

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université ABOU BEKR BELKAID –TLEMCCEN–
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Sciences de la Terre et de
l'Univers

Département de Biologie

Laboratoire :

Antibiotiques, Antifongiques, Physico-chimie :

Synthèse et activités biologiques

Mémoire

En vue de l'obtention du diplôme de Master

Domaine : SNV

Filière : sciences biologiques

Spécialité : Biochimie appliquée

Thème:

**Etude de la cinétique enzymatique de l' α -amylase
d'origine microbienne : commercialisée d'origine
Bacillus sp. et extraite d'*Aspergillus niger***

Présenté par :

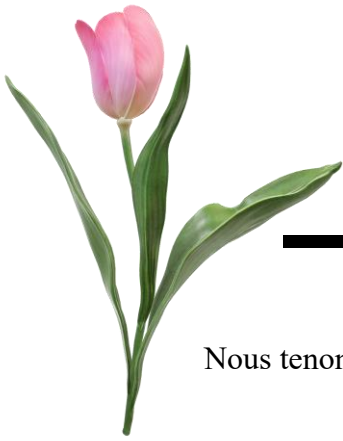
M^{elle} ELLABOUT Manel & M^{elle} ACHOUI Maroua

Soutenu le 25-06-2024 devant les membres de jury :

Présidente :	BELKACEM Nacéra	MCA	Univ. Tlemcen
Encadreur :	AZZI Rachid	Pr	Univ. Tlemcen
Examinatrice :	MEDJDOUB Houria	MCA	Univ. Tlemcen
Examineur :	BELYAGOUBI Larbi	Pr	Univ. Tlemcen

Année Universitaire : 2023/2024





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.

Tout d'abord, nous voulons exprimer notre profonde reconnaissance envers nos proches pour leur soutien indéfectible tout au long de cette expérience académique. Leurs encouragements, leur amour et leur compréhension ont été nos piliers dans les moments de questionnement et de fatigue. Leur présence nous a donné la force nécessaire pour continuer nos études et atteindre ce moment tant attendu.

Nous tenons également à remercier chaleureusement **Mr AZZI Rachid**, Professeur au département de Biologie, faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, des sciences de la Terre et de l'Univers, Université Aboubekr Belkaid Tlemcen pour son accompagnement précieux, son expertise et sa patience tout au long de l'élaboration de ce mémoire. Ses conseils éclairés, son écoute attentive et ses encouragements ont joué un rôle essentiel dans notre apprentissage et la qualité de ce travail.

Nous souhaitons aussi à remercier vivement **Mr BELYAGOUBI Larbi**, Professeur au département de Biologie, faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, des sciences de la Terre et de l'Univers, Université Aboubekr Belkaid Tlemcen, de nous avoir offert l'opportunité de poursuivre nos études supérieures et d'approfondir nos connaissances dans notre domaine d'intérêt d'identification des moisissures et des levures. Il a mis à notre disposition le matériel et les produits chimiques nécessaires pour la réalisation de notre travail. Merci également pour son aide, ses conseils, sa gentillesse.

Mme **BELKACEM Nacéra**, Maitre des conférences A au département de Biologie, faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, des sciences de la Terre et de l'Univers, Université Aboubekr Belkaid Tlemcen, pour nous avoir fait l'honneur de présider le jury de ma soutenance.

Mme **MEJDOUB Houria**, Maitre des conférences A au département de Biologie, faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, des sciences de la Terre et de l'Univers, Université Aboubekr Belkaid Tlemcen, pour avoir accepté d'examiner ce modeste travail.

Nous tenons à remercier particulièrement Mr **EL HACI Imad** pour leur soutien moral et leurs encouragements qui sont une source de motivation tout au long de nos études.

Enfin, nous exprimons notre gratitude envers toutes les personnes qui ont contribué, de près ou de loin, à la réalisation de ce projet. Leur soutien, leurs conseils et leur appui ont enrichi notre parcours académique et ont permis la concrétisation de ce mémoire.

À nos familles, à notre encadrant ainsi qu'à tous ceux qui nous ont accompagnés dans cette aventure, nous adressons nos plus sincères remerciements.



Dédicace

À nos parents, ainsi qu'à nos frères 'Ali', Zineddine', 'Fares' et sœurs 'Racha', Kawther', Firdaws, ma chère tante Souad qui ont été nos guides tout au long de cette expérience scolaire. Nos sources d'inspiration ont été leur amour, leur soutien et leur encouragement. Nous leur exprimons notre gratitude sincère pour leur présence constante et leur sacrifice incessant.

Dans ce mémoire, j'aimerais dédier un espace spécifique à une personne qui a éclairé mon parcours tout au long de cette expérience universitaire. Nabila, ton soutien constant, ton attention bienveillante et ta présence constante ont été des bénéfices précieux.

Tu as dépassé le simple statut d'amie ; tu as été ma source d'inspiration, mon soutien moral et mon appui solide lors des moments d'incertitude. Je te suis extrêmement reconnaissant pour ce travail, en guise de reconnaissance.

المخلص

هدفت هذه الدراسة إلى استخلاص وتنقية إنزيم ألفا أميلاز من الرشاشات السوداء (المحلول الجلوكوزي المعقد بالبطاطس) المعزول من منطقة تيميمون، وذلك من خلال التخمير سائل- سائل لمدة 07 أيام. وقد تم متابعة تطور النمو الفطري من خلال الملاحظة المجهرية، وتنقية المستخلص الإنزيمي عن طريق الترسيب بكبريتات الأمونيوم ومن تم الطرد المركزي، وهو ما أدى إلى الحصول على إنزيم ذو نقاء عال. في حين تم التوصل إلى كمية البروتين المتواجدة في الانزيم (0.77 ملغ/مل) عن طريق رد فعل البيوريت.

تمت دراسة حركية الإنزيم المستخلص من الرشاشات السوداء ، ومقارنتها بحركية الإنزيم التجاري المستخلص من بكتيريا "الباسيليوس" من خلال حساب السرعة القصوى وثابت مايكليس-منتن.

أظهرت النتائج أنّ قيمة السرعة القصوى للإنزيم المستخلص من "الباسيليوس" والمقدّرة بـ (0.796 ميكرولت/دقيقة) تتجاوز قيمة السرعة القصوى للإنزيم المستخلص من " الرشاشات السوداء " المقدّرة بـ (0.533 ميكرولت/دقيقة)، وهو ما يدلّ على أنّ الإنزيم الأول يمتلك قدرة أعلى على تحفيز ردّ الفعل. ورغم ذلك، تشير النتائج إلى أنّ قيمة ثابت مايكليس-منتن للإنزيم المستخلص من العفن الأسود (0.017 مليمول/ل) أقل بكثير مقارنة بتلك التي تم الحصول عليها من إنزيم "الباسيليوس" (0.274 مليمول/ل)، مما يدل على أنّ إنزيم الرشاشات السوداء لديه تفاعل أكبر مع مادته الفعالة.

سمحت هذه المقاربة على الحصول على إنزيم ألفا أميلاز نشط، تتوفّر به خصائص حركية يمكن اعتمادها في التطبيقات الصناعية، مع تقليل التكاليف المرتبطة بالإنتاج.

الكلمات المفتاحية: ألفا-أميلاز - الرشاشات السوداء - تنقية - النشاط الإنزيمي.

Abstract:

This study focused on the extraction and purification of α -amylase enzyme from *Aspergillus niger* isolated from the Timimoun region, using liquid-liquid fermentation over 7 days. The fungal growth progression was monitored through macroscopic observation during development. The enzymatic extract was purified through ammonium sulfate precipitation followed by centrifugation, resulting in high purity. Protein quantification was performed using the biuret reaction, revealing a protein concentration of 0.77 mg/ml.

The kinetics of the α -amylase extract from *Aspergillus niger* were compared to those of a commercially available enzyme from *Bacillus* origin, and the K_m and V_{max} constants were calculated. The results demonstrated that the *Bacillus sp* enzyme had a higher V_{max} (0.796 mmol/min) compared to the enzyme from *Aspergillus niger* (V_{max} 0.533 mmol/min), indicating that the *Bacillus* enzyme had a greater capacity to catalyze the reaction. However, the K_m value of the *Aspergillus niger* enzyme (K_m of 0.017 mmol/l) was significantly lower compared to that of the *Bacillus sp* enzyme (K_m of 0.274 mmol/l). In conclusion, the *Aspergillus niger* enzyme exhibited a higher affinity for its substrate.

This approach yields an active α -amylase enzyme with promising kinetic properties for industrial applications, while reducing associated production costs

Keywords: α -amylase – *Aspergillus niger* – Purification – Enzymatic activity.

Résumé

Cette étude a porté sur l'extraction et la purification de l'enzyme α -amylase à partir d'*Aspergillus niger* isolé de la région de Timimoun, par fermentation liquide-liquide pendant 7 jours. L'évolution de la croissance fongique a été suivie par observation macroscopique au cours du développement. L'extrait enzymatique a été purifié par précipitation au sulfate d'ammonium suivi de centrifugation, ce qui a permis d'obtenir une pureté élevée. La quantification des protéines a été réalisée par la réaction du biuret, révélant une concentration en protéine de 0,77 mg/ml.

La cinétique de l'extrait enzymatique extraite d'*Aspergillus niger*, comparée à celle d'enzyme commercialisée d'origine *Bacillus* a été étudiée et les constantes K_m et V_{max} ont été calculées.

Les résultats ont démontré que l'enzyme d'origine *Bacillus sp* possède une V_{max} (0,796 mmol/min) plus élevée que l'enzyme extraite d'*Aspergillus niger* (V_{max} 0,533 mmol/min), ce qui indique que l'enzyme de *Bacillus* a une capacité plus élevée à stimuler la réaction. Toutefois, la valeur de K_m de l'enzyme d'origine d'*Aspergillus niger* (K_m de 0,017 mmol/l) est beaucoup plus faible en comparaison avec celle de l'enzyme d'origine *Bacillus sp* (K_m de 0,274 mmol/l). En conclusion, l'enzyme d'origine d'*Aspergillus* donne une affinité plus élevée pour son substrat.

Cette approche permet d'obtenir une enzyme α -amylase active, avec des propriétés cinétiques intéressantes pour des applications industrielles, tout en réduisant les coûts associés à la production.

Mots clés : α -amylase – *Aspergillus niger* - Purification- Activité enzymatique.



Table des matières

Introduction	1
Revue bibliographique	4
1. Définition.....	6
2. Nomenclature.....	6
3. Caractéristiques et propriétés des α - amylases.....	6
3.1. Structure de l' α -amylase.....	6
3.2. Poids moléculaire.....	8
3.3. Température optimum.....	8
3.4. pH optimum.....	8
3.5. Effecteurs.....	8
3.6. Spécificité du substrat.....	8
4. Les différentes sources et origines de α -amylase.....	8
4.1. L'origine animale.....	8
4.2. L'origine végétale.....	8
4.3. L'origine microbienne.....	8
- α -amylase bactérienne.....	9
- α -amylase fongique.....	9
5. Mécanisme d'action.....	9
6. Production d' α -amylase.....	9
7. Utilisation de l' α -amylase dans les industries agro-alimentaires.....	10
8. Domaine médical et pharmaceutique.....	10
9. Autre utilisation.....	11
<i>Aspergillus niger</i>	12
1. Espèce <i>Aspergillus niger</i>	13
2. Taxonomie.....	13
3. Caractères culturels.....	13
4. Morphologie.....	14
5. Reproduction.....	15
6. Utilisations industrielles d' <i>Aspergillus niger</i>	15
6.1. Applications dans l'environnement.....	15
6.2. Production d'acide citrique.....	15
6.3. Production des enzymes.....	15

Matériels et Méthodes.....	17
1.Echantillonnage.....	18
2. Ensemencement.....	19
3. Identification de l'isolat fongique sélectionné.....	19
- Observation microscopique.....	19
- Méthode de Scotch.....	19
4. Production de l' α -amylase « fermentation en milieu liquide ».....	19
- Préparation du milieu de culture liquide.....	19
- Inoculation de la souche.....	20
- Incubation.....	20
5.Purification de l'enzyme α -amylase.....	20
- précipitation des protéines.....	20
6. Evaluation de l'activité enzymatique.....	22
6.1. Préparation des solutions.....	22
6.1.1. α -amylase commercialisé <i>Bacillus sp.</i>	22
6.1.2. α -amylase extraite d' <i>Aspergillus Niger</i>	22
6.1.3. Préparation du substrat (Amidon soluble).....	22
6.1.4. Préparation du (DNSA).....	22
6.2 La cinétique enzymatique.....	23
-Principe.....	23
-Protocole.....	23
6.3 Expression des résultats.....	24
6.3.1 Dosage du maltose, produit de la réaction enzymatique.....	24
6.3.2. Dosage des protéines par la réaction du biuret	26
6.3.3 Détermination de l'activité de l' α -amylase (K_m et V_{max}).....	27
7. Analyse statistique	27
Résultats et discussion.....	28
1. Observation microscopique.....	29
2. Analyse Comparative de la Cinétique Enzymatique de l' α -amylase Produite par <i>Bacillus sp.</i> et <i>Aspergillus niger</i>	30
Conclusion Et Perspectives.....	36
Références bibliographiques.....	38

