimale d'enzymes réside dans sa composition chimique, car il contient une proportion appropriée de fibres, d'hydrates de carbone, de protéines et de graisses nécessaires à la croissance du micro-organisme et à la production d'alpha-amylase (Haq *et al.*, 2012).

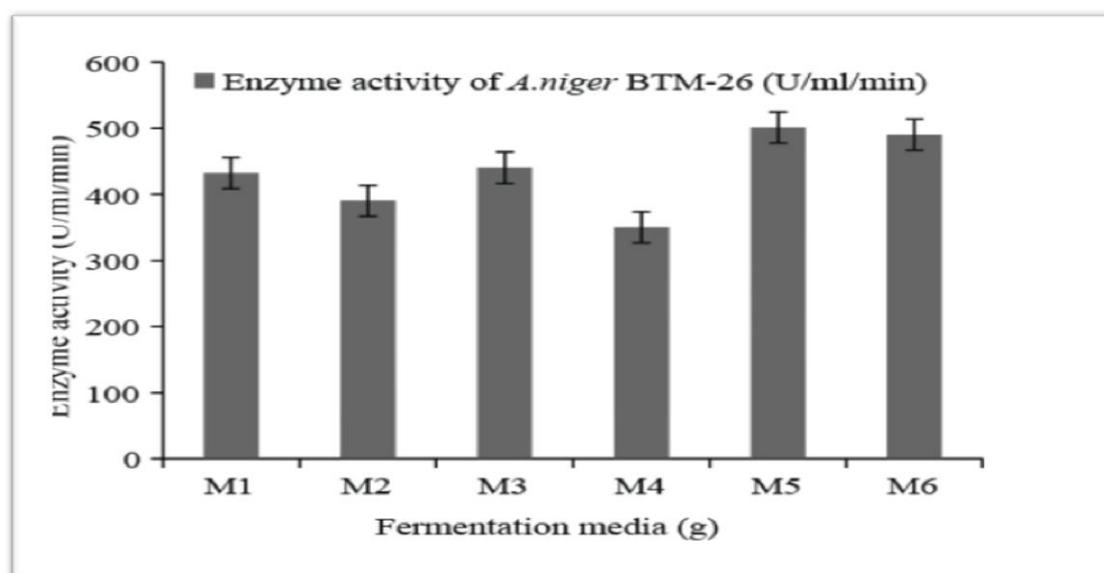


Figure 5 : Effet de différents milieux de culture sur la production d'alpha amylase par *Aspergillus niger* (BTM-26) Période de fermentation 72h, pH 6, température d'incubation 30°C.

3. Effet de la concentration du substrat sur la production de l'enzyme

La figure 6 montre l'effet de la concentration du son de blé (2.5 à 12.5 %) sur la production d'alpha-amylase par *Aspergillus niger* (BTM-26). La production d'alpha amylase augmente progressivement jusqu'à 10 g de son de blé, puis diminue. Les rendements enzymatiques étaient les plus élevés à une concentration de 10 g de son de blé. Par conséquent, cette concentration a été retenue pour la suite de l'étude.

Résultat et discussion

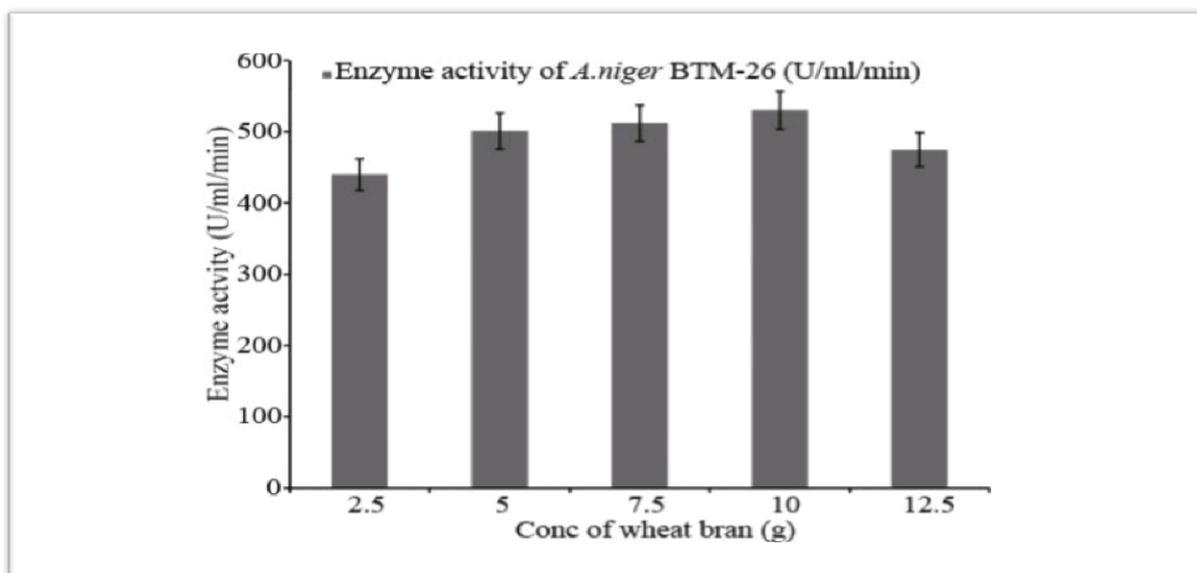


Figure 6: Effet de différentes concentrations de son de blé sur la production d'alpha amylase par *Aspergillus niger* (BTM-26), Période de fermentation 72h, pH 6, température d'incubation 30°C

4. Effet du temps d'incubation

L'effet de différents temps d'incubation de (0 - 96 heures) sur la production d'alpha amylase par *Aspergillus niger* (BTM 26) a également été testée et les résultats représentés dans la figure 7 montrent que la production d'alpha amylase a augmenté progressivement avec le temps jusqu'à 72 heures. Au-delà de ce niveau, on a observé une diminution de la production d'enzymes. Ce temps d'incubation est donc sélectionné pour une optimisation ultérieure.

La raison pourrait être que le champignon en pleine croissance a atteint la fin de la phase logarithmique et est entré dans la phase de croissance stationnaire. Ceci a été en témoigne Prescott et Dunn (1987) l'ont démontré en rapportant que l'accumulation d'alpha-amylase par une souche fongique a atteint le niveau optimal dans la phase de croissance stationnaire. L'incubation au-delà de 72 h a entraîné une diminution du rendement enzymatique. La réduction de la production d'enzymes pourrait être due à la baisse de la teneur en nutriments et en sucre. En outre, inhibiteurs générés par le champignon pourraient également être la cause possible (Ramesh et Lonsane, 1990 ; Krishna et Chandrasekaran, 1996).

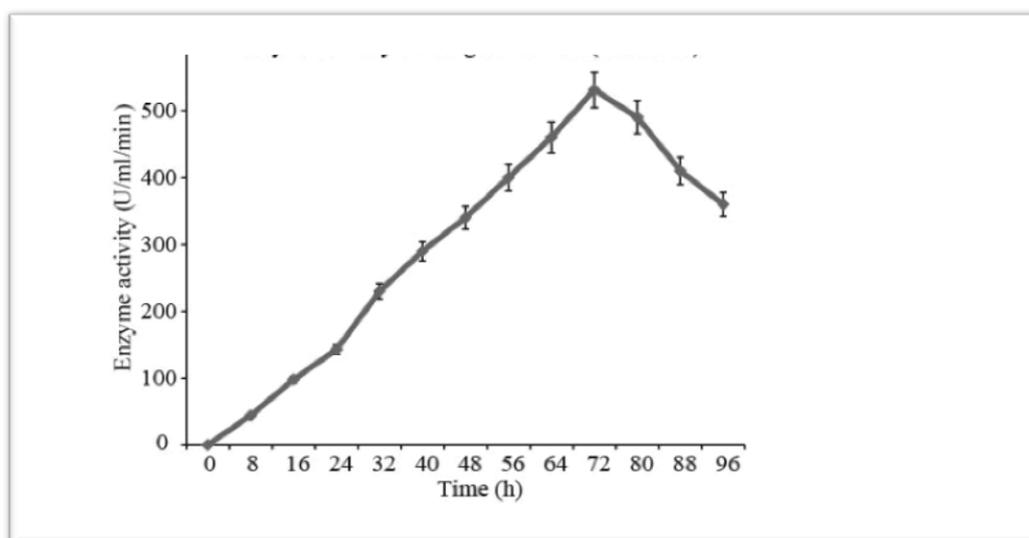


Figure 7: Effet de différents temps d'incubation sur la production d'alpha amylase par *Aspergillus niger* (BTM- 26), Température d'incubation 30°C, pH 6.0.

5. Effet de la température

L'effet de différentes températures (20°C à 50°C) sur la production d' α -amylase par *Aspergillus niger* (BTM-26) a été évalué. Dans cette étude, une température de 30°C s'est avérée être la température optimale. En effet, des températures plus élevées entraînent une diminution progressive de la production d'enzymes.

La diminution de la production d'enzymes est liée à la réduction de la teneur en humidité. En effet, une température élevée provoque l'évaporation dans le FMS et entraîne une diminution du niveau d'humidité contenu dans le milieu. Réduction de la teneur en humidité, à son tour abaisse le taux de croissance du champignon conduisant à une diminution de la production d'enzymes (Roheena *et al.*, 2014). (Figure 8).

