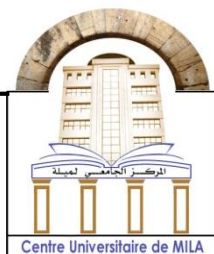


الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de L'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



N°Ref :

Centre Universitaire Abdelhafid BOUSSOUF- Mila

Institut des Sciences et de la Technologie

Département des Sciences de la Nature et de la Vie

Mémoire préparé en vue de l'obtention du diplôme de

Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences biologiques

Spécialité : Biochimie appliquée

Thème :

**Étude des propriétés enzymatiques de quelques
moisissures thermales**

Présenté par :

- Harimi Aymen
- Khebbat Narimen
- Belmoures Ouarda

Devant le jury :

Président : Mme. LALAOUI Meriem MCB /C. U Abdelhafid Boussouf. Mila

Examineur : Mme. HARRIECHE Ouahiba MCB /C. U Abdelhafid Boussouf. Mila

Promoteur : Mme. BENSERRADJ Ouafa MCA /C. U Abdelhafid Boussouf. Mila

Année Universitaire : 2021/2022



Remerciement



Ce mémoire est le fruit des efforts fournis et des sacrifices consentis par plusieurs personnes que je ne pourrai oublier de remercier.

Nos remerciements s'adressent d'abord à (الله), créateur de toutes choses, pour son souffle et tous ses innombrables bienfaits.

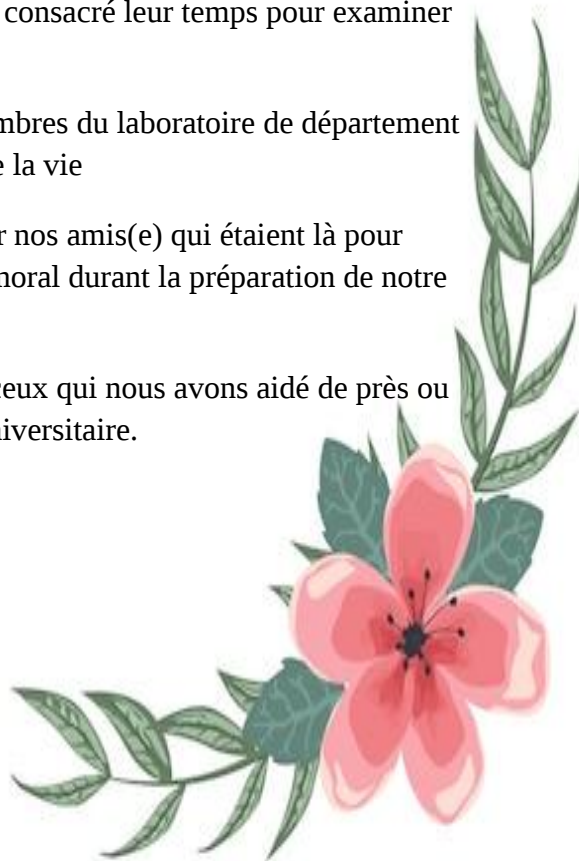
Nous tenons avant tout à exprimer nos remerciements les plus sincères à **M^{me} Benserradj Ouafa** pour la confiance qu'elle a placée en nous, pour effectuer ce travail, Sa disponibilité, ses précieux conseils, son aide, ses suggestions sur la rédaction de ce mémoire ainsi que la confiance qu'elle nous a témoigné tout au long de cette étude.

Nos sincères remerciements vont aussi aux membres de jury pour l'honneur qu'ils auront fait en acceptant de juger ce travail ; à madame lalaoui Meriem pour accepter de présider le jury à madame Harich Oahiba qui a consacré leur temps pour examiner de ce travail.

Nous remercions tous les membres du laboratoire de département des sciences de la nature et de la vie

Nous tenons enfin à remercier nos amis(e) qui étaient là pour nous offrir un grand soutien moral durant la préparation de notre mémoire

Enfin, nous remercions tous ceux qui nous avons aidé de près ou de loin durant notre cursus universitaire.





Dédicace

Avec l'expression de ma reconnaissance, je dédie ce modeste travail

À ceux qui, quels que soient les termes embrassés, je n'arriverais

Jamais à leur exprimer mon amour sincère.

A l'homme, mon précieux offre du dieu, qui doit ma vie, ma

*Réussite et tout mon respect : **mon cher père « AHCEN » »***

A la femme qui a souffert sans me laisser souffrir, qui n'a jamais

Dit non à mes exigences et qui n'a épargné aucun effort pour

*Me rendre heureuse : **mon adorable mère « RACHIDA » »***

*A ma chère sœur « **CHAHINAZ** » » et « **AMEL** » » qui n'ont.*

Pas cessée de me conseiller, encourager et soutenir tout au

Long de mes études. Que Dieu les protège et leurs offres la

Chance et le bonheur.

*À mon adorable frère « **le patron** » » « **AHMED** » », qui sait toujours*

Comment il apporte la joie et le bonheur à toute la famille.

*À mon cher grand frère « **AISSA** » », le meilleur frère du monde, le premier*

lien après mon père, qui ne sera plus répété, le propriétaire des conseils et le

propriétaire du soutien, merci dans le nombre de gouttes de pluie

*A mes grands-mères, mes oncles et mes tantes et tout la famille « **HARIMI** » »*

***ET « KEZIOU » ».** Que Dieu leur*

Donne une longue et joyeuse vie.

A tous les cousins, les voisins et les amis que j'ai connu jusqu'à

*Maintenant surtout « **HAMZA** » ». Merci pour leurs amours et leurs*

encouragements.



Aymen



*Au nom d'ALLAH le tout puissant, le clément et
miséricordieux. Louange à ALLAH, l'unique et que la bénédiction le
salut soient sur l'ultime prophète*

Je dédie ce travail, d'un profond amour ;

*A Mon très cher père Belmoures **Djamel**, Le meilleure papa du monde,
Mon héros, qui m'a guidé vers le bon chemin et de me voir réaliser
mes, tes sacrifices que vous avez consentis pour mon éducation, sa
chaleur paternelle a été et sera toujours pour moi d'un grand
réconfort je suis fière d'être son unique fille.*

*A Mon cher Mère, **Boulekezaz Samira**, mon paradis sur terre, la
lumière de ma vie, la plus adorables et gentille au monde, la source de
tendresse, qui pour me rendre heureuse, n'a jamais cessé de me venir
en aide chaque instant de ma vie.*

*Mes parents Vous étés les beaux visages que j'ai vus, les deux meilleurs
mots que j'ai prononcés, Que Dieu (الله) les gardes et les accords en long
vie et bonnes santés*

*Mes très chers frères, mes fidèles accompagnants dans ma vie, qui
m'ont énormément encouragée, ; LAKHDER, MAHDI, SABRI que
Dieu (الله) les gardes et les protèges*

*A mes grandes familles ; Belmoures et Boulekzzaz et mes proches
amies*

*A mes binômes ; Narimen, on 'a passé des bons moments ensemble
depuis 5 ans, qui ont à la bonne volonté de réalise Ce travail.*

A tous nos professeures qui nous enseigner pendant 5 ans.

Et notre cher encadreur : Madame, Benserradje ouafa



Ouarda



Grace à **Allah** et avec sa faveur, j'ai pu réaliser ce travail que je dédie à celle qui m'a donné

La tendresse et le courage à celle qui attend chaleureusement ce jour :

A ma très chère mère

Aucun dédicace très chère maman, ne pourrait exprimer la profondeur des sentiments que j'éprouve pour vous, vos sacrifices innombrables et votre dévouement firent pour moi un encouragement. Vous avez guetté mes pas, et m'avez couvé de tendresse, ta prière et la bénédiction m'ont été d'un grand secours pour mener à bien mes études. Vous m'avez aidé et soutenu pendant de nombreuses années avec à chaque fois une attention renouvelée.

Puisse dieu, tout puissant vous combler de santé, de bonheur et vous procurer une longue vie.

A mon très cher père

Mon histoire est courte, je suis tombée amoureuse d'un homme plus que moi-même. Une nuit, j'ai été terrifiée par la nouvelle de sa mort. Le temps ne m'a pas satisfait. Mon père, parti longtemps pour la patrie des dormeurs, et tout est resté différent après son départ, mon père, s'il n'y avait pas ton âme qui planait sur moi, je n'aurais pas continué mon chemin. Ton rôle dans ta vie et dans ta mort était un. Tu es la lampe que ma vie s'allume et mon père l'éteint. Aujourd'hui j'ai tellement souhaité que tu me vois lever mon chapeau haut et voir ton sourire qui me remplit de joie. Mon père tu es la vie il n'y pas de vie après dieu.

A MON très chère encadreur : Mme Benserradj Ouafa

A mes adorables frères : Mouncef, Abed Rahman et à mon petit ange Adam et ma sœur : Lilia

A mes oncles, tantes et toute la famille Khebbat et Larioui.

A mes binômes Aymen et Ouarda on a passé des bons moments

ensembles.



Narimen

Liste des tableaux

Numéro	Titre	Pages
Tableau 01	Exemples d'enzymes produites par les moisissures.	09
Tableau 02	Différents types de champignons et leurs besoins de température	10
Tableau 03	Les différentes classes d'enzymes	12
Tableau 04	Exemples des protéases microbiennes	16
Tableau 05	Quelques protéases fongiques et leurs applications industrielles	17
Tableau 06	Les principaux microorganismes producteurs de l' α -amylases.	19
Tableau 07	Applications industrielles de L' α amylase	20
Tableau 08	Les principaux microorganismes producteurs de la cellulase	22
Tableau 09	Les Applications industrielles de la cellulase.	23
Tableau 10	Applications industrielles des pectinases	25
Tableau 11	Quelque exemple sur l'origine microbienne de lipase	27
Tableau 12	Propriétés physiques et chimiques des eaux de Hammam Abdallah	31
Tableau 13	Observation macroscopique des dix moisissures isolées sur le milieu PDA.	41
Tableau 14	Étude Microscopique des souches fongiques isolées à partir du sol.	45
Tableau 15	Résultats de l'activité amylolytiques des huit souches sur le milieu Amidon 10%.	51
Tableau 16	Résultats de l'activité cellulolytique des souches fongiques sur le milieu CMC	54
Tableau 17	La mise en évidence l'activité protéolytiques des huit souches sur le milieu lait gélosé	57

Tableau 18	La mise en évidence l'activité pectinolytique des huit souches sur le milieu pectine –agar.	59
Tableau 19	La mise en évidence l'activité lipolytique (lipasique et estérasique) sur les huit souches)	62

Liste des figures

Numéro	Titre	Page
Figure 01	Hyphe Cénocytique (a) et hyphe septé (b).	02
Figure 02	Structures de quelques moisissures	03
Figure 03	Classification des Mycètes (moisissures) dans le monde vivant	04
Figure 04	Image représente des sources thermales	10
Figure 05	Structure dimensionnelle d'hélice (site active d'une lipase). Le feuillet beta en jaune, les hélices alpha en violet, les hélices alpha en bleu, et les motifs 'turn' en bleu ciel.	26
Figure 06	Situation géographique de Hammam Abdallah (Bouhama).	30
Figure 07	Carte géologique de la région de Bouhama (Mammeri M 2017) .	31
Figure 08	Présentation du site d'étude Hammam Abd ALLAH (Bouhamma)	32
Figure 09	Le site d'étude Hammam Beni Guecha	33
Figure 10	Prélèvement de l'échantillon à partir du sol de Hammam AbdAllah(Bouhamma_ Mila	33
Figure 11	Prélèvement de l'échantillon à partir du sol de Hammam Beni Ghuecha	34
Figure 12	Préparation des dilutions	35
Figure 13	Les étapes de d'ensemencement des échantillons.	36
Figure 14	Purification et repiquage des colonies isolées	37
Figure 15	Pourcentages des genres fongiques isolés.	49
Figure 16	Les diamètres des zones d'hydrolyses de l'amidon par les souches fongiques	52
Figure 17	Les diamètres des zones d'hydrolyses la cellulose par les souches fongiques.	55

Figure 18	Les diamètres des zones d'hydrolyse de la caséine par les souches fongiques	58
Figure 19	Diamètre des zones d'hydrolyse de la pectine par les souches ! fongiques	61
Figure 20	Les diamètres des zones d'hydrolyse de Tween 20 % par les souches fongiques.	63
Figure 21	Les Diamètres des zones d'hydrolyse de Tween 80 % par les souches fongiques.	64

Liste des abréviations

PDA	Potato Dextrose Agar
<i>A</i>	<i>Aspergillus</i>
<i>P</i>	<i>Penicillium</i>
<i>Sp</i>	Espèce
CMC	Carboxyméthylcellulose
°C	Degrés Celsius
M	Molaire
PH	Potentiel d'hydrogène
T	Température
EC	Enzyme Commission
PGA	Polygalacturonases
Na Cl	Chlorure de sodium
Φ	Diamètre
PCR	Polymerase Chain reaction
HPLC	Haute performance liquid chromatography
Opt	Optimum

Table des matières

Introduction	1
---------------------------	----------

Partie 01 : synthèse bibliographique

Chapitre 01 : les moisissures

1. Généralités	2
2. Structure des moisissures	2
3. Classification des moisissures.....	3
4. Conditions de développement des moisissures	4
4.1. Facteurs nutritionnels	4
4.1.1. Besoin en carbone	4
4.1.2. Besoin en azote.....	5
4.1.3. Besoin en élément minéraux	5
4.1.4. Besoin en vitamines et facteurs de croissance	5
4.1.5. Teneur en eau du substrat	5
4.2. Facteurs environnementaux	6
4.2.1. Température	6
4.2.2. pH.....	6
4.2.3. Oxygène	6
4.2.4. Lumière	6
4.2.5. Humidité.....	7
4.2.6. Dioxyde de carbone.....	7
5. Reproduction des moisissures	7
5.1. Reproduction sexuée.....	7
5.2. Reproduction asexuée.....	7
6. Intérêt industriel des moisissures.....	8
6.1. Production des enzymes par les moisissures	8
7. Les moisissures thermophiles.....	9
8. Tolérance des moisissures à la haute température.....	11

9. Adaptation physiologique à la thermophile :	11
---	-----------

Chapitre 02 : Les enzymes

1. Définition	12
2. La nomenclature et la classification des enzymes	12
3. Origine des enzymes industrielles	13
4. Enzymes importantes à l'échelle industrielle	15
4.1. Les protéases	15
4.1.1. Définition	15
4.1.2. Les protéases d'origine microbienne	15
4.1.3. Applications industrielles des protéases	16
4.2. Les amylases	17
4.2.1. Définition	17
4.2.2. L' α -amylases d'origine microbienne	18
4.2.3. Applications industrielles des α -amylases	19
4.3. Cellulase	20
4.3.1. Définition	20
4.3.2. La cellulase d'origine microbienne	21
4.3.3. Applications industrielles des cellulases	22
4.4. Pectinase	23
4.4.1. Définition	23
4.4.2. Origine microbienne des pectinases	24
4.4.3. Applications industrielles des enzymes pectinolytiques	24
4.5. Lipase	25
4.5.1. Définition	25
4.5.2. Origine microbienne des lipases	26
4.6. Les estérases	28
4.6.1. Définition	28
4.6.2. Origine microbienne des estérases	29
4.6.3. Applications industrielles des enzymes lipolytiques	29

Partie 02 : Étude expérimentale

Matériel et méthodes

1. Isolement des champignons du sol.....	30
1.1. Les sites d'étude	30
1.1.1. Hammam Abdallah – Bouhamma, Mila.....	30
1.1.2. Hammam Beni Guecha, Ferdjioua (Mila)	32
1.2. Échantillonnage	32
1.3. Le milieu d'isolement	34
1.4. La préparation des dilutions.....	34
1.5. Méthode d'isolement	35
1.6. Ensemencement et incubation	36
1.7. Repiquage et purification des moisissures isolées.....	36
2. Identification des moisissures isolées.....	37
2.1. Identification macroscopique	37
2.2. Identification microscopique	37
3. La mise en évidence de l'activité enzymatique des moisissures isolées	38
3.1. La recherche de l'activité amylolytique des moisissures	38
3.4. La recherche de l'activité cellulolytique	39
3.5. La recherche de l'activité pectinolytique :	39
3.6. La recherche de l'activité lipolytiques	39
3.7. La recherche de l'activité estérasique :	39

Résultats et discussion

1. Isolement des moisissures	41
2. Identification des moisissures.....	41
2.1. Identification macroscopique	41
2.2. Étude microscopique	45
3. Mise en évidence des activités enzymatiques	50
3.1. La recherche de l'activité amylolytique.....	50

3.2. La recherche de l'activité cellulolytique	53
3.4. Recherche de l'activité protéolytique	56
3.5. Recherche de l'activité pectinolytique	59
3.6. Recherche de l'activité lipolytique et estérasique	62
Conclusion.....	56
Références bibliographiques.....	68
Annexes	
Abstract	
المخلص	
Résumé	

Introduction



Introduction

Jusqu'au début des années 1970, on a considéré que les plantes et les animaux étaient les meilleures sources d'enzymes. Cependant, différents microorganismes ont été intensivement utilisés pour la biosynthèse des enzymes hydrolytiques (**Fogarty et Kelly, 1980 ; Nigam et Singh, 1995**).

Parmi ces microorganismes, les moisissures disposent de possibilité d'applications biotechnologiques très étendues par leur capacité à conquérir des substrats naturels grâce à une dissémination efficace, une croissance rapide et un arsenal enzymatique très développé (**Leveau et Bouix, 1993**).

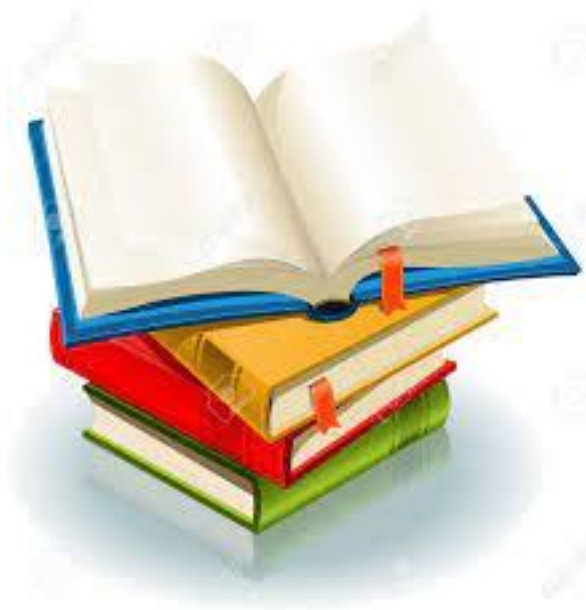
Environ 40% des enzymes industrielles sont d'origine fongique (**Botton et al., 1990**). Appartenant aux enzymes de la famille des hydrolases telles que, l' α -amylase, la cellulase, la protéase, la pectinase, la lipase sont parmi les plus importantes enzymes à l'échelle industrielle, ce qui les rendent l'un des outils-clés des biotechnologies (**Leghlmi H, 2013**).

L'industrie exige l'emploi d'enzymes thermostables qui ont la capacité de supporter des températures élevées. Pour répondre à cette exigence, l'isolement des moisissures de régions chaudes ou zones thermales peut constituer une alternative intéressante permettant d'obtenir des souches productrices de ce type d'enzymes. En effet, plusieurs études ont été réalisées dans ce sens afin de sélectionner des souches révélant une potentialité intéressante (**Bouchet et al., 1999**).

Le présent travail se résume en trois étapes :

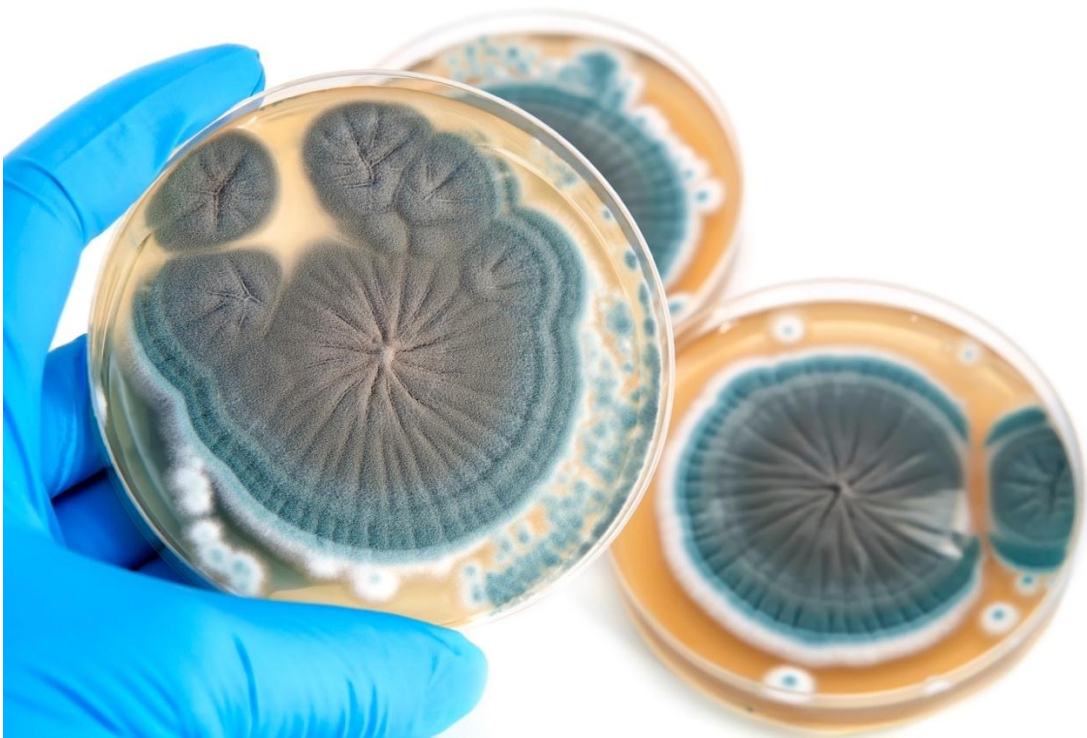
- La première étape consiste à isoler des souches fongiques à partir de deux milieux extrêmes (sol proche des sources thermales : Hammam Abdellah (Bouhamma –Mila) et Hammam Beni Guecha (Ferdjioua_ Mila).
- La deuxième étape est l'identification des différentes souches isolées.
- La troisième étape est la mise en évidence de la production de Six enzymes (Protéase, Amylase, Cellulase, Pectinase, Lipase et Estérase) par ces souches préalablement isolées et identifiées.

Partie 01 :
Synthèse
Bibliographique



Chapitre 01 :

Les moisissures



1. Généralités

Les moisissures sont des champignons filamenteux uni ou multicellulaires (**Guiraud 1998**). Ces microorganismes sont largement répandus dans la nature et peuvent être observés à divers endroits (atmosphère, sol, eau, végétaux et déchets organiques etc.). Et tout particulièrement sur les denrées alimentaires entreposées stockées depuis un certain temps (pain rassis, fromage ou fruit) (**Tabuc 2007 ; Berthier et al., 2002**).

Le terme de moisissure n'a pas réellement de signification systématique et ne représente pas un groupe botanique bien défini. Il désigne l'ensemble des champignons microscopiques qui ont de l'importance dans l'industrie humaine et dans l'environnement, d'action bénéfique ou néfaste (**Leyral et Vierling 2001**).

2. Structure des moisissures

Les moisissures (micromycètes) ne correspondent pas à un groupe systématique homogène mais se situent dans diverses familles de champignons microscopiques. Leur structure de base est le thalle filamenteux qui constitue l'appareil végétatif de ces microorganismes. Il a la forme d'un mycélium constitué d'un amas de filaments enchevêtrés et ramifiés dans tous les sens lors de la croissance, appelé hyphes (**Bourgeois et al., 1996**). Ces derniers peuvent être non cloisonnés (hyphes cenocytiques) dans le cas des phycomycètes ou cloisonnés (hyphes septés) chez les septomycètes (**Leyral et Vierling 2001**) (Figure :01)

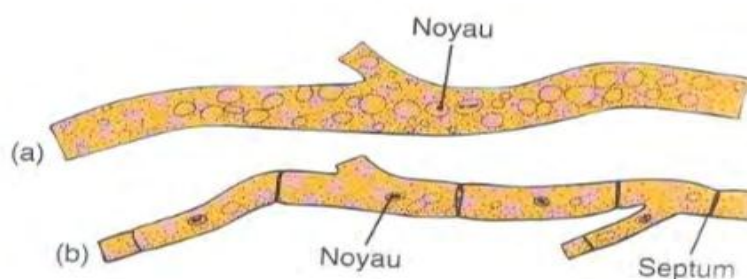


Figure 01 : a) hyphes cenocytiques, b) hyphes cloisonnés (**prescott et al., 2007**)

Le développement des champignons se fait par croissance à des structures plus spécialisées qui produisent des spores asexuées (conidies) ou plus rarement des spores sexuées (**Kendrick, 1999**).

Les cellules de moisissure sont tubulaires formant des filaments. La composition chimique globale est voisine de celle des bactéries (Guiraud,1998). La paroi cellulaire responsable de la forme et riche en cellulose ou en chitine selon le groupe. Le cytoplasme limité par une membrane cytoplasmique contient des ribosomes des mitochondries un réticulum endoplasmique un appareil de Golgi, des lysosomes, des peroxyosomes, des vacuoles etc.) et un ou plusieurs noyaux (Guiraud,1998)

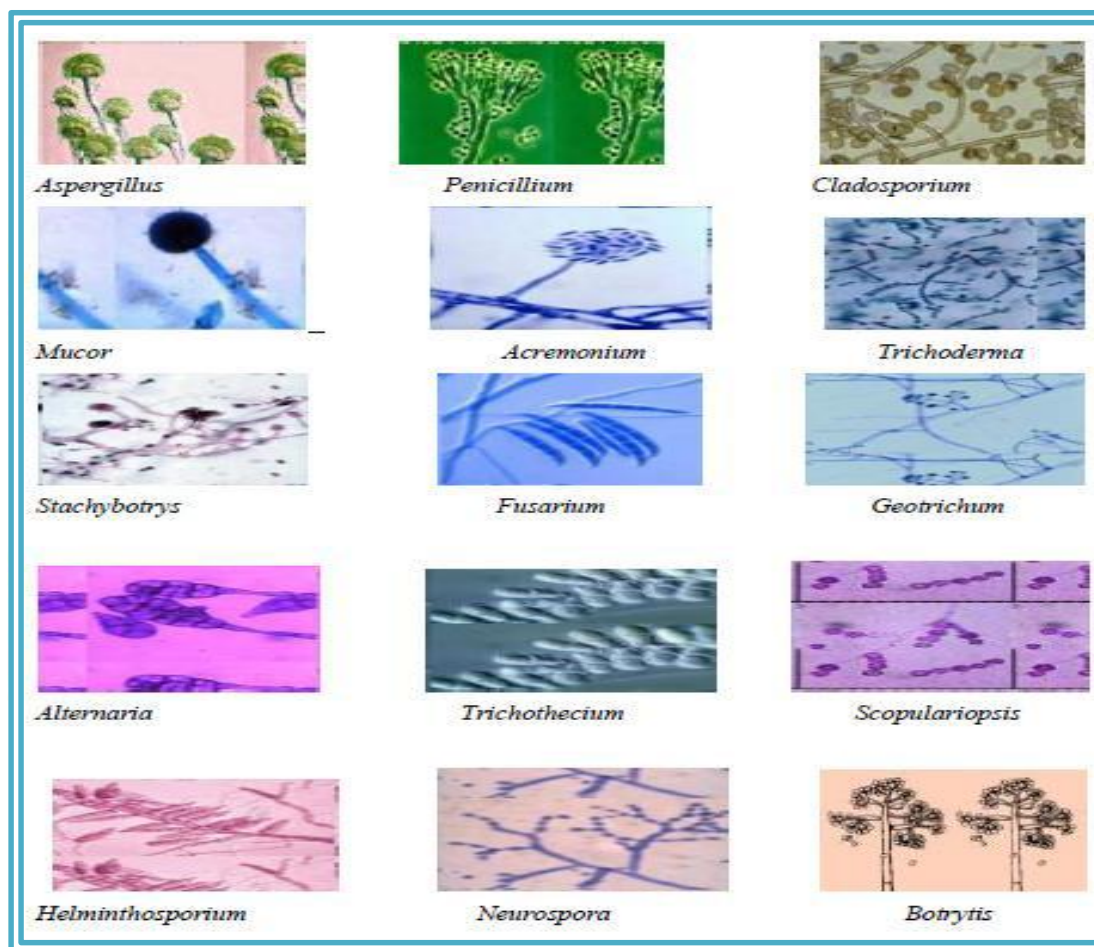


Figure 02 : Structures de quelques moisissures (Dendouga, 2006)

3. Classification des moisissures

La classification fait essentiellement appel aux caractères morphologiques et au mode de reproduction pour définir les grandes classes de moisissures (Heritage *et al.*, 1996 ;Leveau et Bouix 1993). On différencie ainsi quatre subdivisions selon les modalités de reproduction

sexuées les *Mastigomycotina* (*Chytridiomycotina*) les *Zygomycotina*, les *Basidiomycotina* et les *Ascomycotina*.