Liste des tableaux

N°	Titre	Page
01	Applications industrielles de l' α - amylase	10
02	Concentration de maltose et volumes correspondants	25
03	Concentration protéique et volumes des solutions	26
04	Vitesse initiale pour différentes concentrations de l'enzyme α -amylase de <i>Bacillus</i>	31
05	Vitesse initiale pour chaque concentration de l'enzyme α -amylase extraite d' <i>Aspergillus niger</i>	32

Liste des figures

N°	Titre	Page
01	Structure secondaire Myoglobine (Phillips, 1980)	05
02	Structure quaternaire de l'hémoglobine (Lubert Stryer, 2003)	06
03	Structure tridimensionnelle de l' α -amylase d'après Kraulis . (1991)	07
04	Mécanisme catalytique des hydrolases glycosyliques (Nielsen et al., 2001)	09
05	(a) <i>Aspergillus niger</i> sur milieu nutritif (b) <i>Aspergillus niger</i> sur Milieu sulfaté (Zenati, 2018)	14
06	Représentation microscopique de la Représentation macroscopique d'A <i>conidiophore</i> d' <i>A.niger</i> (Pasqualotto, 2010)	14
07	Représentation macroscopique d' <i>A.Niger</i> (Nygren et al., 2007)	14
08	Localisation géographique de la région d'échantillonnage	18
09	Milieu de fermentation à base de déchets de pommes de terre. (PDB)	20
10	Tubes d'extrait en centrifugation	21
11	Tube contenant un extrait d' <i>Aspergillus niger</i> après centrifugation	21
12	Disposition des cuves dans le spectrophotomètre UV-Visible	24
13	La courbe d'étalonnage du Maltose	26
14	Droite d'étalonnage de gélatine	27
15	Observation macroscopique d'une souche d' <i>Aspergillus niger</i>	29
16	Observation microscopique d'une souche d' <i>Aspergillus niger</i>	30
17	Evolution de la formation du produit de dégradation d'amidon au cours du temps en présence de l'enzyme α -amylase de <i>Bacillus</i> sp	31
18	Evolution de la formation du produit de dégradation d'amidon au cours du temps en présence de l'enzyme α -amylase extraite d' <i>Aspergillus niger</i>	32
19	Graphique Lineweaver-Burk pour l' α -amylase de <i>Bacillus</i> sp	33
20	Graphique Lineweaver-Burk pour l' α -amylase extrait d' <i>Aspergillus niger</i>	33

Introduction

La biotechnologie consiste à utiliser des micro-organismes (les éléments des vivants) (champignons, levures, bactéries, plantes) dans diverses activités industrielles (Chevallier, 1990). La production d'enzymes microbiennes est une application importante de la biotechnologie. Les α -amylases microbiennes sont parmi les enzymes les plus utilisées dans les procédés industriels : industrie alimentaire, pharmaceutique, textile, papeterie, et détergent (Merabti, 2006).

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 et ne peut pas répondre à la demande du marché. En revanche, une quantité appréciable d' α -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).

Plusieurs études ont été menées sur la production d' α -amylase à partir de micro-organismes. Vishwanatha et al. (2010) ont isolé un genre d'*Aspergillus* capable de produire des enzymes α -amylasiques à partir du sol.

L'objectif principal de ce travail porte sur la possibilité d'utiliser *Aspergillus niger* pour produire l'enzyme α -amylase à partir de substrats tels que le bouillon de pomme de terre au dextrose (PDB)

La cinétique de l'extrait enzymatique extraite d'*Aspergillus niger* est comparée à celle d'une enzyme commercialisée d'origine *Bacillus*

L'importance de cette recherche réside dans le rôle crucial que jouent les α -amylases dans le métabolisme glucidique, où elles participent à la conversion de l'amidon en sucres simples, et la possibilité de produire α -amylase à partir de sources microbiennes qui permettent également, de préparer ou de fabriquer une enzyme moins coûteuse par rapport au marché, ce qui pourrait rendre ces applications plus accessibles et plus économiquement viables.

La concrétisation de ce document est comme suit :

- Première partie, concerne la synthèse bibliographique sur l'amylase, *Aspergillus Niger*.
- Deuxième partie, regroupe les différentes techniques et méthodes utilisées lors de la présente étude (Isolement, sélection d'amylase, purification, centrifugation), les résultats obtenus avec leur discussion.

Le travail se termine avec une conclusion et des perspectives.

Revue Bibliographique

Généralité

Les enzymes sont des macromolécules protéiques de haute masse moléculaire (10 à 100 kDa). Elles catalysent les réactions chimiques en augmentant leur vitesse d'au moins 10^6 fois, par rapport à la réaction en leur absence. En effet, les enzymes sont présentes dans les cellules de tous les organismes vivants où elles jouent un rôle essentiel en contrôlant les procédés métaboliques permettant aux nutriments d'être transformés en énergie et en matériaux cellulaires. En 2005, plus de 3000 activités enzymatiques différentes ont été isolées et identifiées, et la structure d'environ 1300 d'entre elles a été déterminée (Jones et *al.* 2010).

Ces protéines ont tendance à se replier sur elles-mêmes pour former des arrangements secondaires, principalement des hélices α et des feuillets β . Cette structure est stabilisée par la génération de liaisons hydrogènes. L'arrangement de ces structures secondaires les unes par rapport aux autres forme une structure tertiaire, qui est stabilisée par des ponts disulfures. La figure 1 illustre ces arrangements secondaires et leur organisation dans la structure tridimensionnelle des protéines. (Berg et *al.* 2002).

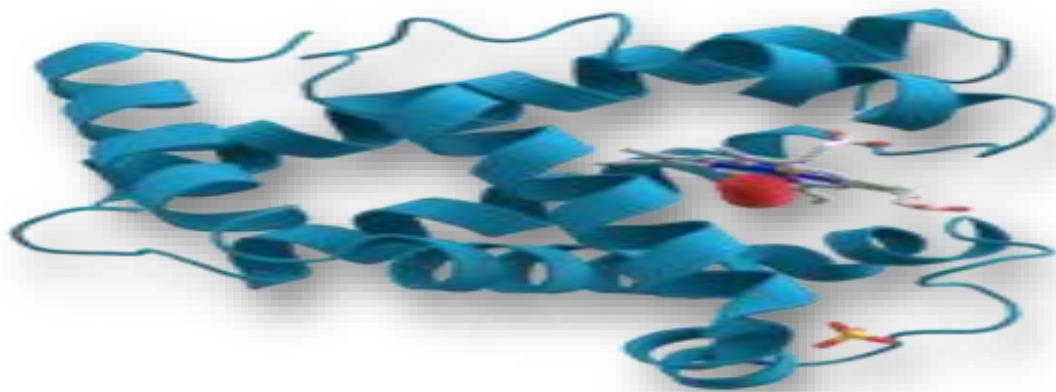


Figure 1 : Structure secondaire Myoglobine (Phillips. (1980))

Une structure quaternaire peut même être décrite pour les enzymes de très grande taille (figure 2). Cette structure tridimensionnelle de l'enzyme lui confère sa spécificité, lui permettant de reconnaître un substrat particulier à travers une région distincte de l'enzyme, appelée le site actif (Berg et *al.*, 2002).

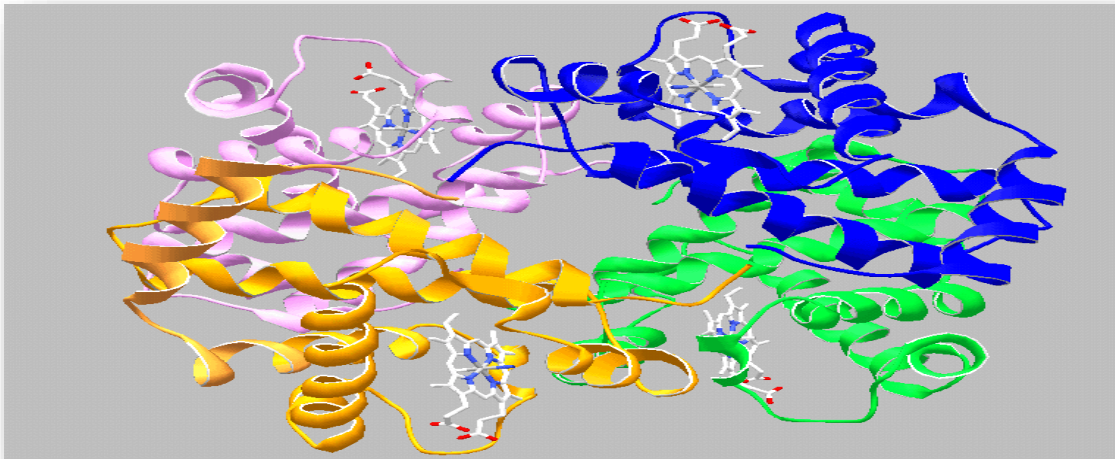


Figure 2 : Structure quaternaire de l'hémoglobine ((Lubert Stryer, 2003)

1. Définition

L' α -amylase [α -(1,4) -D-glucaneglucanohydrolase (E.C.3.2.1.1)] est une endoenzyme appartenant à la famille des hydrolases (Mercier, 1985. Keating *et al.*, 1998). Elle hydrolyse de manière aléatoire, les liaisons osidiques de l'amylose, de l'amylopéctine de l'amidon, du glycogène et d'autres polysaccharides contenant plus de trois liaisons α (1,4) D Glucose (Ait Kaki-El-Hadef *et al.*, 2012).

2. Nomenclature

- **Nom codifié** : EC 3.2.1.1
- **Nom commun** : alpha –amylase
- **D'autres noms** : α -amylase ; endo amylase ; Taka-amylase A, maxilase.
- **Nom systématique** : 1,4–alpha-D-glucane-4-glucanohydrolase (Schaumburg et Slzmann, 1991 ; Brozowski et Davies, 1997 ; Dauter *et al.*, 1999).

3. Caractéristiques et propriétés des α - amylases

3.1. Structure de l' α -amylase

L' α -amylase est une glycoprotéine, comportant trois domaines globulaires) A, B et C) (Farber *et al.*, 1990). Elle renferme une partie glucidique, qui est formée principalement,

de D-mannose, D-glucose, D-galactose, D-xylose et D-glucosamine) (Stefanova et *al*, 1992) associés chimiquement à la chaîne polypeptidique constituée de 471 à 483 résidus d'acides aminés, avec 4 ou 5 ponts disulfures) (Figure 3) (Heslot, 1996).

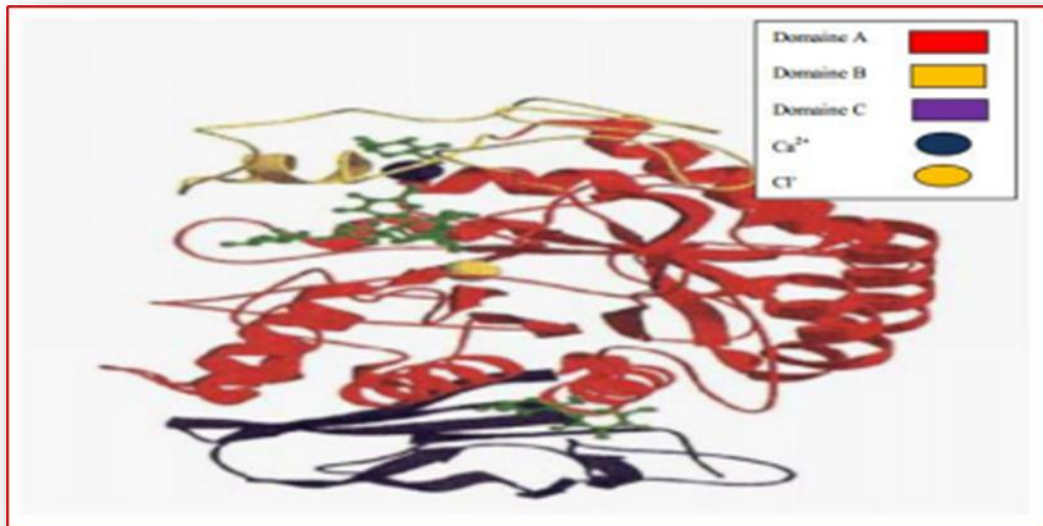


Figure 3. Structure tridimensionnelle de l'α-amylase d'après Kraulis. (1991).

- Le domaine central A, forme une structure de tonneau (β/α) qui contient 8 feuillets β plissés et qui se disposent de façon parallèle et de 8 hélices α . Il porte le site actif à la partie C-terminale des feuillets β .
- Le domaine B est formé d'une boucle de 64 résidus d'acide aminé reliant A- β 3 avec A- α 3 et constitue une sorte de « couvercle » au-dessus du site actif.
- Alors le domaine C est constitué d'un tonneau composé de 8 feuillets β antiparallèles (Kadziola et *al.*, 1994)

3.2. Poids moléculaire

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

3.3. Température optimum :

Selon l'origine et les espèces, les α -amylases ont des températures optimales comprises entre 40°C et 90°C (Schombury et *al*, 1991). En effet, l' α -amylase bactérienne est réputée pour sa

grande thermo stabilité, celle de *Bacillus amyloliquefaciens* est caractérisée par un optimum de température qui, selon les applications va de 70°C à 90°C, alors que l'optimum de l' α amylase fongique se situe entre 50°C et 70°C (Sicard, 1982 ; Panchal, 1990).