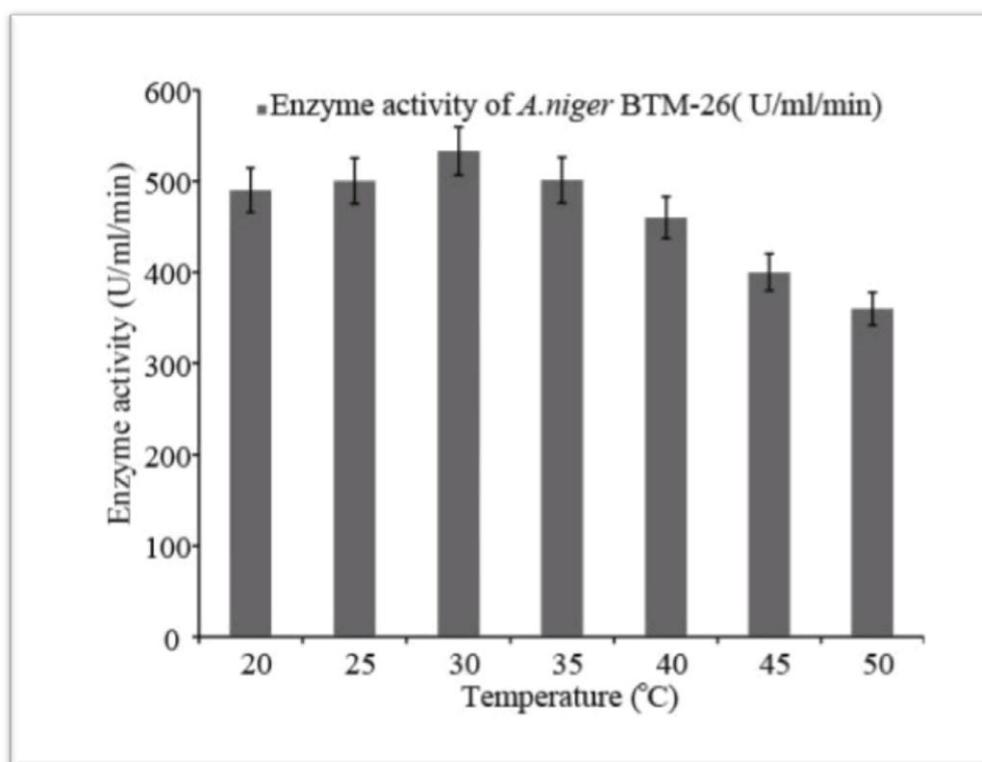


Figure 8: Effet de la variation des températures d'incubation sur la production d'alpha amylase par *Aspergillus niger* (BTM-26), Temps de fermentation 72h, pH 6.0

6. Effet du pH

L'effet de divers pH (3-9) sur la production d'enzymes a été étudié. L'activité maximale est notée à pH 5 (Figure 9). D'après Gupta *et al.*, (2008). Les enzymes fonctionnent plus efficacement sur une plage étroite de pH et sont très sensibles aux petits changements de pH.

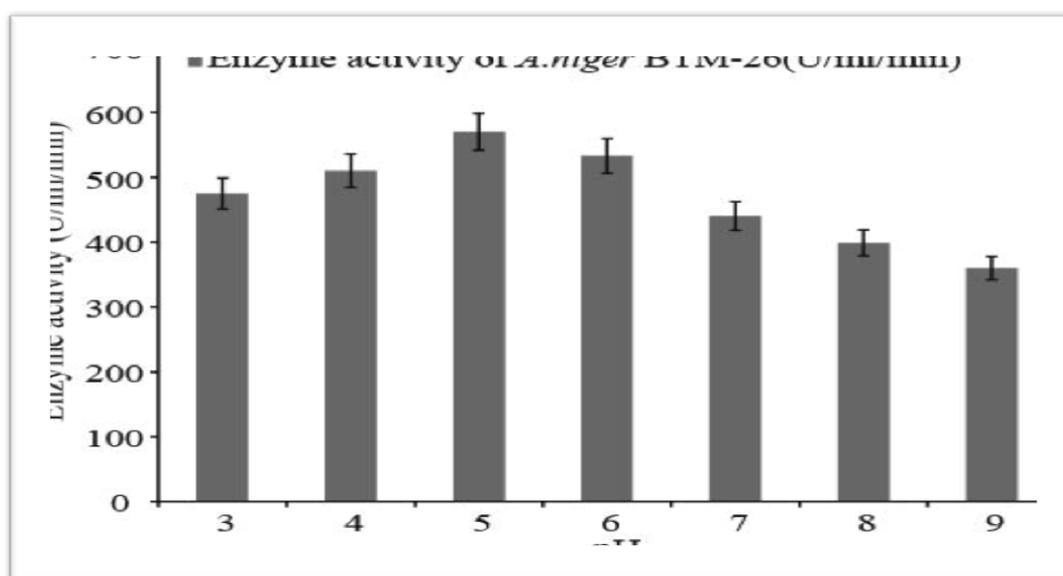


Figure 9 : Effet de différents pH sur la production d'alpha amylase par *Aspergillus niger* (BTM-26),
Température d'incubation 30°C, Temps de fermentation 72h.

7. Effet de l'inoculum

La figure 10 montre l'impact des différentes suspensions sporales (0.5 ml à 2.5 ml) sur la production d' α -amylase par *Aspergillus niger* (BTM-26). 1ml est celle qui a donné le maximum d'activité enzymatique. La croissance du champignon et sa capacité à produire une enzyme est liée à la taille d'inoculum. La diminution de la production d'enzymes à des tailles d'inoculum plus grandes était due à la surcroissance d'*Aspergillus niger* (BTM-26) qui produit des conditions anaérobies. Cela engendre une grande consommation du substrat affectant le processus métabolique de synthèse enzymatique. (Roheena *et al.*, 2014).

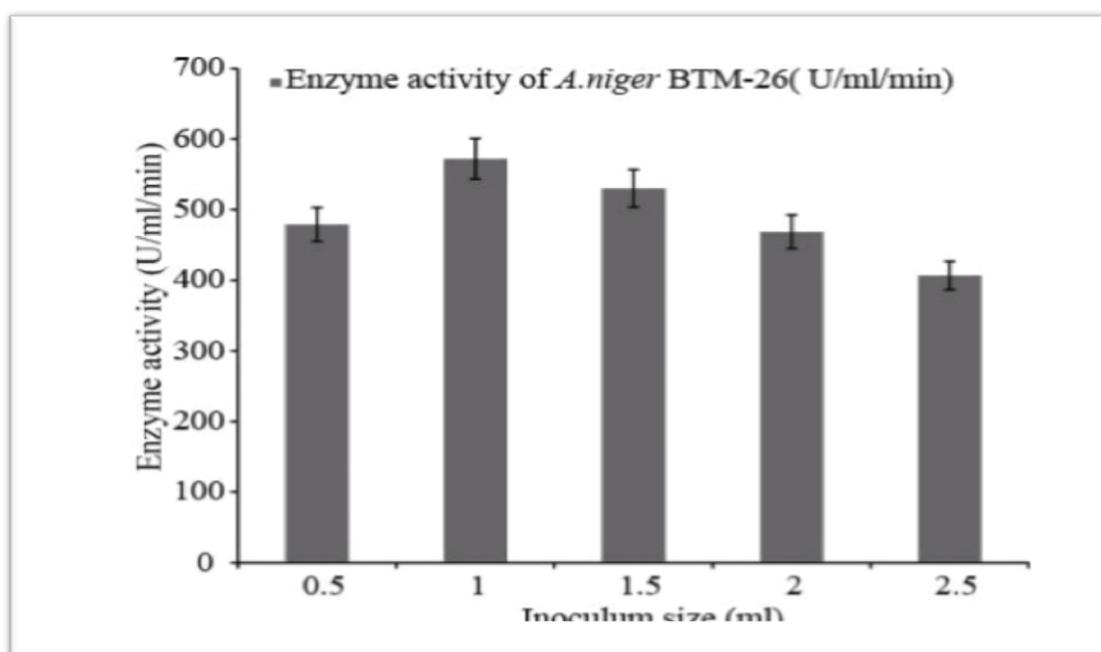


Figure 10 : Influence de l'inoculum sur la production d'alpha amylase par *Aspergillus niger* (BTM-26), Période de fermentation 72h, pH 5, température d'incubation 30°C

8. Sélection des meilleures sources de carbone

L'utilisation des différentes sources de carbone (le lactose, le maltose, le glucose, le xylose et le saccharose) ont été étudiés pour la production d'alpha amylase. De toutes ces sources de carbone, le lactose à une concentration de 1.5% a montré la plus grande production d'enzyme (Figure 11). La diminution de la production d'enzymes à faible teneur en lactose pourrait être due à une plus faible quantité de carbone nécessaire à la synthèse de l'enzyme. L'augmentation de la concentration de lactose au-delà d'un certain seuil donne un excès de carbone qui a causé la répression catabolique (Gupta et *al.*, 2008).