En outre lorsque la reproduction sexuée n'est pas connue, la subdivision est appelée *Deuteromycotina* (Heritage et al 1996 ; Leveau Bouix 1993). Les *Deuteromycotina* ne sont pas une division véritable mais un groupe dans lequel sont réunis les espèces qui n'ont pas de reproduction sexuée ou que l'on ne connaît pas encore. Le tri est en cours et les organismes qui y sont classés trouvent peu à peu leur place chez les *Basidiomycotina* et les *Ascomycotina* (Figure 03). (Branger et al 2007).

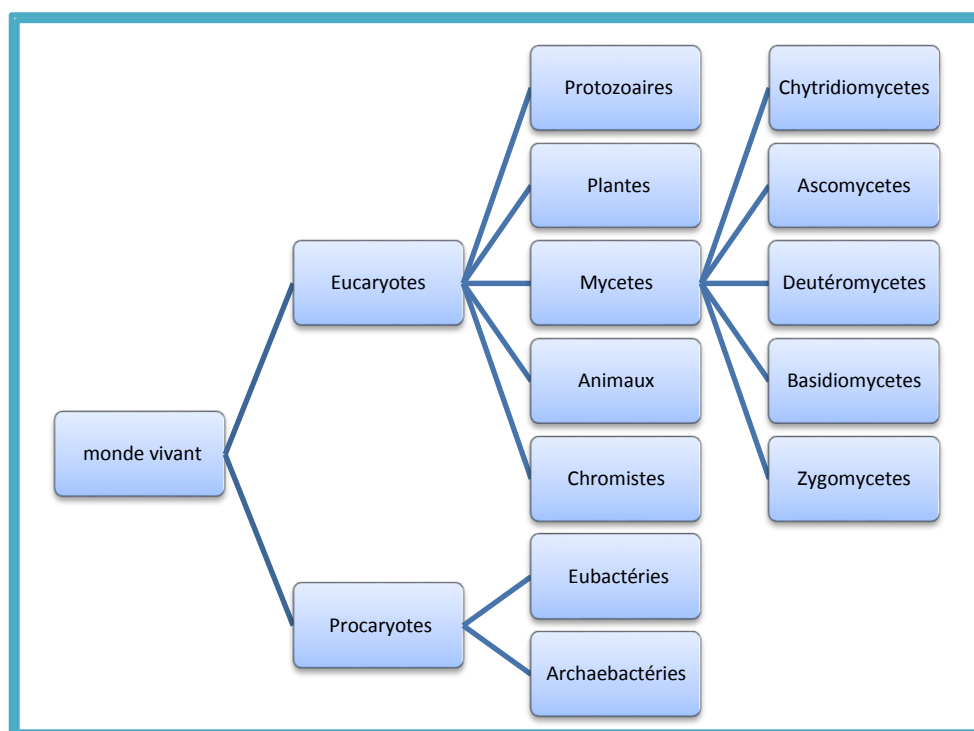


Figure 03 : Classification des Mycètes (moisissures) dans le monde vivant (Blackwell et al., 2012).

4. Conditions de développement des moisissures

4.1. Facteurs nutritionnels

4.1.1. Besoin en carbone

Les moisissures utilisent des substances organiques comme sources de carbone et partie de carbone de l'environnement est de sous forme de polymères complexes tels que la cellulose la chitine et la lignine. Ces polymères doivent être hydrolysés par des enzymes hydrolytiques

libérées par les moisissures pour avoir une forme soluble et diffusible (la paroi cellulaire rigide empêche l'endocytose) (Nicklin *et al.*, 2000).

4.1.2. Besoin en azote

Les moisissures ne peuvent pas fixer l'azote gazeux (Hritage *et al.*, 1996). Cependant la plupart des espèces peuvent assimiler facilement aussi bien l'azote ammoniacal que l'azote nitrique. Certaines sources d'azote organique peuvent aussi être utilisées sous forme d'acide aminés par absorption directe à travers la membrane (Davet et Rouel 1997). Les peptides et les protéines ne sont utilisables qu'après leur dégradation par des protéases fongiques en acides aminés absorbables (Nicklin *et al.*, 2000 ; Hritage *et al.*, 1996)

4.1.3. Besoin en élément minéraux

Les moisissures ont un requis spécifique en éléments traces tels que le soufre le phosphore le magnésium le fer, le cuivre, le manganèse, le zinc, le molybdène, le potassium, le sodium et le calcium qui sont convertis en divers composés après réduction.

Ces traces d'éléments sont nécessaires à la plupart des espèces fongiques pour la production des cytochromes, des pigments, d'acides organiques etc. (Boiron *et al.*, 1996).

4.1.4. Besoin en vitamines et facteurs de croissance

Beaucoup de moisissures exigent diverses vitamines pour leur croissance à de très faibles concentrations. Les besoins les plus communs concernent la thiamine et la biotine intervenant comme coenzyme lors des réactions de carboxylation.

Les facteurs de croissance sont des facteurs indispensables à la nutrition et à la croissance de certains microorganismes tels que les stérols, les acides gras, les purines et les pyrimidines nécessaires en quantité relativement importante. À titre d'exemple les stérols jouent un rôle majeur dans la composition des membranes fongiques et leur perméabilité (Boiron *et al.*, 1996).

4.1.5. Teneur en eau du substrat

La teneur en eau du substrat est un facteur déterminant le développement des moisissures. L'activité de l'eau exprime la teneur en eau libre du substrat et qui est disponible pour la croissance des moisissures. Si elle est maintenue en dessous de 0.65 aucun développement fongique ne sera observé (Roquebert, 1984).

4.2. Facteurs environnementaux

4.2.1. Température

La végétation maximale des moisissures est produite entre 20 et 30°C mais la plupart des moisissures tolèrent généralement une température de 5 à 40 °C elles sont dites donc mésophiles.

Les espèces psychrotolérantes sont capables de se développer à des températures basses et même négative. Les espèces de moisissures incapables de pousser au-dessus de 20 °C sont dites psychrophiles.

Les espèces thermotolérantes poussent à des températures allant jusqu'à 55°C. Celles qui ne poussent pas au moins de 20°C sont dites thermophiles (**Leyral et al., 2001 ; Nicklin et al., 2000, Boiron 1996**).

4.2.2. pH

Les moisissures peuvent se développer dans une large gamme de pH allant de 4.5 à 8 (**Larpen -g et al. ,1992**).

Toute fois les variations de pH peuvent influencer la croissance fongique soit indirectement par action sur la membrane cellulaire séchant que la plupart des moisissures peuvent ajustent le pH du milieu à leur convenance (**Boiron, 1999**).

4.2.3. Oxygène

La quantité d'oxygène mise à la disposition des moisissures est un facteur important de développement. La plupart sont aérobies les plus exigeantes vivent dans les régions périphériques des substrats les moins exigeantes peuvent se développer en profondeur comme *Fusarium oxysporum* et *Aspergillus fumigatus*. Certaines peuvent même supporter une anaérobiose très stricte comme *Neocallimasti* (**Bourgoise et al., 1989, Botton et al.,1990**).

4.2.4. Lumière

Peut influencer favorablement ou défavorablement la croissance et la sporulation de certaines moisissures mais la plupart d'entre elles se développent aussi bien à la lumière que à l'obscurité (**Leveau et bouix 1993**).

Toutefois Boiron (199) signale que la lumière influence la croissance de certaines moisissures soit par destruction photochimique de constituant de milieu soit en agissant directement sur le métabolisme fongique (induction de biosynthèse de pigment caroténoïdes de *Fusarium aqueductum*).

4.2.5. Humidité

Les mycètes ont besoin de l'eau pour extraire les nutriments et sont donc restreints à des environnements assez humides comme les tissus d'un hôte, les sols et leur substances humides (Nicklin *et al.*, 2000).

4.2.6. Dioxyde de carbone

Le dioxyde de carbone est un élément nécessaire intervenant dans l'importante réaction métabolique des moisissures. Cependant certaines espèces sont intoxiquées par des concentrations élevées de dioxyde de carbone alors que d'autre ne peuvent se développer en présence d'une forte concentration de cet élément (Boiron, 1996).

5. Reproduction des moisissures

5.1. Reproduction sexuée

Ce type de reproduction permet la recombinaison des caractères héréditaires. Les cellules jouant le rôle de gamètes se forment à partir des hyphes déjà différenciés. La cellule résultant de la fécondation des gamètes subit des transformations plus ou moins importantes pour donner une spore (Leyral *et al.*, 2001 ; Guiraud, 1998). Les champignons issus de ce type de reproduction sont dits téléomorphes ou parfait (Cahagnier *et al.*, 1998)

5.2. Reproduction asexuée

Certaines moisissures sont le plus souvent ou exclusivement rencontrées à des stades de multiplication asexuée par l'intermédiaire de spores ou de conidies. Ces champignons sont dits Anamorphes ou imparfaits et sont alors classés dans la cinquième subdivision les *Deuteromycotina* (Blackwell *et al.*, 2012).

Les spores d'origine végétative résultent d'une simple mitose elles assurent la reproduction et la dissémination de l'espèce chez les *Deuteromycotina* (appelés également champignons mitosporiques ou conidies) (Prescott *et al.*, 2007 ; Leyral *et al.*, 2001 ; Guiraud 1998).

Lorsque les deux formes de reproduction coexistent les champignons sont dits holomorphes.

6. Intérêt industriel des moisissures

Les moisissures jouent un rôle primordial dans divers domaines d'applications ; elles sont utilisées dans les industries alimentaires, chimiques, la biolixiviation et la biotransformation, etc. Cependant l'industrie n'exploite commercialement qu'un petit nombre de métabolites de quelques espèces seulement (**Boiron et al. ,1996**). Leur intérêt économique repose sur leur activité biologique dans la production d'une grande diversité de molécules produites au cours des métabolismes primaires et secondaires, exploitées en particulier par l'industrie pharmaceutique et en médecine (**Larpend-g et al., 1992**).

6.1. Production des enzymes par les moisissures

Le tableau 01 ci-dessous regroupe quelques enzymes industrielles produites par quelques moisissures :

Tableau 01 : Exemples d'enzymes produites par les moisissures.

Enzymes	Espèces	Références
Protéase	<i>Aspergillus oryzae</i>	(Garcia-Gomez <i>et al.</i> , 2009).
	<i>Aspergillus terreus</i>	(Wu <i>et al.</i> , 2006).
	<i>Aspergillus clavatus</i> ESI	(Hajji <i>et al.</i> , 2007).
	<i>Mucor circinelloides</i>	(Sathya <i>et al.</i> , 2009).
	<i>Conidiobolus coronatus</i>	(Laxman <i>et al.</i> , 2005).
	<i>Penicillium</i> sp.	(Germano <i>et al.</i> , 2003).
	<i>Bauveria felina</i>	(Agrawal <i>et al.</i> , 2005).
Amylase (α-amylase)	<i>Aspergillus oryzae</i>	(Agger <i>et al.</i> , 1998).
	<i>Aspergillus niger</i>	(Botton <i>et al.</i> , 1990 ; Akbache et Bariout, 2007).
	<i>Aspergillus flavus</i> <i>Aspergillus sojae</i>	(Aidoo <i>et al.</i> , 1981 ; Khoo, 1994).
	<i>Rhizopus oryzae</i>	(Lucio <i>et al.</i> , 1996 ; Cuveillier, 1999 ; Akbache et Bariout, 2007).
	<i>Penicillium griseoroseum</i>	(Ray, 2001).
	<i>Penicillium fellutanum</i> <i>Penicillium chrysogenum</i>	(Kathiresan et Mannivanan, 2006 ; Ertan et Balkan, 2007).
	<i>Alternaria alternata</i>	(Lateef <i>et al.</i> , 2004).
Cellulase	<i>Neocallimastix frontalis</i> , <i>Sphaeromonas communis</i> , <i>Piromonas communis</i> , <i>Chytridomycètes</i> <i>Trichoderma viridae</i> ,	(Béguin et Aubert, 1992).

7. Les moisissures thermophiles

La relation des organismes vivants à la température a longtemps été considérée en biologie comme un élément de base de classification. La température joue un rôle majeur dans la croissance, la reproduction et la survie des microorganismes « Champignons ».

Quatre groupes majeurs sont définis selon les températures optimales de croissance : les psychrophiles qui ont une *Topt* de croissance basse, les mésophiles ayant une *Topt* moyenne,

les thermophiles ayant une Température élevée (Tableau : 02) et les hyperthermophiles ayant une T_{opt} très élevée.



Figure 04 : image représente des sources thermales

Tableau 02 : Différents types de champignons et leurs besoins de température (Cooney et Emerson, 1964).

Les catégories de champignons	La température de croissance (°C)	
	Minimal	Maximal
Les champignons thermophiles	20	62
Les champignons mésophiles	20	45
Les champignons psychrophiles	10	15

Les organismes thermophiles (du grec thermê, chaleur et philein, aimer) sont des organismes ayant besoin d'une température élevée pour se développer. Plusieurs définitions ont été proposées pour définir le thermophile. La plus reconnue est celle qui a été proposée par Thomas Brock, le microbiologiste à l'origine de la découverte des micro-organismes thermophiles. Selon cette définition, « un thermophile est un être vivant dont la température optimale de croissance se situe au-dessus de 60 °C ». Une définition plus pratique et plus large a été proposée par Karl Stetter et qualifie d'organismes thermophiles, tous les êtres vivants se développant à des températures supérieures à 45 °C. Cette dernière définition est intéressante car elle définit deux sous catégories au sein des thermophiles :

- Les thermophiles dont la température de croissance se situe au-delà de 45 °C ;

- Les hyper-thermophiles dont la *Topt* de croissance est au-delà de 80 °C (**Madigan et Martinko, 2007 ; Alain et al., 2011**)

8. Tolérance des moisissures à la haute température

Parmi les organismes eucaryotes, seulement quelques espèces de champignons peuvent se développer à des températures situées entre 45 °C et 55 °C (**Cooney et al., 1964**). En effet, les champignons « moisissures » thermophiles ont une température de croissance minimale inférieure à 20°C et maximale supérieure à 50 °C (**Brock, 1995 ; Blochl et al., 1997 ; Maheshwari et al., 2000**).

Par ailleurs, Tansey et Brock (1978) ont répertorié 30 espèces fongiques croît à des températures élevées modérément (60°C à 62°C). En outre, la majorité de moisissures thermophiles appartiennent aux Zygomycètes (*Rhizomucormiehi*, *R.pussillus*), Ascomycètes (*Chaetomium thermophile*, *Thermoascusaurantiacus*, *Dactylomyces thermophilus*, *Melanocarpusalbomyces*, *Talaromyces thermophilus*, *T. emersonii*, *Thielaviaterresteris*), Basidiomycètes (*Phanerochaetchrysosporium*) et Hyphomycètes (*Acremoniumalbambensis*, *A. thermophilum*, *Myceliophthorathermophila*, *Thermomyceslaginosus*, *Seytalidiumthermophilum*, *Malbrancheacimnamonea*) (**Tansey et Brock, 1978; Mouchacca, 1997; 1999**).

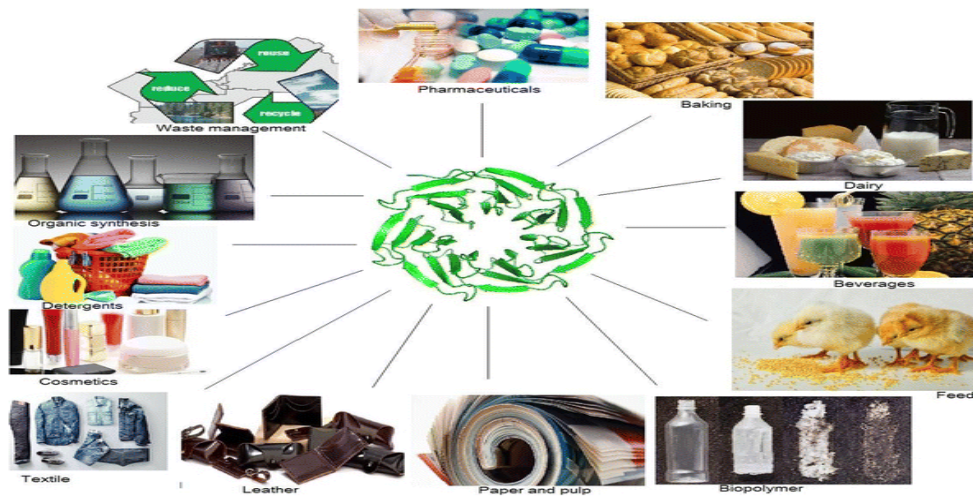
9. Adaptation physiologique à la thermophile :

Les moisissures thermophiles peuvent vivre à des températures élevées grâce à de nombreux mécanismes adaptatifs, notamment:

- ❖ Les protéines résistantes à la chaleur fonctionnent de manière optimale à des températures élevées car chaque protéine adopte sa propre stratégie adaptative.
- ❖ Les protéines se replient de manière compacte en modifiant l'ordre des acides aminés.
- ❖ Nombre accru de grands résidus hydrophobes et les liaisons disulfure.
- ❖ Diminution du nombre de cavités internes de la protéine.
- ❖ Augmentation du nombre de ponts ioniques qui contribuent au maintien de l'assemblage et à la résistance à la déformation.
- ❖ La présence de protéines d'accompagnement qui améliorent la stabilité thermique.
- ❖ Ils ont une structure distinctive et plus robuste qui lui permet de rester stable et pratique à haute température (**Karine Alain et al., 2011**).

Chapitre 02 :

Les enzymes



1. Définition

Les enzymes sont des macromolécules protéiques et des catalyseurs biologiques, sont capable d'accélèrent les réactions chimiques spécifiques qui sont retrouvées dans leur état initiale à l'issus de la réaction catalysée. Les enzymes fonctionnées comme « machines - outils » du métabolisme cellulaire, sont variées selon l'organisme mais présentés et disponible dans toutes les cellules.

Les enzymes jouent un rôle essentiel à la dégradation des nutriments pour fournir l'énergie pour alimenter la motilité cellulaire, (**Peter K ,2015**).

2. La nomenclature et la classification des enzymes

Selon la proposition fait par Emile Duclaux 1898 d'ajout le suffixe « ase » au substrat, cette nomenclature st insuffisante utilisée sauf dans les laboratoires avec le temps et le développement des recherche biologique, elle définit par la commission d'enzyme EC (Enzyme Commission) de l'Union Internationale de Biochimie et de biologie moléculaire (**Demain L et al., 2000**), dans laquelle chaque enzyme porte un nom unique et numéro de code identifie le type de réaction catalysée et le substrat concernée (**Peter K, 2015**), donc à cette découverte l'enzyme devisées en six groupes qui sont représentés dans le (Tableau 03) suivant (**Peter K, 2015 ; Aksas K, 2016**)

Tableau 03 : Les différentes classes d'enzymes

Nom Code	Classe d'enzyme	Profile de la réaction
EC 1	Oxydoréductase	Les enzymes catalysées, les réactions d'oxydation /réductions sont impliquées dans le transfert d'électrons d'une molécule à une autre et avoir élimination de l'hydrogène de tel substrat, les enzymes de cette classe conduit les réactions déshydrogénases comme : laccases, peroxydases. Impliqués dans les processus biologiques.
EC 2	Transférases	Catalyse le transfert de groupe de certains groupes de donneur à l'accepteur, telle que groupe méthyle, groupe glycolyse et groupe aminé, des fois le donneur est un cofacteur, permet les transférases : transaminases, phosphatases, glucokinase

EC 3	Hydrolases	Cette classe d'enzyme hydrolyse ou clivage d'une molécule et fixent les radicaux H et OH de l'eau sur valences libres, les enzymes assurent le clivage des liaisons peptidiques dans les protéines, liaisons glycosidiques dans les carbohydrates, les ester, les liaisons d'acide anhydride, donc les grosses molécules réduit en faibles poids, exemple : lipases, peptidase, estérases et amylases
EC4	Lyase	Ces enzymes sont clivées les liaisons C-C, C-O, C-N, les formations doubles liaisons. Exemple décarboxylase éliminer le CO ₂ , aldolase éliminer l'aldéhyde, déhydratase éliminer l'eau, tryptophane éliminer le synthase.
EC 5	Isomérases	Les enzymes de cette classe catalysent le transfert de groupe d'une position à une autre de la même molécule (intermoléculaire), donc ces enzymes modifient la structure d'un substrat ou l'réarrangement et les positions, les plus connus l'épimerases, isomérases, tautomérases, mutases, cis-trans-isomérase, racémases
EC 6	Ligases	Les enzymes ligases sont relient les molécules avec des liaisons covalentes, et la formation des liaisons C-O, C-C et C-N, cette classe couplées à d'hydrolyse diphosphates ou triphosphates comme ATP, cofacteurs formes d'énergies, exemple : Glutamine synthétase
EC 7	Translocase	Eté confirmé en 2018, ces enzymes catalysent le transfert d'ions ou des molécules aux membranes cellulaires ou leur séparation à l'intérieure des membranes. Que désignée un transfert du "côté 1" vers le "côté 2". Sont des systèmes de sécrétion le plus courant chez les bactéries Gram positives

3. Origine des enzymes industrielles

Les enzymes industrielles peuvent avoir plusieurs origines dont les végétaux, les animaux et les microorganismes (**Scriban, 1993 ; Amaud *et al.*, 1993 ; Rao *et al.*, 1998 ; Meunier, 1999**).

Les microorganismes constituent la principale source d'enzymes industrielles : 50% proviennent des champignons et des levures, 35% des bactéries, alors que 15% sont d'origine végétale ou animale (**Barnabé *et al.*, 2003**). L'extraction à partir des plantes et des animaux est

cependant limitée par de nombreux paramètres difficiles à contrôler. Les principaux avantages des enzymes d'origine microbienne sont les suivants :

- Une production indépendante des contraintes saisonnières et géographiques ;
- Une possibilité d'utilisation de matières premières bon marché ;
- Des rendements de production pouvant être augmentés de façon importante par l'amélioration des souches microbiennes par génie génétique et l'optimisation des conditions de production (**Amaud *et al.*, 1993 ; Scriban, 1993**).

Les enzymes produites par les thermophiles et les hyperthermophiles (bactéries, champignons) sont habituellement thermostables, c'est-à-dire qu'elles sont résistantes à l'inactivation irréversible à des températures élevées. On les appelle thermozymes ou thermoenzymes (**Li *et al.*, 2005**). Les enzymes produites par les mésophiles sont, quant à elles, connues sous le nom de mésozymes. Ces dernières ne sont souvent pas appropriées pour certains procédés industriels qui requièrent des conditions réactionnelles parfois rudes et particulières (température, pH, présence de solvants). Les thermozymes possèdent des avantages biotechnologiques par rapport aux mésozymes. Elles sont plus résistantes que les mésozymes à la dénaturation thermique et chimique (**Zrikus *et al.*, 1998**). Elles sont plus faciles à purifier par traitement à la chaleur (**Li *et al.*, 2005**). En raison de leur thermo stabilité, les réactions catalysées par des thermozymes sont moins susceptibles d'être contaminées par des microorganismes et ont souvent des taux réactionnels plus élevés que les mêmes réactions catalysées par des mésozymes. Ainsi que, le fait d'opérer des procédés à des températures élevées entraîne une diminution de la viscosité du milieu réactionnel en plus d'augmenter la solubilité des substrats (**Bruins *et al.*, 2001**).

Parmi les enzymes actives à des températures élevées d'intérêt industriel, les protéases, les lipases, les estérases, les pectinases et d'autres hydrolases comme les cellulases et les amylases.

4. Enzymes importantes à l'échelle industrielle

4.1. Les protéases

4.1.1. Définition

Les enzymes protéolytiques ou les protéases sont des enzymes qui catalysent l'hydrolyse des protéines, en scindant la liaison peptidique qui relie deux acides aminés dans une chaîne peptidique (**Benedykt et Katarzyana, 2008 ; Mukherjee *et al.*, 2008 ; Reddy *et al.*, 2008**).

Les protéases sont classées en deux groupes, les protéases **extracellulaires** et les **intracellulaires**. Les protéases intracellulaires sont importantes pour une variété de processus cellulaires et métaboliques. Les protéases extracellulaires sont importantes pour l'hydrolyse des protéines dans l'environnement extérieur de la cellule (**Kalisz, 1988**).

Ces dernières sont plus intéressantes à utiliser en industrie, car elles ne nécessitent pas d'étape de lyse cellulaire pour en faire l'extraction. Une centrifugation suffit pour les séparer des cellules (**Rao *et al.*, 1998**). Elles se différencient également selon leur mode d'action en deux groupes, les **endopeptidases** et les **exopeptidases**. Les exopeptidases agissent seulement sur les liaisons peptidiques proches des extrémités de la chaîne peptidique. Par contre, les endopeptidases sont caractérisées par leur action spécifique à l'intérieur de la chaîne peptidique (**Rao *et al.*, 1998**).

4.1.2. Les protéases d'origine microbienne

Les enzymes protéolytiques sont omniprésentes dans tous les organismes vivants vue leur rôle essentiel dans la croissance cellulaire et dans la différenciation (**Gupta *et al.*, 2002 ; Sandhya *et al.*, 2005**). Cependant, la majorité des protéases commercialisées sont d'origine microbienne, elles peuvent être produites par les moisissures, les levures et les bactéries (Tableau 5) car ces enzymes sont plus stables vis-à-vis de la température, du pH et de certains détergents par rapport aux protéases d'origine animale ou végétale (**Beg *et al.*, 2002 ; Nascimento et Martins, 2004**). Beaucoup de travaux de recherche se sont intéressés à la production de protéases à partir de moisissures (**Belmessikh, 2012 ; Benkahoul, 2017**).

Tableau 04 : Exemples des protéases microbiennes (Belmessikh *et al.*, 2011).