3.4. pH optimum

L' α -amylase est très sensible au pH. Par conséquent, le choix du pH optimum est très essentiel pour la production de cette enzyme (McMahon et al., 1999). Selon Kindle, (1983), l'optimum d'activité peut être obtenu à des pH compris entre 4 et 8. Les α -amylases bactériennes, ont un optimum supérieur à la neutralité, alors que les fongiques, ont des pH optimum compris entre 4 et 6 (Larpent et al., 1992). Pour les levures, l'enzyme requiert selon les espèces des pH entre 4 et 6 (Panchal, 1990 ; Avwioroko, 2015).

3.5. Effecteurs

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

3.6. Spécificité du substrat

Le substrat naturel de l' α -amylase est l'amidon (Nelson et al 2005). Dans la molécule d'amidon, les unités de glucose sont reliées par des liaisons osidiques α (1- 4) en formant ainsi des chaînes hélicoïdales d'amylose, sur lesquelles de courtes chaînes de même constitution se branchent par des liaisons osidiques α (1-6) (Mercier, 1985). La production d' α -amylase par certaines souches fongiques (*Aspergillus sp.*, *Rhizopus sp.* Et *Penicilium sp.*) est contrôlée par l'amidon ; il s'agit d'une induction de l'enzyme par son substrat naturel (Leveau et al, 1993 ; Nouadri 2011).

4. Les différentes sources et origines de l' α -amylase :

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

4.1. L'origine animale

Les amylases d'origine animale sont généralement extraites à partir de la salive et du pancréas des mammifères (French, 1975). Les α -amylases animales sont incapables d'hydrolyser la liaison α (1 \rightarrow 6) de l'amylopectine ou du glycosyl oligosaccharides,

l'hydrolyse complète de l'amylase et de l'amylpectine par les α -amylases animales donne respectivement du maltose et du D-glucose pour l'amylase et du glucose, maltose et des dextrines limites pour l'amylpectine (Coolbear et *al.*, 1992).

4.2. L'origine végétale

Les α -amylases végétales possèdent une importance primordiale dans le métabolisme glucidique où elles participent à la conversion de l'amidon en le réduisant en sucres réducteurs qui sont la source énergétique nécessaire à la germination et elles sont généralement incapable d'hydrolyser le maltose (Octávio et *al.*, 2000). Ces enzymes végétales sont synthétisées par un mécanisme cellulaire compliqué, au cours de la germination des graines qui requiert une activité enzymatique très importante pour la mobilisation des réserves et le développement de l'embryon (Bradford, 1995).

4.3. L'origine microbienne

➤ L' α -amylase bactérienne :

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

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

➤ L' α -amylase fongique :

Les α -amylases fongiques diffèrent des amylases bactériennes par une inactivation par la température, un pouvoir élevé de saccharification, et un pH optimal généralement bas, mais pas nécessairement aussi bas que 4-5 (Costes, 1982).

5. Mécanisme d'action

L'activité catalytique de l'enzyme implique la participation des trois acides aminés du site actif: Asp 231 (nucléophile catalytique), Glu 261(donneur catalytique de l'hydrogène) et Asp 328 (l'aide de catalyse) (Mc carter et Withers, 1996 et Uitdehaag et *al.*, 1999). En effet, la réaction catalytique est réalisée en trois étapes (Figure 4) :

- Protonation de l'oxygène glucosidique par le donneur de proton Glu 261 suivi d'une attaque nucléophile sur C1 du résidu du sucre en position 1 par Asp 231 et le départ de l'extrémité réductrice du substrat.
- Activation d'une molécule d'eau, vraisemblablement par le maintien du Glu 261 déprotonné
- Régénération de l'état initial et libération de l'autre fragment du substrat, par hydrolyse du lien covalent entre l'oxygène nucléophile de l'Asp 231 et le C1 de résidu du sucre en position 1 (Davies et *al.*, 1999 ; Nielson et *al.*, 2001).

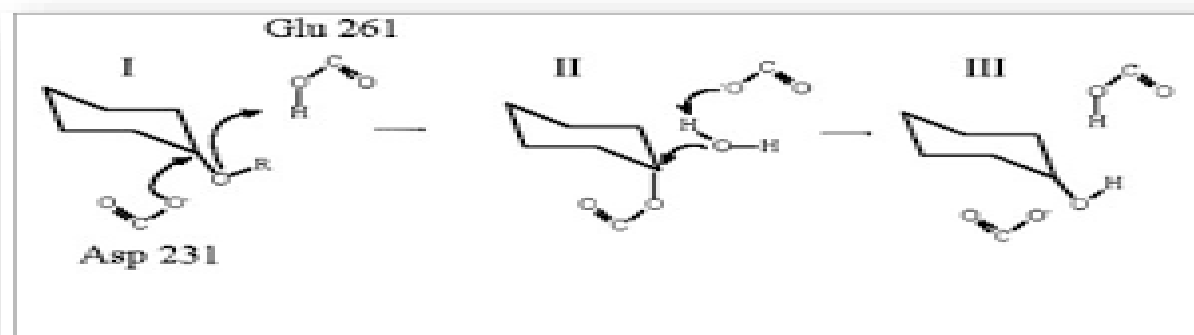


Figure 4 : Mécanisme catalytique des hydrolases glycosyliques (Nielsen et *al.*, 2001)

6. Production d' α -amylase

Plusieurs auteurs travaillent au criblage des microorganismes pour la production d'enzymes, l'isolement et la production des α -amylases extracellulaires (Jensen et *al.*, 1987 ; Haasum et *al.*, 1991), ainsi que la purification et la caractérisation de ces dernières (Nguyen et *al.* 2000). Des α -amylases microbiennes sont maintenant industriellement produites, par des espèces de *Bacillus*, *Aspergillus* et *Rhizopus*, par fermentation submergée ou semi solide (Niehaus et *al.*, 1999 ; Belen et *al.*, 2006). Actuellement, la production d' α -amylase met en jeu des procédés biotechnologiques à moindre coût, utilisant comme substrat de fermentation des déchets organiques, tels que le pulpe de betterave (Baldwin et *al.*, 1986), les déchets d'oranges (Diomi et *al.*, 2008 ; Mahmoud et *al.*, 1998 ; Hart et *al.*, 1991), les produits céréaliers (Pascal et *al.*, 1990), les rebuts des dattes (Açourène et *al.*, 2011) et le lactosérum (Ait Kaki et *al.*, 2012). Le milieu de fermentation contient en général l'amidon, considérée

comme meilleur inducteur de l' α -amylase bactérienne (*Thermomyces lanuginosus*) et fongique (*Aspergillus et Penicillium*) (Leveau et al, 1993).

7. Utilisation de l' α -amylase dans les industries agro-alimentaires :

Le **tableau 1** résume les applications de l' α – amylase en industrie agroalimentaire :

Tableau 1. Applications industrielles de l' α - amylase (Nouadri, 2011).

Industries	Applications
Glucoserie	Solubilisation de l'amidon, accompagnée d'une chute importante de la viscosité (liquéfaction).
Sucrierie	Réduction de la viscosité des sirops de cannes à sucre, en hydrolysant les contaminants amylicés pour réussir le processus de cristallisation.
Biscuiterie et Panification	Amélioration des propriétés rhéologiques et fermentaires de la pâte, ainsi que le volume de la mie et la coloration de la croûte

8. Domaine médical et pharmaceutique

L'Agence nationale de sécurité des médicaments et des produits de santé (ANSM) recommande que les médicaments à base de l' α -amylase (Maxilase Maux de gorge α - amylase) soient utilisés comme traitement d'appoint pour les maux de gorge peu intenses et sans fièvre.(<https://www.anism.sante.fr/>)

Dans le domaine médical, le taux de l' α -amylase dans les liquides biologiques peut être utilisé pour détecter certaines maladies : insuffisance cardiaque, oreillons, cancer du pancréas (Benaouida, 2008).

9. Autres utilisations :

Les α -amylases sont aussi utilisées dans l'industrie textile pour le désencollage des tissus ainsi que dans les domaines de la tannerie, de la papeterie et des détergents pour les lessives où elles facilitent la disparition des tâches en dégradant les souillures, permettant ainsi l'augmentation du pouvoir blanchissant. Elles sont utilisées aussi dans le traitement des eaux résiduaires pour l'élimination de l'amidon (Benaouida, 2008 ; Merabti, 2006).

Aspergillus niger

Le nom *Aspergillus* a été introduit pour la première fois par Micheli en 1729 pour décrire des champignons asexués (Tsang et al., 2018) ; le genre *Aspergillus* comprend environ 180 espèces (Robert et al, 1989), ces espèces sont vitales pour l'industrie alimentaire et un bon nombre d'entre elles sont exploitées pour produire des aliments fermentés (Tsang et al., 2018).

1. Espèce *Aspergillus niger*

Aspergillus niger appelé aussi l'aspergille noire, est l'une des espèces la plus utilisée en Industries agro-alimentaires, ainsi que dans les différentes recherches en vue de leurs Innombrables métabolites d'intérêt, tels que les enzymes : les pectinases, les amylases, les Cellulases et les acides organiques. L'espèce niger est un champignon filamenteux Ascomycète. C'est une des espèces les plus connues du genre *Aspergillus* qui apparaît sous forme d'une moisissure de couleur noire sur les fruits et les légumes (Raper et al, 1977). L'*Aspergillus niger* est capable de croître dans une large plage de température (6-47°C) avec un optimum de 35 à 37 °C. Cette espèce est caractérisée par la production d'un grand nombre de spores en chaîne. La sporulation produit des conidies contenant des spores asexuées haploïdes, disséminées dans l'atmosphère après maturation. La croissance végétative est initiée par la germination des spores avec formation d'un hyphe tubulaire (extension strictement apicale), donnant naissance à un réseau mycélien par ramification qui acquiert les éléments nutritifs de l'environnement (Meyer et al., 2004 ; Ward et al., 2006).

2. Taxonomie

Al-Musallam en 1980 a révisé la taxonomie de ce groupe de champignons en utilisant une analyse par grappes impliquant tous les paramètres morphologiques et culturels disponibles. *Aspergillus* est un groupe diversifié de champignons filamenteux et cosmopolites qui comprend des espèces importantes pour la mycologie médicale, l'alimentation, la recherche fondamentale et l'agro-industrie, ils appartiennent au sous-genre *Circumdati* qui comprend 26 espèces réparties dans les clades *A. niger*, *A. carbonarius*, *A. heteromorphus*, *A. homomorphus* et *A. acualeatus* (Díaz et al., 2020).

3. Caractères cultureux

Aspergillus niger pousse rapidement (2-3 jours) sur les milieux de culture classiques (gélose au malt et Sabouraud). La température optimale de croissance varie généralement entre 25 et 30°C, et elle peut aller jusqu'à 42°C (Tabuc, 2007), son développement est aussi inhibé par

l'ajout de l'actidione dans le milieu de culture (Quatresous, 2011). Les colonies peuvent atteindre 3 à 4 cm en 10 jours, avec un mycélium hyalin et étendu, principalement immergé dans la gélose. Les colonies apparaissent d'abord blanches, puis jaunes, et enfin granuleuses noires à la maturation (Figure 5) (Quatresous, 2011). En effet, ce champignon produit également du mycélium aérien blanc et de très nombreuses structures sporifères érigées, pulvérulentes, brun-noire, qui sont généralement disposées en cercles concentriques (Quatresous, 2011). Le revers des colonies est incolore ou jaune pâle, un exsudat jaune pâle peut être produit en toutes petites gouttelettes (Tabuc, 2007).

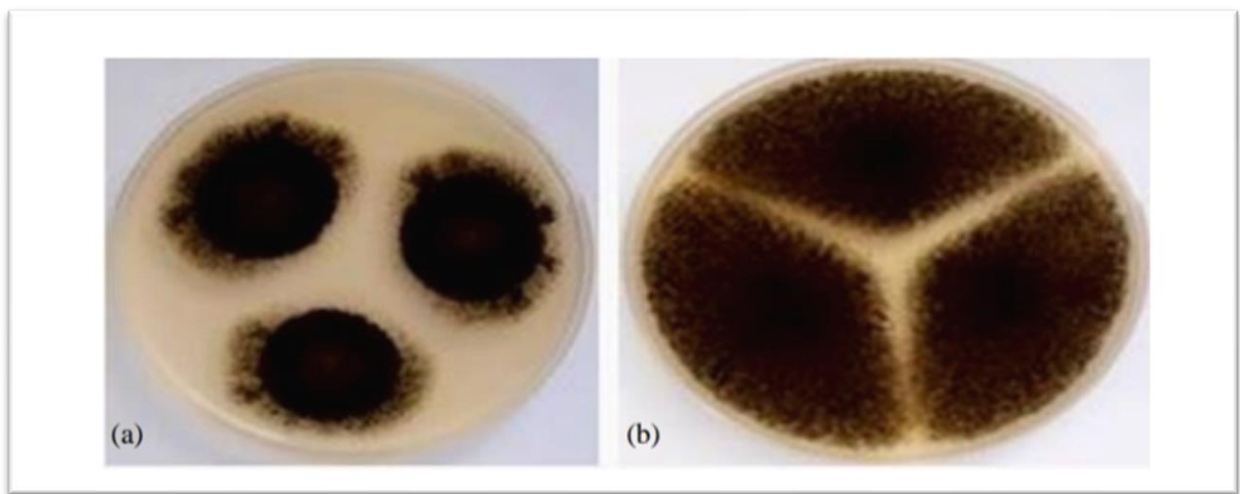


Figure 5 : (a) *Aspergillus niger* sur milieu nutritif (b) *Aspergillus niger* sur Milieu sulfaté

(Zenati, 2018).