Résultat et discussion

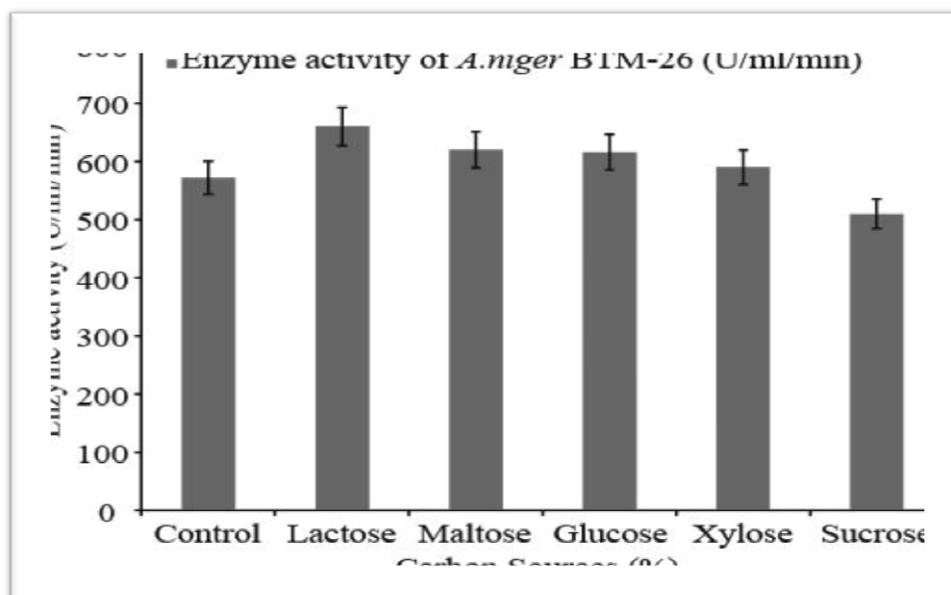


Figure 11 : Influence de différents sources de carbone sur la production d'alpha amylase par *Aspergillus niger* (BTM-26), Période de fermentation 72h, pH 5, température d'incubation 30°C

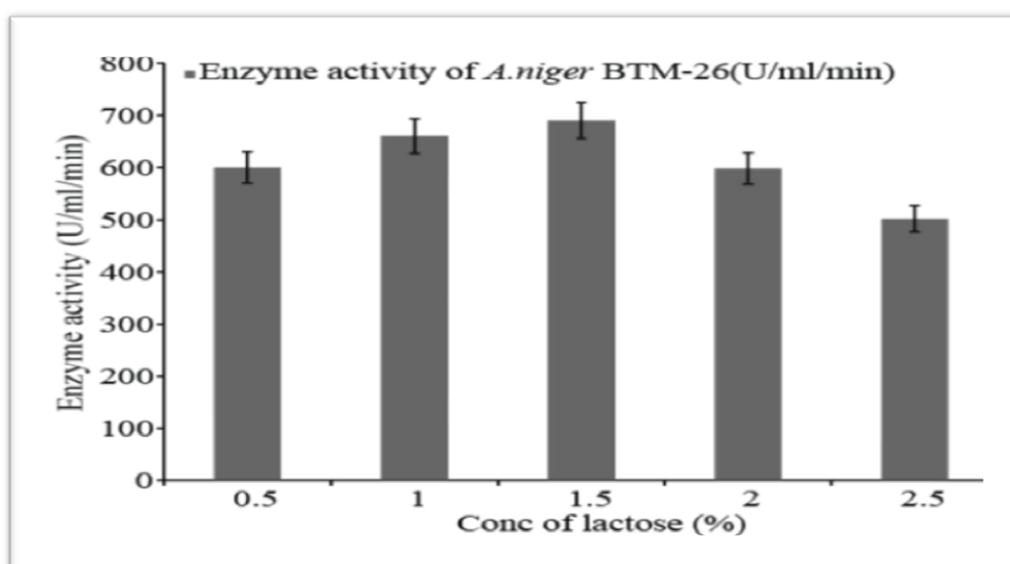


Figure 12 : Effet de différentes concentrations de lactose sur la production d'alpha amylase par *Aspergillus niger* (BTM-26), Période de fermentation 72h, pH 5, température d'incubation 30°C

9. Effet des différentes sources d'azote organique et inorganique

Diverses sources d'azote inorganiques et organiques, à savoir NaNO_3 , KNO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, extrait de levure, peptone, liqueur de maïs et l'urée ont été utilisées dans cette étude pour

Résultat et discussion

tester leur influence sur la production d'enzymes (Figure 13 et 14). Parmi les sources d'azote testées, le $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ et l'extrait de levure se sont avérés les meilleures sources inorganiques et organiques respectivement pour la production d'alpha amylase (Figure 13 et 14). Pour plus d'informations les effets du $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ et de l'extrait de levure sont testés à différentes concentrations.

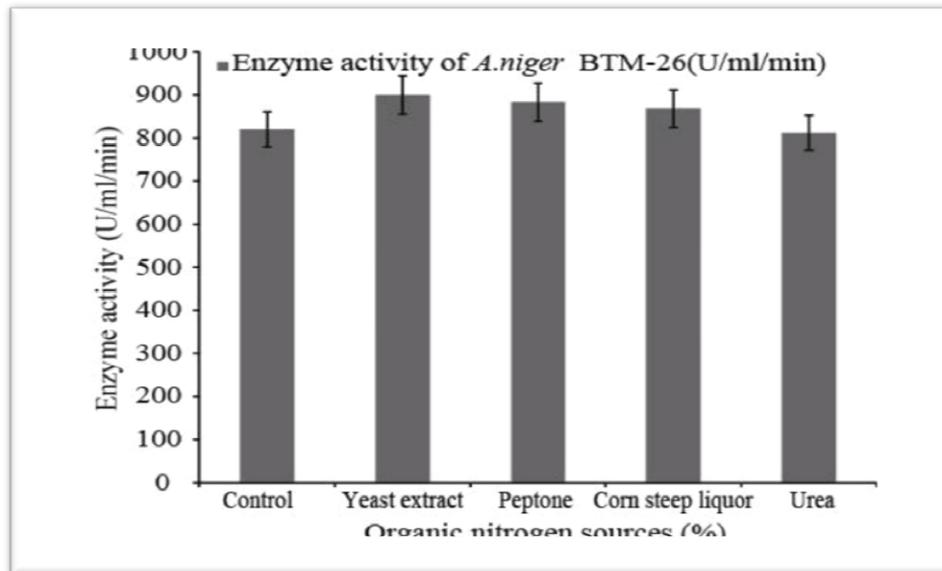


Figure 13: Effet des différentes sources d'azote organique sur la production d'alpha amylase par *Aspergillus niger* (BTM-26), Période de fermentation 72h, pH 5, température d'incubation 30°C

Résultat et discussion

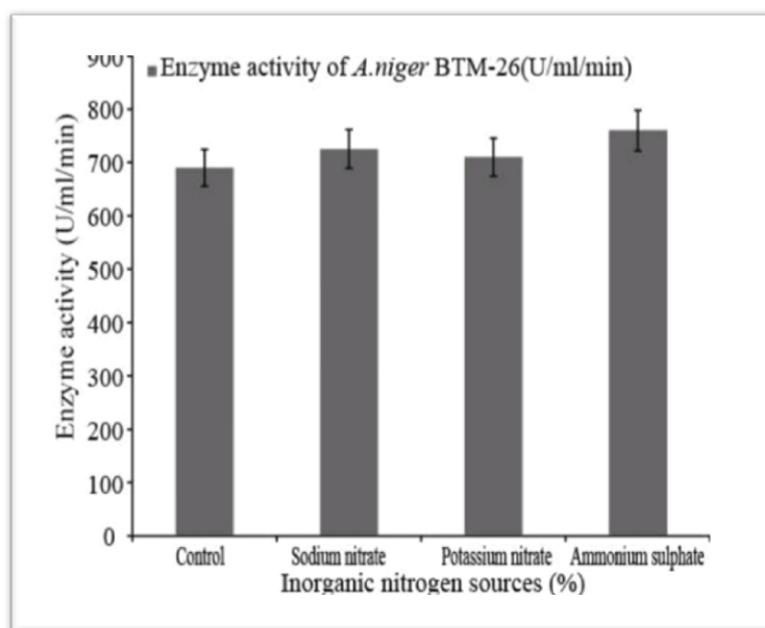


Figure 14 : Effet de différentes sources d'azote inorganique sur la production d'alpha amylase par *Aspergillus niger* (BTM-26) Période de fermentation 72h, pH 5, température d'incubation 30°C

Parmi ces sources d'azote, 0.2% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ et 0.3% d'extrait de levure sont avérés les meilleurs pour la production d'enzymes (Figure15 et 16). La croissance du champignon et la synthèse enzymatique nécessitent l'azote. L'augmentation de la concentration de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ au-delà de 0.2% diminue la synthèse d' α -amylase en raison de l'effet toxique et inhibiteur de l'azote sur la synthèse enzymatique comme le soulignent Anto *et al.* (2006).

Résultat et discussion

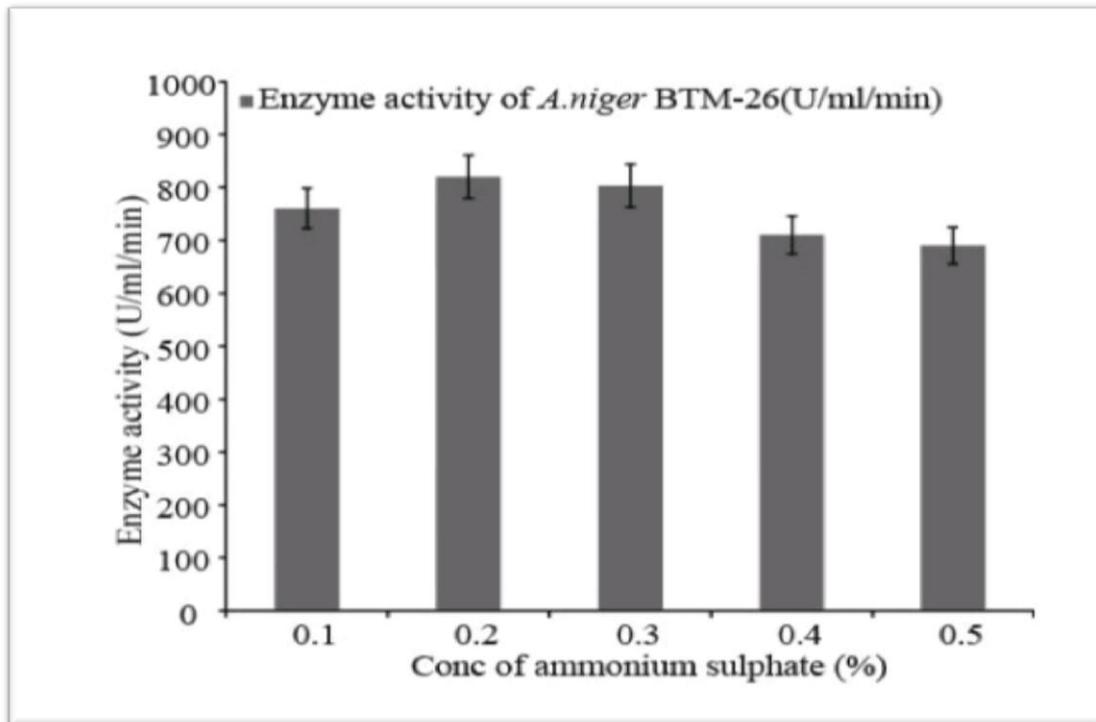


Figure 15 : Effet des différentes concentrations de sulfate d'ammonium sur la production d'alpha amylase par *Aspergillus niger* (BTM-26), Période de fermentation 72h, pH 5, température d'incubation 30°C