Sources	Espèces	Références
Moisissures	<i>Aspergillus oryzae</i> <i>Mucor circinelloides</i> <i>Conidiobolus coronatus</i> <i>Penicillium sp.</i> <i>Aspergillus terreus</i> <i>Bauveria felina</i> <i>Aspergillus clavatus</i> <i>ESI</i>	García-Gómez <i>et al.</i> , 2009 Sathya <i>et al.</i> , 2009 Laxman <i>et al.</i> , 2005 Germano <i>et al.</i> , 2003 Wu <i>et al.</i> , 2006 Agrawal <i>et al.</i> , 2005 Hajji <i>et al.</i> , 2007
Levures	<i>Aureobasidium pullulans</i> <i>Candida lipolytica</i>	Chi <i>et al.</i> , 2007 Tobe <i>et al.</i> , 1976
Bactéries	<i>Bacillus licheniformis</i> <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> <i>Bacillus subtilis</i> <i>Bacillus sp.</i> <i>Virgibacillus sp.</i> <i>SK33</i> <i>Synergistes sp</i>	Ferrero <i>et al.</i> , 1996 George <i>et al.</i> , 1995 Soares <i>et al.</i> , 2005 Patel <i>et al.</i> , 2005 Sinsuwan <i>et al.</i> , 2008 Kumar <i>et al.</i> , 2008)
Actinomycètes	<i>Streptomyces sp.</i> <i>Nocardiopsis alkaliphila sp</i>	Mehta <i>et al.</i> , 2006 Hozzein <i>et al.</i> , 2004

4.1.3. Applications industrielles des protéases

Les protéases sont les plus employées par rapport aux autres enzymes utilisées en biotechnologie (Antranikian, 2009), elles sont très recherchées dans la bio-industrie et l'agro-alimentaire. Elles représentent environ 65% (50 et 60 milliards d'euros par an) des ventes d'enzymes industrielles dans le marché mondial (Sahoo *et al.*, 2012). Elles sont utilisées comme additives dans : les détergents de blanchisserie, la transformation des produits alimentaires, l'industrie pharmaceutique, la tannerie et dans la gestion des déchets (Tableau 05) (Amoozgar *et al.*, 2007 ; Karbalaie-Heidari *et al.*, 2009).

Tableau 05 : Quelques protéases fongiques et leurs applications industrielles.

Genre	Espèce	Type d'enzyme	Applications industrielles	Références
<i>Aspergillus</i>	<i>niger</i>	p.ac	aide digestive, préparation des souces de soja et	Jernejc et Cimerman(2001). Rugsaseel et <i>al.</i> , (1995). Davidson et <i>al.</i> , (1975). Haussnert et <i>al.</i> , (1996). Dahot (1987) Jernejc et Cimerman (2001) // Dahot, 1987 Botton et <i>al.</i> , (1990)
	<i>oryzae</i>	p.ac, p.n et p.al	panification attendrissage	
	<i>melleus</i>	p.al	des viandes, aide digestive, détergents, brasserie détergents pour lessives	
	<i>candidus</i>	//	//	
	<i>flavus</i>	//	clinique	
	<i>saitoi</i>	p.ac	Affinage des fromages	
	<i>parasiticus</i>	p.al	détergents pour lessives	
	<i>sojae</i>	p.al	préparation des souces de soja	
<i>Endothia</i>	<i>parasitica</i>	p.ac	Coagulation du lait et l'affinage des fromages	Durand et Monson (1982)
<i>Fusarium</i>	<i>culmorum</i>	p.ac	Médicale (phytopathologie)	Urbanek et Yirdaw (1984) Pekkarinen et <i>al.</i> , (2002)
		p.al	Hydrolyse des protéines céréales	
<i>Geotrichum</i>	<i>candidum</i>	p.n	Affinage des fromages	Boiron (1996)
<i>Mucor</i>	<i>bacilliformis</i>	p.ac	Coagulation du lait	Fernandez-Lahore et <i>al.</i> , (1998)
	<i>miehei</i> <i>pusillus</i>			Durand et Monson (1982)
<i>Penicillium</i>	<i>camemberti</i>	p.ac, p.n et p.al	Industrie laitière (affinage des fromages et la coagulation du lait)	Auberger et <i>al.</i> , (1985) Dahot(1987); Dai et <i>al.</i> , (2004).Modler et <i>al.</i> , (1974).Sodek et Hofmann (1970)
	<i>expansum</i>	p.ac p.ac, p.n et		
	<i>requaforti</i>	p.al		
	<i>tanthinellum</i>	p.ac		

4.2. Les amylases

4.2.1. Définition

L'amylase est une enzyme hydrolysant l'amidon (**Ross, 1976**). Elle est constituée d'une α amylase et d'une β -amylase (**Thoma et al., 1971**). Il est bien établi que les α -amylases sont synthétisées par les plantes, les animaux et les micro-organismes, tandis que, les β -amylases sont principalement synthétisées par les plantes (**Pazur, 1965 ; Thoma et al., 1971**). Plusieurs autres enzymes sont induites en présence de l'amidon, mais ce sont les α -

amylases qui dégradent l'amidon en glucose et/ou oligosaccharides, alors que les β -amylases obtiennent du maltose (**Thoma et al., 1971**).

Les amylases sont classées en deux catégories, endoamylases et exoamylases. Les endoamylases catalysent l'hydrolyse à l'intérieur de la molécule d'amidon d'une manière aléatoire. Cette action provoque la formation d'oligosaccharides linéaires et ramifiés de diverses longueurs de chaîne. Les exoamylases hydrolysent l'extrémité non réductrice, pour donner successivement des produits finaux plus courts (**Gupta et al., 2003**).

4.2.2. L' α -amylases d'origine microbienne

Les amylases proviennent de différentes sources (plantes, animaux et microorganismes). Aux cours de la dernière décennie. Des recherches considérables ont été entreprises avec l' α amylase extracellulaire étant produite par une grande variété de micro-organismes (**Lonsane et al., 1990**).

L'avantage majeur de l'utilisation des microorganismes pour la production des amylases est la capacité de produire à grande échelle ainsi que, la facilité de manipulation pour obtenir des enzymes avec des caractéristiques souhaitées (**Lonsane et al., 1990**).

Les principaux microorganismes producteurs de l' α -amylases sont consignés dans le (Tableau 06)

Tableau 06 : Les principaux microorganismes producteurs de l' α -amylases.

Microorganismes	Espèces	Références
Moisissures	<i>Penicillium fellutanam</i>	Kathiresan et Mannivanan (2006); Ertan et Balkan (2007).
	<i>Penicillium chrysogenum</i>	
	<i>Rhizopus oryzae</i>	Akbache et Bariout (2007); Mama (2009); Açourène et Ammouche (2011).
	<i>Aspergillus niger</i>	
	<i>Alternaria Alternata</i>	Lateef et al., (2004).
Levures	<i>Candida guilliermondii</i>	Akbache et Bariout (2007); Mama (2009); Açourène et Ammouche (2011).
	<i>Candida tropicalis</i>	
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Tamura (1993).
Bactérie	<i>Bacillus licheniformis</i>	Lies et al., (2000).
	<i>Bacillus subtilis</i>	
	<i>Lanugilnosus thermomyces</i>	
	<i>Lactobacillus casie</i>	
	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	

4.2.3. Applications industrielles des α -amylases

Les amylases sont parmi les enzymes les plus importantes en biotechnologie (**Gupta et al., 2003**). Elles représentent environ 25 à 33% du marché mondial des enzymes (**Saxena et al., 2008**).

L' α amylase microbiennes sont parmi les enzymes les plus utilisés dans les procédés industriels. En effet, les amylases possèdent une gamme étendue d'applications tels que les industries de la saccharification d'amidon, le textile, les aliments, la boulangerie, le brassage et la distillation (**Gupta et al., 2003**). En raison de l'importance industrielle de cette enzyme, un intérêt est porté à l'isolement de nouvelles amylases appropriées à des applications industrielles nouvelles (**Burhan et al., 2003**). (Tableau 07)

Tableau 07 : Applications industrielles de L'α amylase

Industries	Applications	Référence
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 amylacés 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.	Sicard, (1983)
Industrie textile	Le désencollage textile, qui permet d'éliminer la colle d'amidon qui enduit les fibres et les protège au cours du tissage.	
Papeterie	Liquéfaction de l'amidon pour préparer des sauces de couchage, permettant d'éliminer les irrégularités superficielles de la feuille.	
Détergents	Dégradation des taches à base d'amidon. Les oligosaccharides et les dextrines libérés de l'action hydrolytique sont solubles, par conséquent, la tache est physiquement découpée.	Igarashi <i>et al.</i> , (1998) Nielsen <i>et</i> Borchet, (2000).
Industrie pharmaceutique	-Agent anti-inflammatoire. -Un aide digestif (contre les dyspepsies et les fermentations intestinales).	Nielsen <i>et</i> Borchet, (2000).

4.3. Cellulase

4.3.1. Définition

Les cellulases [1,4-(1,3 ; 1,4) -β-D-Glucanohydrolase] se rapportent à un groupe d'enzymes qui, agissant ensemble, hydrolysent la cellulose en sucres simples (**Kader *et al.*, 1999 ; Korish, 2003**). Elle est l'une des principaux membres de la famille des glycosides hydrolases. C'est un système enzymatique complexe, composé de trois types principaux d'enzymes : Endo β (1-4) -glucanase ou endocellulase (EC 3.2.1.4), Exo β (1-4) - glucanase ou cellobiohydrolase (EC 3.2.1.91), β (1-4) -glucosidase ou cellobiase (EC 3.2.1.21) (**Xu, *et al.*, 2002**).

A. Endo-cellulase (EC 3.2.1.4) : Elle casse les liaisons internes pour perturber la structure cristalline de la cellulose et pour exposer différentes chaînes de polysaccharide de

cellulose, en diminuant rapidement le degré de polymérisation du substrat. Les endoglucanases coupent la cellulose aléatoirement au niveau des zones amorphes de la cellulose, générant de nouvelles extrémités de chaînes. (Xu *et al.*, 2000).

B. L'exoglucanase (EC 3.2.1.91) : Elle attaque les liaisons β (1-4) glycosidiques des chaînes de cellulose par les extrémités non réductrices et libère exclusivement du cellobiose (Xu, *et al.*, 2002).

C. La cellobiase (EC 3.2.1.21) : Elle hydrolyse les liaisons β (1-4) glycosidiques de la cellobiose, pour donner deux molécules de glucose (Onsori H *et al.*, 2005).

4.3.2. La cellulase d'origine microbienne

Les bactéries et les moisissures utilisent la cellulose pour la production de quantités substantielles d'enzymes extracellulaires qui sont alors facilement récupérées du milieu de culture après fermentation, bien que ces enzymes, peuvent être présentes sur la surface des cellules (Beerman, et Rapp 1991).

Les cellulases sont principalement produites par les champignons dont les moisissures, les bactéries et autres organismes cellulolytiques (Beguín et Aubert, 1994 ; Kader, 1999 ; Korish, 2003). La majorité des cellulases microbiennes étudiées sont des glycoprotéines, avec un taux élevé en acides aminés acides (Beldman *et al.*, 1985) et ne sont pas des métalloprotéines (Saha *et al.*, 1994). Elles ont généralement une structure modulaire avec deux domaines fonctionnels distincts : le site catalytique et le site de fixation du substrat, habituellement reliés entre eux par un peptide glycosylé flexible riche en sérine, proline et thréonine appelé « linker » (Hasper *et al.*, 2002 ; Receveur *et al.*, 2002).

Les principaux microorganismes producteurs de la cellulase sont consignés dans le (tableau 08) (Debbie M *et al.*, 1992 ; Katoch Meenu *et al.*, 2014),

Tableau 08 : Les principaux microorganismes producteurs de la cellulase

Microorganismes	Espèces
Moisissures	<i>Neocallimastix frontalis</i> , <i>Sphaeromonas communis</i> , <i>Piromonas communis</i> , <i>Chytridomycètes</i> , <i>Trichoderma viridae</i> , <i>T. reesei</i> , <i>T. koningii</i> , <i>Aspergillus aculeatus</i> , <i>A.nidulans</i> , <i>A. oryzae</i> , <i>A. niger</i> , <i>A. terreus</i> , <i>Fusarium solani</i> , <i>Sporotrichumpulver lentum</i> , <i>Chaetomium cellulolyticum</i> , <i>Humicolain solens</i>
Levures	<i>Candida molischiana</i> , <i>C. pulcherrima</i> , <i>C. stellata</i> , <i>C. wickerhamii</i> , <i>Cryptococcus flavus</i> , <i>Kloeckera apiculata</i> , <i>Kluyveromyces lactis</i> , <i>Rhodotorulaglu</i> , <i>Saccharomyces fibuligeratinis</i> , <i>Trichosporon cutanum</i>
Bactéries	Aérobies : <i>Sporocytophaga</i>, <i>Myxococcoides</i>, <i>Baccillussubtilis</i>, <i>Cellulomonas</i> et <i>Pseudomonas</i> Anaérobies strictes : <i>Clostridium thermocellum</i>, <i>C. stercorarium</i>, <i>Ruminococcus albus</i>, <i>R. flavefasciens</i>, <i>Bactéroï des succinogenes</i> Anaérobies facultatives : <i>Erwinia chrysantharum</i> Anaérobies strictes: <i>Clostridium thermocellum</i>, <i>C. stercorarium</i>, <i>Ruminococcus albus</i>, <i>R. flavefasciens</i> et <i>Bactéroï des succinogenes</i>

4.3.3. Applications industrielles des cellulases

La biotechnologie des cellulases a débuté vers les années 1980 dans l'alimentation animale (Chesson, 1987) et ensuite dans l'industrie du textile, de la lessive et du papier.

Actuellement, elle occupe environ 20 % du marché mondial des enzymes (Bhat, 2000, Lekchiri *et al.*, 2006). Les performances élevées atteintes leurs ouvrent des perspectives intéressantes pour différentes applications industrielles (Scriban, 1993), dans les industries de transformation de l'amidon, de brasserie, l'extraction de jus de fruits et légumes (Gao *et al.*,2008). L'une des applications potentielles des cellulases est la production d'éthanol-carburant à partir de la biomasse lignocellulosique (Tableau 09).

Tableau 09 : Les Applications industrielles de la cellulase.

Industries	Applications
Alimentaires	Les cellulases sont utilisées pour faciliter la filtration de diverses suspensions, riches en fibres cellulosiques (Scriban, 1993). Des traitements de différents produits pour améliorer leurs qualités, où les cellulases sont utilisées sous forme de mélange d'enzymes.
des textiles et des détergents	Elles sont utilisées au cours de la finition, pour donner l'aspect aux vêtements en jean après lavage et améliorer l'apparence des tissus par élimination des tâches (Gusakov <i>et al.</i> , 2007). Elles sont utilisées aussi dans les lessives afin d'améliorer l'apparence et la brillance des couleurs (Maurer, 1997 ; Cavako-Paulo, 1998).
Papeterie	Dans la fabrication des pâtes à papier, l'addition de cellulases, aux suspensions de pâtes en cours de lavage et surtout aux suspensions de pâtes de papier de recyclage, améliore significativement leur filtrabilité et conduit à des économies importantes de consommation d'eau (Scriban, 1993).
Nutrition animale	utilisées comme additifs dans l'alimentation animale car l'addition des cellulases, aux aliments pour porcs, améliore leur digestibilité, ce qui réduit l'excrétion de cellulose non digérée (et donc diminue la charge polluante des excréments) (Scriban, 1993 ; Gusakov <i>et al.</i> , 2000)
Thérapeutique	L'utilisation quasi confidentielle de certaines cellulases dans des formules médicamenteuses à vocation d'aide digestive (Odier et Rouau, 1985 ; Scriban, 1993).

4.4. Pectinase

4.4.1. Définition

Les enzymes pectinolytiques ou pectinases sont des enzymes qui se caractérisent par leurs pouvoir de dégrader la pectine (**Martinez-Trujillo *et al.*, 2011**). Elles forment un groupe unique, complexe et hétérogène de différentes enzymes agissant spécifiquement sur les substrats pectinolytiques, notamment les polymères de pectine. Ces dernières représentent le polysaccharide majeur de la paroi cellulaire primaire et la lamelle moyenne de la paroi végétale (**Tatianadacosta et Flevo, 2005**)

Les pectinases peuvent être classées en se basant sur la nature du substrat (pectine, acide pectique et oligogalacturonate), le mécanisme de dégradation (trans-élimination ou hydrolyse) et le type de clivage (endo ou exo) (**Favela-Torres et al., 2006**)

4.4.2. Origine microbienne des pectinases

La plupart des préparations commerciales de pectinases sont d'origine microbienne notamment fongique. Cependant, l'espèce *Aspergillus niger* est la source fongique la plus communément utilisée pour la production industrielle d'enzymes pectinolytiques (**Jayani et al., 2005 ; Dinu et al., 2007**).

4.4.3. Applications industrielles des enzymes pectinolytiques

Les pectinases microbiennes représentent 25% des ventes mondiales d'enzymes alimentaires (**Jayani et al., 2005**). Dans les industries agroalimentaires, elles sont utilisées en association avec les amylases pour clarifier les jus et réduire ainsi le temps de filtration de 50% (**Saxena et al., 2008**), elles sont utilisées également comme complément alimentaire dans l'alimentation animale (**Rodriguez-Fernández et al., 2011**). Les pectinases peuvent être utilisées dans divers domaines tels que, le textile, l'industries du papier, la fermentation du cacao, la confection et la maturité du thé, l'extraction des pulpes à partir des fruits et des légumes, ainsi que le traitement des eaux usées (**Zeni1 et al., 2015**). (Tableau 10)

Tableau 10 : Applications industrielles des pectinases

Application	Le but
Stabilisation des troubles	Pour précipiter la matière hydrocolloïde présent dans les jus de fruits (Samanta S ,2020)
Clarification du jus de fruit	Dégradation des substances formant un nuage pectique, par conséquence, le jus peut être facilement filtré et traité. (Maria G et al.,2021)
Macération	Pour décomposer les tissus des légumes et les fruites pour donner des produits pulpeux utilisés comme matériau de base pour les jus, nectar comme dans le cas d'aliments pour bébés, pudding et yaourt. (Samanta S ,2020)
Extraction de jus et d'huile	Pour surmonter la difficulté de pressage pilpe de fruit pour donner du jus et de l'huile. (Mwaurah P.W et al., 2020)
Liquéfaction	Pour décomposer les glucides végétaux fermentescibles en sucres simples par des enzymes. (Pasha et al., 2013)
Rouissage des cultures à fibres	Pour libérer les fibres des cultures en fermentant avec des microorganismes qui dégradent la pectine (Kaur et al., 2004)
Traitement des eaux usées	Pour dégradées les substances pectiques dans les eaux usées des industries de transformation des agrumes. (Hooondal et al., 2002)
Fermentation du café et du thé	Pour éliminer la couche de mucilage du grain de café, et améliorer la fermentation du thé et la propriété de formation de mousse du thé. (Samanta S et al., 2020)
Préservation du bois	Pour éviter l'infection du bois en augmentant la perméabilité des conserveurs de bois (Kaur et al., 2004)

4.5. Lipase

4 .5.1. Définition

Les lipases (Triacylglycerol acylhydrolases EC3.1.1.3) appartiennent à une classe d'hydrolases spécifiques à l'hydrolyse des graisses en acides gras et du glycérol à l'interface eau-lipides. Ils sont également capables d'inverser la réaction dans les milieux non aqueux et

ils sont abondamment présents dans la nature (**Singh et al., 2017**). Claude Bernard, 1856, dans le jus pancréatique, a déterminé que la lipase était une enzyme qui hydrolysait les gouttelettes d'huile insoluble et les transformait en produits solubles. (**Sangeetha et al., 2010**).

La structure des lipases a été déterminée par cristallogénèse et diffraction des rayons x (**Najjar, 2010**). Toutes les lipases connues à ce jour présentent une organisation tridimensionnelle commune composée d'un feuillet bêta centrale formée de huit brins parallèles connectés entre eux par des hélices alpha (Figure 04) (**Najjar, 2010**).

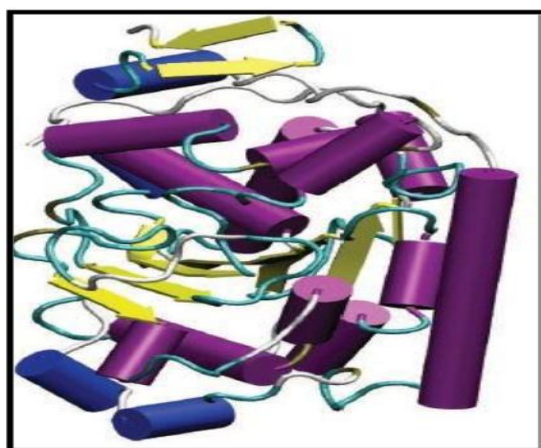


Figure 05 : Structure dimensionnelle d'hélice (site active d'une lipase). le feuillet beta en jaune, les hélices alpha en violet, les hélices alpha en bleu, et les motifs 'turn' en bleu ciel (**Chaput, 2012**).

D'un point de vue biochimique, une lipase est obligatoirement une estérase, mais l'inverse n'est pas vrai puisqu'il existe de nombreuses estérases non lipolytiques (**Zallot, 2011**).

4.5.2. Origine microbienne des lipases

De nombreux genres des microorganismes sont capables de produire de la lipase, et bon nombre d'entre eux sont associés à des bactéries, des actinomycètes, des champignons, les moisissures et les levures. Les lipases produites à partir de ces origines microbiennes sont plutôt diverses et diffèrent normalement les unes des autres en termes de caractéristiques physicochimiques et biologiques. L'intérêt des lipases microbiennes n'a cessé de s'accroître au cours de ces dernières années principalement en raison du grand nombre d'application qu'elles offrent dans les domaines très variées (**Rihani, 2012**).

La production de lipase par les champignons varie et dépend du type de la souche, des ingrédients du milieu de production, des sources de carbone et d'azote et des conditions de

culture telles que la température, le pH, l'aération. *Mucor* est connu pour sa thermostabilité et sa résistance aux conditions alcalines élevées (**Cihangir et Sarikaya, 2004**).

Quelques exemples de microorganismes lipolytiques sont rassemblés et regroupés dans le (Tableau 11).

Tableau 11 : Quelques exemples sur l'origine microbienne de lipase.

Microorganismes	Genres	espèces	références
moisissures	Rhizopus	<i>R. arrhizus</i>	Rajendran and Thangavelu, 2009
		<i>R. chinensis</i>	Wang et al., 2008
		<i>R. oryzae</i>	Hiol et al. 2000
		<i>R. oligosporus</i>	Ifikhar et al., 2010
	Aspergillus	<i>A. flavus</i>	Pera et al., 2006
		<i>A. oryzae</i>	Zhou et al., 2012
		<i>A. niger</i>	Toscano et al., 2011
		<i>A. fumigatus</i>	Shangguan et al., 2011
		<i>A. terreus</i>	Sethi et al., 2016
		<i>A. nidulans</i>	Niaz et al., 2014, Mayordomo et al., 2004
		<i>A. melleus</i>	Amin et al., 2014
		<i>A. carbonarius</i>	Ire and Ike, 2014
	Penicillium	<i>Pe. citrinum</i>	D'Annibale et al., 2006
		<i>Pe. caseicolum</i>	Lamberet, Lenoir, 1972
		<i>Pe. camambertii</i>	Tan et al. 2004
		<i>Pe. chrysogenum</i>	Bancerz et al. 2005
		<i>Pe. Wortmanii</i>	Costa and Peralta, 1999
		<i>Pe. cyclopium</i>	Chahinian et al., 2000

4.6. Les estérases

4.6.1. Définition

Les estérases (E C 3.1.1.1) sont des lipases qui hydrolysent les solutions d'esters de chaîne acyl courte soluble dans l'eau, elles sont inactives contre les triacylglycérols à longue chaîne insoluble dans l'eau (**Chahinian et Sarda, 2009**). Elles sont localisées dans le réticulum endoplasmique, le cytosol de différents tissus et abondantes dans le foie. Elles manifestent une large spécificité en substrat tels que amides, esters, thioesters, hydrolysent un grand nombre de composés de différentes structures et jouent un rôle très important dans l'élimination des produits toxiques et xénobiotiques (**Gilham et Lehner, 2005**).

4.6.2. Origine microbienne des estérases

Les estérases sont produites par un ensemble des microorganismes, tels que *Streptomyces sp.* (Nishimura et Inouye, 2000), *Pseudomonas sp.* (Prim et al., 2006 ; Tserovska et al., 2006), *B sp.* (Ding et al., 2014 ; Metin et al., 2006), *Lactobacillus sp.* (Choi et Lee, 2001), *Micrococcus sp.* (Fernández et al., 2004), *Ophistoma sp.* (CaleroRueda et al., 2002), *Penicillium sp.* (Horne et al., 2002), *Aspergillus sp.* (Giuliani et al., 2001), *Humicola sp.* (Hatzakis et al., 2003), *Saccharomyces sp.* (Lomolino et al., 2003), *Candida sp.* (Ghosh et al., 1991).

4.6.3. Applications industrielles des enzymes lipolytiques

Les lipases sont souvent perçues comme une des plus importantes classes d'enzymes pour le monde industriel, cet intérêt provient principalement du fait que les lipases possèdent des propriétés catalytiques atypique d'une part, et que d'autre part les technologies à mettre en œuvre par les produits relativement simple ; leur domaine d'application sont donc très vastes et variés. (Rihani, 2012).

4.6.3.1. Application dans les détergents

L'utilisation des lipases dans les détergents est le champ d'application le plus important de ces enzymes. La lipase produite par *Pseudomonas mendocina* appelée 'lumafast' possède un large spectre de substrat et elle est capable de tolérer les conditions de lavage, telle que les valeurs de pH 10 et 11, température de 30 à 60°C ; une fois que les lipides sont partiellement ou totalement hydrolysée par l'enzyme, ils deviennent plus faciles à extraire du tissu lavé (Najjar, 2010).

4.6.3.2. Application dans l'industrie alimentaire

Un grand nombre d'applications hydrolytique additionnelle ont été décrites pour les lipases microbiennes y compris le développement de stem pour les produits laitiers (fromage, beurre, margarine, boissons alcooliques), réalisé par l'hydrolyse sélective de gros triglycérides pour libérer des acides gras, ceux-ci peuvent agir en tant que saveurs ou précurseurs de saveur, dans l'industrie agro-alimentaire. Les lipases sont couramment utilisées en boulangerie, en biscuiterie, en chocolaterie (Boukaa, 2015). Elles ont aussi une application dans le domaine de développement des arômes par les lipases exogènes (lipase pré gastrique ou microbienne), comme les lipases de *Candida antarctica* et de *Rhizomucor miehei* synthétise des arômes par réaction de transestérification comme pour le 3,7-diméthyl-4,7 octadien-1-ol qui présente un

arôme de Rose (**Fickers et al., 2008**). Les lipases sont aussi utilisées dans le secteur des farines de blé pour renforcer les pâtes et dans le beurre de cacao (**Jaeger et al., 1994 ; Jeager et Reetz, 1998 ; Sherma et al., 2001**).

4.6.3.3. Application en l'oléo-chimie

La transformation des corps gras est encore majoritairement réalisée par des procédés chimiques consommant beaucoup d'énergie (**Vulfson, 1994**). Ce qui a conduit à de nombreux procédés utilisant des lipases qui ont été développés pour pouvoir travailler dans des conditions moins drastiques et plus spécifique en utilisant par exemple la lipase produite par *Candida rugosa* (**Najjar, 2010**).

4.6.3.4. Application dans l'industrie du papier

A l'heure actuelle le premier ennemi dans l'industrie est la poix, mélange mou et collant à base de résine et de goudron végétale, qui nuit à la qualité du papier ; le développement d'un procédé d'hydrolyse de ces esters par additions de lipases, comme le cas de la lipase de *B. subtilus*, limite le problème posé ce qui constitue un moyen facile et efficace pour le contrôle de la poix et donc pour améliorer la qualité du papier (**Najjar, 2010**).

4.6.3.5. Application dans l'environnement

Les lipases sont également utilisées en environnement dans le domaine de la bioremédiation qui est devenue la méthode la plus utilisée pour restaurer des environnements pollués à l'exemple de lipases végétales utilisées contre les effluents des industries agroalimentaire riche en lipides et en graisses ; ces dernières entraînent le colmatage des canalisations. Les lipases sont également utilisées lors de traitement de sols contaminés par des hydrocarbures (**Boukaa, 2015**).

Partie : 02

Étude expérimentale



Matériel et méthodes



b) Conditions géologiques

La source thermale émerge à l'intersection d'une faille de direction NNE –SSW qui met en contact les calcaires albiens et les marnes sénoniennes avec une faille probable de direction E-W), (Figure), (Mammeri M 2017).