4. Morphologie

Les champignons filamenteux présentent une morphologie dispersée (hyphes libres ou amas lâches) ou granulée (agglomérats sphériques d'hyphes) (Salvatierra et al., 2021), *A. niger* est caractérisé par la présence de filaments perpendiculaires (stipes) aux hyphes végétatifs, ces stipes se terminent par une vésicule supportant les cellules de la conidiogénèse : les phialides. Celles-ci, sans collerette, sont soit portées directement par la vésicule, soit séparées par des pièces intermédiaires appelées métules (Morin, 2003) ; l'une des caractéristiques les plus intrigantes et souvent incontrôlables de cet organisme filamenteux est sa morphologie complexe, allant des pastilles sphériques denses aux mycéliums visqueux en fonction des conditions de culture, une productivité optimale est fortement corrélée à une forme morphologique spécifique (Figure 6 et 7) (Wucherpfennig et al., 2011)

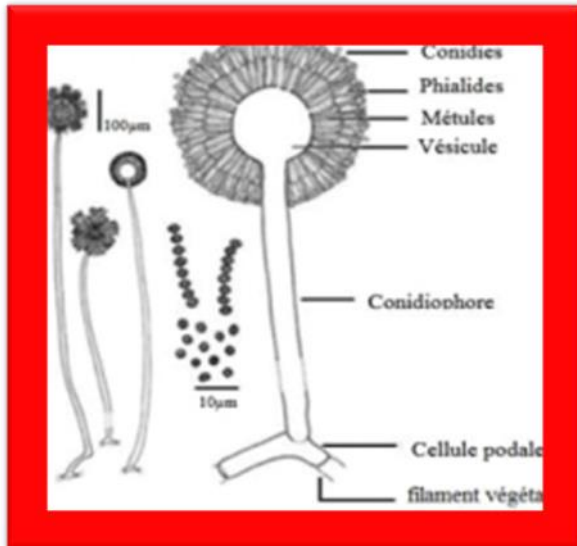


Figure 6. Représentation microscopique de la d'A conidiophore d'*A.niger* (Pasqualotto, 2010).

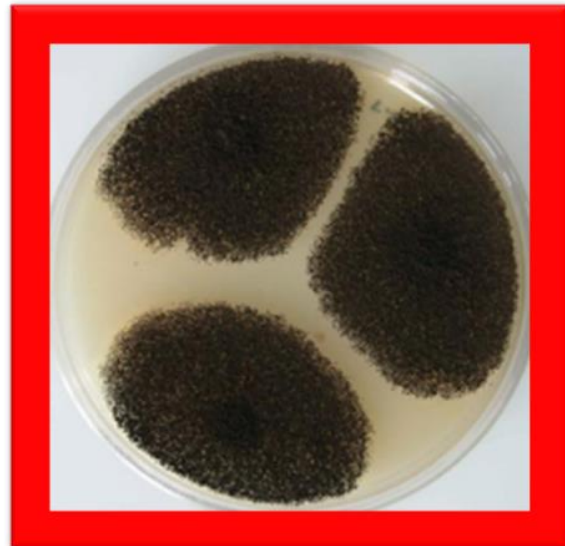


Figure 7. Représentation macroscopique *Niger* (Nygren et al., 2007).

5. Reproduction

A. niger est un champignon ascomycète connu pour se reproduire uniquement par des spores asexuées (Wadman et al., 2009), le cycle asexué est le principal moyen de dispersion cellulaire et protège le génome fongique dans des conditions défavorables, et la production de métabolites secondaires est fréquemment associée à ces processus de développement. La sporulation produit des conidies contenant les spores haploïdes et asexuées uni-nuclées (Ward et al., 2006). La croissance est initiée par germination de la spore, avec formation d'hyphes tubulaires, se développant de manière apolaire par extension apicale et ramification pour former un réseau de mycélium, qui acquiert des nutriments de l'environnement (Ward et al., 2006).

6. Utilisations industrielles d'*Aspergillus niger*

Jusqu'à récemment, les principales applications industrielles d'*Aspergillus niger* sont appuyées sur l'art traditionnel et les sciences liées à la production d'aliments fermentés, ainsi que sur les procédés classiques de biochimie, microbiologie, génétique et le génie génétique (Ward et al., 2006). *L'Aspergillus niger* est aussi utilisé comme usine cellulaire pour la production d'enzymes comme la pectinase, la protéase et l'amyloglucosidase qui étaient les premières à être exploitées et ont été initialement produites en culture de surface (Schuster et al., 2002). La plupart des préparations commerciales des pectinases sont d'origine fongique, les pectinases d'*Aspergillus niger* sont les plus utilisées en industrie, car ces enzymes sont extracellulaires ce qui facilite leur extraction et leur purification. De plus, *l'Aspergillus niger*

est considéré comme inoffensif pour l'alimentation (Generally Regarded As Safe), ce qui favorise l'utilisation des métabolites produits par niger en toute sécurité (Mrudula et al, 2011). *L'Aspergillus niger* peut être cultivé et employé pour synthétiser d'autres composés utiles, et les utiliser en divers domaines :

6.1. Applications dans l'environnement

Les applications d'*Aspergillus* dans l'environnement sont plutôt limitées. Néanmoins, une souche d'*Aspergillus niger* a été étudiée par différents laboratoires pour la biosorption des métaux lourds (Dursun, 2003).

6.2. Production d'acide citrique

Aspergillus niger est devenu un organisme industriellement utilisé lorsque l'acide citrique a été tout d'abord produit par fermentation en 1919 (Roukas, 2000 ; Schuster et al., 2002). L'acide citrique est produit presque exclusivement par la fermentation d'*Aspergillus niger* et d'*Aspergillus fistulosum* parce que les rendements de ces organismes sont élevés. La Food and Drug Administration (FDA) a classé *Aspergillus niger* comme source d'acide citrique (Schuster et al., 2002). Ce dernier est employé couramment dans une variété d'industries, et en volume des ventes, dépassent largement les autres métabolites tels que l'acide gluconique (Roukas, 2000 ; Schuster et al., 2002).

6.3. Production des enzymes

L'espèce d'*Aspergillus niger* est capable de produire une très large gamme d'enzymes d'intérêt industriel à part les pectinases, citant : les protéases, les amylases..., etc. Les principales activités protéolytiques d'*Aspergillus niger* semblent être dues à des protéases extracellulaires acides, ce qui reflète l'adaptation de ce dernier aux milieux de croissance à pH acide (Schuster et al., 2002). Grâce aux capacités hydrolytiques importantes d'*Aspergillus niger* et sa tolérance à l'acidité (pH < 3), il permet d'éviter les contaminations bactériennes au cours des processus biotechnologiques (Jarai et al, 1994 ; Dekrif- Dakhmouche et al., 2006).

Matériel et Méthodes

Cette étude est réalisée au sein de laboratoire de recherche « Antibiotiques, antifongiques, physico-chimie, synthèse et activité biologique », et le laboratoire « Produits naturels » département de biologie, faculté des sciences de la nature et de la vie, des sciences de la terre et de l'univers, université Abou Bekr Belkaïd, Tlemcen.

Elle a pour objectif l'étude de la cinétique et de l'activité enzymatique de l'enzyme α - amylase extraite d'*Aspergillus niger* cultivées sur un milieu liquide à base de bouillon de dextrose de pomme de terre, comparée à celle d' α - amylase commercialisée d'origine microbienne, purifié à partir de *Bacillus* sp.

1. Echantillonnage

Les échantillons de sol utilisés dans le présent travail sont prélevés à partir d'une région de zone aride : Timimoun, sud de l'Algérie, à environ 1 400 km d'Alger, (Figure 8). Cette région est considérée comme écosystèmes extrême (Température élevée).

une quantité du sol est prélevée à partir d'une profondeur de 10 cm à l'aide d'une spatule stérile et est introduite dans une seringue stérile afin de la transporter jusqu'au laboratoire.

Ce prélèvement et l'isolement ont été réalisés par le Pr **BELYAGOUBI Larbi**, laboratoire des produits naturels, département de biologie, faculté des sciences de la nature et de la vie, des sciences de la terre et de l'univers, université Abou Bekr Belkaïd, Tlemcen.

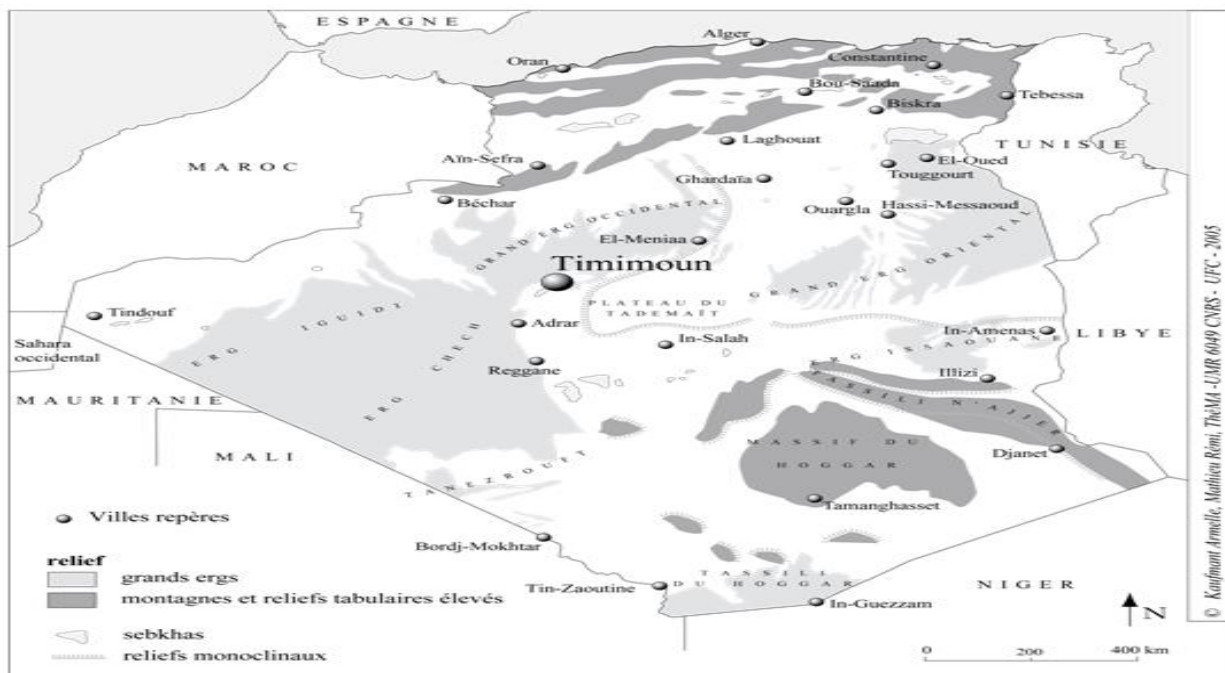


Figure 8 : Localisation géographique de la région d'échantillonnage.

2. Ensemencement

Les échantillons sont déposés sur des boîtes de Piétri contenant du milieu gélosé PDB, puis répartis uniformément à l'aide d'une spatule stérile en effectuant un mouvement de balayage et de rotation sur toute la surface du milieu. Ensuite, les boîtes sont incubées à 30°C pendant 5 jours, la durée nécessaire à l'apparition des colonies fongiques.

3. Identification de l'isolat fongique sélectionné

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

➤ Observation microscopique :

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

➤ Méthode de Scotch

Un petit morceau de scotch est appliqué par la face collante sur la colonie à l'aide d'une pince puis déposé sur une lame porte -objet (Chabasse et *al.*, 2002). puis, une goutte de colorant (Bleu de coton), recouvert d'une lamelle couvre-objet qui écrase la préparation (Chabasse et *al.*, 2002).

4. Production de l' α -amylase « fermentation en milieu liquide » :

➤ **Préparation du milieu de culture liquide :** Dans le cadre de la production d'amylase par *Aspergillus niger*, un milieu de culture liquide a été préparé en utilisant du PDB (Bouillon de dextrose de pomme de terre) liquide enrichi en extraits de pomme de terre et d'autres nutriments essentiels (Acide lactique, sucre). Ce milieu a été sélectionné pour sa capacité à favoriser la croissance optimale du micro-organisme cible et à stimuler la production d'amylase. Les extraits de pomme de terre fournissent une source riche en hydrates de carbone, tandis que les autres nutriments ajoutés assurent un environnement nutritif complet pour le développement et la fonction enzymatique d'*Aspergillus niger*.

➤ **Inoculation de la souche :** l'inoculation de la souche d'*Aspergillus niger* a été réalisée en introduisant une quantité déterminée de la souche cultivée dans le milieu de culture liquide. Cette étape implique l'utilisation d'une culture préexistante pour ensemencher le milieu de fermentation.

➤ **Incubation :** Par la suite, l'erlenmeyer contenant la culture inoculée a été placé dans un incubateur réglé à une température optimale de croissance pour *Aspergillus niger*,

généralement maintenue entre 25°C et 30°C. La culture a été laissée à fermenter pendant 7 jours, afin de permettre à la souche de se développer et de produire de l'amylase. Pendant la phase d'incubation, un suivi régulier de la fermentation a été effectué. Cela implique l'observation visuelle de l'aspect du milieu de culture pour détecter tout changement significatif, ainsi que l'évaluation de la turbidité de la culture (Figure 9).