Résultat et discussion

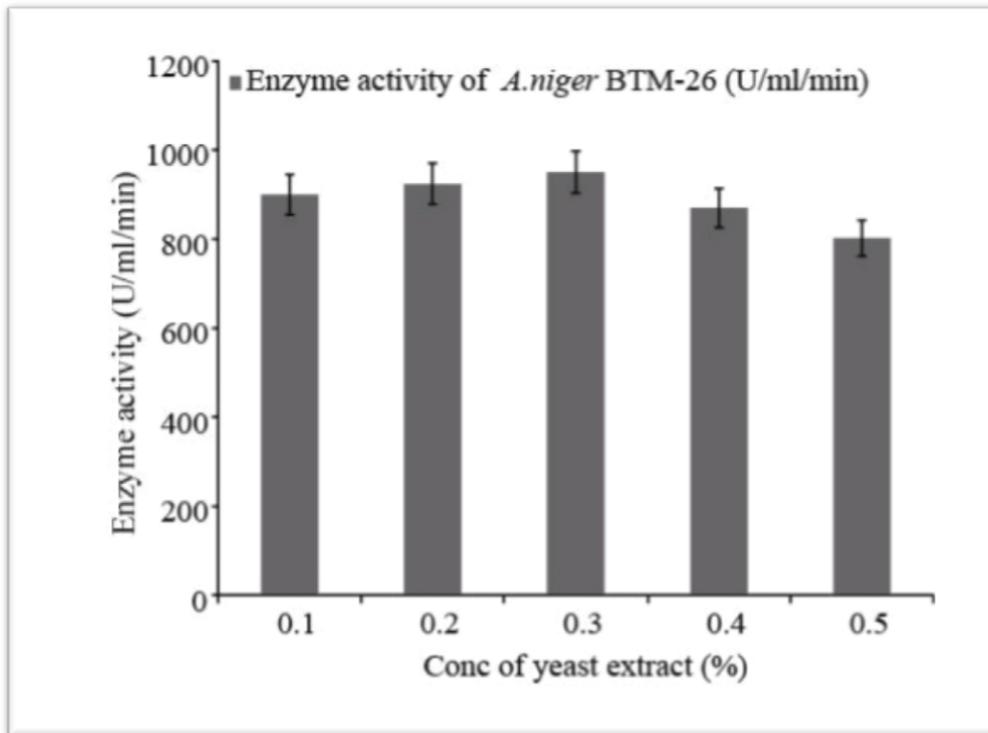


Figure 16 : Effet de différentes concentrations d'extrait de levure sur la production d'alpha amylase par *Aspergillus niger* (BTM-26) Période de fermentation 72h, température d'incubation 30°C

2. Travaux de Shahzad, M. et al. (2016) concernant l'optimisation de la production de l'amylase par *Aspergillus niger* sur la peau de pomme de terre

Dans cette étude, α -amylase était produit à partir d'*Aspergillus niger* par fermentation à l'état solide en utilisant les pelures de pomme de terre comme substrat.

1. Analyse chimique des pelures de pommes de terre

Les résultats concernant la composition de la pelure de la pomme de terre crue a montré que celle-ci contient près de 83.5% d'eau, environ 5.68% de cendres, 2.94% de protéines et 6.74% de matières grasses en poids sec. En comparant ces résultats avec celles publiées par le Ministère de l'Agriculture des États-Unis en 2008 qui a déclaré que pour 100g de peau crue, il y a 83.29 g d'eau, 2.57g de protéines, 1.61g de cendres, 0.1g de matières grasses totales et 2.5g de fibres alimentaires totales. En effet les résultats de l'étude Shahzad *et al.*, (2016) se rapproche à celle du rapport de l'USDA et la variation des résultats peut être due à des différences dans les conditions environnementales.

Lors de la production de l'amylase par *Aspergillus niger* sur la peau de pomme de terre, le processus de fermentation a été optimisés en testant différents paramètres dont : le temps d'incubation, pH, température, taux d'humidité, taille de l'inoculum, la source de carbone et la source d'azote.

2. Effet de la période d'incubation

D'après la figure 17 l'activité enzymatique augmente après 24h d'inoculation. L'activité maximale (1142.70 ± 1.25 U/g), elle est obtenue à 72h, un résultat similaire est noté par Ahmed *et al.*, 2015 ; Haq *et al.*, 2002 ; Ramachandran *et al.*, 2004 ; Tiwari *et al.*, 2007.

Après 72h, une diminution de la production de l'enzyme est notée, elle peut être due soit à l'épuisement des nutriments dans le milieu (Haq *et al.*., 2002 ; Erdal et Taskin, 2010), soit à la dénaturation de l'enzyme (Sindhu *et al.*, 2009) ou en raison de la production d'autres sous-produits (Haq *et al.*, 2002).

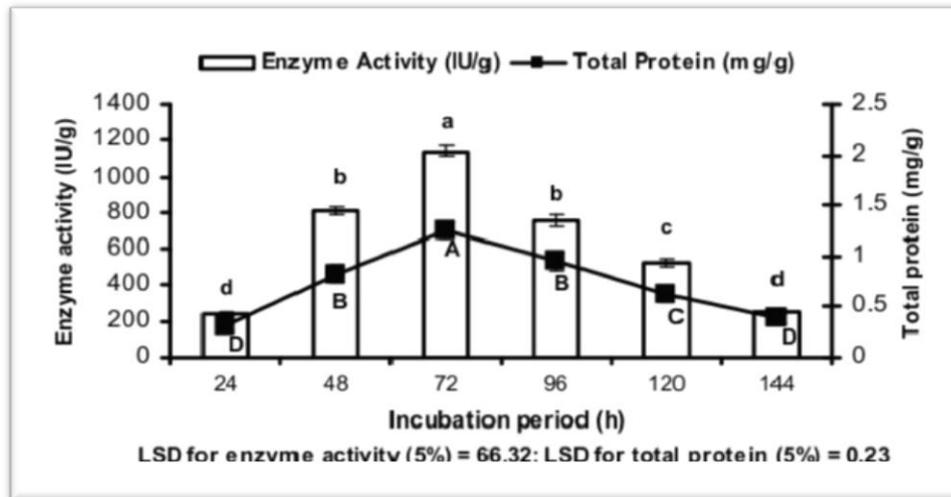


Figure 17: Effet de la période d'incubation sur la production d' α -amylase et la production des protéines

3. Effet de la température d'incubation

L'effet de la température est testé entre 20 et 50°C et la production maximale d' α -amylase par *Aspergillus niger* est représentée dans la figure 18. Elle est obtenue à 30°C (1162,98±1,34U/g). Quand la température est supérieure à 45 °C, une perte de l'humidité du substrat du milieu de fermentation est observé ce qui affecte l'activité de métabolisme du micro-organisme. En effet, ceci entraîne aussi bien la réduction de la croissance et de la production d'enzymes (Sindhu, 2009). 30°C est la température optimale notée pour la production d' α -amylase (Irfan *et al.*, 2012; Ramachandran *et al.*, 2004; Kunamneni *et al.*, 2005; Kathiresan et Manivannan, 2006; Gupta *et al.*, 2008; Chimata *et al.*, 2010; Erdal et Taskin, 2010; Negi et Banerjee, 2010).

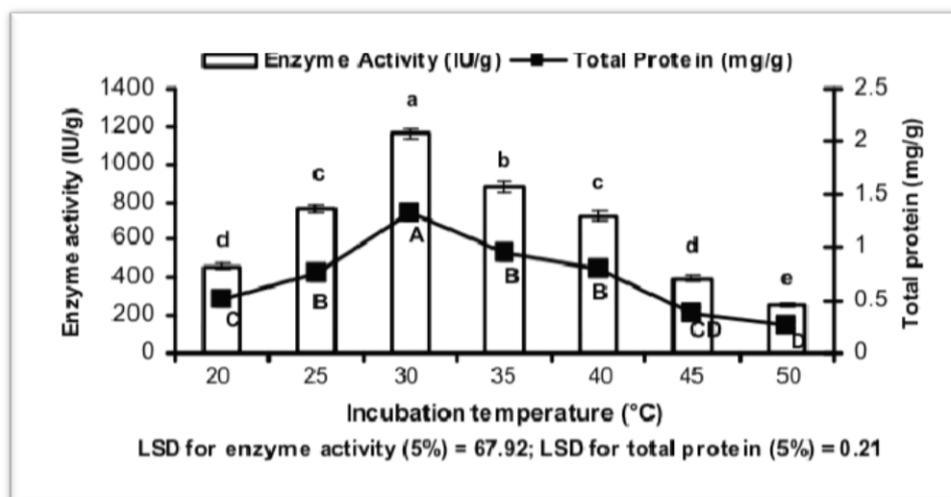


Figure 18: Effet de la température d'incubation sur l' α -amylase et la production totale de protéines par *Aspergillus niger*

4. Effet du pH initial

Effet du pH initial (4-9) du milieu de culture a été déterminé pour une meilleure production d' α -amylase. La production maximale d' α -amylase (1262.27 ± 2.18 U/g) a été obtenue à pH initial de 5 (figure 19). Inférieur ou supérieur à cette valeur de pH, la production d'enzyme était plus faible. Des études antérieures ont également rapporté des résultats similaires pour la production d' α -amylase à pH optimal 5 (Sivaramakrishnan *et al.*, 2007; Gupta *et al.*, 2008 ; Sindhu *et al.*, 2009 ; Chimata *et al.*, 2010; Erdal et Taskin, 2010 ; Negi et Banerjee, 2010; Irfan *et al.*, 2012). Certaines souches d'*Aspergillus niger* présentent un pH initial de 6,0 pour la production maximale d'amylase (Saleem et Ebrahim, 2014).