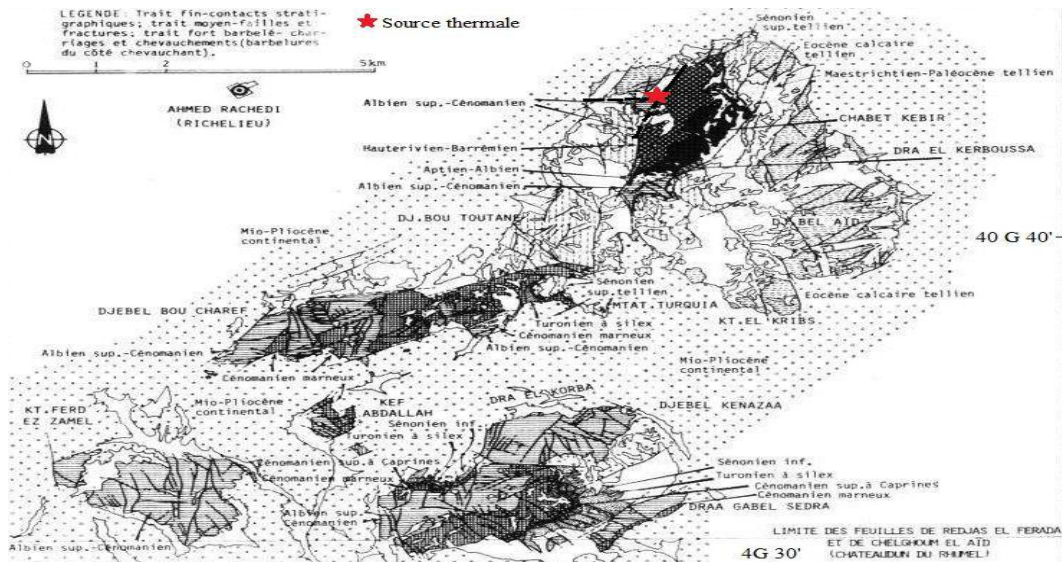


Figure 07 : Carte géologique de la région de Bouhama (Mammeri M 2017).

c) Propriétés physico-chimiques des eaux

Les différentes propriétés physico-chimiques des eaux sont rapportées dans le (tableau 12)

Tableau 12 : propriétés physiques et chimiques des eaux de Hammam Abdallah (Mammeri Madiha, 2017)

Propriétés physiques et chimiques de la région	Valeurs
Température	42 et 43 °C
PH	6,7 et 6.8
La conductivité	3595,25 et 3706,29
Minéralisation	2750,93 et 2836,66 mg/l
Strontium _ Fluor _ ammonium _ le brome _ le lithium_ le bore _ l'iode	9,6 mg/l_ 2,7mg/l _ 1,22mg/l _ 0,95mg/l_0,62mg/l_0,5mg/_0,17mg/l
SO ₄ ⁻ > CL> HCO ₃ Ca ²⁺ > Na ⁺ >MG ²⁺	%

1.1.2. Hammam Beni Guecha, Ferdjioua (Mila)

a) Localisation géographique

Hammam Beni Guecha est situé sur la route reliant Mila à Ferdjioua), Commune de Yahia Beni Guecha, daïra de Ferdjioua, (Nord Est Mila), se caractérise par :

- **Altitude** : 656.00m, Latitude : 36.39 Nord, longitude 5.99 East
- **Le Climat** méditerranéen avec été chaud est le climat principal du Daïra de Ferdjioua.
- La température maximale à Mila est en moyenne de 23°C sur l'année (<https://www.ou-et-quand.net/partir/quand/afrique/algerie/mila/>) 36°24'30.24

1.2. Échantillonnage

Pour le prélèvement de l'échantillon nous avons choisis le sol proche d'eau thermal, à partir les deux sites (Figures 08 et 09).



Figure 08 : Présentation du site d'étude Hammam AbdALLAH (Bouhamma)



Figure 09 : Le site d'étude Hammam Beni Guecha

Les gros débris sont d'abord écartés (plante, racines, pierres, etc....), puis à 10 cm de profondeur, 40g de sol sont prélevés à l'aide d'une spatule et placés dans un flacon stérile (Figures 09).

L'échantillon est déposé sur un papier d'aluminium stérile soigneusement enveloppé dans un sac en papier stérile. Il a été ensuite gardé au frais (4°C) puis transféré au laboratoire pour une analyse immédiate. Et transportés au laboratoire dans des conditions d'asepsie rigoureuse.



Figure 10 : Prélèvement de l'échantillon à partir du sol de Hammam AbdAllah (Bouhamma_Mila)

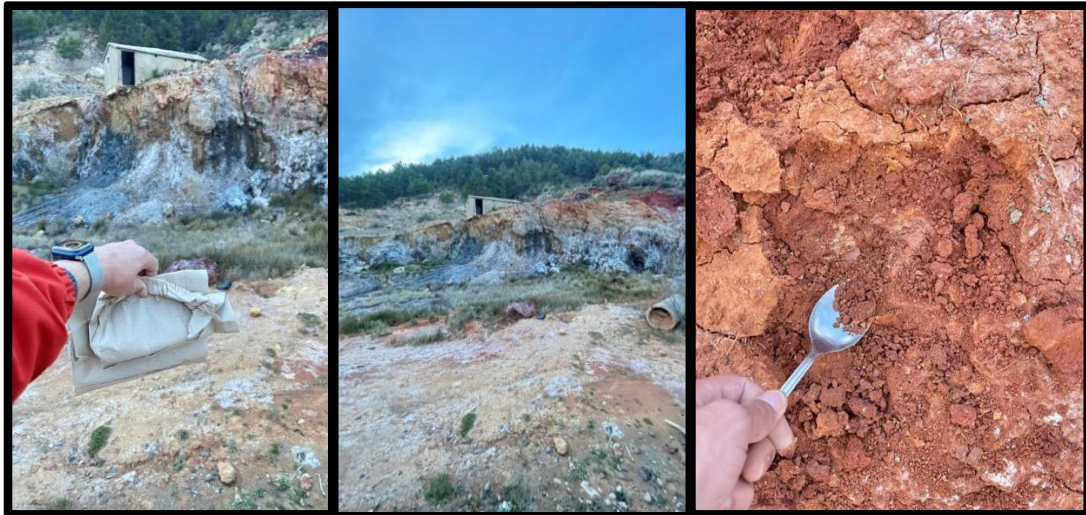


Figure 11 : Prélèvement de l'échantillon à partir du sol de Hammam Beni Ghuecha

1.3. Le milieu d'isolement

Le milieu utilisé pour l'isolement des moisissures du sol est la gélose PDA (potato dextrose agar) (**Annexe 02**). La croissance bactérienne est inhibée par l'addition d'Amoclan aux milieux de culture, avant stérilisation, à la concentration de 5 mg/l (**Botton et al. 1999**).

1.4. La préparation des dilutions

a) But

La diminution de la charge microbienne par dilution de l'échantillon de sol à analyser est réalisée dans le but d'une purification ultérieure plus aisée et l'obtention de colonies bien séparées à partir des cultures mixtes.

b) Principe

La dilution décimale consiste à diminuer la densité de sol en micro-organismes, d'abord à 1/10 puis à 1/100 et ainsi de suite jusqu'à réduire la concentration microbienne de la suspension mère au facteur de 10^{-4} . Ainsi, le sol est prêt à l'analyse microbiologique, bien que la probabilité d'éliminer un nombre considérable d'espèces microbiennes soit non nulle.

c) Préparation de la solution mère

Une quantité de 1g de sol a été dilué dans 9ml d'eau physiologique stérile, puis le mélange a été agité au Vortex pendant 10 min.

d) Préparation des dilutions

Une série de dilutions a été préparée dans des tubes de 9 ml de l'eau physiologique stérile. (Annexe 01),

Les dilutions ont été réalisées à partir de la solution mère jusqu'à 10^{-4} (Figure 11).

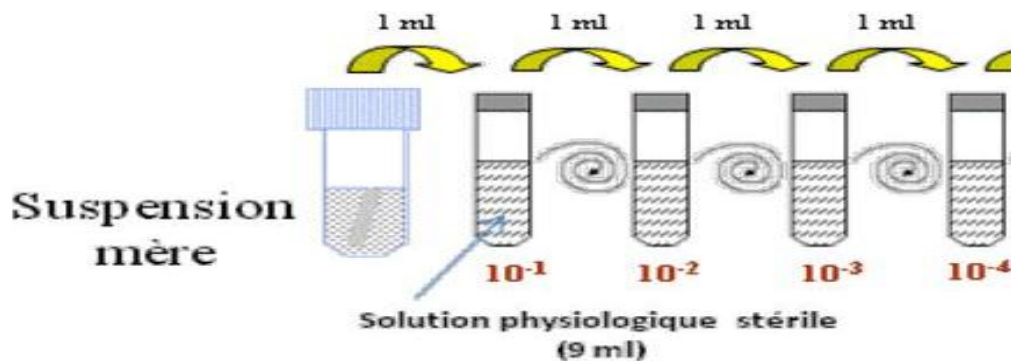


Figure 12 : Préparation des dilutions

1.5. Méthode d'isolement

Avant d'entamer le travail, il est important de créer une zone stérile, par la flamme du bec Bunsen, sur une paillasse soigneusement nettoyée. Ensuite, la suspension mère est préparée en mélangeant 1 g de chaque échantillon avec 9 ml d'eau distillée stérile. Les étapes suivantes sont :

- Homogénéiser la suspension mère par agitation du flacon de prélèvement
- Procéder tout d'abord à la numérotation des tubes en les étiquetant respectivement de 10^{-1} à 10^{-4} celles/ml pour les différentes dilutions
- Prélever à l'aide d'une pipette graduée, 1 ml d'échantillon mère, puis l'ajouter à 9 ml d'eau physiologique stérile dans un tube à essai, permettant ainsi d'obtenir une suspension microbienne diluée à 10^{-1} par rapport à la suspension mère
- Prélever 1 ml de la suspension 10^{-1} agitée, à l'avance à l'aide d'un vortex, avec une pipette pasteur neuve et diluer dans un second tube à essai contenant 9 ml d'eau physiologique stérile, pour arriver à une dilution de 10^{-2} , et ainsi de suite à chaque dilution, pour arriver à diminuer la charge microbienne de l'échantillon mère à l'exponentiel de 10^{-4} . Changer les pipettes entre chaque prélèvement.

1.6. Ensemencement et incubation

Tout en respectant les conditions d'asepsie et en manipulant toujours dans la zone stérile :

- Bien homogénéiser le contenu du tube à essai contenant la suspension diluée à 10^{-4} .
- Prélever à l'aide d'une pipette Pasteur, une goutte de cette suspension.
- L'étaler à l'aide d'un râteau, sur toute la surface de la boîte de Pétri coulée (Le râteau en verre est flambé avant et après chaque utilisation).
- Sur les boîtes ensemencées on indique le numéro de l'échantillon, la dilution ainsi que la date d'ensemencement.

Il est à noter que deux répétitions sont réalisées pour chaque dilution.

Les boîtes ont été incubées à 28°C et ont été observées quotidiennement pendant trois jours.



Figure 13 : Les étapes de d'ensemencement des échantillons.

1.7. Repiquage et purification des moisissures isolées

Après un bon développement des colonies, nous avons effectué des repiquages de chaque colonie pour purifier les champignons et minimiser les risques de contamination, jusqu'à arriver à isoler sur chaque boîte de Pétri une seule colonie d'un champignon donné. **(Guiraud, 1998)**.

Le repiquage se fait par prélèvement d'un fragment de colonie à l'aide d'une anse stérilisée tout en évitant son contact avec les autres colonies avoisinantes de la même boîte sur milieux PDA (Figure 13).

Ce fragment est déposé au centre d'une nouvelle boîte de même milieu PDA sur laquelle on indique la date de repiquage et les coordonnées de la boîte de prélèvement.

Le repiquage se fait aseptiquement près du bec Bunsen. Les boîtes ont été incubées à 28 °C pendant six jours jusqu'à obtention des souches pures.

Des repiquages successifs des souches jusqu'à l'obtention des souches pures.

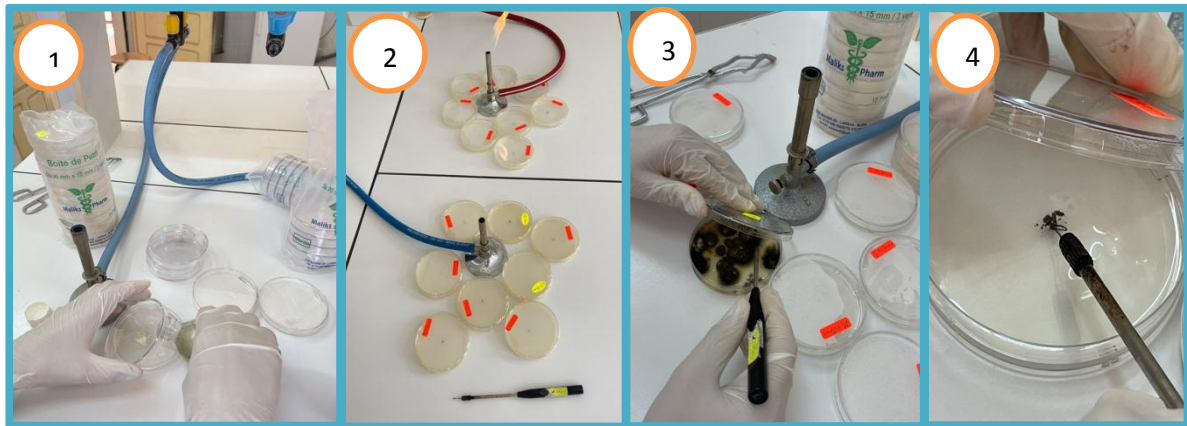


Figure 14 : Purification et repiquage des colonies isolées

2. Identification des moisissures isolées

L'identification des moisissures est basée sur l'observation des caractères cultureux et morphologiques. Les progrès récents de la biologie moléculaire ont permis de proposer des outils d'aide à l'identification. Toutefois la complexité du règne fongique fait qu'à l'heure actuelle ces outils ne peuvent pas encore remplacer complètement l'examen morphologique qui reste la base de l'identification.

2.1. Identification macroscopique

L'identification des souches obtenues est déterminée après leur ensemencement sur le milieu de culture spécifique (PDA). L'identification se fait à l'œil nu, elle se base essentiellement sur les caractères suivants : la vitesse de croissance, l'aspect du mycélium aérien, couleur de l'envers de la colonie, l'odeur et la couleur des moisissures.

2.2. Identification microscopique

L'identification microscopique des champignons repose sur plusieurs méthodes, les deux les plus utilisées sont celles la méthode de coloration par bleu de méthylène et la méthode de Scotche.

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

- Méthode de scotch : Elle consiste à adhérer à l'aide d'un bout de scotch (technique du drapeau) une fraction mycélienne, on le recolle sur une lame préalablement étalée par une goutte de bleu de méthylène diluée avec deux gouttes de l'eau physiologique.

L'observation microscopique est effectuée en microscope optique aux différents grossissements (X10, X40) ainsi qu'à l'immersion (GX100).

3. La mise en évidence de l'activité enzymatique des moisissures isolées

Nos souches sont repiquées à l'aide d'une anse de platine sur différents milieux pour tester la production des enzymes hydrolases extracellulaires puis les boîtes Pétri sont incubées pendant 7 jours à 30°C. Après l'incubation et la croissance, l'apparition d'une zone claire autour des colonies témoigne de l'hydrolyse du substrat testé, le diamètre de cette zone est lié à la quantité des enzymes produites par les moisissures.

3.1. La recherche de l'activité amylolytique des moisissures

L'activité amylolytique est effectuée sur milieu de culture à base d'amidon 1% (**Annexe 03**) Après incubation, le milieu gélosé est recouvert d'une solution de Lugol (**Annexe 04**) pendant 30 secondes suivie d'un rinçage avec de l'eau distillée. L'eau iodée contenant l'iode se complexe avec l'amidon présent dans le milieu et donne un précipité bleu sombre.

L'hydrolyse de l'amidon est indiquée par l'apparition d'une zone claire autour de la colonie productrice d'amylase (**Tatsinko et al., 2005**).

3.2. La recherche de l'activité protéolytique des moisissures

La dégradation de la caséine du lait se caractérise par l'observation visuelle et directe d'une zone claire et transparente autour de la colonie (**Harrigan et Mccance, 1976**). La gélose au lait (lait à 20% d'agar) (**Annexe 03**) est utilisée pour la mise en évidence de la présence d'une activité protéolytique chez les souches fongiques.

L'ensemencement se fait par touche centrale et l'incubation est effectuée à une température, 30°C pendant 5 à 7 jours pour les moisissures. La gélose au lait est choisie pour ses avantages tels que la simplicité dans la préparation, la richesse en protéines et son faible coût (**Smith et al., 1952**).

3.4. La recherche de l'activité cellulolytique

La mise en évidence de l'activité cellulolytique des souches testées est évaluée sur milieu contenant 3% de CMC (**Annexe 03**) Les boîtes sont incubées à 30°C pendant 7 jours.

Après la croissance, les boîtes sont colorées avec une solution de rouge Congo de 0.1% (**Annexe 04**) pendant 30 min à température ambiante puis sont lavées avec une solution de NaCl (1M) pendant 1 heure (**Annexe 01**) l'apparition de zones claires autour des colonies indique la présence de cellulases extracellulaires.

Le rouge Congo a une affinité pour les parois cellulaires et ne colorant pas le contenu de cellule permet la visualisation d'un halo clair autour des colonies pour déterminer l'activité cellulolytique avec la mesure le diamètre de la zone d'hydrolyse. (**Amjad khalil ,2011**).

3.5. La recherche de l'activité pectinolytique :

Chaque souche est ensemencée par une touche centrale sur le milieu pectine agar (**Annexe 03**) et incubé à 30°C pendant 7 jours. Après l'incubation, les boîtes sont inondées par une solution aqueuse d'acétate de cuivre à 7.5% (**Annexe 04**) pendant 10 minutes.

L'acétate de cuivre donne une couleur bleu clair sur la gélose qui contient la pectine non dégradée (**Snaiki et al., 2006**). L'hydrolyse enzymatique des substances pectique est caractérisée par le halo clair autour des colonies productrices.

3.6. La recherche de l'activité lipolytiques

L'activité lipase a été déterminée par l'ensemencement par une touche centrale sur milieu de culture spécifique contenant du tween 80 comme substrat lipidique (**Annexe 03**). Le Tween 80 a été stérilisé séparément puis ajouter au milieu stérile. Après incubation, les cultures ont été mises à 4°C pendant 12 h pour mieux visualiser l'apparence d'un opaque précipitations autour du thalle (**Chamekh et al., 2019**). En cas de réaction positive, il se forme un halo opaque autour de la strie hydrolysant le Tween 80, dû à la précipitation des acides gras.

3.7. La recherche de l'activité estérasique :

La recherche de l'activité estérasique est réalisée de la même manière que l'activité lipolytique. Toutefois, le tween 80 est remplacé par le tween 20, parce que les estérases sont inactivées en présence tween 80, après la stérilisation, les souches sont repiquées au centre des

boites contient le milieu sélectif, les résultats observées par la formation d'un halo opaque autour des colonies par des zone d'hydrolyse à différents diamètres. **(Sierra, 1957)**

Résultats et Discussion



Ce travail consiste à isoler, purifier, identifier et mettre en évidence quelques activités enzymatiques des souches fongiques prélevées à partir d'une source thermique.

1. Isolement des moisissures

Les cultures réalisées à partir des dilutions décimales d'échantillon de sol thermal appartiennent à hammam Yahia Beni Guecha et a Hammam Abdallah Bouhama. Ils ont abouti à des aspects, de texture et de couleurs différentes sur milieu PDA. Nous avons pu sélectionner 10 souches fongiques que nous avons purifiées.

2. Identification des moisissures

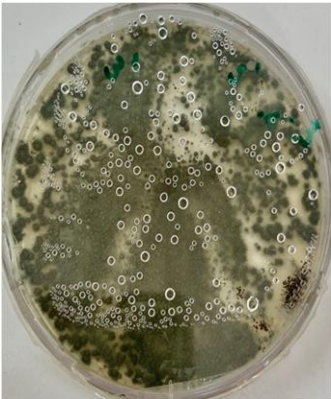
2.1. Identification macroscopique

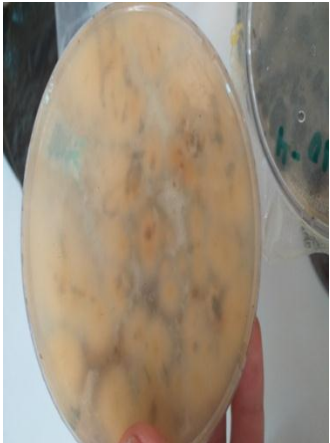
Les caractères macroscopiques des différentes souches de moisissures isolées ont été étudiés sur milieu gélosé PDA, l'un des milieux les plus fréquemment utilisés (**Botton et al, 1990**). L'étude macroscopique a été réalisée par l'observation, à l'œil nu, des caractères cultureux (aspect de la colonie, couleur, revers des boîtes de Pétri., et la vitesse de la croissance ainsi que la présence ou l'absence de pigments caractéristiques de chaque souche (Tableau 13).

Tableau 13 : observation macroscopique des dix moisissures isolées sur le milieu PDA

La souche	Description	Recto	Verso
S1	Couleur du mycélium : les colonies deviennent vertes et jaunes. Vitesse de croissance : lente Aspect : velouté à poudreuse. Revers : jaune à vert		

S2	Couleur du mycélium : les colonies blanches, à maturités devient noir. Vitesse de croissance : chargé de spores et croissance rapide. Aspect : velouté à poudreuse Revers : pas de pigment, jaune pâle.		
S3	Couleur du mycélium : vert olive, brun noir très foncé. La vitesse de croissance : lente à modérément rapide. Aspect : velouté ou floconneuse Revers : brin noir		
S4	Couleur du mycélium : teinte brun noisette à marron foncé. Aspect ; colonies duveteuses à poudreuses Vitesse de croissance : rapide Revers : jaune à brin orange		

S5	Couleur, du mycélium : vert olive à jaune. Vitesse de croissance : rapide. Aspect : duveteuses à poudreuses Revers : pas de pigment, beige – jaune		
S6	Couleur du mycélium : Vert foncé. Vitesse de croissance : rapide Aspect : velouté à poudreuse Revers : pas de pigment		
S7	Couleur de mycélium : colonies bleu vert, virant en vert foncé, à gris noirâtre Vitesse de croissance : rapide. Aspect : poudreuse Revers : pas de pigment, jaune		

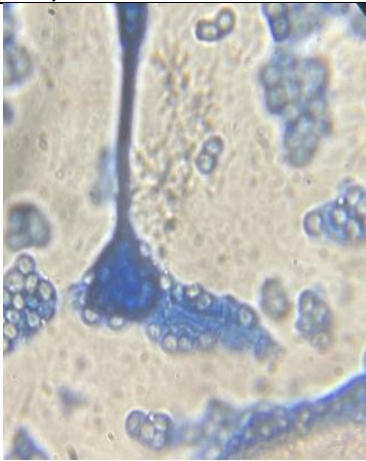
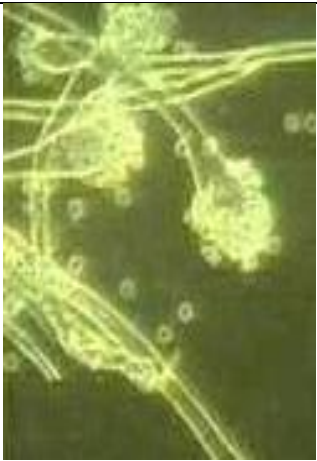
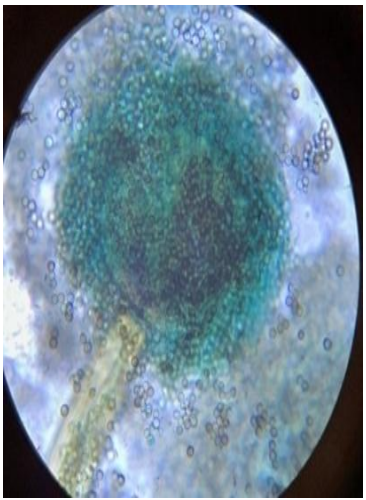
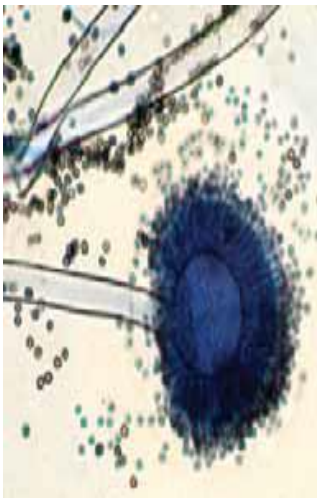
S8	Couleur de mycélium : vert et entouré par cercle blanc, devient vert à noirâtre. Vitesse de croissance : rapide. Aspect : velouté à poudreuse. Revers : jaune foncé	 A petri dish showing numerous dark, fuzzy colonies on a yellowish agar. Some colonies are marked with green ink. The colonies have a velvety to powdery texture.	 The reverse side of the petri dish for S8, showing a uniform yellowish-brown color, indicating the underside of the colonies.
S9	Couleur de mycélium : jaune au centre puis blanches Vitesse de croissance : lente Aspect : colonies cotonneuses Revers ; pas de pigment, incolore	 A petri dish showing a single, large, cottony colony with a yellow center and white edges.	 The reverse side of the petri dish for S9, showing a clear, colorless agar surface.
S10	Couleur du mycélium : Colonies au début devenant vert olive foncé Vitesse de croissance : lent. Aspect : Cotonneuse et poudreuse. Revers ; incolore	 A petri dish showing a large, cottony colony with a dark green to black center and white edges.	 The reverse side of the petri dish for S10, showing a clear, colorless agar surface.