Figure 9 : Milieu de fermentation à base de déchets de pommes de terre

5. Purification de l'enzyme α -amylase

- Précipitation des protéines

Après la période d'incubation : Cette suspension a ensuite été filtrée. La purification d'enzyme amylase a été réalisée par précipitation au sulfate d'ammonium à 50%.

Le filtrat de cette suspension a été saturé avec le sulfate d'ammonium et centrifugé à une vitesse de 4000 tr/min pendant 15 minutes. Le culot a été recueilli pour une analyse plus approfondie (Figure 10 et 11).



Figure 10 : Tubes d'extrait en centrifugation



Figure 11 : Tube contenant un extrait d'*Aspergillus niger* après Centrifugation.

6. Evaluation de l'activité enzymatiques

Deux origines d'enzymes d' α amylase ont été utilisées dans cette partie : α -amylase extraite d'*Aspergillus niger* et α -amylase commercialisée d'origine microbienne, purifiée à partir de *Bacillus sp.*

6.1 Préparation des solutions

6.1.1 α -amylase commercialisé *Bacillus sp.*

L'origine de l' α -amylase utilisée comme référence est d'origine Bactérienne *Bacillus sp.* (E.C.3.2.1.1).

Elle est commercialisée sous forme lyophilisée (Poids moléculaire : 58 000 et une activité spécifique de $\geq 1,500$ U/mg de protéine (biuret) (**Sigma Aldrich, A6380**).

L'optimum de l'activité catalytique est mesuré à pH 6,9 pour une température de 37°C. Elle est conservée à +4°C.

L' α -amylase est fraîchement préparée avec une concentration de (1,5 U/ml) dans une solution tampon PBS (0,02M, pH 6,9).

6.1.2 α -amylase Extraite d'*Aspergillus niger*

L'extrait enzymatique récupéré sous forme de poudre a été solubilisé dans une solution tampon PBS (0,02M, pH 6,9).

6.1.3 Préparation du substrat (amidon soluble)

Le substrat utilisé est l'amidon soluble de pomme de terre. 1g d'amidon soluble a été dissout dans 50ml de solution tampon phosphate (0,02M, pH 6,9). L'ensemble a été chauffé à une température de 50-70°C, sous agitation.

6.1.4 Préparation du 3,5-dinitrosalicylique (DNSA)

Une solution chromogène a été préparée en utilisant le 3,5-dinitrosalicylique (DNSA), le NaOH (2N) et le tartrate double de sodium et de potassium suivant le protocole décrit par **Sigma Aldrich** :

1g de DNSA est dispersé dans 40ml d'eau distillée. La solution obtenue est de couleur jaune opaque. En parallèle, une solution de NaOH (2N) et 30g de tartrate double de sodium et de potassium est dissoute dans 20ml d'eau distillée, sous agitation. Une fois les deux solutions sont mélangées, le réactif devient limpide avec une couleur orange. Le volume final est ajusté à 100ml avec de l'eau distillée. Le réactif obtenu est conservé à l'abri de la lumière et à +4°C.

6.2 La cinétique enzymatique

❖ Principe

Le principe fondamental de ce mode opératoire réside dans la création de diverses concentrations de substrat dans un environnement expérimental contrôlé. En ajustant les proportions d'enzyme et de substrat dans chaque tube, nous visons à observer comment la variation de la concentration de substrat affecte la réaction enzymatique. Cette approche permet d'évaluer la cinétique de la réaction et d'identifier des tendances significatives. En comprenant comment la concentration de substrat influence la vitesse et l'efficacité de la réaction, nous pouvons déduire des informations cruciales sur le mécanisme d'action enzymatique et optimiser les conditions expérimentales pour des applications pratiques. Cela nous a également permis de comparer les activités enzymatiques des deux sources d'enzymes et d'évaluer leur efficacité dans la dégradation de l'amidon.

❖ Protocole

Pour cette étude, quatre tubes de différentes concentrations (2%, 1,5%, 1% et 0,5%) ont été préparés à partir de la solution d'amidon soluble (2%) afin d'évaluer la réaction enzymatique.

Dans le premier tube, une concentration de **2%** a été obtenue en mélangeant **1 ml** d'enzyme avec **1 ml** d'amidon.

Le deuxième tube, de concentration **1,5%**, a été constitué en ajoutant **1 ml** d'enzyme à un mélange de **250 µl** de solution tampon phosphate salin (PBS) et **750 µl** d'amidon.

Le troisième tube, de concentration **1%**, **1 ml** d'enzyme a été combiné avec **500 µl** de solution tampon PBS et **500 µl** d'amidon.

Le quatrième tube, de concentration **0,5%**, a été préparé en ajoutant **1 ml d'enzyme** à un mélange de **750 µl** de solution tampon phosphate salin (PBS) et **250 µl** d'amidon.

Chaque tube a été incubé à une température de 37°C pendant **15 minutes** avec agitation.

Un prélèvement de 500µl du milieu réactionnel, pour chaque concentration, a été réalisé en quatre temps (3, 7, 11 et 15 min).

1ml de DNSA a été ajouté à chaque tube, suivi d'une période d'incubation au bain-marie pendant **5 minutes**.

L'absorbance est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre à **540 nm**, contre un blanc de la réaction, contenant 1ml de PBS au lieu de 1ml d'extrait enzymatique.

Dans une seconde série d'expériences, nous avons répété le même protocole (même conditions) en remplaçant l' α -amylase issue du *Bacillus sp.* par l'extrait enzymatique d'*Aspergillus niger*, préparé.



Figure 12 : Disposition des cuves dans le spectrophotomètre UV-Visible

6.3 Expression des résultats

6.3.1 Dosage du maltose, produit de la réaction enzymatique

Le maltose est le sucre produit de la réaction enzymatique de substrat (Amidon soluble) et leur enzyme α -amylase :

- A partir d'une solution mère aqueuse du maltose à 2%, des solutions filles sont ainsi préparées à des concentrations allant de 0,025 g/l jusqu'à 0,2 g/l ;
- 1 ml du réactif DNSA est ajouté à chaque tube
- L'ensemble est porté à l'ébullition (100°C) durant 5min ;
- Après refroidissement, le mélange est complet en ajoutant 3 ml par l'eau distillée ;
- La lecture de l'absorbance de chaque solution est effectuée à l'aide d'un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 540 nm contre un blanc (Tableau 3) ;

- La courbe d'étalonnage des concentrations du maltose en fonction des absorbances obtenues ;
- L'équation de régression linéaire est utilisée pour déterminer les concentrations des produits obtenus dans chaque tube des réactions enzymatiques étudiées (Figure 13).

Tableau 2 : Gamme d'étalonnage pour le dosage du maltose produit par les réactions enzymatiques

Tube	0	1	2	3	4	5	6
Concentration de maltose (g/l)	0	0,025	0,05	0,075	0,1	0,15	0,2
Volume de maltose (ml)	0	0,25	0,5	0,75	1	1,5	2
Volume d'eau distillé(ml)	2	1,75	1,5	1,25	1	0,5	0
DNSA (ml)	1	1	1	1	1	1	1
	Agiter et incuber à 100°C pendant 5min						
Eau distillée (ml)	3	3	3	3	3	3	3
	Agiter et mesurer l'absorbance à 540nm						

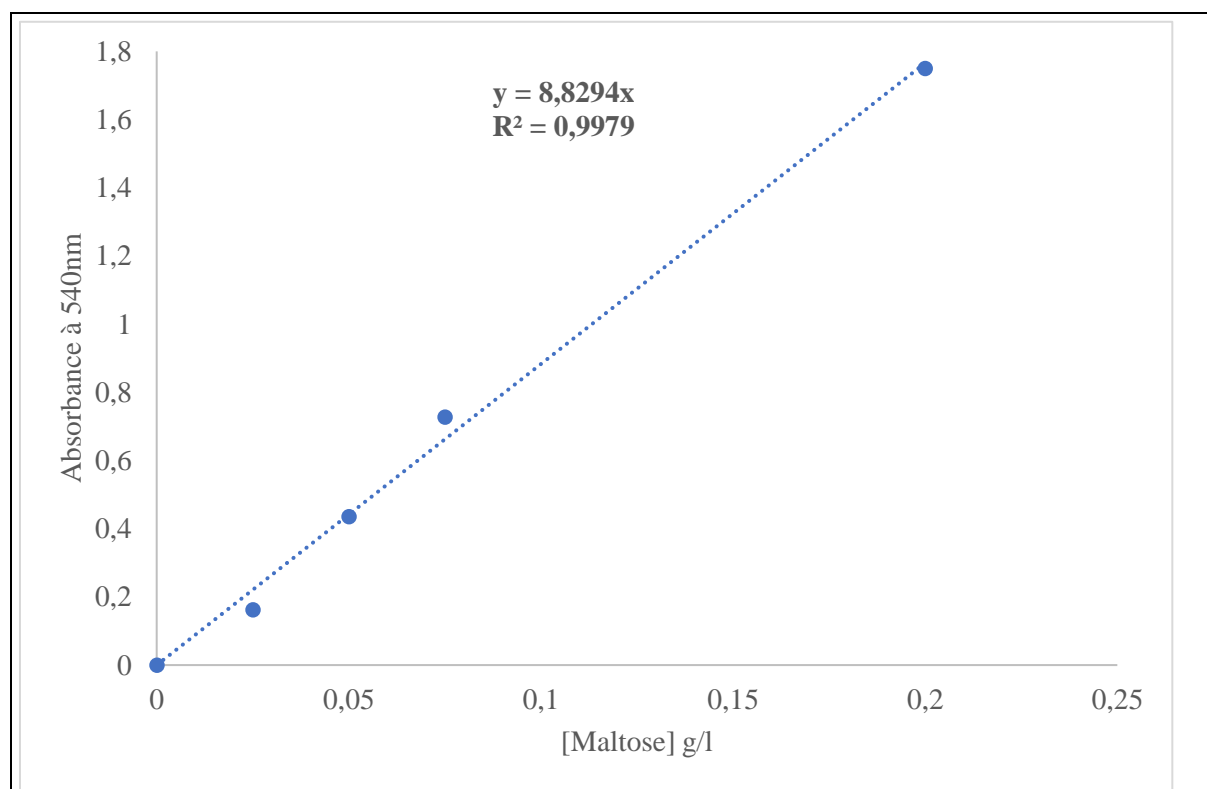


Figure 13 : La courbe d'étalonnage du Maltose

6.3.2 Dosage des protéines par la réaction du biuret

La réaction du biuret est caractéristique de la liaison peptidique, c'est donc une réaction très générale des protéines. Elle consiste en la formation d'un complexe coloré bleu-violet par les protéines et le sulfate de cuivre en milieu alcalin. L'intensité de la coloration de ce complexe est proportionnelle à la concentration en protéines.

1ml d'extrait protéique obtenu a été ajouté à 4 ml du réactif Biuret. L'ensemble a été incubé à température ambiante, pendant 20 min.

Une gamme d'étalonnage a été préparée à partir de la gélatine (10g/l)) (Tableau 3):

L'absorbance a été mesurée à 540 nm à l'aide d'un colorimètre contre un blanc contenant l'eau distillée.

La concentration des protéines dans l'extrait enzymatique préparé à partir *Aspergillus niger*, est calculée à partir de l'équation de la gamme d'étalonnage ($y=0,085x$, $R^2= 0.9927$) des concentrations de la gélatine en fonction des absorbances mesurés (Figure 14).

Tableau 3 : Gamme d'étalonnage pour la détermination de la concentration des protéines

Numéro du tube	1	2	3	4	5	6
Concentration protéines (g/l)	0	2	4	6	8	10
Volume de solution mère (ml)	0	2	4	6	8	10
Volume d'eau distillée (ml)	10	8	6	4	2	0
Réactif Biuret (ml)	4	4	4	4	4	4
	Incubation à température ambiante durant 20 min					
	Lecture des absorbances à 540nm					

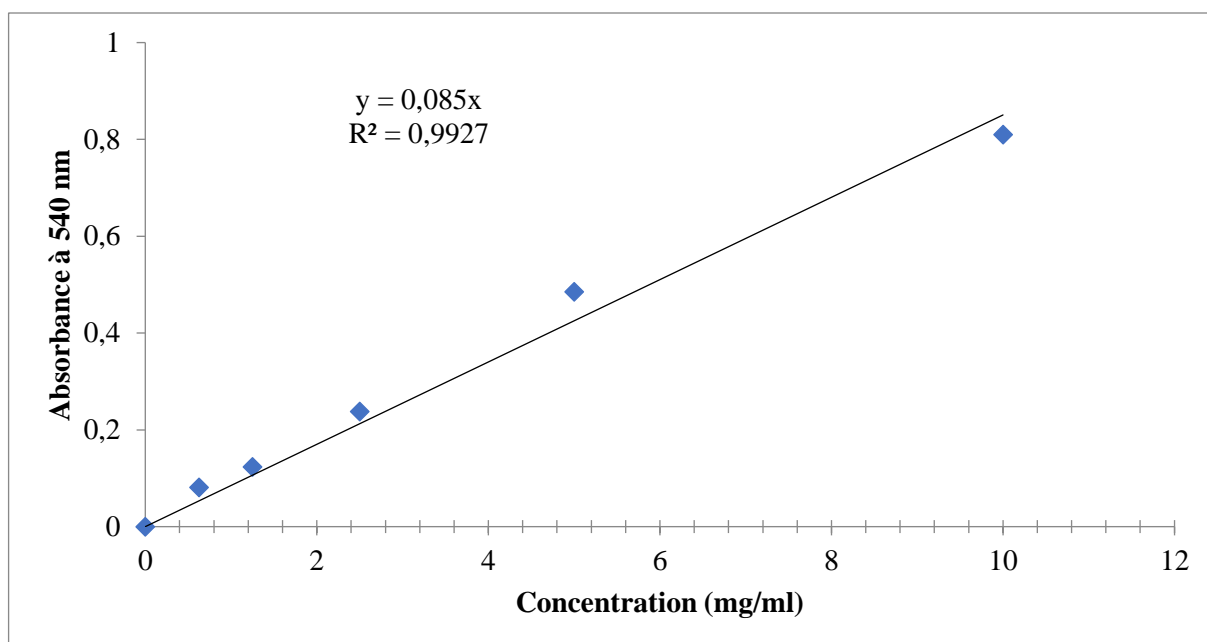


Figure 14 : Droite d'étalonnage de gélatine pour le dosage des protéines

6.3.3 Détermination de l'activité de l' α -amylase (K_m et V_{max})

Pour la détermination des paramètres cinétiques (K_m et V_{max}) de chaque enzyme étudiée, nous avons suivi les étapes suivantes :

- Tracer les courbes cinétiques, concentrations du produit en fonction du temps, de chaque dilution d'amidon ;
- Déterminer la vitesse initiale (V_i) pour chaque courbe ($\Delta[P]/\Delta[t]$) ;
- Représenter graphiquement $1/V_i = f(1/[S])$ (Présentation de Lineweaver-Burk).
- Déterminer graphiquement les paramètres cinétique K_m et V_{max} .
- Déterminer l'activité catalytique et spécifique.