Résultat et discussion

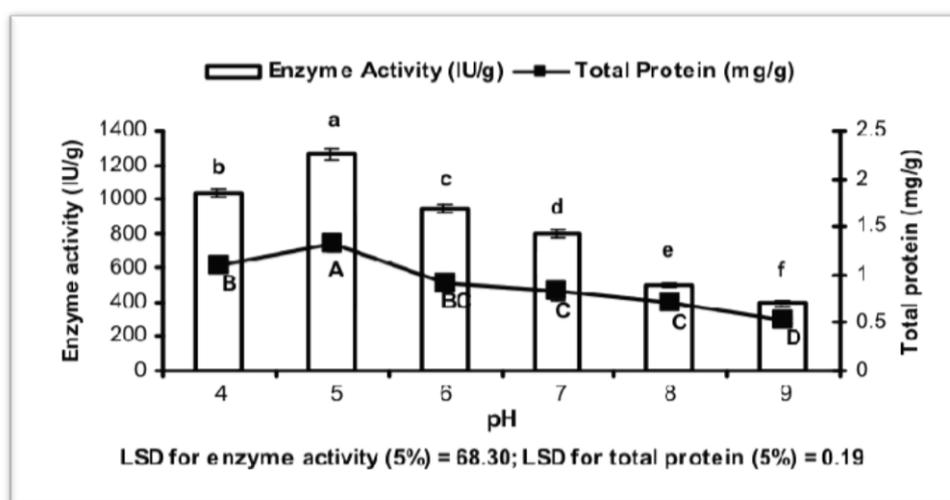


Figure 19 : Effet du pH initial sur l' α -amylase et la production totale de protéines par *Aspergillus niger*.

5. Effet du taux d'humidité

Les effets de divers niveaux d'humidité (0-15%) sur la production d' α -amylase par *Aspergillus niger* sont présentés dans la figure 20.

La production maximale d'enzymes (1051.05 ± 1.83 U/g) a été observée à un taux d'humidité de 5%, une nouvelle augmentation à 15%, il y a eu une baisse de la production d'enzymes. La production maximale d'amylase a été atteinte à 70-90% d'humidité, un résultat déjà révélé par de nombreux chercheurs (Ramachandran *et al.*, 2004 ; Kunamneni *et al.*, 2005 ; Chimata *et al.*, 2010 ; Erdal et Taskin, 2010 et Negi et Banerjee, 2010). Un niveau d'humidité plus élevé diminue la porosité du substrat, favorise l'adhérence et les bouquets de substrat, diminue la dégradation du substrat, réduit le volume et les échanges de gaz, tandis que, une faible teneur en humidité peut conduire à une mauvaise solubilité et accessibilité des éléments nutritifs, un inférieur degré de gonflement du substrat et tension de l'eau plus élevée, ce qui entraîne une mauvaise croissance microbienne et diminution de la production d'enzymes (Mahanta *et al.*, 2008 ; Zambare, 2010).

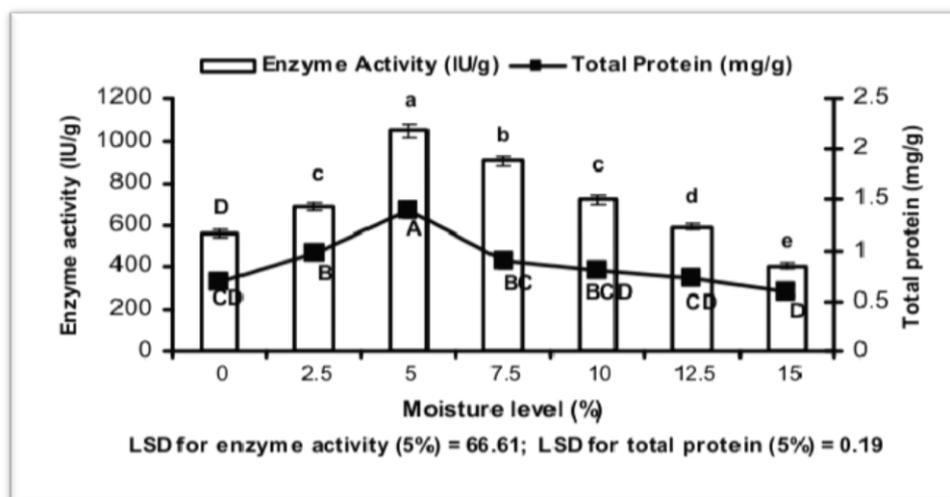


Figure 20 : Effet de l'humidité sur l' α -amylase et la production totale de protéines par *Aspergillus niger*.

6. Effet de la taille de l'inoculum

La figure 21 montre l'effet de diverses tailles d'inoculum (2.5 à 15 %) sur la Production d' α -amylase par *Aspergillus niger* en SMF. La production d'amylase la plus élevée (1047.68 \pm 1.15 U/g) est notée avec une concentration d'inoculum de 5% et puis une baisse marginale de la production enzymatique a été observée à 15%. Résultats similaires ont été signalés par Kareem *et al.*, (2009) et Chimata *et al.*, (2010) qui ont obtenu un maximum d'activité enzymatique à 5% d'inoculum. Certains chercheurs ont obtenu la production d' α -amylase la plus élevée en utilisant un niveau d'inoculum de 10% (Ramachandran *et al.*, 2004; Kunamneni *et al.*, 2005). Une concentration d'inoculum plus faible peut ne pas être suffisante pour amorcer la croissance des champignons et la production des enzymes. L'augmentation de la taille d'inoculum assure une propagation rapide de la biomasse et la synthèse enzymatique. Après un certain seuil, la production de l'enzyme diminue en raison de l'épuisement des nutriments dus à l'augmentation de la biomasse, qui a entraîné une diminution de l'activité métabolique (Kashyap *et al.*, 2002).

Résultat et discussion

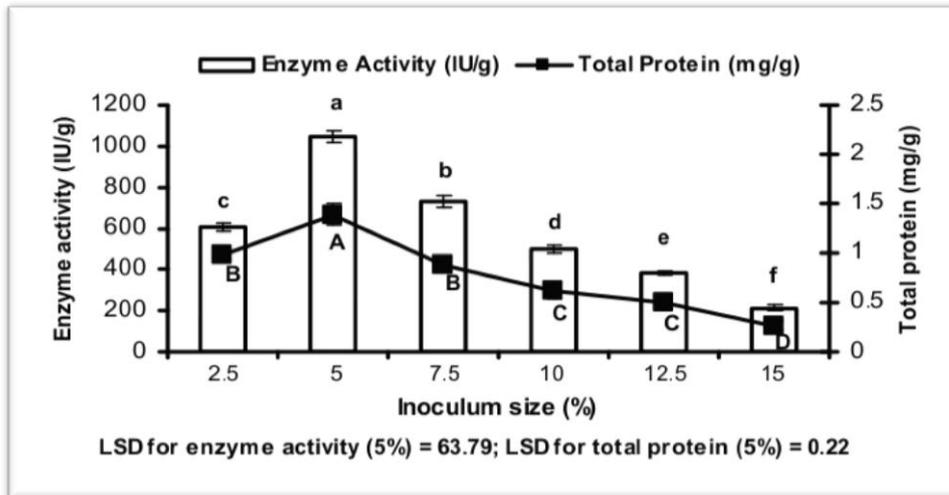
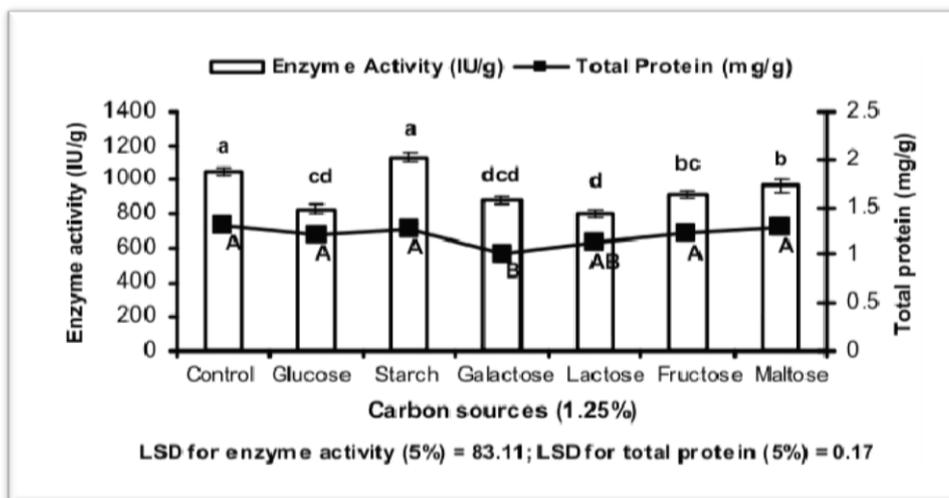


Figure 21 : Effet de la taille de l'inoculum sur α -amylase et la production totale de protéines par *Aspergillus niger*.