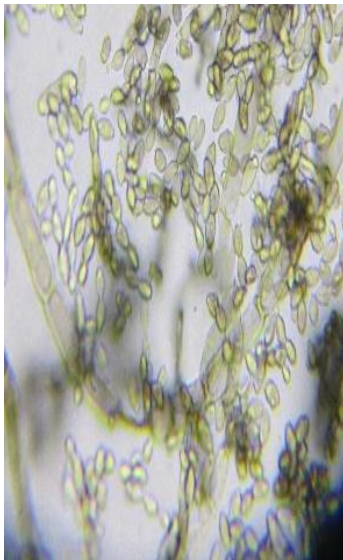
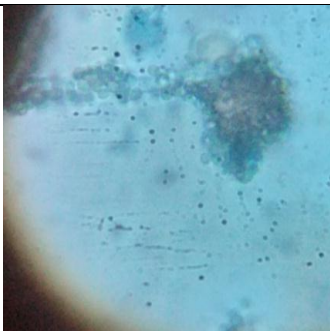
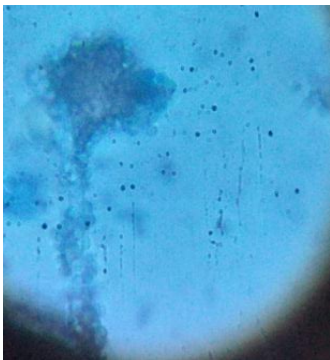
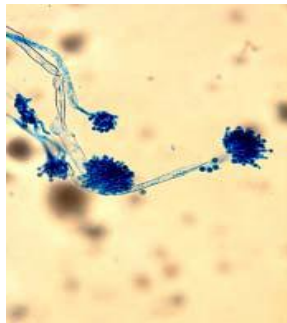
2.2. Étude microscopique

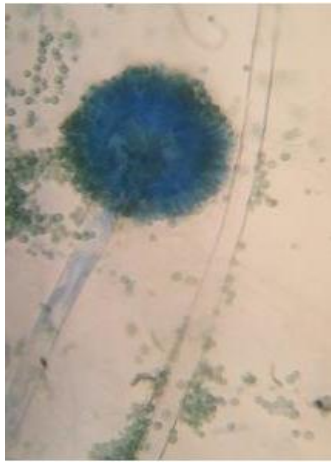
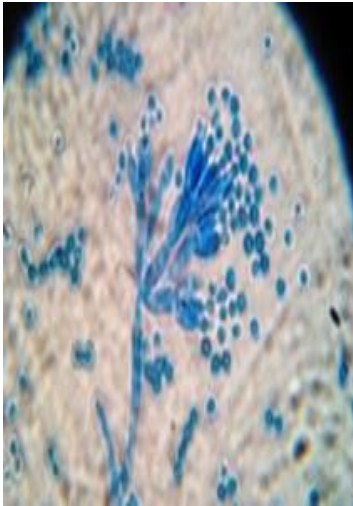
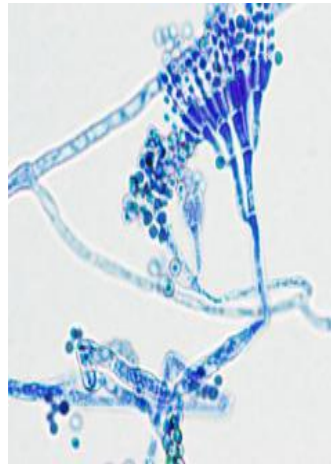
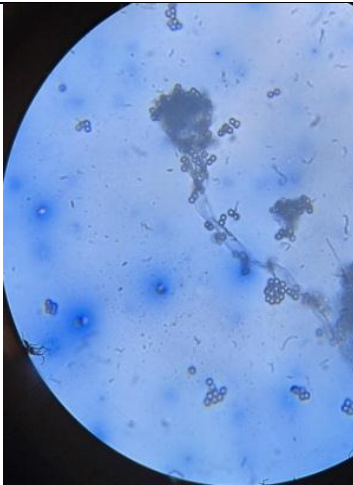
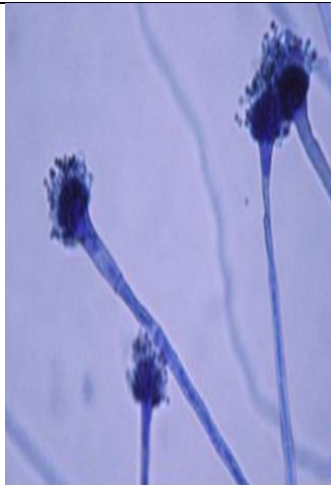
L'étude microscopique porte sur l'observation des structures caractéristiques des 10 souches fongiques (Conidiophores, conidies et mycélium). (Tableau 14).

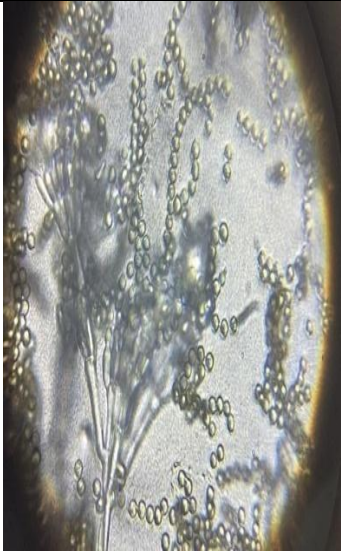
L'isolement à partir du sol thermal a permis l'obtention de 10 isolats fongiques appartenant à 4 genres *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cladosporium* et *Absidia*.

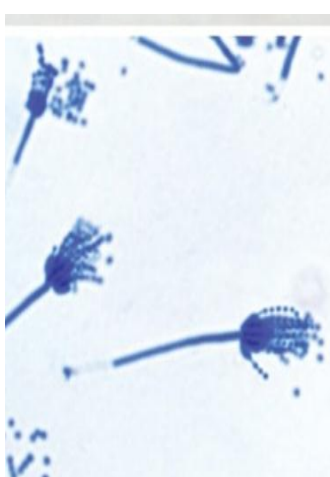
Tableau 14 : Étude Microscopique des souches fongiques isolées à partir du sol

Espèce	Description	Observation microscopique, grossissement GX (40-100)	La Photo à référence
<i>Aspergillus sp.1</i>	_ Filament septé _ Conidiophores court et lise, phialides directement porté par la vésicule dressée densément groupées. _ Conidies globuleux petit tailles _ Tête aspergillaire Unisériés		 (Malloch D 1997)
<i>Aspergillus Niger</i>	- Conidiophores lisses et très long _ Phialides insérées sur la vésicule, par l'intermédiaire de métules disposées sur tout le pourtour de la vésicule. _ Vésicule globuleuse _ Tête aspergillaire bisériée radiée, noir à maturité.		 (Tabuc. 2007)

	_ Conidies globuleuses brunes disposées en chaines		
<i>Cladosporium sp</i>	Hyphes septés, sont pigmentées produisent des conidiophores. _ Conidiophores variées grand à petite uni et pluricellulaire. Formées en chaines acropètes ramifiées, arbuscules fragiles. _ Conidies contient des parois formées elliptiques à cylindriques, présentées des bourgeonnements.		 (Yuri, 2012)
<i>Aspergillus terreus</i>	_ Conidiophores lisses incolores. _ Vésicule globuleuse. _ Phialides portées par des métules insères sur la partie supérieure de la vésicule. _ Conidies de petite taille légèrement elliptiques. _ Tête aspergillaire : bisériée en colonne évasé (aspect d'éventail)	 	 (Basil. A et al ,2021)  (Diba. K et al, 2007)

<i>Aspergillus flavus</i>	_ Vésicule : sphérique _ conidiophores : long, verruqueux avec des aspérités. _ phialides : directement insérées sur la vésicule, et portées par des métules. _ Conidies globuleuses, Tête aspergillaire : unisériée, radiée		 (Basil A et al., 2021)
<i>Penicillium sp.1</i>	- Hyphe septé -Conidiophores isolées, avec une métules -Pénicilles constituées les phialides branchées directement à l'extrémité du conidiophores. -phialides en forme verticale non ramifiées. - Les conidies rondes à ovoïdes.		 (NitinKumar.P, 2010)
<i>Aspergillus fumigatus</i>	_ Conidiophores lisse et incolore. _ Vésicule hémisphérique. _ Phialides directement portées par la vésicule dressée, densément groupées. _ Conidies : globuleuses vert et petites.		 (Diana S et al., 2016)

	_ Tête aspergillaire unisériée en colonne compacte assez grand		
<i>Pénicillium sp.2</i>	_ Hyphe septé _ phialides disposées en verticilles à l'extrémité des conidiophores, serrées l'une de l'autre donné une forme de pinceau. _ conidies rondes à ovoïdes _ Conidiophores lisses et cloisonnés.		 (Chabasse et al., 2002)
<i>Absidia .sp</i>	_ Sporocystophore ramifiées terminées par une columelle hémisphérique faisant saillie dans le sporocyste globuleux _ Spores : cylindriques _ Hyphe : pas septé		 (Chabasse et al., 2002)

<i>Pénicillum.sp₃</i>	_ Conidiophores isolées. _ Métules biverticillé _ phialides branchées directement à l'extrémité des conidiophores. _ Conidies, rondes disposées en longues colonnes irrégulière.		
----------------------------------	---	--	---

(Chabasse et al., 2002)

Les résultats de l'isolement des moisissures à partir du sol proche des sources thermales ; Hammam AbdAllah (Bouhamma – Mila) et Hammam Beni Ghuecha (Feurdjioua-Mila) montrent l'existence d'une flore fongique plus ou moins variée de 10 isolats fongiques appartenant à 4 genres : Le genre *Aspergillus* représenté par cinq espèces (*A. flavus*, *A. terreus* ; *A. niger*, *A.fumigatus* et *Aspergillus sp*), Le genre *Penicillium* représenté par trois espèces , Le genre *Cladosporium* et le genre *Absidia* . (Chabasse et al., 2002 ; Diba K et al., 2007 ; Tabuc, 2007 ; Malloch 1997).

L'analyse des résultats montre par ordre croissant, que le genre majoritaire est *Aspergillus sp* avec une fréquence de 50%, suivie du genre *Penicillium sp* avec un pourcentage de 30 %, enfin les genres *Cladosporium sp* et *Absidia sp* avec un même pourcentage de 10 %. (Figure 14)

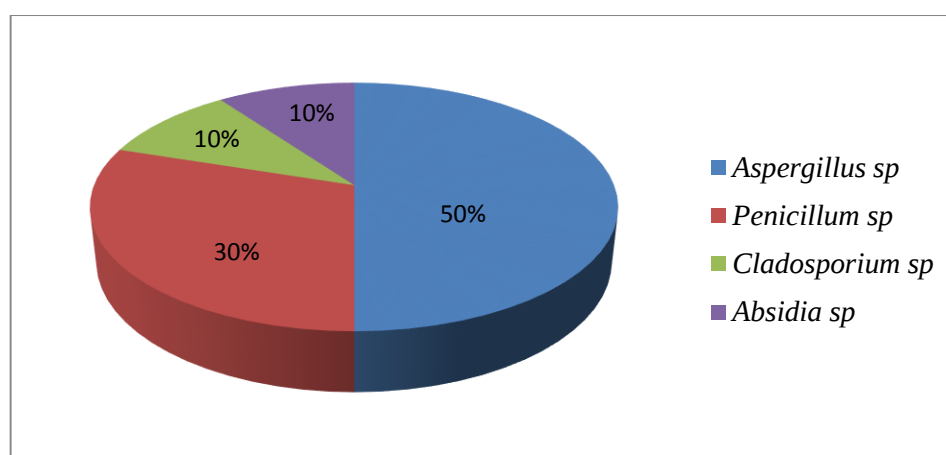


Figure 15 : Pourcentages des genres fongiques isolés.

Ces genres fongiques que nous avons trouvées, sont habituellement isolées à partir de la plupart des sols (**Alvarez Rodriguez et al., 2003**)

Nos résultats sont en accord avec **Ben kherara et Benbouzid (2020)** qui ont isolés les mêmes genres à partir d'un sol proche des sources thermales hammam El Hadjeb, Lioua , Tlaghma, et Oued Athmania .

Nos résultats sont en concordance aussi avec les travaux de **Boulefkhad N et Talhi, (2018)** qui ont isolé en majoritaire les deux genres *Aspergillus* et *Penicillium* avec une fréquence de 46 % et 27 % respectivement à partir d'un sol proche d'une souche thermique (Hammam Debegh),

Les différentes souches fongiques isolées à partir du sol des deux zones thermales , sont exprimées par l'influence des propriétés et les caractères physiques et chimiques d'une région à l'autre comme la température, le pH, la texture du sol ,les matières organiques, l'humidité , Nous supposons que ces moisissures sont thermophiles et elles ont la capacité de résister à certaines conditions comme la chaleur pour évaluer la métabolisme, surtout leur intérêt de la production des enzymes nécessaire dans diverses industries (**Smith et al., 2000 ; Antonio L, 1998**) .

3. Mise en évidence des activités enzymatiques

Pour tester la production d'un microorganisme en hydrolase, il suffit de le cultiver sur un milieu contenant le substrat de l'enzyme comme seule source de carbone et d'énergie. La révélation d'une activité hydrolytique positive se fait soit directement par l'observation d'un halo transparent ou indirectement par l'ajout d'un réactif spécifique. Plusieurs recherches sur les hydrolases d'origine fongique ont été réalisées. Pour cela, nous avons utilisé les milieux gélosés : Amidon 1%, Pectine - agar, CMC- agar, Tween 80 % et Tween 20 %, gélose au lait 20%, pour la détection des activités (amylolytiques, pectinolytiques, cellulolytiques, lipasiques, estérasiques et protéolytiques) respectivement, chez les différentes souches testées.

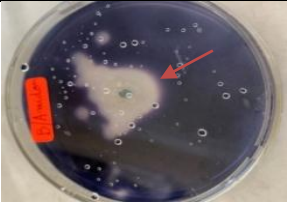
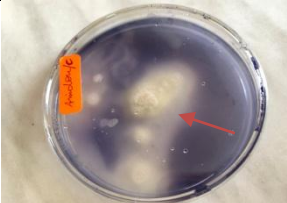
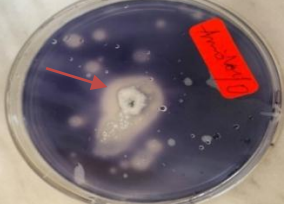
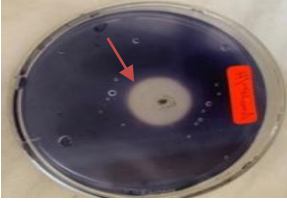
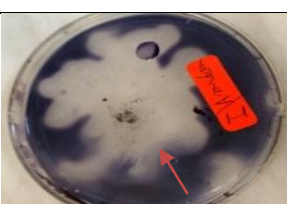
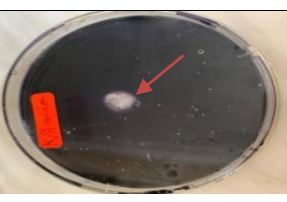
3.1. La recherche de l'activité amylolytique

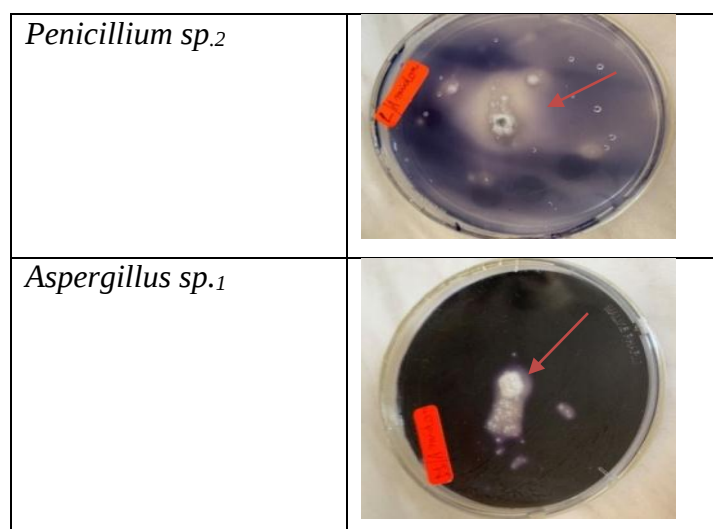
Pour tester la production de l'amylase, l'amidon a été utilisé comme seule source d'énergie.

En effet, en présence de l'iode, l'amidon se combine avec lui et donne un complexe de coloration bleu foncé plus ou moins intense selon sa concentration. Preuve de la dégradation de

l'amidon par l' α -amylase, les souches à halo clair sur le pourtour, sont considérées comme productrices d' α -amylases (tableau 15).

Tableau 15 : Résultats de l'activité amylolytiques des huit souches sur le milieu Amidon 10%.

La souche	L'activité amylolytique
<i>Penicillium sp</i> ₁	
<i>Aspergillus terreus</i>	
<i>Aspergillus flavus</i>	
<i>Cladosporium sp</i>	
<i>Aspergillus. niger</i>	
<i>Absidia sp</i>	



Les résultats obtenus après l'ensemencement des milieux gélosés et après incubation, donnent des zones d'hydrolyse de diamètres différents suivant la capacité de chaque souche à dégrader le substrat disponible. Le diamètre des zones d'hydrolyse (figure 16), est pris en considération pour la sélection de la souche amylolytique la plus performante.

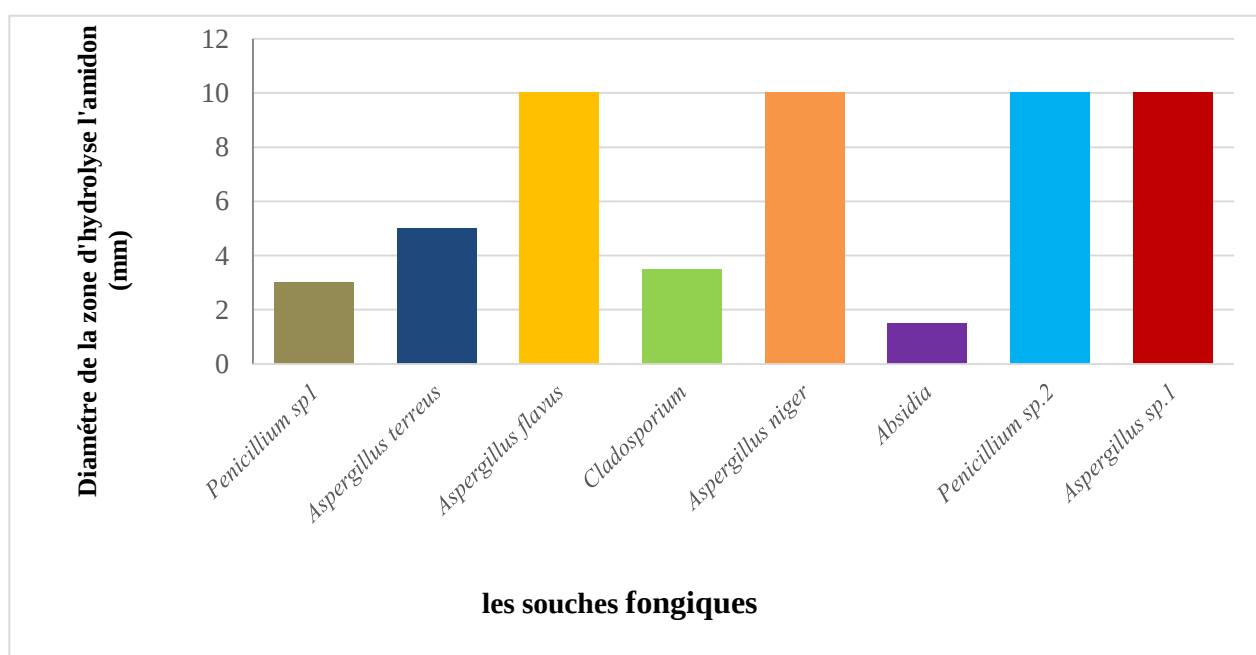


Figure 16 : Les diamètres des zones d'hydrolyses de l'amidon par les souches fongiques.

Parmi les 8 souches testées, les souches *A.flavus*, *A.niger*, *Penicillium sp₂* et *Aspergillus sp₁* se distinguent par une activité amylolytique élevée avec une zone d'hydrolyse de diamètre mesuré à 10mm. Par contre, les souches *A. terreus*, *Cladosporium sp* et *Penicillium sp₁* ont

donné une zone d'hydrolyse de diamètre moyen entre 3 et 5 mm. Tandis que, avec la souche *Absidia.sp* une zone d'hydrolyse faible a été observée de diamètre mesuré à 1.5mm.

Les amylases sont des enzymes qui hydrolysent l'amidon ou le glycogène. Elles peuvent dériver de plusieurs sources comme les plantes, les animaux et les microorganismes. Ces derniers sont plus favorisés grâce à leur large disponibilité et leur production volumineuse à l'échelle industrielle (**Vidyalakshmi et al., 2009**).

La production industrielle d'enzymes à partir des microorganismes fongiques appartenant surtout aux genres *Aspergillus* et *Penicillium*, existe depuis longtemps, du fait que la première production d' α -amylase a été réussie par **Takamine** en **1894**.

Nos résultats sont en accord avec ceux de **Meziane et Mahcene (2017)**, qui ont trouvé que la souche *Penicillium.sp* se distingue par une activité amylolytique élevée avec une zone d'hydrolyse de diamètre mesuré à 10 mm.

Plusieurs travaux sont réalisés pour détecter la production des Amylases par les champignons. Dans ce contexte **Reddy et al., (2012)** ont publié leur travail sur des champignons filamenteux isolés du sol (India). Selon cette référence, les isolats ont été identifiées comme ; *A.niger*, *Cladosporium*, *A. terreus* et *A. flavus* et ont été sélectionnés sur 1 % d'amidon comme producteurs d'amylase extracellulaire. En parallèle, les auteurs ont rapporté l'observation d'une grande zone d'hydrolyse par *A.niger* et *Cladosporium* mesuré par un diamètre (20 mm).

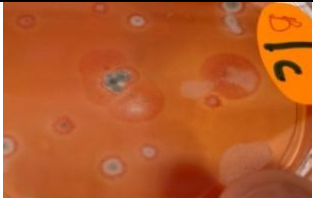
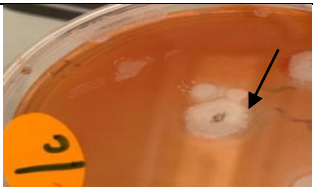
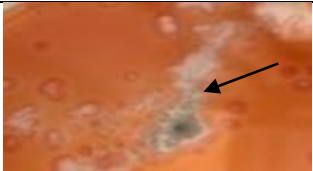
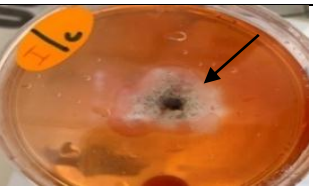
En effet, l'étude réalisée par **Tatsinkou et al. (2005)** a décrit la capacité de certaines souches fongiques productrice de l'alpha amylase dans les mêmes conditions expérimentales que ce travail

3.2. La recherche de l'activité cellulolytique

Les souches ont été incubées à partir d'un milieu sélectif le CMC Agar, Cette activité est détectée par l'indicateur « Rouge Congo » (0.1%) qui est dispersée dans le milieu et se complexé avec le substrat suivi d'une décoloration avec une solution du Na Cl.

La production de la cellulase se traduit par l'observation d'une zone claire apparente autour des colonies des souches productrices (Tableau 16)

Tableau 16 : Résultats de l'activité cellulolytique des souches fongiques sur le milieu CMC

La souche	L'activité cellulolytique
<i>Pénicillium sp</i> ₁	
<i>Aspergillus terreus</i>	
<i>Aspergillus flavus</i>	
<i>Cladosporium sp</i>	
<i>Aspergillus niger</i>	
<i>Absidia sp</i>	
<i>Pénicillium sp</i> ₂	
<i>Aspergillus sp</i> ₁	

Les résultats obtenus après l'ensemencement des milieux gélosés à base de cellulose, donnent des zones d'hydrolyse de diamètres différents suivant la capacité de chaque souche à dégrader ce substrat (Figure 17)

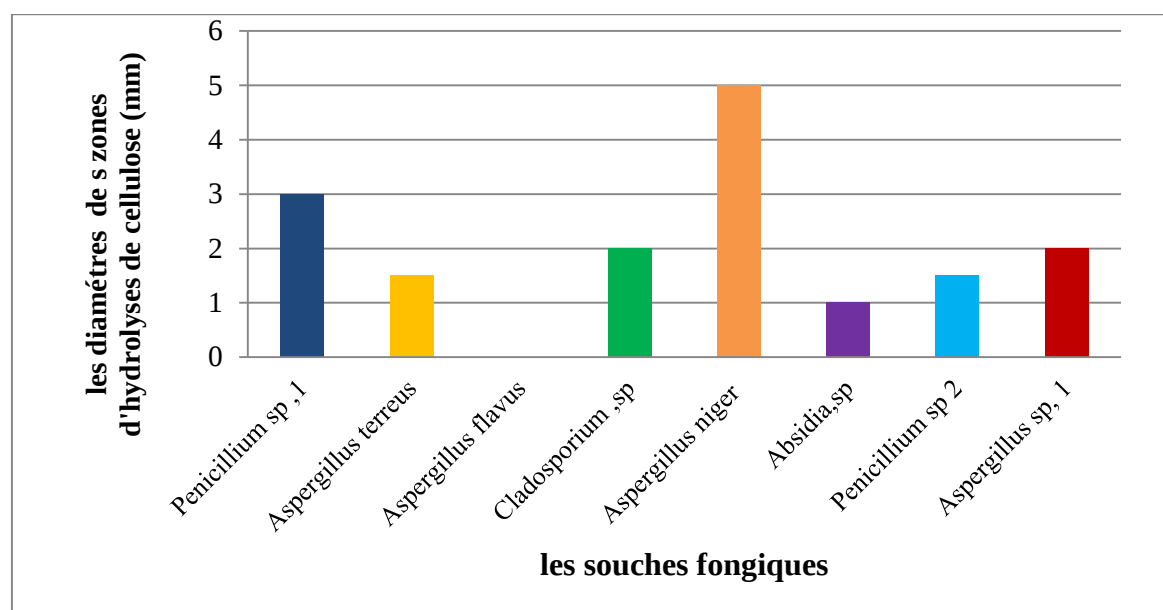


Figure 17 : Les diamètres des zones d'hydrolyses la cellulose par les souches fongiques.

D'après les résultats rapportés dans le tableau et la figure, nous avons remarqué qu'il ya sept souches (*A.niger*, *Penicillium sp₁*, *Aspergillus sp₁*, *Cladosporium.sp*, *A.terreus*, *Pénicillium sp.2* et *Absidia.sp*) possédant une activité cellulolytique. Une souche (*A.flavus*) ne présente aucune activité cellulolytique notée sur le milieu de culture

Les diamètres obtenus chez les deux souches productrices *A. niger* et *Penicillium sp₁* sont proches ($\Phi= 5\text{mm}$; $\Phi= 3\text{mm}$), les deux souches *Aspergillus sp₁* et *Cladosporium sp* ont donné une zone d'hydrolyse faible avec un diamètre égal à 2mm et enfin les trois souches *A. terreus*, *Penicillium sp.2* et *Absidia.sp* ($\Phi= 1.5$, 1.5 et 1mm respectivement). Ainsi on constate l'absence de zone d'hydrolyse autour de souches (*A. flavus*).

Plusieurs travaux menés sur des souches fongiques isolées des milieux extrêmes montrent la capacité de ces moisissures notamment les genres *Aspergillus* et *Penicillium* à produire la cellulase (Leghlimi, 2013 ; Fergani et Lakhel, 2015).

Nos résultats sont en accord aussi avec ceux obtenus par (Noor.et al. 2011) qui ont expliqué la dégradation de cellulose par un complexe enzymatique l'endoglucanase par le genre *Penicillium* et l'espèce *A.niger*.

Nos résultats sont en concordance aussi avec ceux de (**Leghlimi, 2013 ; Meziani et Mehcene, 2017**) qui ont trouvés une faible activité de la cellulase par la moisissure *A.terreus* alors que (**Wesley et al., 1982**) ont décrit une activité maximale d'*A. terreus* , par la sécrétion du cellulase de type β - glucosidase., Contrairement le genre *Penicillium*. Testé par (**Leghlimi, 2017**) n'a pas donné une activité cellulolytique.

L'étude de (**Saroj Ahirwar et al., 2017**) montrés une activité cellulolytique importante par la souche *Absidia.sp.*

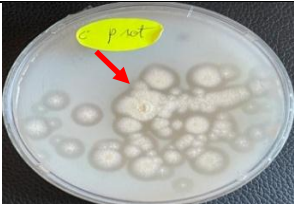
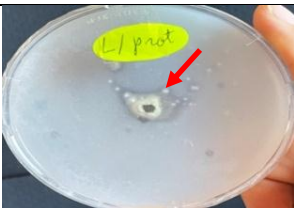
En revanche, Nos résultats sont différents de ceux trouvés par **Reddy L et al., (2014)** ou ils ont précisé que la souche *Aspergillus flavus* a une *activité* cellulolytique intéressante.

3.4. Recherche de l'activité protéolytique

Les souches protéolytiques sont reconnues par la formation d'un halo transparent autour des colonies, résultant de la dégradation des protéines du lait dans le milieu par l'exo protéase produite : plus le halo est grand, plus la quantité d'enzyme produite est importante.

Les résultats obtenus sont rapportés dans le (Tableau 17) suivant :

Tableau 17 : La mise en évidence l'activité protéolytiques des huit souches

La souche	Activité protéolytique (zone d'hydrolyse)
<i>Pénicillium sp.1</i>	
<i>Aspergillus terreus</i>	
<i>Aspergillus flavus.</i>	
<i>Cladosporium sp</i>	
<i>Aspergillus niger</i>	
<i>Absidia.sp</i>	
<i>Pénicillium sp.2</i>	



Les résultats obtenus après l'ensemencement des milieux gélosés, donnent des zones d'hydrolyse de diamètres différents suivant la capacité de chaque souche à dégrader les protéines du lait dans le milieu (figure 18).