6. Analyse statistique :

Toutes les expériences ont été réalisées en triplicata et les résultats ont été exprimés sous forme de moyennes \pm écart-type. Les données ont été analysées statistiquement à l'aide du logiciel Excel pour déterminer les différences significatives entre les échantillons.

Résultats et Discussion

1. Observation microscopique

La souche d'*Aspergillus niger* cultivée sur milieu gélosé dans une boîte de Pétri a été observée microscopiquement et macroscopiquement et ses principales caractéristiques morphologiques ont été révélées (Figure 15 et 16).

À l'état jeune, le mycélium est constitué d'hyphes septés blancs, qui deviennent noirs au fur et à mesure du développement des conidiophores. Ils sont dressés, lisses et non ramifiés, avec une vésicule sphérique recouverte de phialides disposées en une ou deux rangées. Les conidies, globuleuses, noires et rugueuses, Les principales caractéristiques morphologiques observées au microscope optique confirment l'identification de cette souche fongique comme faisant partie de l'espèce *Aspergillus niger*.

L'observation macroscopique de la souche d'*Aspergillus niger* montre des colonies circulaires avec une tête aspergillaire distincte. Les colonies commencent par être blanches et translucides, puis deviennent noires en sporulant. La taille des colonies peut atteindre 4 à 5 cm en 7 jours sur milieu gélosé incubé à 25 °C

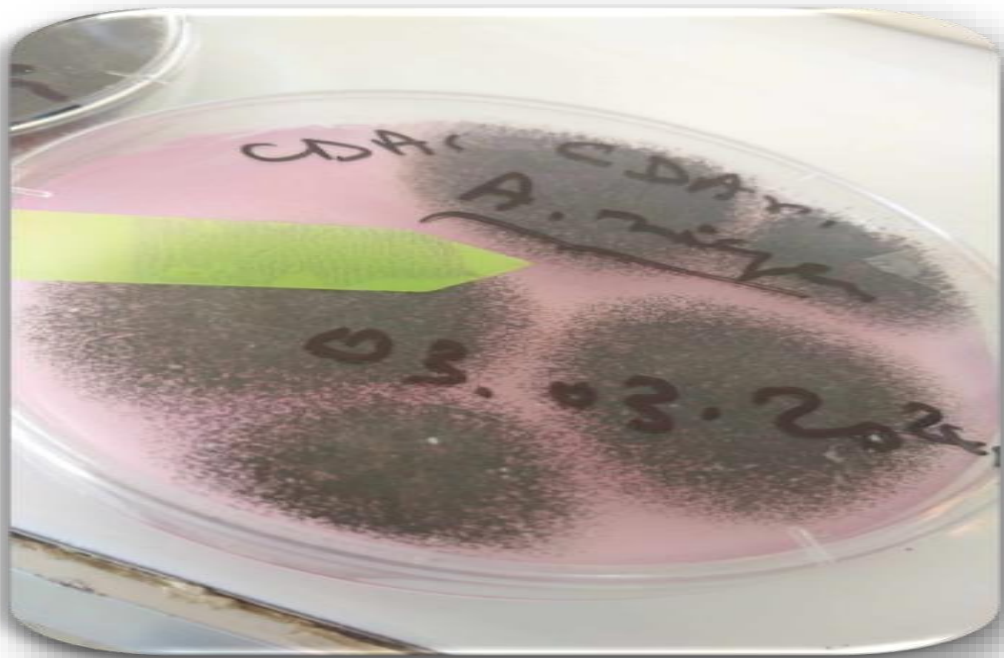


Figure 15 : Observation macroscopique d'une souche d'*Aspergillus niger*

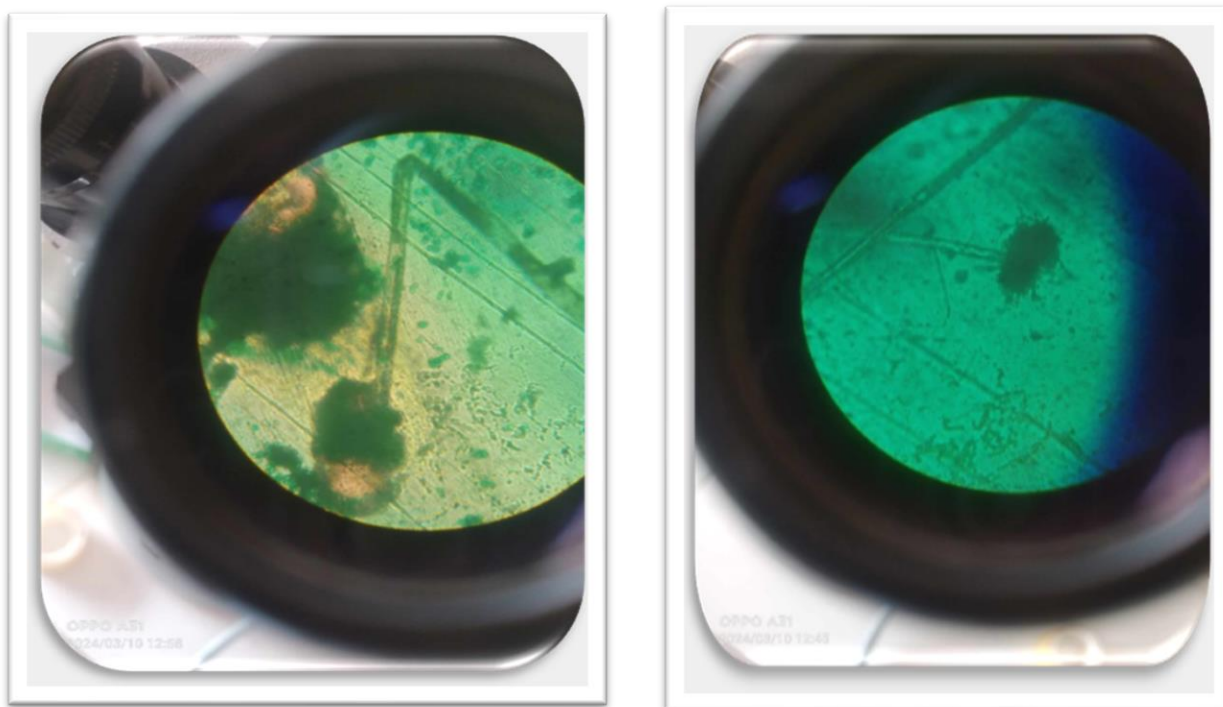


Figure 16 : Observation microscopique d'une souche d'*Aspergillus niger*

2. Analyse Comparative de la Cinétique Enzymatique de l' α -amylase Produite par *Bacillus sp.* et *Aspergillus niger*

- Détermination des Paramètres Cinétiques K_m et V_{max}

Nous avons étudié l'activité enzymatique des enzymes α -amylase de *Bacillus sp.* « Commercialisée » et de l'extrait d'*Aspergillus niger* par analyse cinétique. La détermination des paramètres cinétiques K_m et V_{max} a été réalisée en utilisant une variété de maltose comme produit de dégradation afin de caractériser la vitesse de réaction de ces enzymes. Des variations importantes dans les cinétiques enzymatiques entre les deux sources de l' α -amylase ont été observées, ce qui met en évidence les particularités de leur activité catalytique.

L'analyse détaillée des cinétiques enzymatiques fournit des informations précieuses sur les performances de ces enzymes et leur potentiel d'utilisation dans différents secteurs industriels. Les graphiques et figures présentés ci-après illustrent les résultats de cette analyse cinétique comparative.

La figure 17 présente l'évolution de la formation du produit de dégradation d'amidon en fonction du temps en présence de l'enzyme α -amylase commercialisée d'origine *Bacillus sp.*

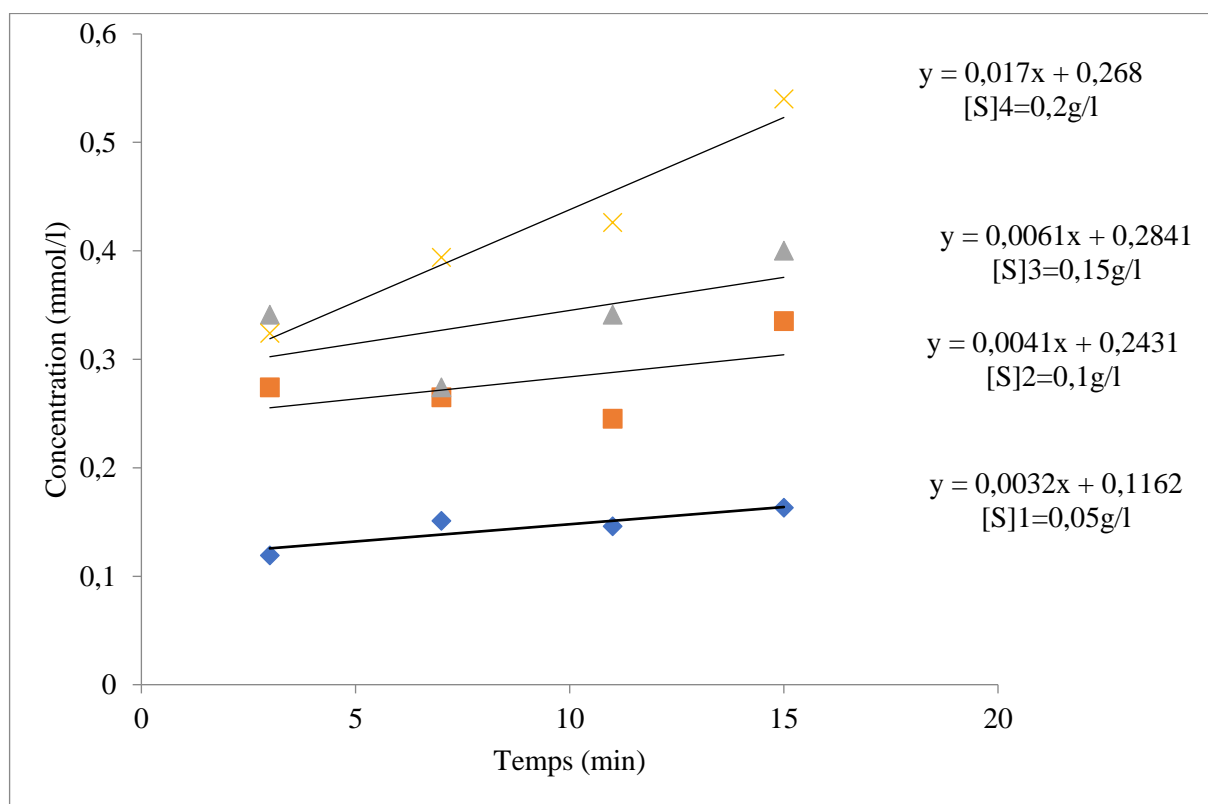


Figure 17 : Evolution de la formation du produit de dégradation d'amidon en fonction du temps en présence de l'enzyme α -amylase de *Bacillus sp.*

A partir de ces courbes, nous avons déterminé la vitesse initiale pour chaque concentration du substrat étudié en présence de l'enzyme α -amylase de *Bacillus sp.* (**Tableau 4**).

Tableau 4 : Vitesse initiale pour les différentes concentrations du produit formé en présence de l'enzyme α -amylase de *Bacillus*.