7. Effet des sources de Carbone

Divers sources de carbone sont testées comme le glucose, l'amidon, le galactose, le lactose, le fructose et le maltose, la production d' α -amylase a montré une production accrue de l'enzyme (1132.40 ± 1.75 U/g) en présence de l'amidon soluble (figure 22).

Des résultats similaires sont rapportés par de nombreux chercheurs (Ramachandran *et al.*, 2004 ; Kunamneni *et al.*, 2005 ; Varalakshmi *et al.*, 2009 ; Erdal et Taskin, 2010 et Chimata *et al.*, 2010).



Résultat et discussion

Figure 22: Effet des sources de carbone sur l' α -amylase et la production totale de protéines par *Aspergillus niger*.

8. Effet des sources d'azote

Divers sources d'azote organique et inorganique ont été utilisées comme supplément au milieu de culture pour la croissance d'*Aspergillus niger* et production d' α -amylase. Les résultats montrent que la production maximale enzymatique est obtenue avec de la peptone (1180.64 ± 1.43 U/g) et le nitrate d'ammonium (1298.12 ± 1.94 U/g) sous forme organique et inorganique respectivement (figure 23 et 24). Des résultats similaires avaient déjà été signalés dans diverses études (Ramachandran *et al.*, 2004 ; Kunamneni *et al.*, 2005 ; Kathiresan et Manivannan, 2006 ; Tiwari *et al.*, 2007 ; Gupta *et al.*, 2008 ; Chimata *et al.*, 2010 ; Erdal et Taskin, 2010 ; Negi et Banerjee, 2010). Extrait de levure était également la meilleure source d'azote pour la Production maximal d' α -amylase par les espèces d'*Aspergillus* (Ahmed *et al.* , 2015 ; 2014).

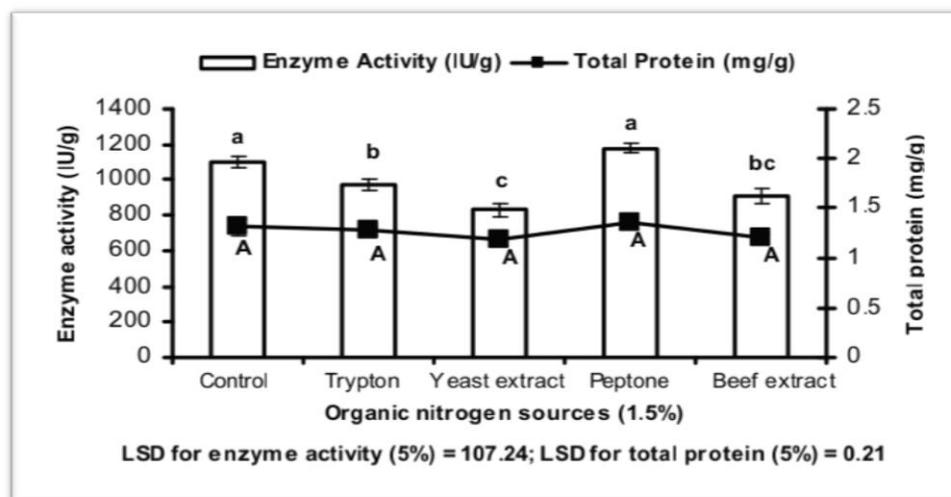


Figure 23: Effet des sources d'azote organique sur l' α -amylase et la production totale de protéines par *Aspergillus niger*

Résultat et discussion

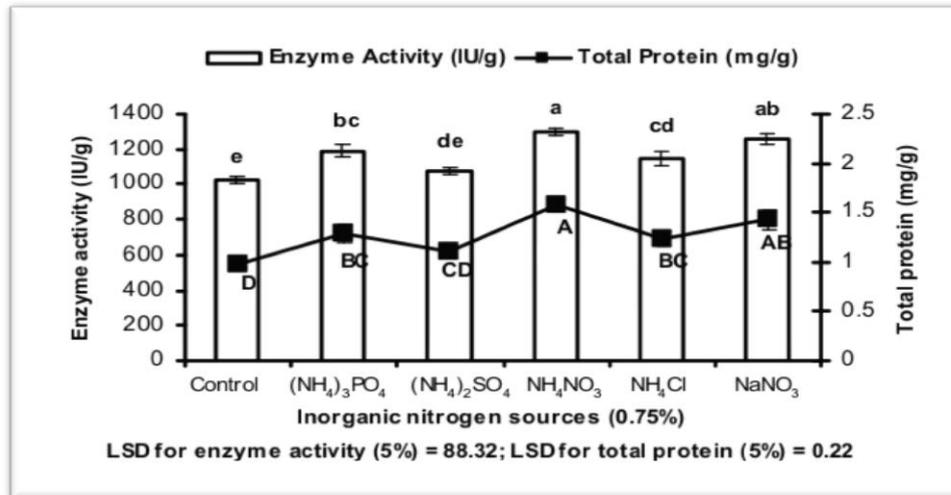


Figure 24 : Effet de la source d'azote inorganique sur la α -amylase et la production totale de protéines par *Aspergillus niger*.

Résultat et discussion

Tableau : Comparaison entre les résultats

Les paramètres sélectionnés pour étudier la production d'alpha - amylase	Travail 1 selon Roheena, A. ; et <i>al</i> (2014)	Travail 2 selon Shahzad, M. ; et <i>al</i> (2016)	Comparaison
La meilleure souche	<i>Aspergillus niger</i> (BTM-26)	<i>Aspergillus niger</i> (SM24)	D'après les deux expériences : Roheena, A ; et <i>al</i> (2014) et Shahzad, M ; et <i>al</i> (2016) montrés que la meilleure souche productrice d'alpha amylase <i>Aspergillus niger</i> (BTM-26) qui donne une production maximale d'enzyme (432±0.9) et <i>Aspergillus niger</i> (SM24)
Substrat	Son de blé	Pelure de pomme de terre	Pour la concentration du substrat Roheena, A ; et <i>al</i> (2014) a montré que meilleur production d'alpha amylase en utilisant 10g du son de blé
Milieu	Milieu M5	PDA	Dans ce travail Shahzad, M ; et <i>al</i> (2016) on utiliser le milieu PDA dans leur travail, Roheena, A ; et <i>al</i> (2014) montré que le milieu M5 est le meilleur pour la production d'alpha amylase
Période d'incubation	72 heures	72 heures	<p>La période d'incubation joue un rôle vital dans la production d'enzyme.</p> <p>Dans la 1^{ère} étude on n'observe que la production d'alpha amylase a augmenté progressivement avec le temps jusqu'à 72 h c'est le temps d'incubation au la production maximale,</p> <p>Pour le 2eme travail</p> <p>Le Rendement en alpha amylase Etait maximale à 72 h d'incubation (1142,70 1,25 µ/g).</p>

Résultat et discussion

Taux d'humidité	Non étudier	5%	La Production maximale d'enzymes (1051,05 1,83μ/g) a été observée à un niveau d'humidité de 5%.
Température	30 °C	30°C	La température est un paramètre important pour la production d'enzymes. La 1 ^{ère} étude montre une température de 30°C s'est avérée être la température optimale pour la production d'enzyme, Dans le deuxième travail la production maximale d'α-amylase a été obtenue à 30 °C (1162,98 1,34μ/g).
pH	pH=5	pH=5	Le pH est un paramètre pour la production d'enzymes. La plupart des micro-organismes sont capables de se développer dans une plage de pH de 5 à 7 (Verma. et al. 2020). Selon Roheena, A ; et al (2014) ont trouvé que la production d'enzymes était maximale (560 μ/ml /min) à pH 5, en comparant avec La production maximale d'α-amylase par <i>Aspergillus niger</i> (SM 24), Shahzad, M et al ;(2016) a été (1262.27 ±2.18 μ/g) obtenue à pH initial moyen 5.
Taille d'inoculum	1ml	5%	Dans la 1 ^{ère} étude, la taille d'inoculum la plus appropriée pour la production maximale était de 1ml, à activité enzymatique (580μ/ml/min) en comparant avec la 2 ^{ème} la production d'amylase la plus élevée (1047.68±1.15μ/g) a été atteint avec une concentration d'inoculum 5%
Source de carbone	Lactose	Amidon soluble	Le carbone est l'un des paramètres les plus importants qui influencent les voies métaboliques des micro-organismes et la production des protéines spécialement les enzymes. Dans ce travail les deux chercheurs ont trouvés que le

Résultat et discussion

			lactose et l'amidon soluble sont les meilleures substrats pour la production optimale d'alpha amylase en successif (700µ/ml/min) et (1133.40±1.75µ/g)
Source d'azote	-Azote organique : extrait de levures - Azote inorganique : sulfate d'ammonium	-Azote organique : peptone -Azote inorganique : nitrate d'ammonium	le 1er travail montre que 0,2 % de sulfate d'ammonium et 0,3 % d'extrait de levure se sont avérés les meilleurs pour la production d'enzymes, pour le 2 ^{ème} travail les résultats ont montré que la production maximale d'enzyme avec peptone (1180.64 ± 1.43 µ/g) et nitrate d'ammonium (1298.12 ± 1.94 µ/g) sous forme organique et inorganique source d'azote respectivement.