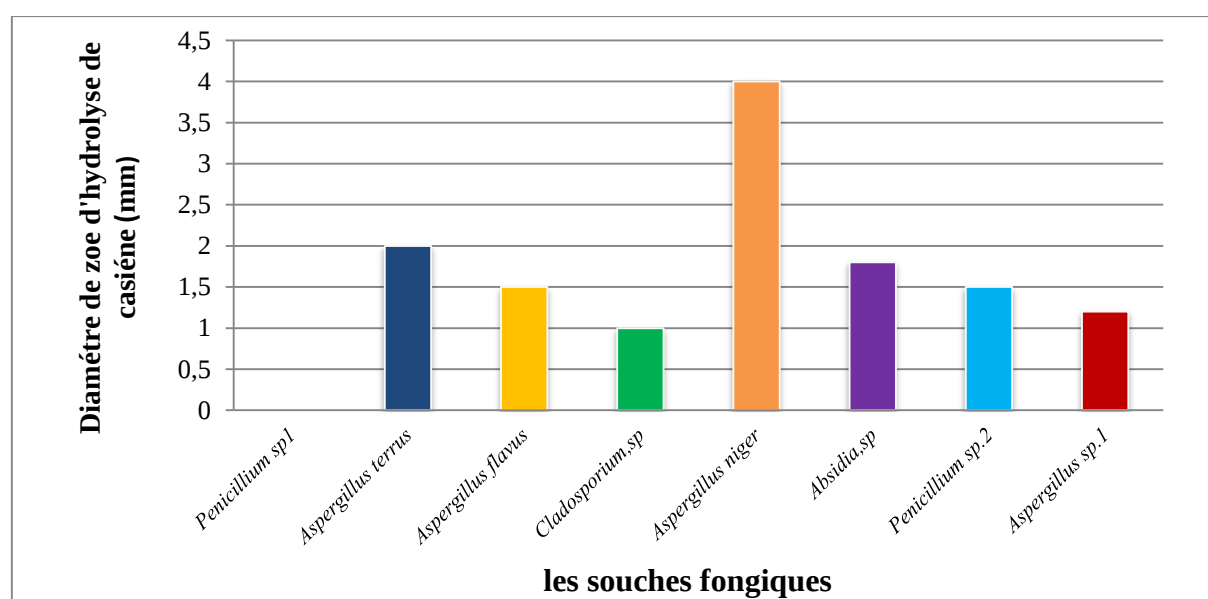


Figure 18 : Les diamètres des zones d'hydrolyse de la caséine par les souches fongiques.

Les résultats obtenus après l'ensemencement des laits gélosés donnent des zones d'hydrolyses permettant la mise en évidence de l'activité protéolytique chez sept moisissures sur huit souches. Quatre souches sont caractérisées par des zones d'hydrolyse dont le diamètre est inférieur à 2mm (*Aspergillus sp.1*, *Cladosporium sp*, *A. flavus*, *Penicillium sp2* et *Absidia sp*) respectivement. Une seule souche a un diamètre de 2 mm (*Aspergillus terreus*,) et enfin, une souche (*A.niger*) à un diamètre supérieur à 4mm a été sélectionnée pour la production de protéase.

Nos résultats sont similaires à ceux obtenus par **Sohail et al. (2009)** qui ont détecté l'activité protéolytique chez 79 isolats, en utilisant la caséine comme seule source de carbone. Dans cette référence, les auteurs ont sélectionné les isolats suivants comme protéolytiques ; des isolats du genre *Aspergillus* (8 *A. flavus*, 2 *A. fumigatus*, *A. nidulans*, 40 *A. niger*, 2 *A.terreus*, 2 *A. wentii*).

Chandrasekaran S et al., (2015) montrent les deux espèces ; *A. niger* et *A. flavus* présentaient les taux les plus élevés de la zone d'hydrolyse sur les six isolats totale sélectionnées de la sole (Mannargudi- India).

Chamekh et al., (2019) ont pu sélectionner 18 isolats sur la base de la présence d'une zone d'hydrolyse sur un milieu gélosé caséine. Sept du genre *Aspergillus* (*A. subramanianii*, *A. terreus*, *A.europaeus*), neufs isolats appartiennent au genre *Penicillium* (*P. flavigenum*, *P. canescens*, *P. mariae-crucis*, *P. allii*, *P. vinaceum*, *P.egyptiacum*, *P.longicatenatum*). D'autres isolats ont montré également leur capacité à produire cette hydrolase (*Tritirachium sp.*, *Beauveria bassiana*, *Lecanicillium sp* et *Cladosporium sp*).

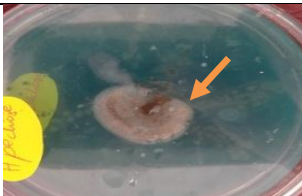
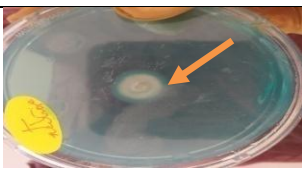
Il est à noter que même en absence d'une activité protéolytique exo-cellulaire, nous avons observé un envahissement du milieu, comme c'est le cas chez la souche *Penicillium sp1*. Ceci indique une utilisation des sucres totaux présents dans le lait comme source de carbone et d'énergie, ou par la production d'une activité protéolytique endo-cellulaire (**Debananda et al., 2009 ; Adjimi et Kebkoub ,2019**).

3.5. Recherche de l'activité pectinolytique

La révélation de la sécrétion des pectinases qui dégradent la pectine est faite par l'ajout d'une solution d'acétate du cuivre. L'acétate de cuivre précipite la pectine non dégradée, un halo translucide (clair) sur fond bleu clair apparaît autour des colonies productrices de pectinases (tableau 18).

Tableau 18 : La mise en évidence l'activité protéolytiques des huit souches

La souche	L'activité pectinolytique (zone hydrolyse)
<i>Pénicullum sp.1</i>	
<i>Aspergillus terreus.</i>	

<i>Aspergillus flavus</i>		
<i>Cladosporium.sp</i>		
<i>Aspergillus niger</i>		
<i>Absidia.sp</i>		
<i>Pénicillium sp.2</i>		
<i>Aspergillus sp.1</i>		

Les zones claires ou les zones d'hydrolyse observées donnent des diamètres différents Montées dans la (figure 19).

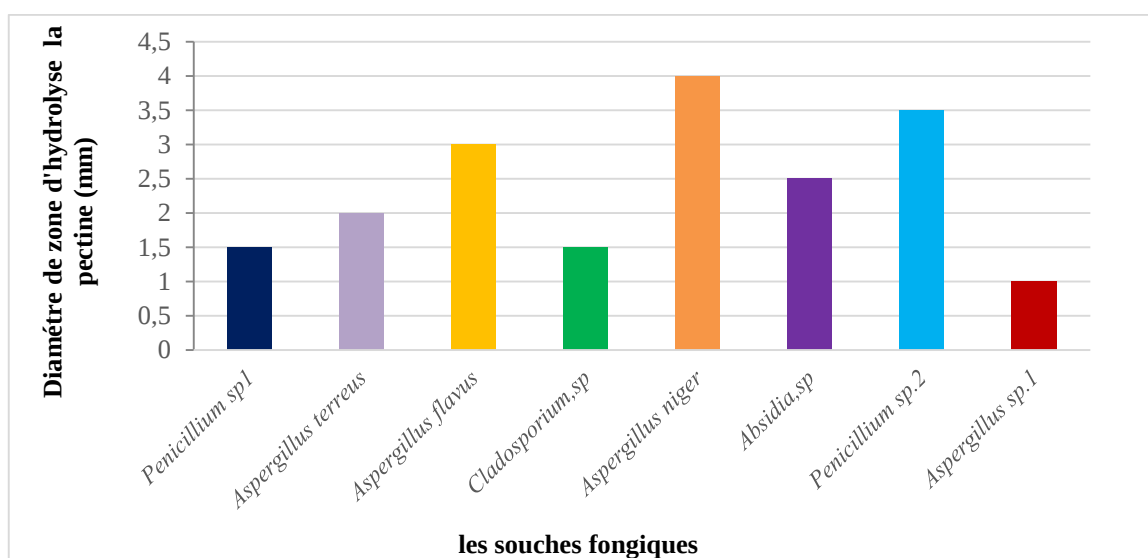


Figure 19 : Diamètre des zones d'hydrolyse de la pectine par les souches fongiques.

D'après nos résultats, nous avons remarqué que les huit souches fongiques isolées et testées possèdent une activité pectinolytique. En effet, une bonne activité enzymatique sur le milieu pectine-agar a été observée par l'apparition de zones claires autour des colonies. La souche *A.niger* présente une activité pectinolytique importante par rapport aux autres souches avec un diamètre de 4 mm ; suivi par les souches *Penicillium sp₂* ($\Phi = 3.5$) et *A. flavus* ($\Phi = 3.5$), le reste des souches (*Absidia sp*, *A. terreus*, *Penicillium sp₁*, *Cladosporium sp* et *Aspergillus sp₁*) présentent une faible activité avec des diamètres d'hydrolyse de (2,5 mm, 2mm, 1,5mm, 1,5mm, 1mm) respectivement.

Nos résultats en concordance ont ceux **Reddy P et al (2012)** détectent que les deux espèces *A niger* et *A flavus* représentent des activités pectinolytiques importantes, les diamètres mesurés $\Phi = 10, 15$ mm respectivement.

L'étude réalisée par **Meziani et Mahcen (2017)** montrent également la production de cette enzyme par *Penicillium. sp* avec un diamètre mesuré à 7.6 mm et *Aspergillus terreus* qui a donné un diamètre égal à 3.8 mm

Le résultat c'était : deux du genre *Rhizopus* comme des meilleurs producteurs, 4 isolats (*T. reesei*, *N. crassa*, *A. niger* et *Colletotrichum* non identifié) ont été classés comme de bons producteurs. D'autres isolats ont montré une zone de lyse avec un diamètre plus au moins faible, qui reflète la sécrétion de pectinase extracellulaire, il s'agit de *Humicola grisea* et *Mucor rouxii*. **Sohail et al. (2009)** ont montré la capacité de production de pectinase sur un milieu gélosé à

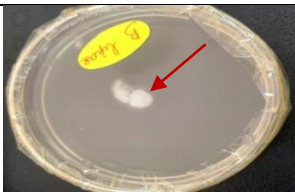
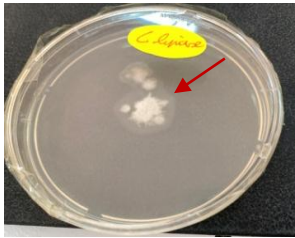
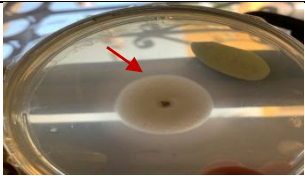
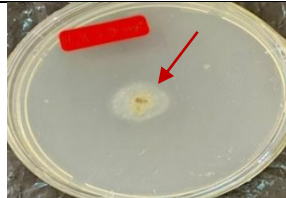
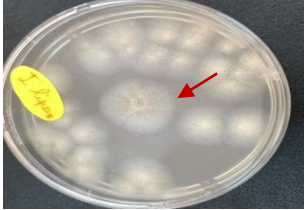
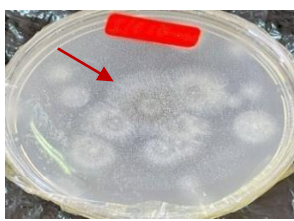
base de pectine uniquement chez trois isolats de moisissures. Deux isolats appartiennent au genre *Aspergillus* et un isolat non identifié du genre *Penicillium*.

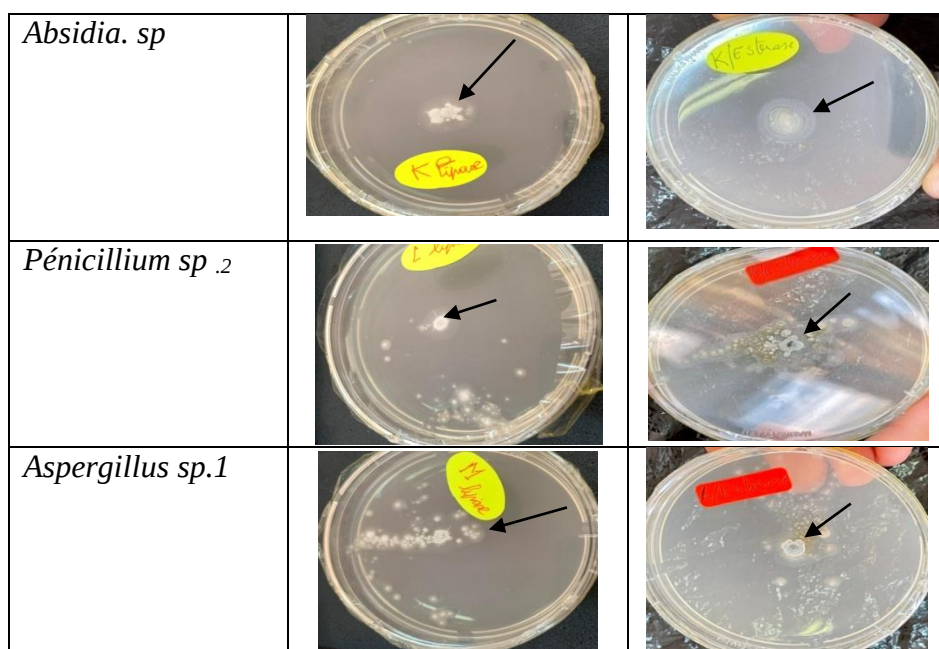
3.6. Recherche de l'activité lipolytique et estérasique

Les huit souches fongiques isolées ont été repiquées sur deux milieux contenant le Tween 20, pour tester l'activité lipasique et le Tween 80 pour tester l'activité estérasique.

La présence d'une activité estérasique et lipolytique s'exprime par la présence d'un halo autour des colonies (Tableau 19)

Tableau 19 : la mise en évidence l'activité lipolytique (lipasique et estérasique) sur les huit souches)

La souche	Activité lipolytique	Activité estérase
<i>Pénicillium sp.1</i>		
<i>Aspergillus terreus</i>		
<i>Aspergillus flavus</i>		
<i>Cladosporium.sp</i>		
<i>Aspergillus niger</i>		



Les différents diamètres des zones d'hydrolyse de la matière grasse présente dans le milieu de culture sont mentionnés dans les (figures 20, 21) suivantes

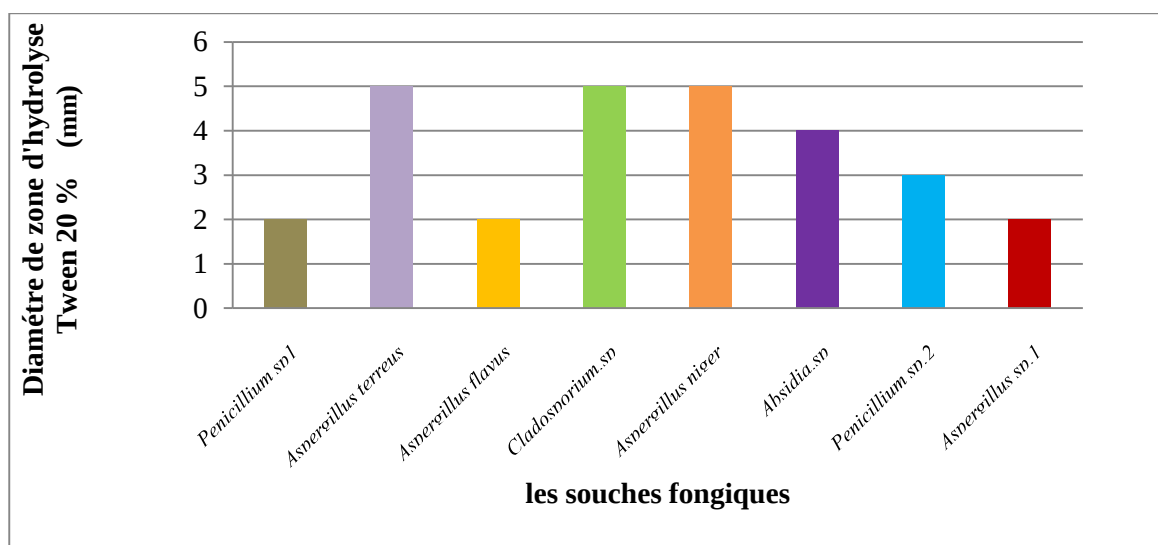


Figure 20 : Les diamètres des zones d'hydrolyse de Tween 20 % par les souches fongiques

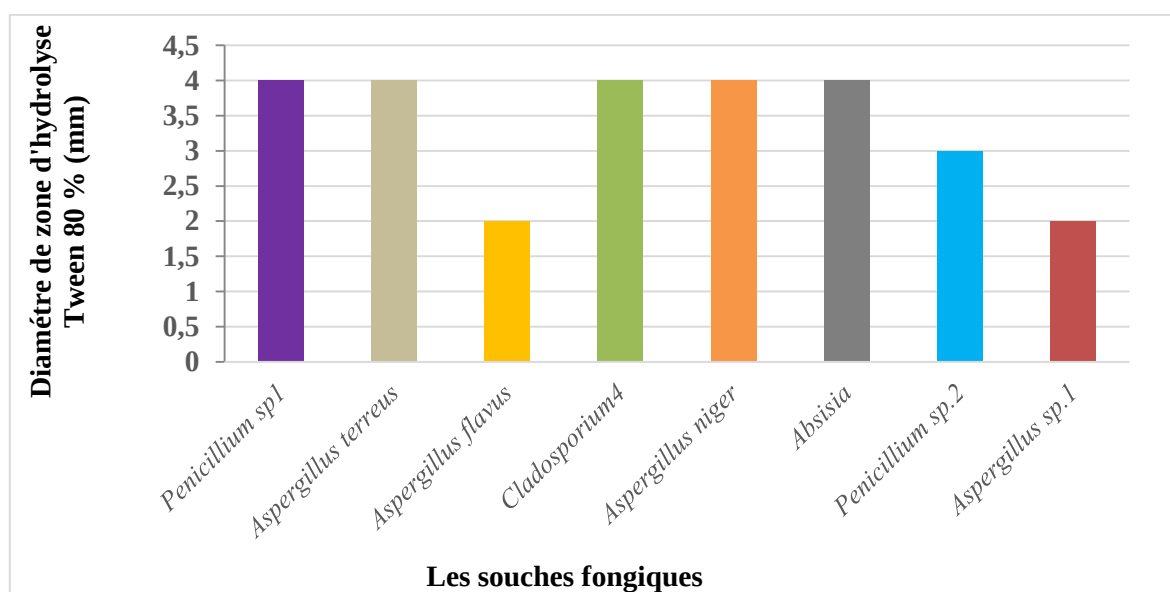


Figure 21 : les Diamètres des zones d'hydrolyse de Tween 80 % par les souches fongiques.

D'après les résultats obtenus, nous avons constaté que les huit souches testées sont capables de produire la lipase et l'estérase. Elles ont la capacité des dégradées les triglycérides et les acyles esters.

L'analyse des résultats montre que la meilleure activité lipolytique (lipasique et estérasique) a été observée chez 04 isolats (*A.niger*, *Cladosporium.sp* , *A.terreus*, et *Absidia.sp* avec des diamètres variantes de 5 à 4mm.

Plusieurs travaux ont été réalisés pour détecter la production des enzymes lipolytiques par les moisissures et surtout les thermophiles. Citant les travaux de (**Lacia M et al., 2006**), qui ont **montré** que *A. niger* a un grand potentiel pour produire les lipases extracellulaires.

Un autre travail dans le même contexte a été publié par **Abdullah K. et AL-Bader (1990)**, qu'ont annoncé la production de lipase et d'estérase chez 13 isolats isolées du sol (Iraq). Quatre du genre *Aspergillus* (*A. candidus*, *A. Fumigatus*, *A. niger*, *A. terreus*) et aussi 9 isolats de différentes espèces.

Nos résultats sont en accord avec **Compaoré H et al., (2017)** qui ont prouvées que les souches ; *A. flavus*, *A. fumigatus*, *penicillium sp*, était capables de produire lipases extracellulaires

Cependant, **Ben Younes et Sayadi (2011)** ont examiné la présence des lipases chez 37 isolats, les résultats obtenus montrent l'absence d'activité lipolytique chez tous les isolats testés.

En fait, les données littéraires ont rapporté que les moisissures sont capables de produire un grand nombre d'enzymes, qui sont d'une valeur commerciale élevée (**Zhou *et al.* 2000 ; Chacrabarty *et al.*, 2008 ; Avramenko et Galynkin, 2010**). Ce résultat justifie aussi l'intérêt que portent les chercheurs sur ce type de microorganismes, un intérêt qui n'a cessé de s'accroître au cours de ces dernières années, principalement en raison du grand nombre d'application que les enzymes offrent dans des domaines très variés (**Keyhani et Roseman, 1999 ; Bhat, 2000 ; Mobini Dehkordi et Javan, 2012**)

Conclusion

Et

Perspectives



Conclusion

L'objectif de notre travail consiste à l'isolement et l'identification des souches fongiques thermophiles et mettre en évidence de l'activité enzymatique hydrolytique extracellulaire (Amylase, protéase, cellulase, Pectinase, lipase et estérase) élaborée par les souches isolées.

Les souches fongiques (moisissures) ont été isolées à partir d'un sol proche d'une source thermale. Les échantillons ont été prélevés à partir de deux régions ; Hammam AbdAllah (Bouhama- Mila) et Hammam Beni Ghuecha (Ferdjioua- Mila).

En effet les cultures et la purification des prélèvements effectués sur le milieu PDA, ont permet d'isoler dix (10) souches fongiques,

L'identification des dix souches fongiques a été basé sur l'étude macroscopique et microscopique et qui a montré que ces isolats de moisissures sont repartis en quatre genres : Le genre *Aspergillus* est majoritaire avec 50% regroupé en 5 espèces (*Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus* et *Aspergillus sp1*), suivi par le genre *Penicillium* avec un pourcentage de 30 %, le genre *Absidia* 10% et le genre *Cladosporium* 10 %.

Pour la mise en évidence de l'activité enzymatique nous avons utilisé de différents milieux gélosés sélectifs additionnés de substrat spécifique de chaque enzyme (Amidon 1%, lait écrémé, CMC, pectine, Tween 20 et Tween 80).

Les résultats obtenus après l'incubation des différentes souches sur les milieux sélectifs pour la recherche d'activité enzymatique ont montré clairement la capacité de chaque souche sélectionnée à sécréter l'enzyme, nous avons remarqué que la totalité des souches isolées ont la capacité de produire les différentes enzymes,

Les deux souches *Aspergillus niger* et *Penicillium sp* présentent des activités importantes, et sont considérées comme des moisissures performantes pour la production de diverses enzymes hydrolases thermostables, elles ont occupé un grand potentiel à l'échelle industrielle qui intervient dans plusieurs applications.

Au vu des résultats préliminaires obtenus, cette étude de la production des enzymes hydrolases par les souches fongiques doivent être poursuivies, approfondies et accomplies par les perspectives suivantes :

- Analyse des paramètres physicochimiques des échantillons du sol.
- Identification des souches fongiques par des techniques de biologie moléculaire (PCR)
- Production des enzymes par la fermentation et détermination de leur propriétés Physiques et chimiques optimales (Température, pH, salinité...) pour l'utilisation industrielle.
- Extraction et la purification des enzymes produites par des techniques HPLC, électrophorèses. et étudier leur mécanisme d'action

Références
Bibliographies

-A-

Abdallah K., Al Bader SM. (1990). On the thermophilic and thermotolerant mycoflora of Iraqi soils. *Sydowia* **42** : 1-7.

Avramenko S.V., Galyntin V.A. (2010). Features of biosynthesis of chitinolytic enzymes by *Streptomyces griseus* Var. *Streptomycini*. *Applied Biochemistry and Microbiology*. **46**(4). 405- 408.

Adjimi M. et Kebkoub A. (2019). Activités hydrolases de moisissures isolées du sol des sources thermales. Mémoire de master, université Mohamed Khider de Biskra, Algérie, 29-33.

Aidoo E. F., Herdey R. et Wood B. J. B. (1981). Estimation of fungal growth in a solid-state fermentation system. *European J. Appl. Microbiol. Biochem.* **33**, 6284-6294.

Akbatche N., et Bariout S. (2007). Utilisation de planification expérimentale pour l'optimisation d'un milieu de culture à base de farine de dattes déclassées pour la production d' α -amylase de *Rhizopus oryzae*. Mémoire d'ingénieur, INATAA, université Mentouri, Constantine. 41

Aksas K. (2016). Nomenclature et Classification Des enzymes, Les cofacteurs, les isoenzymes .2^{ème} année pharmacie. 84..

Agger T., Sphor A B., Carlesen M. et Nielsen J. (1998). growth and Product formation of *Aspergillus oryzae* during submerged cultivations verification of morphologically structured model using fluorescent. *Probs. biotechnol. bioeng.* **57**, 321-329.

Agrawal D., Patidar P., Banerjee T. et Patil S. (2005). Alkaline protease production by a soil isolate of *Beauveria felina* under SSF condition: parameter optimization and application to soy protein hydrolysis. *Proc. Biochem.* **40** : 1131–1136

-Alain K., Claire G., Anne G., Daniel P., Keller N., (2011). The fungal treasure chest: Spore origins? *Fungal Biol. Rev.* 25.

Alvarez -Ropdriguez M.L., Lopez-Ocana L., Lopez C., Rodriguez N.E., Martinez M.J., Larriba G., Coque J-J.R. (2002). Cork taint of wines: role of filamentous fungi Isolated from rock in the function of 2,4,6- Trichloroanisol by O methylation of 2,4,6 – Trichlorophenol. *Appl. Environ. Microbiol.* **68** (12) :5860-5869.

Alkorta I., Garbisu C., Llama M.J., Serra J.L. (1998). Industrial applications of pectic enzymes: A review. *Proc. Biochem.* **33** (1): 21-28.

Amaud A., Berset C., Bocquet J., Bouix M., Cerisie Y., Cuvellier EG.F., De Nettancourt D., Engasser J.M., GaW P., Goursaud J., Cnrenini M., Guiraud J.P., Richard, H.,

Steenbrugge, H., Teoule, E., Thomas, D. et Vandecasteele, J.P. (1993). Biotechnologies. 4^{ième} (ed)., Scriban R. (éd), Technique et Documentation Lavoisier. Paris, France, 904.

Amjad K., (2011). Isolation and characterization of three thermophilic bacterial strains (lipase, cellulase and amylase) from hot springs in Saudi Arabia. *Afric.J.Biotechnol.* **10**(44):8834-8839.

Amin M., Bhatti H. N., Zuber M., Bhatti I. A. & Asgher M. (2014) Potential use of agricultural wastes for the production of lipase by *Aspergillus melleus* under solid state fermentation. *J. Animal. Plant.Sci.* **24**: 1430-1437.

Amoozegar M.A., Fatemi Z.A., Karbalaeei-Heidari H.R. and Razavi M.R. (2007). Production of an extracellular alkaline metalloprotease from a newly isolated, moderately halophile, *Salinivibrio* sp. strain AF-2004. *Microbiol. Res.* **162**: 369-377

Antranikian G. (2009). Extremophiles and Biotechnology in: Encyclopedia of Life Sciences (ELS). John Wiley & Sons, Ltd: Chichester. 1-5.

Aouarib K et Lemsara R (2016). Etude des activités antimicrobienne et enzymatique des champignons endophytes isolés à partir d'*Artemisia absinthium*. Mémoire Académique Université Kasdi Merbah-Ouargla, 49-51.

Auberger B., Lamberet G. & Lenoir J. (1985) Les activités enzymatiques de *Penicillium camemberti*. *Le lait.* **59**: 244-268.