Concentration substrat (Amidon)	0,05g/l	0,10g/l	0,15g/l	0,20g/l
V_i (mmoml/l/min)	$y = 0,0032x + 0,1162$	$y = 0,0041x + 0,2431$	$y = 0,0061x + 0,2841$	$y = 0,017x + 0,268$
	$V_i=0,1194$	$V_i=0,2472$	$V_i=0,2902$	$V_i=0,285$

La figure 18 présente l'évolution de la formation du produit de dégradation d'amidon en fonction du temps en présence de l'enzyme α -amylase extraite d' *Aspergillus niger*

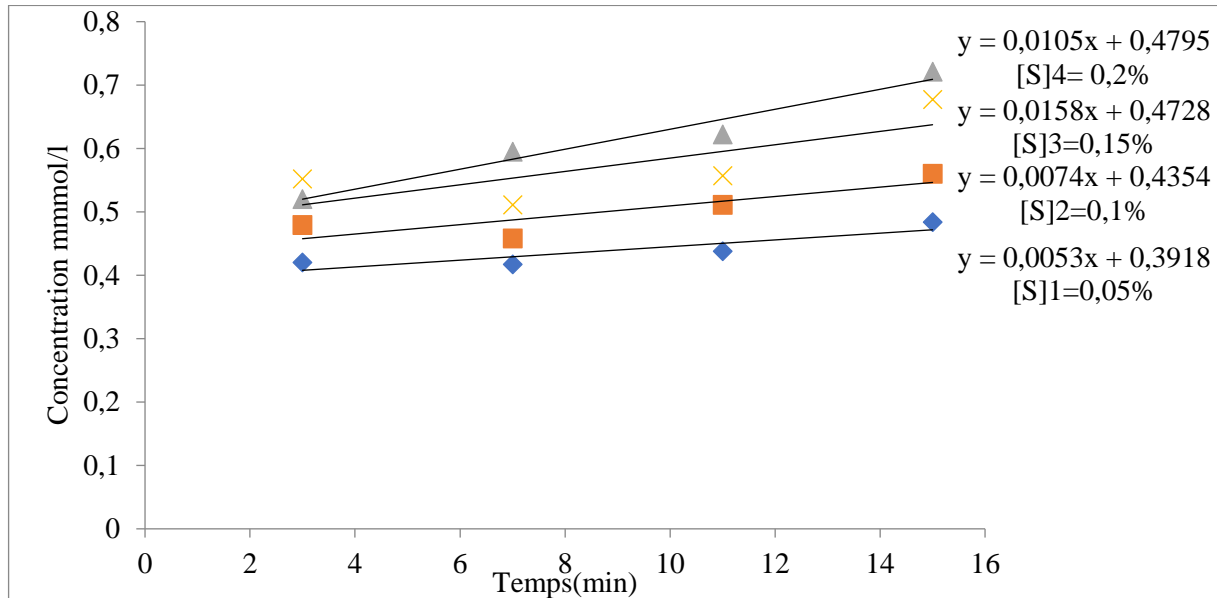


Figure 18 : Evolution de la formation du produit de dégradation d'amidon en fonction du temps en présence de l'enzyme α -amylase extraite d'*Aspergillus niger*

Tableau 5 : Vitesse initiale pour les différentes concentrations du produit formé en présence de l'enzyme α -amylase extraite d'*Aspergillus niger*.

Concentration substrat (Amidon)	0,05g/l	0,1g/l	0,15g/l	0,2g/l
V_i (mmol/l/min)	$y = 0,0053x + 0,3918$	$y = 0,0074x + 0,4354$	$y = 0,0158x + 0,4728$	$y = 0,0105x + 0,4795$
	$V_i = 0,3971$	$V_i = 0,4428$	$V_i = 0,4886$	$V_i = 0,49$

Les figures 19 et 20 représentent les Représentation des doubles inverses ($1/V_i = f(1/[S])$) ou représentation de Lineweaver-Burk. Ces droites permettent de déterminer les paramètres de la cinétique enzymatique (V_{max} et K_m) des deux enzymes étudiées.

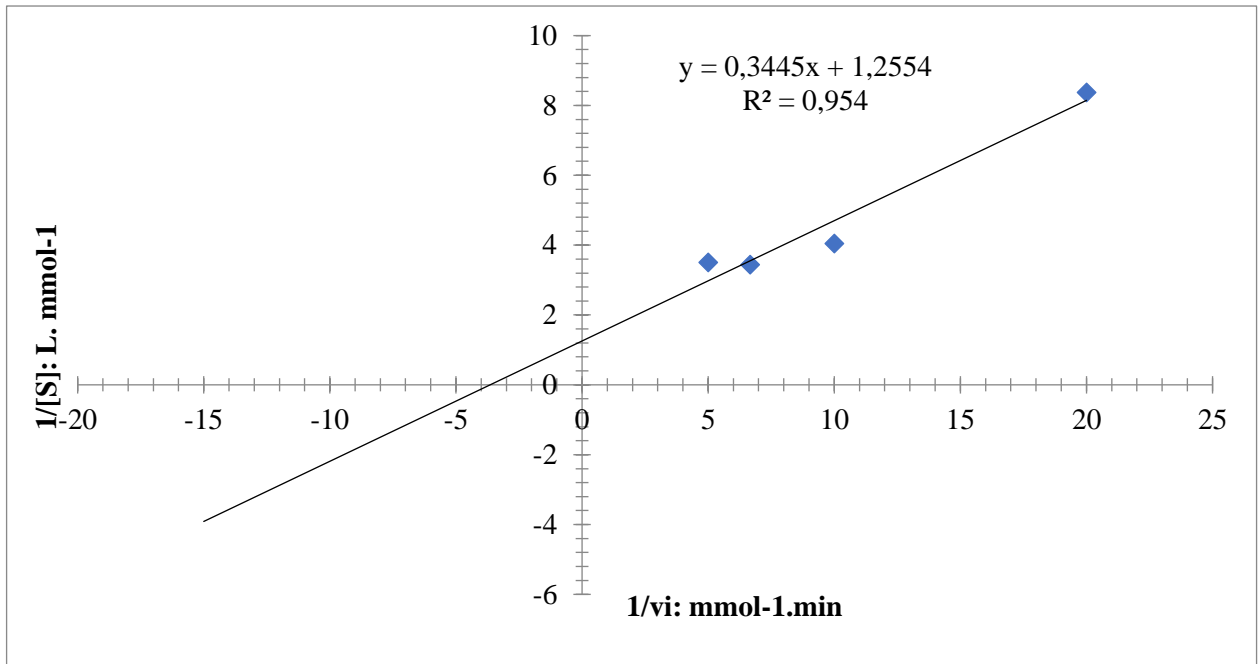


Figure 19: Graphique Lineweaver-Burk pour l' α -amylase de *Bacillus sp.*

$V_{max} = 0.796 \text{ mmol/min}$

$K_m = 0.274 \text{ mmol/l}$

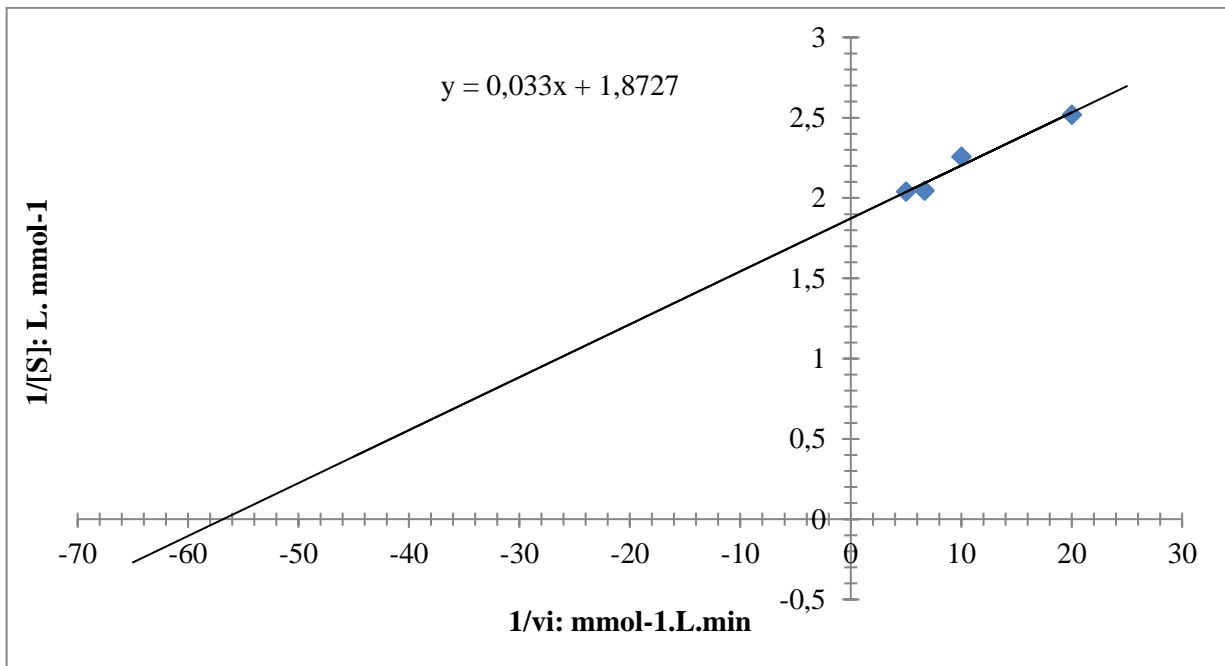


Figure 20: Graphique Lineweaver-Burk pour l' α -amylase extrait d'*Aspergillus niger*

$V_{max} = 0.533 \text{ mmol/min}$

$K_m = 0.017 \text{ mmol/l}$

Les enzymes α -amylase provenant de différentes sources microbiennes présentent des caractéristiques cinétiques distinctes. L'enzyme α -amylase de *Bacillus*, une bactérie thermostable, est commercialisée et possède des valeurs spécifiques de K_m et de V_{max} (Mamo et al., 2009). D'autre part, l'enzyme α -amylase d'*Aspergillus niger* est un champignon qui a ses propres propriétés cinétiques qui peuvent différer de celles de l'enzyme de *Bacillus* (Jana et al., 2008).

La fermentation par solution PDB est une méthode fréquemment employée en biotechnologie pour extraire l'enzyme d' α -amylase à partir d'*Aspergillus niger*. Cette méthode a été sélectionnée en raison de son coût réduit et de sa rapidité d'exécution. Effectivement, ce processus de fermentation est plutôt simple, ne demandant pas d'équipements sophistiqués ni de conditions de culture complexes. En outre, cela facilite la fabrication rapide et efficace de l'enzyme, ce qui revêt une importance capitale pour les applications industrielles qui requièrent une production en grande quantité. Cette méthode permet d'obtenir de manière rentable et efficace une source d'enzyme α -amylase de haute qualité.

La production d' α -amylase par *Aspergillus niger* à partir de déchets végétaux a fait l'objet de nombreuses études. Prenons l'exemple de Krischna et al. (2012) qui ont fabriqué l' α -amylase d'*Aspergillus niger* en utilisant des déchets de banane comme substrat.

Grâce à l'amélioration des conditions de culture, la production d' α -amylase a été améliorée. En utilisant différents déchets agricoles comme substrat, Djekrif-Dakhmouche et al. (2006) ont examiné l'impact de la température, du pH et de l'âge de l'inoculum sur la production d'alpha amylase par *A. niger*.

En comparant la cinétique de l'enzyme α -amylase d'*Aspergillus Niger* avec celle de *Bacillus sp.*, nous avons enregistré que l'enzyme α -amylase de *Bacillus* commercialisée a une V_{max} de 0,796 mmol/min et un K_m de 0,274 mmol/L. Tandis que, l'enzyme extraite d'*Aspergillus niger* a une V_{max} de 0,533 mmol/min et un K_m de 0,017 mmol/L. Les valeurs de V_{max} et de K_m indiquent respectivement la vitesse de réaction maximale et l'affinité de l'enzyme envers son substrat, mettant en évidence des disparités significatives entre les deux enzymes en ce qui concerne leur efficacité catalytique et leur interaction avec le substrat.

L'enzyme de *Bacillus* possède une V_{max} plus élevée que l'enzyme d'*Aspergillus*, ce qui indique que l'enzyme de *Bacillus* a une capacité plus élevée à stimuler la réaction. Toutefois, la valeur de K_m de l'enzyme d'origine d'*Aspergillus* est beaucoup plus faible en comparaison

avec celle de l'enzyme de *Bacillus*. En conclusion, l'enzyme d'origine d'*Aspergillus* donne une affinité plus élevée pour son substrat.

L'activité catalytique et spécifique des enzymes est fondamentale pour comprendre leur fonctionnement et leur rôle dans les processus biologiques. La spécificité et l'activité catalytique des enzymes sont étroitement interdépendantes et jouent un rôle crucial dans la régulation des réactions biochimiques au sein des cellules vivantes.

Les résultats des calculs révèlent que l'enzyme provenant d'*Aspergillus niger* présentent une activité catalytique de 0,533 mmol/min et une activité spécifique de 0,69 U/mg, tandis que l'enzyme commercialisée d'origine *Bacillus* présente une activité catalytique de 0,796mmol/min et une activité spécifique de $\geq 1,500$ U/mg de protéine (biuret) (Sigma Aldrich, A6380).

Par rapport à l'origine microbien: L'enzyme de *Bacillus* est issue d'une bactérie thermostable, tandis que celle d'*Aspergillus niger* provient d'un champignon. En général, les enzymes bactériennes sont plus robustes et tolérantes aux conditions de stress (Smith et al., 2018), ce qui peut se traduire par une production plus fiable et stable (Johnson et al., 2019).

L'analyse comparative des paramètres cinétiques des enzymes α amylase de *Bacillus* et d'*Aspergillus niger* met en lumière des opportunités pour la fabrication d'une enzyme moins coûteuse, en exploitant les caractéristiques spécifiques de chaque enzyme pour optimiser les processus de production.