Conclusion

Conclusion

L'objectif principal de ce travail est d'optimiser la production de l'enzyme alpha amylase par la souche *Aspergillus niger* au moyen de la technique de fermentation à l'état solide qui a reçu une grande importance dans divers secteurs. Les résultats de cette étude ont montré que la production maximale d'enzyme dans la première et la deuxième expérience sont respectivement (432 ± 0.9 U/ml/min) et (1262.27 ± 2.11 U/g). Ces valeurs ont été enregistrées par l'optimisation des paramètres de processus ceux-ci pH, température, taille d'inoculum, la période d'incubation, la source de carbone et d'azote. Certes la production de l'enzyme alpha amylase existe en Algérie, déjà développée à partir de la datte mais pas encore à la quantité souhaitée. Cette méthode par laquelle nous avons fait l'approche de la production de cette enzyme par *Aspergillus niger* qui ouvre de nouveaux horizons pour améliorer le marché algérien et permettre un rendement économique considérable.

*Références
bibliographiques*

Références bibliographies

- Ahmed, K., Valeem,E.F., Haq,Q., Mehmood, I., Dahot, M.U.(2014). Optimal conditions for the production of industrial enzymes by *Aspergillus niger* using agricultural wastes as sources of carbon. *FUUAST J. Biol*, 4(2), 129-136
- Ahmed, K., Valeem,E.F., Khan, M.A., Haq,Q. (2015).Biosynthesis of alpha amylase from *Aspergillus Fumigatus* (Fresenius 1863) in submerged fermentation. *Pak. J. Biotechnol*, 12 (2), 87 - 92
- Akpan, I., Bankole, M.O., Adesemowo, A.M. (1999). A rapid plate culture method for screening of alpha amylase producing microorganism. *Biotechnol*,13, 411-413
- Assamoi, 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*. *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment*, 13 (2) ,281-294
- Banner, D. W., Bloomer, A. C., Petsko, G. A., Phillips, D. C.,Pogson, C.I.,Wilson, I.A.,Corran ,P. H., Furth, A. J., Milaman ,J. D., Offord, R. E., Priddle, J. D., Waley, S. G. (1975). Structure of Chicken muscle triose phosphate isomerase determined cristallographically at 2,5 Å resolution using amino acid sequence data. *Nature*, 255, 609-703
- Battle, N., Carbonell,J.V ., Sendra , J.M. (2000). Determination of depolymerization kinetics of amylose, amylopectin and soluble starch by *Aspergillus niger* " α -amylase " using a fluorimetric 2-p-toluidine naphthalene-6-sulfonate / flow injection analysis system. *Biotechnol Bioeng*, 70(5), 552-554
- Brayer, G. D., Luo, Y. G., Withers, S. G. (1995). The structure of human pancreatic α -amylase at 1.8 Å resolution and comparisons with related enzymes. *Protein Sci*, 41730-1742
- Burhan, A ., Nisa,U ., Gokhan,C ., Omer, C ., Ashabil,A ;Osman,G .(2003) .Enzymatic properties of novel thermostable, thermophilic, alkaline and chelator resistant amylase from analkaliphilic *Bacillus* sp. isolate ANT-6.*Process Biochem* , 38 , 1397-1403

Références bibliographies

- Chimata, M.K., Sasidhar, P., Challa,S. (2010).Production of extracellular amylase from agricultural residues by a newly isolated *Aspergillus* species in solidstate fermentation. *African J. Biotechnol*, 9(32), 5162-5169
- Dakhmouche-djekrif, S. (2016). Production et caractérisation de l'amylopullulanase de la levure *Clavispora lusitaniae* ABS7 isolée de blé cultivé et stocké en zones arides. Thèse de doctorat : biochimie et biologie moléculaire et cellulaire. Constantine: université des frères mentourie, 201p <https://fac.umc.edu.dz>
- De Souza, P. M., De Oliveira, P.M. (2010). Application of microbial α -amylase in industry - A review. *Braz J Microbiol*, 2010, 41(4) ,850-861.
- Dhanya, G., Madhavan,N.K ., Swetha, S ., Pandey,A .(2009)., Immobilized bacterial α -amylases for effective hydrolysis of raw starch and soluble starch. *Food Res. Int*, 42 (4), 436-442
- Erdal, S., Taskin M. (2010). Production of α -amylase by *Penicillium expansum* MT-1 in solid-state fermentation using waste Loquat (*Eriobotrya japonica* Lindley) kernels as substrate. *Roma- nian Biotechnol. Lett.* 15(3), 5342-5350
- ESIAB, UBO. Les *Aspergillus* (en ligne). (page consultée le 09 /03/2022). <https://www.univ-brest.fr/esiabscientifique/Mycologie/Les+fiches+pratiques/aspniger>
- Fergani, kh. Lakhel, R. (2015).Activités cellulolytiques de *Trichoderma longibrachiatum* cultivée sur son de blé. Memoire master recherche : Biotechnologie des mycètes. Constantine : Université des frères mentourie, 56p
- Gangadharan, D., Sivaramakrishnan,S., Nampoothiri, K.M ., Pandey,A.(2006). Solid culturing of *Bacillus amyloliquefaciens* for α -amylase production. *Food Technol. Biotechnol.* 44,269-274
- Gibbons, J.G., Rokas, A. (2013). The function and evolution of the *Aspergillus* genome. *NIH Public Access* (en ligne), 21(1), (page consultée le 09 /03/2022) <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3534798/>
- Gupta, A., Gautam, N., Raj Modi, D. (2010). Optimization of α -amylase production from free and immobilized cells of *Aspergillus niger*. *Journal of biotechnology and*

Références bibliographies

pharmaceutical research [en ligne], 1(1) (page consultée le 10/03/2022).
<http://www.e3journals.org/JBPR>

- Gupta, A., Gupta, V.K., Modi, D.R., Yadava, L.P. (2008). Production and characterization of alpha- amylase from *Aspergillus niger*. *Biotechnol.* 7(3),551-556
- Gupta, R., Gigras, P., Mohapatra, H., Goswami, V. K., Chauhan, B. (2003). Microbial α -amylases: a biotechnological perspective. *Process Biochem*,38, 1599-1616
- Haq, I., Abdullah, R., Ashraf, H., Shah, A.H. (2002). Isolation and screening of fungi for the biosynthesis of α -amylase. *Biotechnology*, 1(2), 61-66
- Haq, I., H. Ashraf, H., Omer. Qadeer M. (2002). Biosynthesis of amyloglucosidase by *Aspergillus niger* using wheat bran as substrate. *Pak. J. Bio. Sci*, 5(9),962-964
- Haq, I., Hameed, U., Mahmood, Z., Javed, M.M. (2012) . Solid state fermentation for the production of α -amylase by *Paenibacillus amylolyticus*. *Pak. J. Bot*, 44, 341-346
- Hasnaoui ,S ., Zemmouri ,S ., Ziadi ,C .(2020) . La production des enzymes pectinolytiques par *Aspergillus Niger* cultivé sur les résidus d'agrumes. Mémoire Master recherche : Mycologie et biotechnologie fongique.Constantine : Université des frères mentourie, 65 p
- Irfan, M., Nadeem, M., Syed, Q. (2012).Media optimazation for amylase production in solid state fermentation of wheat bran by fungal strains. *J Cell Mol. Biol*, 10(1), 55-64
- Ivanova, V ., Yankov, D ., Kabaivanova , L ., Pashkkoulov, D .(2001). Simultaneous biosynthesis and purification of two extra cellular *Bacillus* hydrolases in aqueous two alpha amylase. *J. Biochem. Eng*, 8, 61-81
- Jespersen, H. M., MacGregor, E. A., Henrissat, B., Sierks, M. R.,Svensson ,B. (1993). Starch- and glycogen-debranching and branching enzymes: prediction of structural features of the catalytic (b/a) 8-barrel domain and evolutionary relationship to other amylolytic enzymes. *J. Protein. Chem*, 12,791-805
- Kaassis, M., Khanfar, M. (2019). Etude de la production des lyases par la moisissure *Aspergillus niger* cultivée sur milieu solide (SSF) à base de son de blé : caractérisation

Références bibliographies

des lyases .Mémoire master recherche : Biochimie de la nutrition. Constantine : Université des frères mentourie, 67p

- Kareem, S.O., Akpan, I., Oduntan, S.B. (2009).Cowpea waste: A novel substrate for solid state production of amylase by *Aspergillus oryzae*. African J. Microbiol. Res, 3(12),974- 977
- Kashyap, P., Sabu, A., Pandey, A., Szakacs, G. (2002).Extracellular L-glutaminase production by *Zygosaccharomyces rouxii* under solid-state fermentation. Process Biochem. 38, 307 - 312
- Kathiresan, K., Manivannan,S. (2006). α -amylase production by *Penicillium fellutanum* isolated from mangrove rhizosphere soil. African J. Biotechnol, 5(10), 829-832
- Khan, J., Yadav, S.K. (2011). Production of alpha amylases by *Aspergillus niger* using cheaper substrates employing solid state fermentation. Int. J. Plant Animal Env. Sci, 1(3), 100-108
- Krishna, C., Chandrasekaran,M. (1996). Banana waste as substrate for alpha amylase production by *Bacillus subtilis* (CBTK106) under solid state fermentation. Appl. Microbiol Biotechnol, 46, 106-111
- Kunamneni, A., Permaul, K., Singh, S. (2005).Amylase production in solid state fermentation by the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus*. J. Biosci. Bioeng, 100(2), 168-171
- Lokeswari, N. (2010) .Statistical optimization of experi-mental variables associated with production of alpha amylases by *Bacillus subtilis* using banana agro residual wastes in solid-state fermentation. Rasayan J. Chem, 3(1), 172-178
- Mahanta, N., Gupta, A., Khare,S. K. (2008).Production of protease and lipase by solvent Tolerant *Pseudomonas aeruginosa* in solidstate fermentation using *Jatropha curcas* seed cake as substrate. Bioresource Technol, 99, 1729-1735
- Marie-Alix d'Halewyn, M., Pierre Chevalier, Ph. D. *Aspergillus niger* (en ligne). (page consultée le 09/03/2022).
<https://www.inspq.qc.ca/moisissures/fiches/aspergillus-niger>