Avramenko S.V., Galyntkin V.A. (2010). Features of biosynthesis of chitinolytic enzymes by *Streptomyces griseus* Var. *Streptomycini*. *Appl. Biochem.Microbiol.* **46**, (4).405-408.

-B-

Basil A.A., Read N.A., Khudor M.H. (2021). Poultry Feed Fungi A Practical Guide. College of Veterinary Medicine , University Of Basrah, Iraq. 1-49

Banakar S P., Thippeswamy B. (2012). Isolation, production and partial purification of fungal extracellular pectinolytic enzymes from the forest soils of Bhadra Wildlife Sanctuary, Western Ghats of Southern India. *J Biochem Tech.* **3**(5) : S138-143.

Basil A.A., Khudor M.H., Raed N.A. (2021). Fungi in Poultry feed with detection aflatoxins and study other aspects of fungi.

Barnabé S., Sasseville J- L., Tyagi R- D. et Valéro J-R. (2003). Eaux usées et résidus industriels, matières tertiaires ou matières premières ? VECTEUR environnement. **36** (2), 50-62.

Beg O.K., Saxena R.K., Gupta R. (2002). Kinetic constants determination for an alkaline protease from *Bacillus mojavenis* using response surface methodology. *Biotechnol Bioeng.* **78**: 289-295.

Bèguin P., Aubert J P. (1994). The biological degradation of cellulose, fems, Microbiol. Rev.13; 25-58.

Beldman G., Searle-Van Leewen M.F., Rombouts F.M., Voorzangen F.G.J. (1985). The cellulose of *Trichoderma viride*. Purification, characterisation and comparaison of al detectable endoglucannases, exoglucanases and α -glucosidases. *Eur J Biochem.* **146** : 301-308

Belmessikh, A. (2011). Optimisation de la production de la protease neutre par *Aspergillusoryzae* sur milieu à base de dechets de tomates. Comparaison entre milieu solide et milieu liquide. Memoire de magister. Universite Mentouri Constantine.

Benaouida K. (2008). Etude de l'alpha amylase de levure isolées d'un écosystème extrême (sol environnant des sources thermales) et cultivées sur un milieu à base de lactosérum. Thèse magister. Biotechnologie microbienne. Constantine. UM. 104.

Bancerz R. Ginalska G., Fiedurek J. & Gromada A. (2005). Cultivation conditions and properties of extracellular crude lipase from the psychrotrophic fungus *Penicillium chrysogenum* 9. *J. Microbiol. Biotechnol.* **32**: 253–260

Benkahoul M., Belmessikh A., Boukhalfa H. et Mechakra-Maza A. (2017). Optimisation à l'aide d'un plan d'expériences de la production d'une protéase fongique sur milieu à base de déchets agro-industriels. Journal Article, sciences et techniques issue N°75.

Ben kherara L., Benbouzid N. (2020). Activités hydrolases des moisissures isolées du sol des sources thermales. Mémoire de Master. Microbiologie appliquée.21_22

Bensmira S. (2009). Isolement et caractérisation de souches fongiques de milieux extrêmes (Sol et Sebkha de la région de Biskra) productrices de cellulase thermostable à intérêt industriel.

Ben Younes, S. K., & Sayadi, S. (2011). Isolation of thermophilic fungal strains producing oxido- reductase and hydrolase enzymes from vario us Tunisian biotopes. International biodeterioration & biodegradation, 1104-1109.

Berthier J., Valla G. (2002). Moisissures-Mycotoxine et Aliment : Du risque à la prévention. Université Claude Bernard Lyon I. page web consultée le 13 janvier 2008 [http://handy.univ – lyon2.fr/service/cours/mycot/mycot.html](http://handy.univ-lyon2.fr/service/cours/mycot/mycot.html)

Bhat M K. (2000). Cellulases and related enzymes in Biotechnology. *Biotechnol Adv.* **18**: 355-383.

Blackwell M., Vilgalys R., James T.Y., Taylor J.W. (2012). Fungi. Eumycota: mushrooms, sac fungi, yeast, molds, rusts, smuts, etc. Version 30 January 2012.in The Tree of Life Web Project, <http://tolweb.org/>.

Boiron P. (1996). Organisation et biologie des champignons. Edition Nathan : 13-69

Botton B., Breton A., Fèvre M., Gauthier S., Guy P., Larpent J.P., Reymond P., Sanglier

J.J., Vayssier Y .et Veau P. (1990). Moisissures utiles et nuisibles, Importance industrielle, 2^{ème} (Ed). Masson collection biotechnologies. 5-10.

Bouchet P. H., Guignard J.L., Villard J. (1999). Les champignons, Mycologie fondamentale et appliquée. Ed. Masson, Paris. 194.

Boukaa, M. (2015). Isolement des microorganismes producteurs de lipases à intérêt biotechnologique. Mémoire Master : Biotechnologie Microbienne. Fès, Maroc : Université Sidi Mohammed Ben Abdellah. 37.

Bourgeois C.M., Mescle J.F. et Zucca J. (1989). Microbiologie alimentaire. Aspect Microbiologique de la sécurité et de la qualité des aliments. Lavoisier. Paris. 216-244.

Bourgeois C-M., Mescle J F., Jucca J. (1996). Microbiologie alimentaire Tome 1 : Aspect microbiologique de la sécurité et de la qualité des aliments. Edition : *Tec et Doc Lavoisier*. France.

Bougherara Chahrazad., Aliani Mabrouk. (2017). Étude de l'effet d'un extrait enzymatique protéolytique d'*Aspergillus niger* sur la gliadine

Boulefkhad N., Talhi A. (2018). La mise en évidence de la production de quatre enzymes (protéase, amylase, cellulase et pectinase) par des micro-organismes isolés à partir d'eau thermale et sol proche des sources thermales. Mémoire de Master. Microbiologie Générale et Biologie Moléculaire des Micro-organismes, Université : Mentouri, Constantine, 53-59.

Branger A., Richer M.M., Roustel S. (2007). Alimentation, sécurité et contrôles microbiologique. (ed); Educagri. 38.

Bruins M. E., Janssen A. E. et Boom R. M. (2001). Thermozyms and their application: A review of recent literature and patents. *Apl Biochem and Biotechnol.* **90** (2), 155-186.

Burhan A., Unaldi N., Coral G., Colak O., Aygan A., Gülnaz O. (2003). Enzymatic properties of a novel thermostable, thermophilic, alkaline and chelator resistant amylase from an alkaliphilic *Bacillus* sp. Isolate ANT-6. *Process Biochem*, **38** : 1397-1403.

-C-

Cahagnier B.1998. Moisissure des aliments peu hydratés. *Lavoisier-Tec &Doc*, Paris. 96-135.

Calero-Rueda O., Plou F.J., Ballesteros A., Martinez A.T., and Martinez M.J., (2002): Production, isolation and characterization of a sterol esterase from *Ophiostoma piceae*. *Biochem. Biophys. Acta.* **1599**: 28–35.

Cihangir N., Sarikaya E. (2004). Investigation of lipase production by a new isolate of *Aspergillus* sp. *World J. Microbiol. Biotechnol*, **20** : 193_197.

Chabasse D., Bouchara JP., De gentile L., Brun S., Cimmon B., Penn P. (2002). Cahier de formation les moisissures d'intérêt médicale.

Chakraborty K. & Paul Raj R. (2008). An extracellular alkaline metalloproteinase from *Bacillus licheniformis* MTCC6824: Purification and biochemical characterization. *Food chemistry*. **109**: 727-736.

Chakraborty S., Khopade A., BiaoJian W., Liu X., et al., (2011). Characterization and stability studies on surfactant, detergent and oxidant stable α -amylase from marine haloalkaliphilic *Saccharopolyspora* sp. A9. *J. Mol. Cat. B: Enz.* **68**(1), 52-58

Chahinian H., Vanot G., Ibrik A., Rugani N., Sarda L. & Comeau L.C. (2000). Production of extracellular lipase by *Penicillium cyclopium* Purification and characterization of a partial acylglycerol lipase. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **64**: 215- 222.

Chahinian, H; Sarda, L. (2009). Distinction between esterases and lipases: Comparative biochemical properties of sequence –related carboxylesterases protein. *pept. lett.* **16**: 1149-1161.

Chamekh, R. D.L & Belabid, L. (2019). Isolation, identification and enzymatic activity of halotolerant and. *Mycobiology* , **47** (2), 230-241 49-1161.

Chandrasekaran S., Kumaresan S.S.P., Manavalan M. (2015). Production and Optimization of Protease by Filamentous Fungus Isolated from Paddy Soil in Thiruvavur District Tamilnadu. *J. Appl. Bio. Biotechnol.* **3**(6): 66-69.

Chaput Ludovic. (2012). Compréhension de l'énantio sélectivité de la lipase B de *Candida antarctica* : étude par modélisation moléculaires et expérimentation. Thèse de Doctorat en Biochimie. L'université de La Rochelle. 12_13

Chi Z., Ma C., Wang P., Li H.F. (2007). Optimization of medium and cultivation conditions for alkaline protease production by the marine yeast *Aureobasidium pullulans*. *Bioresour. Technol.*, **98**: 534–538.

Choi Y.J., Lee B.H. (2001): Culture conditions for the production of esterase from *Lactobacillus casei* CL96. *Bioprocess Biosyst. Eng.* **24**: 59–63.

Compaoré H., Sawadogo L.H., Samandoulougou S., Guira F., Savadogo A., Traore S.A., (2017). Aptitude de trois souches de moisissures à produire des enzyme extracellulaires en milieu solide au Burkina Faso.. *J. Appl. Biosci.* **110** : 10776-10782

Cooney D. G. et Emerson R. (1964). Thermophilic fungi. An account of their biologic activities and classification. San Francisco & London, W. H. Freeman Clife & Co. 188

Cordova Lopez, J. A. (1998). Isolement, identification et physiologie des champignons Thermophiles en vue de la production de lipases par fermentation en milieu solide. Thèse de doctorat, Université de Montpellier II sciences et techniques du Languedoc, Mexique, 267.

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

-D-

- Dai Z., Mao X., Magnuson J. K. & Lasure L. L. (2004).** Identification of genes associated With morphology in *Aspergillus niger* by using suppression subtractive hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.* **70** (4): 2474-2485
- Dahot M. O. (1987).** Stadies on proteolytic enzyme. Part I. Characteristics of protease synthesis by *Penicillium expansum*. *Pakistan J. Sci. Ind. Res.* **30** (3): 194-196
- D'Annibale A., Giovannozzi Sermanni G., Federici F. & Petruccioli M. (2006).** Olive mill wastewaters: a promising substrate for microbial lipase production. *Biores. Technol.* **97**:1828–1833.
- Davidson R., Gertler A. & Hofmann T. (1975).** *Aspergillus oryzae* acid proteinase. Purification and properties, and formation of pi-chymotrypsin. *Biochem. J.* **147** (1) :45-53.
- Debananda S., Pintubala K., Suchitra S., Salam N. (2009).** Screening, identification of best producers and optimization of extracellular proteases from moderately halophilic alkali thermotolerant indigenous actinomycetes. *World J.Appl. Sci.* **7**: 907-916.
- Demain A.L. (2000).** Microbiol Biotechnology (feature). *Trend. biotechnol.* **18**(1) : 26-31.
- Dendouga Wassila, (2006).** Isolement et identification de moisissures productrices de Protéases à partir de milieux extrêmes. Extraction et étude des propriétés de la protéase produite. Mémoire : Magister en Biochimie-Microbiologie appliqués.
- Diana S., Parra R., Karla G.C., Leticia V., Alexandro B. (2016).**
- Diba K., Kordbacheh P., Mirhendi SH., Rezaie S., Mahmoudi M. (2007).** Identification of *Aspergillus* Species Using Morphological Characteristics. *Pak J Med Sci.* **23**: 6 867-872
- Ding J., Yu T., Liang L., Xie Z., Yang Y., Zhou J., et al. (2014):** Biochemical characterization of a GDSSL-motif esterase from *Bacillus sp. K91* with a new putative catalytic Mechanism. *J. Microbiol. Biotechnol.* **24** : 1551–1558.

Durand G. & Monson P. (1982). Les enzymes : production et utilisations industrielles. Bordas. Paris. 36-153.

-E-

- Ertan F., Balkan B. (2007).** Production of a-Amylase from *Penicillium chrysogenum* under Solid-State Fermentation by Using Some Agricultural By-Products. *Food Technol.Biotechnol.* **45** (4): 439-442.

-F-

- Favela-Torres E., Volke-Sepúlveda T. & Vniegra-Gonzalez G. (2006).** Production of hydrolytic polymerizing pectinases. *Food Technol. Biotechnol.*, **44**(2), P: 221-227

Fenghour H., Ladjama A., TAIBI Z. (2002). Recherche de l'activité pectinolytique chez 22 souches de champignons microscopiques isolées d'un sol de la région d'EL Kala. *Technologies avancées*. **14** (1), 55-60.

Ferguani et Lakhel. (2015) Activités cellulytiques de *trichoderma longibrachiatum* cultivé sur son de blé. Mémoire Master Biotechnologies de mycètes. Constantines Université Mentouri, 56.

Fernandez-Lahore H.M., Fraile E. R. & Cascone O. (1998). Acid protease recovery from a solid fermentation system. *J. Biotechnol.* **62**: 83-93

Fernández J., Mohedano A.F., Fernández-García E., Medina M., Nuñez M. (2004):Purification and characterization of an extracellular tributyrin esterase produced by a cheese isolate, *Micrococcus* sp. INIA 528. *Int. Dairy J.* **14** : 135–142.

Ferrero M.A., Castro G.R., Abate C.M., Baigori M.D., Sineriz F. (1996). Thermostable Alkaline proteases of *Bacillus licheniformis* MIR 29: isolation, production and characterization. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **45** : 327–32

Fickers, P ; Destain, J ; et Thonart, P. (2007). Les lipases sont des hydrolases atypiques : Principales caractéristiques et Application. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ* **12**(2) : 119-130

Fickers, P ; Destain, J ; Thonart, Ph. (2008). Les lipases sont des hydrolases atypiques principales caractéristiques et application. *biotechnol. agron. Soc. Environ* .**12**(2) 119-130.

Fogarty W.M., Kelly C.T. (1980). Amylase, amyloglucosidase and related glucanases. In Rose (A.H.) Ed. *Economic microbiology, microbial enzymes and bioconversion*. London: Academic Press, Vol. 5, P: 115-170.

Frazier W.C. (1967). Food microbiology. *Academic presse*. London. 3- 429.

-G-

Gao J., WengH., Zhou D., Yuan M., Guan F. et Xi Y. (2008). Production and characterization of cellulolytic enzymes from the thermoacidophilic fungal *Aspergillus terreus* M11 under solid state cultivation of corn Stover. *Bioressour Technol.* (99), 7623-7629.

García Gómez M J., Huerta Ochoa S., Loera Corral O., Prado Barragán LA. (2009). Advantages of a proteolytic extract by *Aspergillus oryzae* from fish flour over a commercial proteolytic preparation. *Food Chem.* (112), 604–608.

Germano S., Pandey A., Osaku C.A., Rocha S.N., Soccol C.R., (2003). Characterization and stability of proteases from *Penicillium* sp. produced by solid-state fermentation. *Enz Microb. Technol.*, **32**; 246–251.

Ghosh D., Erman M., Duax, W.L., (1991): Crystallization and preliminary diffraction analysis of cholesterol esterase from *Candida cylindracea*.. *J Steroid Biochem. Mol. Biol.* **38**: 663– 665.

Gilhan D., Lehner R. (2005). Techniques to measure lipase and esterase activity in vitro. *Methodes*.**36**: 139-147.

Giuliani S., Piana C., Setti L., Hochkoeppler A., Pifferi P.G., Williamson G., Faulds C.B. (2001): Synthesis of pentylferulate by a feruloyl esterase from *Aspergillus niger* using water-in-oil microemulsions. *Biotechnol. Lett.* **23**: 325–330.

Guimarães L.H., Peixoto-Nog, S.C., Michelin M., Rizzatti, A. C. Sandrim, V. C. Zanoelo, F. F et al. (2006). Screening of filamentous fungi for production of enzymes of biotechnological interest. *Brazilian.J.microbiol*, **37**, 474-480.

Guiraud J. P., 1998. Microbiologie alimentaire. *Dunod*, Paris,7-330.

Gupta R., Beg Q. K. and Lorenz P. (2002). Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol*, **59**: 15-32

Gupta R ., Paresh G., Harapriya M., Vineet Kumar G., Bhavna C. (2003). Microbial α amylases: *a biotechnol perspective*. **38**:1599-161

Gusakov A.V., Sinitsyn A.P., Markov A.V., Skomarovsky A.A., Sinitsyna O.A., Berlin A.G., Ankudimova N.V. (2000). Indigo-binding domain in cellulase molecule. Biocatalysis fundamantals and applications.

Gusakov, A.; Sinitsyn, A.; Berlin, A.; Markov, A. et Ankudimova, N. (2007). Desing of highly efficient cellulase mixtures for enzymatic hydrolysis of cellulose *Biotechnol. Bioeng* **97** : 1028–1038.

-H-

Hajji M., Kanoun S., Nasri M. et Gharsallah N. (2007). Purification and characterization of an alkaline serine-protease produced by a new isolated *Aspergillus clavatus* ES1. *Proc. Biochem.*, **42**: 791–797.

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

Hasper A., Dekkers E., Mil M.V., Van de Vondervoort P.j.i., De Graaff L.H. (2002). Egl C, a new endoglucanase from *Aspergillus niger* with major activity towards xyloglucan. *Appl. Environ.Microbiol.***68** (4): 1556-1560.

Hatzakis N.S., Daphnomili D., Smonou I. (2003): Ferulic acid esterase from *Humicola insolens* catalyzes enantioselective transesterification of secondary alcohols. *J. Mol. Catal. Enz.* **21**: 309–311

Hauschner K., Hilgendor P., Hofbauer C., Demeester J. & Lauwers A. (1996). New international F.I.P. method for the determination of the activity of *Aspergillus oryzae* proteases. *Pharmazie*. **51** (12): 946-50.

Hendriksen H. V., Pedersen S., Bisgard-F. H. 1999. A process for textile warp sizing using enzymatically modified starches cultivate on state fermentation system. European. *J. Appl. Microbiol. Biochemi.* **33**: 6284-6294

Heritage J., Evans E-G-V., Killington R-A. (1996). Introductory microbiology. (Ed): Cambridge university Press: 8-18-23..

Hiol A., Jonzo M.D., Rugani N., Druet D., Sarda L. & Comeau L.C. (2000). Purification and characterization of an extracellular lipase from a thermophilic *Rhizopus oryzae* strain isolated from palm fruit. *Enz . Microbial. Technol.* **26**: 421–430

Hoondal G., Tewari R., Dahiya N., Beg Q. (2002) Microbial alkaline pectinases and their industrial applications: *Rev.appl.Microbiol.biotechnol.* **59**:409–418

Horne I., Harcourt R.L., Sutherland T.D., Russell R.J., Oakeshott J.G. (2002): Isolation Of a *Pseudomonas monteilli* strain with a novel phosphotriesterase. *FEMS Microbiol. Lett.* **206**: 51– 55.

Hozzein Wael N., Li Wen-Jun, Ali Mohammed I.A., Ola Hammouda Mousa, Ahmed S., Xu Li-Hua, Jiang Cheng-Lin. (2004). *Nocardiopsis alkaliphila* sp. nov., a novel alkaliphilic actinomycetes isolated from desert soil in Egypt. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **54**: 247– 252.

-I-

Iftikhar T., Niaz M. & Haq I.U. (2010). Comparative studies on the lipolytic potential of wild and mutant strains of *Rhizopus oligosporus* var. *Microsporous IIB- 63* isolated from lipid rich habitats. *Pak. J. Bot*, **42**(6): 4285-4298.

Igarshi K., Hatada Y., Hagihara H., Saeki K., Takaiwa M., Ulmura T., Ara K., Ozaki K., Kawai S., Kobayashi T. and Ito S. (1998). Enzymatic properties of novel liquefying –amylase from an alkalophilic *Bacillus* isolated and entire nucleotides and amino acids sequences. *Appl. Environ. Microbiol.*, **64**(9): 3282-3289.

Ire F.S. & Ike V.C. (2014). Screening and Optimization of Process Parameters for the Production of Lipase in Submerged Fermentation by *Aspergillus carbonarius* (Bainier) IMI 366159. *Annual Research & Review in Biology*. **4**(16): 2587-2602

-J-

Jayani R-S., Saxena S. et Gupta R. (2005). Microbial pectinolytic enzymes: *Rev. Proc Biochem.* (40), 2931–2944.

Jaeger K. E., Schneidinger B, Rosenau F, Werner M, Lang D, Dijkstra B. W., Reetz M. T. (1997). Bacterial lipases for biotechnological applications. *J. Molec.Ctz. Enz.* 3(1-4):3–12.

Jaeger K. E., Eggert T. (2002): Lipases for biotechnology. *Current opinion in biotechnology.* 13:390-397.

Jernejc K. & Cimerman A. (2001). Morphological characteristics, extracellular and intracellular protein and enzyme patterns of five *Aspergillus* species. *Food Technol. Biotechnol.* 39 (4): 333-340.

-K-

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

Kader A.J., Omar O., and Feng L.S. (1999). Isolation of cellulolytic fungi from the barrio Highlands, Sarawak. University of Kebangsaan, Malaysia. *Revi. Biodiver. Environ. Conserv.*

Karbalaee-Heidari H.R., Amoozegar M.A. and Ziaee A.A. (2009). Production, optimization and purification of a novel extracellular protease from the moderately halophilic bacterium. *J. Indust Microbiol .Biotechnol* , 36: 21- 27

Kathiresan K., Manivannan S. (2006). α -Amylase production by *Penicillium fellutanum* isolated from mangrove rhizosphere soil. *Afr.J. Biotechnol.* 5(10). 829–832.

Kendrick B. (1999) the fifth kingdom.2nd (ed). Mycologue Publications. [http://www.mycolog.com /fifthtoc.htm](http://www.mycolog.com/fifthtoc.htm).

Keyhani N.O., Roseman S. (1999). Physiological aspect of chitin catabolism in marine bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta.* (14)73: 108-112

Khokhar I., Haider M S., Mushtaq S., Mukhtar I. (2012). Isolation and Screening of Highly Cellulolytic Filamentous Fungi, *J. Appl. Sci. Environ. Manage.* 16 (3) 223 – 226

Khoo S. L., Amirul A. A., Kamaruzaman M., Nazalan N. et Azizan M. N. (1994). Purification and characterization of α -amylase from *Aspergillus flavus*. *Folia Microbiol.* 39(5): 392-398.

Kitamoto N., Go M., Shibayama T., Kito Y., Ohmiya K., Tsukagoshi N. (1996). Molecular cloning, purification and characterisation of two endo-1,4- β -glucanases from *Aspergillus oryzae* KBN 616. *Appl. Microbiol. Biotechnol* .46: 538-544

Korish M. (2003). Production, purification, properties and application of the cellulose from a Wild type strain of a yeast isolate. Faculty of biology, Johannes Gutenberg-University, mainz, germany.

Kaur G., Kumar S and T. Satyanarayana. (2004). Production, characterization and application of a thermostable polygalacturonase of a thermophilic mould *Sporotrichum thermophile* Apinis. *Bioresour Technol*, **94**: (239-43).

Kumar A., Dharm D., Archana G. (2015). Screening of Fungal Resources for the Production of Cellulases and Xylanases. *British Biotechnol J*, **9**(1): 1-13.

Kumar Anand., Thirupathi K., Pritam B.S. (2019). Isolation, Identification and Characterization of Fungi from Vinoba Bhawe University Campus, Hazaribag District. *Innov. Matrl. Sci. Engineerin.* 115-123.

Kumar G.et Nagesh N. (2008). Purification of extracellular acid protease and analysis of fermentation metabolites by *Synergist's* sp. utilizing proteinaceous solid waste from tanneries. *Bioresour Technol.* (99), 2364-2372.

-L-

Lambert G. & Lenoir J. (1972). Aptitude de l'espèce *Penicillium caseicolum* à la production d'enzymes lipolytiques. *Le Lait*. 513-514.175-192

Larpent-gourgaud M., Sanglier J.J. (1992). Biotechnologies, principes et méthodes. (ed) Doin. 574 -581.

Larriba G., Coque J-J.R. (2002). Cork taint of wines: role of filamentous fungi Isolated from rock in the function of 2,4,6- Trichloroanisole by O methylation of 2,4,6 – Trichlorophenol. *Appl. Environ.Microbiol.* **68** (12) :5860-5869.

Lateef A., Oloke J-K., Gueguim-Kana E-B. et Adebayo I., (2004). Aspects of the isolation and characterization of thermostable α -amylase from *Alternaria alternata*. *Global Journal of Pure and Applied Sciences*, **10** (1). 75-79.

Laxman, R.S., Sonawane, A.P., More, S.V., Rao, B.S., Rele, M.V., Jogdand, V.V., Deshpande, V.V., Rao, M.B. (2005). Optimization and scale up of production of alkaline protease from *Conidiobolus coronatus*. *Proc. Biochem.*, **40** ; 3152–3158

Leveau S. B. Bouix M. (1993). Les microorganismes d'intérêt industriel. *Edition Tec et Doc* Lavoisier. Paris, 216-244.

Leghlmi H. (2004). Optimisation de la production de la cellulase d'*Aspergillus niger* ATCC 16 404 cultivé sur un milieu à base de lactosérum : étude comparative entre *Aspergillus niger* ATCC 16 404 et *Aspergillus niger* O.Z isolée localement. Thèse de magistère. Université Mentouri. Constantine.

Lekchiri S., Moueqqit M., Lekchiri A. (2006). Mise en évidence d'une activité cellulase chez *Fusarium oxysporum f.sp albedinis* induite par une nouvelle forme d'hydrocellulose purifiée. Faculté des Sciences, Département de Biologie, Faculté des Sciences, Université Mohamed Ier, Oujda, Maroc.

Leveau S. B. Bouix M. (1993). Les microorganismes d'intérêt industriel. Edition Tec et DocLavoisier. Paris, 216-244.

Leyral G., Vierling E. (2001). Microbiologie et toxicologie des aliments : hygiène et sécurité alimentaire .3 Edition, DOIN, Paris ,15-20,268.

Li W. F., Zhou X. X. et Lu P. (2005). Structural features of thermozymes. *Biotechnol Adv.* **23** (4): 271-281.

Li, Y.H., M.Ding, J.Wang, G .J.Xu and F.zhao.(2006). A novel thermoacidophilic endoglucanase, Ba-EGA, from a new cellulose degrading bacterium, *bacillus* sp .AC-l. *Appl microbiol. Biotechnol*, **70** :430-436. lig: 199 -214.Ed Gauthier –Villard, Paris

Licia M., Pera Cintia M., Romero Mario D., Baigori and Guillermo R. Castro. (2006). Catalytic Properties of Lipase Extracts from *Aspergillus niger*. *Food Technol. Biotechnol.* **44** (2) 247–252

Liese A., Seelbach S., Wandrey C. et Wileyu V C H. (2000). Industrial biotransformations.

Lomolino G., Rizzi C., Spettoli P., Curioni A., Lante A. (2003): Cell vitality and esterase activity of *Saccharomyces cerevisiae* is affected by increasing calcium concentration. *AgroFood Industry Hi Tech.* **14**(6): 32–35.

Lonsane B.K., Ramesh, M.V. (1990). Production of bacterial thermostable α -amylase by solid state fermentation: a potential tool for achieving economy in enzyme production and starch hydrolysis. In: Advances in applied microbiology,. San Diego: California Academic Press. **35**:1-56.

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

-M-

Mobini-Dehkordi M., Fahime A.J. (2012). Application of alpha-amylase in Biotechnology.*Journal of Biology and Today's world.* 39-50

Madigan T. M. et Martinko M. J. (2007). Brock biologie des micro-organismes. Pearson. France.1047

Madika A., Ulem EA., Musa B., Sulaiman M.A., Hussaini. (2020). Criblage d'*Aspergillus Niger* isolé du sol pour la production de Pectinase.