Les avantages potentiels de la fabrication d'une enzyme moins coûteuse reposent sur la compréhension approfondie des propriétés cinétiques des enzymes de *Bacillus* et d'*Aspergillus niger*, offrant des pistes pour améliorer l'efficacité et la rentabilité des processus de production enzymatique (Zhang et al., 2018 ; Gupta et al., 2020).

Cependant, il est important de considérer les éventuels inconvénients liés à la fabrication d'une enzyme moins coûteuse. Par exemple, une réduction excessive des coûts pourrait compromettre la qualité ou la pureté de l'enzyme, ce qui pourrait avoir un impact négatif sur son activité et sa performance dans les applications industrielles. De plus, les coûts de purification et de formulation de l'enzyme doivent être pris en compte pour garantir une enzyme de haute qualité (Smith et al., 2017 ; Johnson et al., 2019)

Conclusion Et Perspectives

En conclusion, notre étude a démontré que la production d'enzyme α amylase à partir d'*Aspergillus niger* sur un milieu liquide à base de pomme de terre peut être réalisée de manière efficace et économique. Les résultats obtenus montrent que l'utilisation de techniques de purification alternatives peuvent réduire les coûts de production sans compromettre la qualité de l'enzyme.

En se basant sur nos résultats et en combinant différentes approches, il est possible d'améliorer le processus de production et de purification des enzymes de manière économique, ouvrant ainsi la voie à de nouvelles applications prometteuses dans divers domaines de la biotechnologie comme l'utilisation d'un solvant organique approprié dans l'étape d'extraction telle que le phosphate buffer saline et la purification de l'enzyme en utilisant la chromatographie d'échange d'ions, ce qui permet d'obtenir un enzyme de haute pureté à moindre coût.

Il est crucial de maintenir des conditions de conservation optimale (Lyophilisation ou cryoconservation) du produit final afin de préserver l'intégrité et l'activité de l'enzyme sur une période prolongée.

Pour de futures recherches et de prochaines études ces techniques pourraient être appliquées pour extraire et purifier l'enzyme afin d'étudier son potentiel inhibiteur. Les chercheurs pourraient ainsi mettre au point des outils et des thérapies ciblées pour traiter des maladies liées à des dysfonctionnements de cette enzyme.

Nous soulignons que cette approche permettra aux industries alimentaires, pharmaceutiques et biotechnologiques de produire des enzymes α amylase à faible coût sans compromettre leur qualité. L'utilisation d'*Aspergillus niger* comme source alternative pour la production d' α -amylase offre des avantages économiques et environnementaux significatifs.

Références bibliographiques

Açourène, M., & Ammouche, A. (2011). Valorisation des rebuts de dattes par production d'éthanol. *Revue des Énergies Renouvelables*, 14(3), 443-450

Ait Kaki-El-Hadef, A., Lounici, H., & Drouiche, N. (2012). Production and optimization of α -amylase by *Bacillus licheniformis* 2D55: study of some factors affecting enzyme activity. *BioMed Research International*, 2012.

Alais, C., & Linden, G. (2008). Les glucides dans la pratique alimentaire. 2e édition, Lavoisier.

Baldwin, E. A., Nisperos, M. O., & Shewfelt, R. L. (1986). Production of alpha-amylase by fungi on beet pulp. *Journal of Food Science*, 51(5), 1231-1235.

Belen, F., Curiel, J. A., Fuentes, M. C., Cobos, M. J., & Ballesteros, C. (2006). Production of alpha-amylase by *Aspergillus oryzae* in submerged and solid-state fermentation. *Journal of Food Engineering*, 76(3), 371-377.

Berg, J. M., Tymoczko, J. L., & Stryer, L. (2002). *Biochemistry* (5th ed.). New York: W.H. Freeman and Company.

Boel, E., Brady, L., Brzozowski, A. M., Derewenda, Z., Dodson, E., Dodson, G., ... & Amos, W. B. (1990). Calcium binding in α -amylases: an X-ray diffraction study at 2.1 Å resolution of two enzymes from *Aspergillus*. *Biochemistry*, 29(23), 6244-6249.

Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.

Brozowski, A. M., & Davies, G. J. (1997). Structure and mechanism of glycosyl hydrolases. *Current Opinion in Structural Biology*, 7(5), 637-644.

Burhan A., Nisa U., Gökhan C., Ömer C., Ashabil A., & Osman G. (2003). Enzymatic properties of a novel thermostable, thermophilic, alkaline and chelator resistant amylase from an alkaliphilic *Bacillus* sp. isolate ANT-6. *Process Biochemistry*, 38(10), 1397-1403.

Chatterton, D. E., Nguyen, D. N., Bandyopadhyay, P., & Teng, C. (1996). Two-component α -amylase inhibitors from barley with distinct inhibition specificities. *Phytochemistry*, 41(6), 1471-1475.

Chevallier, D. (1990). Rapport sur les applications des biotechnologies à l'agriculture et à l'industrie agro-alimentaire. Office parlementaire d'évaluation des choix scientifiques et technologiques. Tom 1. N° 1827.177 p.

Coolbear, T., Whittaker, D. J., Daniel, R. M., & Cowan, D. A. (1992). The purification and characterization of an extremely thermostable α -amylase from the hyperthermophilic archaeobacterium *Pyrococcus furiosus*. *Biochemical Journal*, 281(1), 127-133.

Costes, J. P. (1982). Étude de la thermostabilité de l'amylase α de *Penicillium notatum*. *Biochimie*, 64(2), 175-183.

Références bibliographiques

Dauter, Z., & Dauter, M. (1999). De novo phasing and crystallographic analysis of the X-ray structure of the α -amylase from *Bacillus subtilis*. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 55(7), 1200-1207.

Davies, G. J., Wilson, K. S., & Henrissat, B. (1999). Nomenclature for sugar-binding subsites in glycosyl hydrolases. *Biochemical Journal*, 321(2), 557-559.

Díaz, M. R., et al. (2020). *Aspergillus* section *Fumigati* in clinical practice in Hong Kong, China. *Frontiers in Microbiology*, 9, 789.

Farber, G. K., & Petsko, G. A. (1990). The α -amylase family of enzymes. *Proteins: Structure, Function, and Genetics*, 7(3), 205-217.

García-Gómez, B., González-Sánchez, R., Montesinos, J. L., & García-Carmona, F. (2009). Enzyme biotechnology: production and applications of proteases. *Biotechnology Progress*, 25(1), 823-833.

Hart, M. R., Graham, J. M., Hilton, J. L., & Hall, M. B. (1991). Utilization of orange peel in cattle feeding. *Journal of Animal Science*, 69(8), 3410-3416.

Heslot, H. (1996). A novel secreted alpha-amylase from *Streptococcus bovis* with properties identical to those of mammalian alpha-amylases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1294(1), 74-80.

Kadziola, A., Abe, J., Iwasaki, K., Jigami, Y., & Ueno, H. (1994). Crystal and molecular structure of the barley alpha-amylase isozyme 1. *FEBS Letters*, 341(2-3), 276-280.

Keating, G. J., & Whitaker, J. R. (1998). *Enzymes in food processing*. Academic Press.

Leveau, J. Y., & Bouix, M. (1993). The effect of culture conditions on production of pectinolytic enzymes by *Penicillium griseoroseum*. *Journal of Applied Bacteriology*, 74(4), 416-423.

Madigan, M. T., & Martinko, J. M. (2006). *Brock biology of microorganisms* (11th ed.). Pearson Prentice Hall.

Mahmoud, A. E., Badr, E. A., & El-Halwagi, M. M. (1998). Utilization of orange peel for the production of cleaner fuels and value-added products. *Clean Technologies and Environmental Policy*, 1(2), 107-112.

Mandel, A. L., & Breslin, P. A. (2012). High Endogenous Salivary Amylase Activity Is Associated with Improved Glycemic Homeostasis following Starch Ingestion in Adults. *Journal of Nutrition*, 142(5), 853-8.

McCarter, L., & Withers, S. G. (1996). Mechanisms of enzymatic glycoside hydrolysis. *Current Opinion in Structural Biology*, 6(5), 757-765.

Merabti, A. (2006). Production et caractérisation d'enzymes microbiennes : application dans les industries alimentaire, pharmaceutique, textile et papeterie. Thèse de doctorat, Université de Constantine, Algérie.

Références bibliographiques

Meyer, V., Schreiner, U., Dietzel, L., Stabler, N., Schwarz, W. H., & Braun, H. P. (2004). Identification of the *Aspergillus niger* proteins which are secreted in submerged cultures. *Biotechnology Letters*, 26(22), 1733-1737.

Nathalie, M. (1999). Évaluation du potentiel de production de protéases bactériennes à partir de boues d'épuration municipales. Mémoire de Maître ès sciences. Université du Québec INRS-Eau.

Nelson, D. L., & Cox, M. M. (2005). *Lehninger Principles of Biochemistry* (4th ed.). W.H. Freeman.

Nguyen, T. H., Splechna, B., & Steinböck, M. (2000). Purification and characterization of α -amylase from *Bacillus amyloliquefaciens*: insights into the domain structure by comparison with *Bacillus subtilis* enzyme. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1476(2), 257-266.

Niehaus, F., Bertoldo, C., & Kähler, M. (1999). High-level production of thermo-stable α -amylase and α -glucosidase by a genetically modified strain of *Bacillus licheniformis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 52(4), 456-462.

Nielson, J. E., & Borchert, T. V. (2001). Protein engineering of bacterial α -amylases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1547(2), 253-274.

Nouadri, T. (2011). Production d'amylase par le champignon Filamenteux *Aspergillus tamarii*. Thèse de Doctorat, Université de Skikda, Algérie.

Organisation mondiale de la santé. (2019). Diabète. Organisation mondiale de la santé. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/diabetes>

Panchal, C. J. (1990). Production, purification and properties of alpha-amylase from *Schwanniomyces castellii* (Hansei). *Journal of Industrial Microbiology*, 6(4), 279-283.

Park, J. T., & Shaw, W. V. (1997). Lipopolysaccharide biosynthesis. Fundamentals of bacterial cell wall targeting. *Current Opinion in Microbiology*, 47(1), 7-14.

Pascal, F., et al. (1990). Production de l'alpha amylase par certaines souches fongiques sur substrat de fermentation de produits céréaliers. *Journal de Biotechnologie*, 14(1), 1-10

Plotkin, S. A., & Orenstein, W. A. (2013). *Vaccines* (6th ed.). Elsevier.

Raper, K. B., et al. (1977). *Aspergillus niger*. In *Aspergillus* (pp. 1-14). Academic Press.

Reddy, L. V. A., Wee, Y. J., & Ryu, H. W. (2003). Biotechnological production of organic acids from renewable resources. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 95(6), 599-610.

Robert, V. A., & Pitt, J. I. (1989). A numerical taxonomic study of the genus *Aspergillus*. *Mycological Research*, 93(2), 224-234.

Schaumburg, I., & Slzmann, R. (1991). Purification and characterization of a novel thermostable alpha-amylase from the hyperthermophilic archaeobacterium *Pyrococcus woesei* after cloning and expression of its gene in *Escherichia coli*. *European Journal of Biochemistry*, 202(1), 87-93.

Références bibliographiques

- Scriban, R. (1999).** Biotechnologie. Techniques et Documentation ; 5ème édition.
- Srinivasa, R., Mathur, P. M., & Desai, S. (2004).** Production of fungal α -amylase on wheat bran. *Journal of Scientific and Industrial Research*, 63, 847-851.
- Stear, M. L., & Levitzki, A. (1973).** Kinetics of the reaction catalyzed by α -amylase. *The Journal of Biological Chemistry*, 248(3), 963-969.
- Stefanova, L., & Emanuilova, E. (1992).** Chemical modification of α -amylase from *Bacillus licheniformis* with periodate oxidation. *Biotechnology and Bioengineering*, 40(11), 1367-1373.
- Tabuc, C. (2007).** Isolement et identification des moisissures dans différents substrats. Thèse de doctorat, Université de Bucarest, Roumanie.
- Tsang, C. C., Hui, T. W. S., Lee, K. C., Teng, J. L. L., Tse, H., Yuen, K. Y., & Chan, J. F. W. (2018).** Genetic diversity of *Aspergillus section Fumigati* in clinical practice in Hong Kong, China. *Frontiers in Microbiology*, 9, 789.
- Vincent, F. (1996).** Biochimie alimentaire : protéines et enzymes. Dunod.
- Vishwanatha, K. S., Appu Rao, A. G., Singh, S. A., & Tharanathan, R. N. (2010).** Fungal β -glucosidase: microbial production and effect on different food matrices. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 50(5), 425-440.
- Ward, O. P., Qin, W. M., Dhanjoon, J., Ye, J., & Singh, A. (2006).** Physiology and biotechnology of *Aspergillus*. *Advances in Applied Microbiology*, 58, 1-75.

Annexe

PDB: (Potato Dextrose Broth)

Pomme de Terre	200g
Eau distillées.....	1000ml
Glucose	20 grammes
Acide Lactique	7.5 ml

CDA: (Czapek Dextrose Agar) :

NaNO ₃	3g
Saccharose.....	.30g
KH ₂ PO ₄	1.5g
MgSO ₄	0.5g
KCL.....	0.5g
FeSO ₄	0.001g
Agar.....	15g
Eau distillées.....	1000ml

Rose bengal :

Rose bengal	1g
Eau distillé.....	100ml.