Références bibliographies

- Mobini, D., Javan, A. F. (2012). Application of alpha-amylase in biotechnology. *Journal of Biology and today's world*, 1(1), 39-50
- Negi, S., Banerjee, R. (2010). Optimization of culture parameters to enhance production of amylase and protease from *Aspergillus awamori* in a single fermentation. *African J. Biochem.Res*, 4(3), 73-80
- Scriban, R. (1999). *Biotechnologie*. Paris, rue Lavoisier : Tec & Doc.1042p.
- Pandey, A. (2003). Solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, 13(2-3), 81-84
- Pandey, A., Nigam, P., Soccol,C.R., Soccol,V.T., Singh,D ., Mohan,R .(2000).Advances in microbial amylases. *Biotechnol. Appl. Biochem*, 31,135-152
- Prescott, S.,Dunn, A. (1987) . *Industrial Microbiology*. 4t ed. CBS Publishers and Distributors, New Delhi. India, 550-565
- Qian, M., Haser, R., Payan, F. (1993). Structure and molecular model refinement of Zpig pancreatic alpha- amylase at 2, 1 Å resolution. *J. Mol. Biol*, 231, 785-799
- Rahrdojo, Y.S. Tramper, J., RINZEMA, A. (2006). Modeling conversion and transport phenomena in solid-state fermentation. *Biotechnology Advances [en ligne]*, 24(2) (page consultée le 25/03/2022) <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2005.09.002>
- Raimbault, M. (1998).General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. *Electronic Journal of Biotechnology [en ligne]*, 1(3) (page consultée le 27/03/2022) <http://www.ejbiotechnology.info/content/vol1/issue3/full/9/9.PDF>.
- Rajagopalan, G.,Krishnan, C. (2008). Immobilization of maltooligosaccharide forming alpha amylase from *Bacillus substilis* KGG 103, properties and application in starch hydrolysis. *J. Chem. Technol. Biotechnol*, 83, 1511-1517
- Ramachandran, S., Patel, A.K., Nampoothiri, K.M., Francis, F., Nagy, V., Szakacs, G., Pandey,A. (2004). Coconut oil cake - a potential raw material for the production of α -amylase. *Bioresource Technol*. 93, 169-174
- Ramesh, M.V., Lonsane, B.K. (1990). A novel bacterial thermo stable alpha amylase system produced under solidstate fermentation. *Biotechnol Lett*, 99, 501-504

Références bibliographies

- Roheena, A., Naeema, S., Mehwish, I., Shagufta, N., Tehreema, I. (2014). Optimization of cultural conditions for the production of alpha amylase by *Aspergillus Niger* (BTM-26) in solid state fermentation. ResearchGate [en ligne], 46(3) (page Consultée le 20/03/2022).
https://www.researchgate.net/publication/267336230_Optimization_Of_Cultural_Conditions_For_The_Production_Of_Alpha_Amylase_By_AspERGILLUS_Niger_Btm26_In_Solid_State_Fermentation15-
- Saleem, A., Ebrahim, M. K. H. (2014). Production of amylase by fungi isolated from legume seeds collected in Almadinah Almunawwarah, Saudi Arabia. J. Taibah Uni. Sci, 8, 90-97
- Shahzad, M., Ghafoor Shahid, M., Nadeem, M., Irfan, M., Quratulain, S. (2016). Production and optimization of α -amylase from *Aspergillus Niger* using potato peel as substrate. ResearchGate [en ligne], 13 (2) (page consultée le 22/03/2022).
https://www.researchgate.net/publication/320335589_PRODUCTION_AND_OPTIMIZATION_OF_ALPHA-AMYLASE_FROM_ASPERGILLUS_NIGER_USING_POTATO_PEEL_AS_SUBSTRATE
- Shibuya, I., Tamura, G., Ishikawa, T., Hars, S. (1992). Cloning of the α -amylase, DNA of *Aspergillus shirousamii* and its expression in *Saccharomyces cerevisiae*. Bio. Sci. Biotechnol. Biochem, 56, 174-179
- Šimonovičová, A., Vojtková, H., Nosalj, S. (2021). Isolats environnementaux d'*Aspergillus niger* et leur diversité spécifique grâce au profilage des métabolites. National library of medicine (en ligne), 12, (page consultée le 27/02/2022)
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8261049/>
- Sindhu, R., Suprabha, G.N., Shashidhar, S. (2009). Optimization of process parameters for the production of α -amylase from *Penicillium janthinellum* (NCIM 4960) under solid state fermentation. African J. Microbiol. Res, 3(9), 498-503
- Singh, S., Singh, S., Bali, V., Sharma, L., Mangla, J. (2014). Production of fungal amylases using cheap readily available agri-residues, for potential application in textile industry. Bio. Med. Res. Int, 48, 1-9

Références bibliographies

- Sivaramakrishnan, S., Gangadharan, D., Nampoothiri, K.M., Soccol, C.R., Pandey, A. (2007). Alpha amylase production by *Aspergillus oryzae* employing solid-state fermentation. *J. Sci. and Ind. Res.*, 66, 621-626
- Sivaramakrishnan, S., Gangadharan, D., Nampoothiri, K.M., Soccol, C.R., Pandey, A. (2006). α -amylases from microbial sources - an over-view on recent developments. *Food Technol. Biotechnol.*, 44(2), 173-184
- Tiwari, K.L., Jadhav, S.K., A. Fatima. (2007). Culture conditions for the production of thermostable amylase by *Penicillium rugulosum*. *Global J. Biotechnol. Biochem.*, 2(1), 21-24
- Varalakshmi, K.N., Kumudini, B.S., Nandini, B.N., Solomon, J., Suhas, R., Mahesh, B., Kavitha, A.P. (2009). Production and characterization of α -amylase from *Aspergillus niger* JGI 24 isolated in Bangalore. *Polish J. Microbiol.*, 58(1), 29-36
- Wikipédia. *Aspergillus niger* (en ligne). (page consultée le 27 /02/2022) https://fr.wikipedia.org/wiki/Aspergillus_niger
- Zambare, V. (2010). Solid-state fermentation of *Aspergillus oryzae* for glucoamylase production on agroresidues. *Int. J. Life Sci.*, 4, 16-25
- Zoubiri, L. (2012). Production d'alpha amylase par des moisissures cultivées sur milieu à base de rebuts de dattes. Mémoire de magistère en science alimentaires : biotechnologie alimentaires. Institut de nutrition, de l'alimentation et de technologies agro-alimentaire : Université des frères Mentouri Constantine, 79p <https://dspace.univ-ourgladz>

Annexe

M2 ou (M2YA) : milieu aux extraits de malt et de levures

- Extrait de malt 20.0g
- Extrait de levures 2.0g
- Agar 15.0g

M2S5 : milieu salé aux extraits de malt et de levures

- Extrait de malt 20.0g
- Extrait de levures 2.0g
- Agar 15.0g
- NaCl 50.0g

PDA : milieu potato dextrose agar

- Infusion de pomme de terre 200g
- Dextrose 20g
- Agar 20g
- Eau distillé 1litre

<p align="center">Année universitaire : 2021-2022</p>	<p>Présenté par :</p> <p align="center">Bouldjedj Rania Beghriche Hind Makhelfi Kaouther</p>
<p align="center">Modélisation des conditions de culture pour la production de l'enzyme alpha-amylase par <i>Aspergillus niger</i> en fermentation solide</p>	
<p align="center">Mémoire pour l'obtention du diplôme de Master en Mycologie et Biotechnologie Fongique</p>	
<p>Résumé</p> <p>La présente étude porte sur la modélisation, la production et la caractérisation d'α-amylase par <i>Aspergillus niger</i> en fermentation à l'état solide. Pour la première expérience quarante souches fongiques ont été isolées à partir de différents échantillons de sol ont fait d'abord un criblage qualitatif sur milieu gélosé à l'amidon, et un criblage quantitatif a été effectué en fermentation en milieu solide. Une souche d'<i>Aspergillus niger</i> montrant une production maximale d'enzyme a été sélectionnée (432 ± 0.9 U/ml/min) et le code BTM-26 lui a été attribué. Le rendement de son de blé s'est avéré être le meilleur substrat pour la production d'alpha amylase. La production maximale d'enzyme a été obtenue à 30°C, pH 5 et une taille d'inoculum de 1ml et la vitesse de fermentation maximale a été obtenue après 72 heures d'inoculation. L'ajout de 1.5 % de lactose comme source de carbone, de 0.2% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ et de 0.3% d'extrait de levure comme sources d'azote inorganique et organique respectivement, a permis de donner une production d'enzyme (990 ± 0.81 U/ml/min). Pour la deuxième expérience on utilisant des déchets alimentaires comme substrat pour un rendement maximal en α-amylase. L'activité maximale de l'enzyme (1262.27 ± 2.11 U/g) a été enregistrée après 72 h d'incubation à 30°C, pH 5 avec un taux d'humidité et une taille d'inoculum de 5%. Parmi les différentes sources d'azote et de carbones évalués, la peptone (1.5%), NH_4NO_3 (0.75%) et l'amidon soluble (1.25%) ont donné une production maximale d'α-amylase, dans toutes les conditions de culture optimisées, la production maximale d'enzyme a été (1298.12 ± 2.14 U/g).</p>	
<p>Mots clés: Alpha amylase, <i>Aspergillus niger</i>, Fermentation à l'état solide, Modélisation.</p>	
<p>Encadreur : Benkahoul Malika (MCA - Université Frères Mentouri, Constantine 1). Examineur 1 : Meziani Meriem (MCB - Université Frères Mentouri, Constantine 1). Examineur 2 : Abdelaaziz Ouidade (MCB - Université Frères Mentouri, Constantine 1).</p>	