Maheshwari R., Rajasekaran AK. (2000). Thermophilic fungi: an assessment of their potential for growth in soil. *J Biosci.* **18**(3):345

Maheshwari R., Bradwa J. G., Bhat M. K. (2000). Thermophilic fungi their physiology and enzymes. *Microbiology and Molecular Biology Reviws* **64**(3): 461- 488.

Malloch D. (1997). Moulds isolation, cultivation and identification. University of Toronto [Http// www. Botany. uto n ronto. ca/ researchlabs/ malloch/ moulds/ html](http://www.Botany.utoronto.ca/researchlabs/malloch/moulds/html).

Mama B., 2009. Valorisation des rebuts de dattes par la production d'amylases. Mémoire D'ingénieur. Université de Biskra, 54.

Mammeri M. (2017). Le Thermalisme de la région de Mila. Mémoire de magister en géologie. : 107-108.

María G., Zavala P., Villa R., Márquez A.L., Camano R.H.C. (2021), Applications of Fungal Pectinases. *Ency. Mycol.* **1**:316-325.

Mayordomo I., Randez-Gil F. & Prieto J.A. (2004). Isolation, Purification, and Characterization of a Cold-Active Lipase from *Aspergillus nidulans*. *J. Agric. Food Chem.* **48**: 105–109

Mwaurah P.W., Kumar S., Kumar N., Attkan A.K, Panghal A., Singh V.K.(2020). Novel oil extraction technologies: process conditions, quality parameters, and optimization. *Compr Rev Food Sci Food Saf.* **19**:3–20.

Mbarek I., Meddas Z. (2021). Protéase acide extracellulaire d'*Aspergillus niger* : purification et caractérisation. Mémoire : de Master, Biochimie appliquée Université Mohamed Khider de Biskra, 26-27.

Mehta V.J., Thumar J.T., Singh S.P. (2006). Production of alkaline protease from analkaliphilic actinomycete. *Bioresour. Technol.*, **97** : 1650–1654.

Mersaoui K., Bouchelaghem I. (2018). Production de l'enzyme alpha amylase par des champignons entomopathogènes cultivées sur milieu à base de déchets de bananes. Mémoire : Master. Option : Mycologie et Biotechnologie fongique, Université des Frères Mentouri Constantine, 47_48.

Metin K., Burcu Bakir Ateslier Z.,Basbulbul G., and Halil Biyik H. (2006): Characterization of esterase activity in *Geobacillus sp. HBB-4*. *J. Basic Microbiol.* **46** : 400–409.

Meunier N.E., (1999). Valuation du potentiel de production de protéases bactériennes à partir De boues d'épuration municipales.*M.ScThesis, INRSETE, Univ. Quebec. Canada.* 1-168.

Meziani et Mahcen (2017). Activités hydrolases des souches fongiques. Production par fermentation de cellulase et d' α -amylase par *Penicillium. sp* sur substrat solide. Mémoire : Microbiologie, Option : Biotechnologie des Mycètes : Fermentation et production de Substances fongiques. Constantine : Université Mentouri, 55.

Modler H. W., Brunner J. R. & Stine C. M. (1974). Extracellular protease of *Penicilliumroqueforti*. Production and characterization of crude enzyme preparation. *J. Dairy Sci.* 57 (5) : 523-543

Monson P. (1985). Les enzymes bios futurs. 35 : 25 - 28.

Mukherjee, A. K., Adhikari H., & Rai S.K. (2008). Production of alkaline protease by a thermophilic *Bacillus subtilis* under solid-state fermentation (SSF) condition using Imperata cylindrical grass and potato peel as low-cost medium: characterization and application of enzyme in detergent formulation. *J Biochem Engineer*, 39 : 353-361.

-N-

Najjar, A. (2010). Etude quantitative de la sécrétion de lipase. De la lipolyse et du stockage de lipides chez *Yarrowia lipolytica* lors de sa croissance en présence d'huile d'olive. Thèse d doctorat : Microbiologie et biotechnologies : Université de la méditerranée (Aix Marseille II),13

Nielson J-E., Borchert T-V et Vriend G. (2001). The determinant of α -amylase pH-activity profiles. *Protein Engineering*. Oxford University Press. 14(7): 505-512.2

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

Nigam (P.), Singh D. (1995). Enzymes and microbial systems involved in starch processing. *Enzyme Microb. Technol.* 17(9), P: 770-778.

Nishimura M., Inouye S. (2000): Inhibitory effects of carbohydrates on cholesterol esterase biosynthesis in *Streptomyces lavendulae* H646-SY2. *J. Biosci. Bioeng.* 90: 564– 566.

Nitinkumar P.P., Bhushan L.C. (2010). production and purification of Pectinase by Soil Isolate *Penicillium sp* and search for Better Agro-Residue for Its SSF. *Rec. Resr.Sci.Technol.* 2(7): 36-425

Nitin kumar P., Patil1 and Bhushan L. Chaudhari. (2010). Production and Purification of Pectinase by Soil Isolate. *Penicillium Sp* and Search for Better Agro –Residue for Its. *Recent Rec. Sci Technol* .2(7): 36-42

Nouaderi T (2011). -L' α -amylase de *Penicillium camemberti* PL 21 : Production, Purification, Caractérisation et Immobilisation. Mémoire de Magister. Université Mentouri. Constantine. 160.

-O-

Odier E., Rouau X. (1985). Les cellulases et les enzymes de dépolymérisation de la lignine. :199-214. (Ed) Gauthier-Villard, Paris

Onsori H., Zamani M.R., Motallebi M., Zarghami N. (2005) . Identification of over producer strain of endo- α -1,4- glucanase in *Aspergillus Species*: Characterization of crude carboxymethyl cellulose. *Afr. J. Biotechnol.* **4** (1) : 26-30.

-P-

Pasha K.M., Anuradha P., Subbarao D. (2013). Applications of Pectinases in Industria Sector. *Inter. J. Pure .Appl. Sci .Technol.* **16** (1): 89-95

Patel R., Dodia M., Singh S.P. (2005). Extracellular alkaline protease from a newly isolated haloalkaliphilic *Bacillus sp.*: Production and optimization. *Process Biochemistry*, **40**(11), 3569-3575.

Pelmont J. (1995). Enzymes : catalyseurs du monde vivant (No. 577.15 PEL).

Perkkarién A., Jones B.L., Niku-Paalova M.L. (2002). Purification and properties of an alkaline proteinase of *Fusarium culmorum*. *Eur. J. Biochem.* **269**: 798-807.

Pandey H, Kestwal A., Chauhan D, Kumari S., Dhalwal V., Singh J, Singh P., Mann P, Sharma A., Saxena G, Kapoor A and Giri B. (2018). Isolation and screening of potential fungi and standardization of a process for the production of extracellular lipase. *DU J. Undergrad. Res. Innov.* 116-123.

Pazur J H et Marchetti N T (1992). Action patterns of amylolytic enzymes as determined by the [1-14C] mlto-oligo-saccharides mapping method. *Carbohydr. Res.* **227**: 215-225

Pera L.M., Romero C.M., Baigori M.D. & Castro G.R. (2006). Catalytic Properties of Lipase Extracts from *Aspergillus niger*. *Food Technol. Biotechnol.* **44**: 247–252

Perkkarién A., Jones B. L., Niku-Paalova M. L. (2002). Purification and properties of an Alkaline proteinase of *Fusarium culmorum*. *Eur. J. Biochem.* **269**: 798-807.

Peter K. Robinson. (2015). Enzymes; principals and biotechnological applications **59**; 1 -41.

Prescott L.M., Harley J.P., Klein D.A. (2007). Microbiologie (ed) 2 française. (ed): De Boeck, Bruxelles, 553-558.

-R-

Rodríguez-Fernández, D., Rodríguez-León, J., De Carvalho, J., Sturm, W., & Soccol, C. (2011). The behavior of kinetic parameters in production of pectinase and xylanase by solid-state fermentation. *Biores Technol.* **102**(22), 10657-10662.

- Rajendran A. & Thangavelu. (2009).** Statistical experimental design for evaluation of medium components for lipase production by *Rhizopus arrhizus* MTCC 2233. Food Science and Technology. 1-26.
- Rapp, P., Beerman A. (1991).** Bacterial cellulases: 535-595. In C. H. Haigler and P. (ed.), Biosynthesis and biodegradation of cellulose. Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y.
- Rao M.B., Tanksale A.M., Ghatge M.S., Deshpande V.V. (1998).** Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. Microbiol. Mol. Biol. Rev., **62**; 597-635.
- Ray Rina R. (2001).** Production of alpha-amylase by an Alkalophilic *Penicillium griseoroseum* RR-99, Acta, Microbiological Polonica, 56(2) :102-109.
- Receveur V., Czjek M., Schulein M., Panine P., Henrissat B. (2002).** Dimension, shape, and conformational flexibility of two domaine fungal cellulases in solution probed by small angle X-ray scattering. *J Biol Chem.* **277** (43): 40887-40892.
- Reddy L. V., Wee Y.-J., Yun J.-S. and Ryu H.-W. (2008).** Optimization of alkaline protease production by batch culture of *Bacillus* sp. RKY3 through Placket Burman and response surface methodological approaches. *Bioresource Technology*, **99**: 2242-2249.
- Reddy P. L., and. Sreeramulu A. (2012).** Isolation and screening of Pectinolytic fungi from different soil samples of Chittoor district. *Int.J.Curr. Microbiol. Appl Sci.* **1**(3), 187_193.
- Reddy P. L., and. Sreeramulu A. (2012)** Isolation and screening of amylolytic fungi from different soil samples of Chittoor district, India. *Int.J. Curr. Microbiol. Appl Scis.* **1**(3), 187-193.
- Reddy P.L., Suresh B A., Radhaiah A., Sreeramulu A. (2014).** Screening, Identification and Isolation of Cellulolytic fungi from soils of Chittoor District, India, *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, **3** (7),. 761-771
- Reddy P. L., and. Sreeramulu A. (2016).** Journal of Pharmaceutical and Biological Sciences University, Tirupati-517502, A.P, INDIA; **4**(3): 92-95.
- Rihani A., Tichati L., Soumati B. (2018).** Isolation and identification of Lipase Producing Fungi from Local Olive Oil Manufacture in East of Algeria. Scientific Study & Research Chemistry & Chemical Engineering, Biotechnology, *Food Industry*. University of Badji Mokhtar Annaba .**19** (1), 013 – 022
- Rodríguez-Fernández D., Rodríguez-León J., De Carvalho J., Sturm W., & Soccol C. (2011).** The behavior of kinetic parameters in production of pectinase and xylanase by solid-state fermentation. *Biores Technol*, **102**(22), 10657-10662.

Ruchi G., Anshu G. & Khare S. K. (2008). Lipase from solvent tolerant *Pseudomonas aerogenosa* strain: production optimization by response surface methodology and application. *Biores. technolo.* **99**: 4796-4802.

-S-

Saha B.C., Freer S.N., Bothast R.J. (1994). Production, purification and proprieties of a thermostable (beta)-glucosidase from a color variant strain from *Aureobasidium pullulans*. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**(10) : 3774-3780.

Sahoo D.K., Das A., Thatoi H., Mondal K.C., Mohapatra P.K. (2012). Keratinase production and biodegradation of whole chicken feather keratin by anewly isolated bacterium under submerged fermentation, *Appl. Biochem. Biotechnol.* **167**: 1040-1051

Samanta S. (2021). Microbial pectinases. *J. Microbiol. Biotechnol. Food Sci.* **2021**: 248–266

Sandhya, C., Sumantha, A., Szakacs, G., Pandey, A. (2005). Comparative evaluation of neutral protease production by *Aspergillus oryzae* in submerged and solid-state fermentation. *Proc. Biochem.*, **40** ; 2689–2694.

Saroj A., Hemant S., Bhanu P., Prajapati & Naveen K. (2017). Isolation and screening of thermophilic and thermotolerant fungi for production of hemicellulases from heated environments. *Mycology*, **8**:3, 125-134.

Saroj P, Manasa P and Korrapati N. (2018). Characterization of thermophilic fungi producing extracellular lignocellulolytic enzymes for lignocellulosic hydrolysis under solid- state fermentation. *Biores. Bioproc.* 5:31

Saxena S., Shukla S., Thakur A., & Gupta R. (2008). Immobilization of polygalacturonases from *Aspergillus niger* onto activated polyethylene and its application in apple juice clarification. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*, 55(1) :33-51

Savitha J., Srividya S., Jagat R. Payal P., Priyanki S., Rashmi G W., Roshini K T., Saxena S., Shukla S., Thakur A., & Gupta R. (2007). Immobilization of polygalacturonase from *Aspergillus niger* onto activated polyethylene and its application in apple juice clarification. *Acta Microbiol et Immunolo Hungarica*, 55 (1) :33-51.

Scriban R. (1999). *Biotechnologie*. 5eme édition. Technique et Documentation. Lavoisier. Paris, 149-159.

Scriban R. (1993). *Trichoderma reesei* exhibits true reversibility and a high exchange rate on cristalline cellulose. *Biotechnol.* (ed) 4: 32-690.

Sethi B.K., Jana A., Nanda P.K., Das Mohapatra P.K., Sahoo S.L. 2016. Thermostable acidic protease production in *Aspergillus terreus* NCFT 4269.10 using chickling vetch peels. *J. Taibah. Univer. Sci.* **10**: 571–583.

Shantala Y M. (2007). Identification of potential fungal strain(s) for the production of inducible, extracellular and alkalophilic lipase, *Afr. J. Biotechnol.* **6**(5), 564-568.

Sharma R., Chisti Y., Banerjee U. C. (2001): Production, purification, characterization, application of lipases. *Biotechnol. Adv.***19**: 627-662.

Shehada W., Uraz G., Demire R., and Haluk H. (2021). Proteolytic Activity of *Aspergillus niger* Strains Isolated from Soil. *Inter. J. CurrMicrobiol. Appl. Scis.* **10**(02): 67-75.

Sierra G.A. (1957). Simple method for the selection of lypolytic activity of microorganisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substrates. *Antonie van Leewenhoek*; 23:15-22

Sindhu R., Binod P., Madhavan A., Sabeela U.B., Kuruvilla A. M., Abraham A., Pandey.A., Kumar V. (2007). Molecular improvements in microbial α -amylases for enhanced stability and catalytic efficiency. *Biores Technol.* **245**: 1740-1748.

Singh A. (1999). Engineering enzyme properties, *Indian. J. Microbiol*, **39** (2),65–77.

Scriban R. (1999). Biotechnologie. 5eme édition. Technique et Documentation. Lavoisier. Paris, 149-159.

Scriban R. (1993). *Trichoderma reesei* exhibits true reversibility and a high exchange rate on cristalline cellulose. *Biotechnol. (ed)* **4**: 32-690.

Sharma, R; Chisti, Y; Benerjee, UC. (2001). Production purification characterization and Application of lipases. *Biotechnol Adv*, **19**(8): 627-662

Singh S., Kunamneni A., Permaul K. (2005). Amylase production in solid state fermentation by the thermophilic fungus *Thermomyces* of Thermostable Enzymes. *Appl Biochem Biotechnol.*

Sinsuwan S., Rodtong S., Yongsawatdigul J. (2008). Production and characterization of NaCl-activated proteinases from *Virgibacillus* sp. SK33 isolated from fish sauce fermentation.*Proc. Biochem.*, **43** ; 185–192

Smith N. R., Gordon R.E., Clark F.E. (1952). Aerobic spores-forming bacteria. *J. Appl.Bact.* **27**: 78-99.

Snaiki J., Nadif A., Ouhssine M. (2006). Détection biochimique d'*Erwinia carotovora* sub sp. carotovora de tubercules de betterave sucrière atteints de pourriture molle.*Bull. Soc. Pharm. Bordeaux* .**145**:53-60.

Sodek K. J & Hofman T. (1970). Large-scale preparation and some properties of penicillo pepsin, the acid proteinase of *Penicillium janthinelum*. *Can. J. Biochem.* **48**: 425-431.

Sohail, M. Naseeb, S. Khan Sherwani, S. Sultana, S. Aftab, S. Shahzad, S et al. (2009). Distribution of hydrolytic enzymes among native fungi: *Aspergillus* the pre-dominant genus of hydrolase producer. *Pakistan.J.botani* , **41** (5), 2567-2582.

-T-

Tabuc C. (2007). Flore fongique de différents substrats et condition optimales de production des mycotoxines. Thèse de doctorat, Pathologie et Génétique. Université de Bucarest, Roumanie, pp.16-57.

Takashima, S., Nakamura A., Hidaka M., Masaki H., and Uozumi T. (1999). Molecular cloning and expression of the novel fungal beta-glucosidase genes from *Humicola grisea* and *Trichoderma reesei*. *J. Biochem.* **125** :728-736.

Tamura and Takeichi K. Y., Otozai K., Yamasaki M., Yamazaki G. H., Ohmura K. A., Nakayama Y. (1983). Alpha-amylase genes (amy R2 and amy E+) from an alphaamylase hyperproducing *Bacillus subtilis* strain: nucleotide sequences and. *molecular cloning J. Bacteriol*, **156** (1): 327.

Tan T., Zhang M., Xu J., Zhang J. (2004). Optimization of culture conditions and properties of lipase from *Penicillium camembertii* Thom PG-3. *Process Biochemi.* **39**: 1495-1502.

Tatiana da Costa RP, and Flevo F. (2005). Extraction and assay of pectic enzymes from Peruvian carrot (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft). *Food Chem.* **89**: 85-92.

Tatsinkou F.B., Taveai F., Ndjouenkeui R. (2005). Production and partial Characterization of a thermostable amylase from ascomycetes yeast strain isolated from starchy soils. *Afr.J. biotechnol.* **4**(1): 14-18.

Tensey M. R. et Brock T. D. (1978). Microbial life at high temperature, aerological aspect, Kushner. Life in extreme environments. Academic press. Ltd. London. United Kingdom.

Thomas Brock and Mercedes Edwards R. (1971). Fine Structure of *Thermus aquaticus*, an Extreme thermophile, *J. Microbiol.* **104** (1): 509-517.

Toscano L., Montero G., Cervantes L., Stoytcheva M., Gochev V., & Beltrán M. (2013) Production and partial characterization of extracellular lipase from *Trichoderma harzianum* by solid-state fermentation. *Biotechnol.Biotechnolo.Equipm.* **27**(2): 3776-3781.

-U-

Ulacio D., Perez C., Pineda Y. J. (1997). Mycoflora in tobacco plant roots (*Nicotiana tabacum*) in portuguesa state, Venezuela. *Bioagro* **9** (1): 3-11.

Ul-Haq I., Mukhtar H., Daudi S., Sikander A. & Quadeer M. A. (2003) Production of proteases by a locally isolated mould culture under lab conditions. *Vincent. Biotechnol* 2 (1): 30-36.

Urbanek H., Yirdaw G. (1984). Hydrolytic ability of acid protease of *Fusarium culmorum* and its possible role in phytopathogenesis. *Acta Microbiol. Pol.* 33 (2): 131.

-V-

Vidyalakshmi R., Paranthaman R., Indhumathi J. (2009). Amylase Production on Submerged Fermentation by *Bacillus* spp. *World Journal of Chemistry* 4 (1): 89-91

Varalakshmi K. N., Kumudini B. S., Nandini B. N., Solomon J., R. Suhas, 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

Vinod D Parde , Tewodros Ar , Mohan R A , Mohan R A, Kinetibeb B, and. Prasad H K R (2012). Role of the proteolytic Enzymes in the Living Organisms . *SInt. J. Int sci. Inn. Tech.* 1 (4), 32-41

Vulfson, E.N. (1994). Industrial application of lipases in P wooley SBP (eds) lipase: Their structure biochemistry and application. Cambridge university. press 271-286.

-W-

Wang D., Xu Y. & Shan T. (2008). Effects of oils and oil-related substrates on the synthetic activity of membrane-bound lipase from *Rhizopus chinensis* and optimization of the lipase fermentation media. *Bioch Engineer.J.* 41: 30–37.

Wesley E., Workmani and Donal F. Day. (1982). Purification and Properties of, B-Glucosidase from *Aspergillus terreus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 1289-1295.

Wu H., Mulchandani A., Chen W. (2008). Versatile microbial surface-display for environmental remediation and biofuels production. *Trend. Microbiol.* 14(4):181-188

Wu T.Y., Mohammad A.W., Jahim J.Md., Anuar N. (2006). Investigations on protease Production by a wild-type *Aspergillus terreus* strain using diluted retentate of pre-filtered Palm oil mill effluent (POME) as substrate. *Enz. Microb. Technol.* 39; 1223–1229.

Wu, C. G., and Kimbrough J. W. (1992). Ultrastructural studies of ascosporeogenesis in *Ascobolus immersus*. *Mycol.* 84:459-466.

-X-

Xu B., Hellman U., Ersson B., Janson J.C. (2000). Purification, characterisation and amino acid sequence analysis of a thermostable, low molecular mass endo- β -1,4-glucanase from xblue mussel, *Mytilus edulis*. *Euro. J. Biochem.* 267.:4970-4977

-Y-

Yadav R P., Saxena R K., Gupta R., Davidson S. (1998). Lipase production by *Aspergillus* and *Penicillium* species. *Folia Microbial.* 43(4), 373- 378.

Yuri. (2012). Short description and photographs of some photogenic microorganisms. University of Western Ontario (UWO) London.

-Z-

Zhou X., Huang J., Ou Z., Wang H., Wang R. (2000). Conditions of enzyme production and properties of alkaline lipase by Streptomyces Z94-2. Wei sheng Wu Xue Bao.40, 75-79

Zeikus J. G., Vieille C. et Savchenko A. (1998). Thermozyms : biotechnology and structure- function relationships. Extremophiles. 2 (3), 179-183.

Annexe 01 : solutions**➤ Eau physiologique**

Chlorure de sodium9g

Eau distillée1000ml

➤ Solution de chlorure de sodium (NaCl) 1M

Chlorure de sodium 58.44g

Eau distillée1000ml

Annexe 02 : Milieux pour l'isolement et la purification**➤ Milieu Potato Dextrose Agar (PDA)**

Pomme de terre :200g

Glucose :20g

Agar.....20g

Eau distillé.....1000ml

Préparation :

- Laver la pomme de terre non pelée. Couper en cubes dans 500 ml d'eau distillée.

- Ecraser la pomme de terre, filtrer puis ajouter le filtrat à la solution d'agar.

- Ajouter le glucose.

- Compléter le volume à 1000ml.

- Ajuster le pH= 6.4 à 25°C

- Stériliser par autoclavage à 121°C pendant 15min.

Annexe 03 : Milieux pour les tests enzymatique

➤ Milieu PDA à 1% d'amidon

Amidon soluble.....	10.0 g
Agar	15.0 g
KNO ₃	0.5 g/l
K ₂ HPO ₄	1.0 g/l
MgSO ₄	0.2 g/l
CaCL ₂	1.0 g/l
FeCL ₂	0.001 g/l
Eau distillée	1000 ml

Stérilisation à 120°C pendant 20 min.

➤ Milieu lait gélosé à 20% d'agar

Lait écrémé.....	100g
Agar.....	20g
Eau distillée.....	1000ml

- Dissoudre l'agar dans de l'eau distillé chaude.
- Agiter jusqu'à homogénéisation pour obtenir l'eau gélosée.
- Stériliser par autoclavage à 121°C pendant 20 min.
- Ajouter le lait écrémé stérile juste avant l'utilisation du milieu.

➤ Milieu CMC agar

Cellulose	7.00 g
Agar	15 g/l
NaHPO ₄	6.0g/l
KH ₂ PO ₄	3.00g/l

Na CL	0.5 g/l
NH ₄ CL	1.00 g/l
Extrait de levure	3.00 g/l
Eau distillé	1000ml

Stérilisation à 120°C pendant 20 min.

➤ **Milieu lait gélosé à 20% d'agar**

Lait écrémé.....	100g
Agar.....	20g
Eau distillée.....	1000ml

- Dissoudre l'agar dans de l'eau distillé chaude.
- Agiter jusqu'à homogénéisation pour obtenir l'eau gélosée.
- Stériliser par autoclavage à 121°C pendant 20 min.
- Ajouter le lait écrémé stérile juste avant l'utilisation du milieu.

➤ **Milieu pectine –agar**

Pectine	5g
Extrait de levure.....	5g
Agar	20g
Eau distillé... ..	1000ml

Stérilisation à 120 ° pendant 20 min.

➤ **Milieu à base de Tween 80**

Tween 20.....	1%, v/v
Peptone	10.0 g
NaCL	5.0 g/l
Agar	18.0 g

Eau distillé..... 1000 ml
 Stérilisation à 120 ° pendant 20 min.

➤ **Milieu à base de Tween 20**

Tween 20..... 1%, v/v
 Peptone 10.0 g
 NaCL 5.0 g/l
 Agar 18.0 g
 Eau distillé..... 1000 ml
 Stérilisation à 120 ° pendant 20 min.

Annexe 04 : les indicateurs colorés

➤ **Rouge Congo à 0.1%**

Rouge Congo... 0.1g
 Eau distillée 1000ml
 - Dissoudre 0.1g de rouge Congo dans un petite volume d'eau distillée puis compléter le volume jusqu'à 100ml

➤ **Eau iodée (Lugo)**

Iode 1g
 Iodure de potassium ... 2g
 Eau distillé 1000ml
 - Dissoudre 2g d'iodure de potassium dans un peu d'eau distillée puis ajouter 1g diode
 - Compléter à 100ml d'eau distillée (ajouter éventuellement un peu d'iode pour permettre la dissolution totale de l'iode).

➤ **Acétate de cuivre à 0.7%**

Acétate de cuivre 7.5g
 Eau distillé..... 1000ml
 - Dissoudre 7.5g de l'acétate de cuivre dans un petite volume d'eau distillé puis compléter le volume jusqu'à 100ml

الملخص

-من خلال هذه الدراسة، كنا مهتمين بتسليط الضوء على الأنشطة الأنزيمية للسلاسل الفطرية المحلية الأصل. لهذا قمنا بأخذ عينات من بيئة قاسية "تربة قريبة من منبع حراري" حمام بني قشة وحمام بوحامة في ولاية ميله.

تم عزل السلاسل الفطرية بواسطة تقنية التعليق-التخفيف ثم الزرع على وسط PDA

كشف التحديد العياني والمجهري عن 10 عزلات فطرية .

أظهرت الدراسة المجهرية وبالعين المجردة للسلاسل الفطرية أن سلاسل العفن العشر المعزولة تمثل 4 أجناس هي

Cbdisdia, *Cladosporium* ، *Penicillium Aspergillus*,

أظهر التحليل الإحصائي بترتيب تنازلي أن غالبية الجنس هو الرشاشيات بنسبة تكرار 50٪، يليه الجنس *Penicillium* بنسبة 30٪ وأخيراً *Absidia* و *Cladosporium* بنسبة 10٪.

- تم إجراء اختبارات النشاط الأنزيمي : تم إجراء *Cellulase* ، *Protease* ، *Amylase* ، *Pectinase* ، *Esterase* ، والليباز على وسط معين لكل نشاط إنزيمي. أظهرت النتائج التي تم الحصول عليها أن جميع السلاسل الفطرية تظهر نشاطاً إنزيمياً واحداً على الأقل. كشفت اختبارات الإنزيم أن سلالة *Aspergillus niger* هي الأكثر كفاءة لإنتاج جميع الإنزيمات المختبرة -تشير النتائج إلى ثراء العينة التي تم جمعها من السلاسل الفطرية القادرة على إنتاج أنشطة إنزيمية مهمة. في الواقع، تعتبر التربة المحيطة بالينابيع الساخنة مصدراً محتملاً للإنزيمات التي يمكن أن تكون مقاومة للحرارة وبالتالي فهي مهمة جداً لتطبيقاتها الصناعية.

الكلمات المفتاحية: سلاسل فطرية، عزل، تحديد، نشاط إنزيمي، مصدر حراري

Abstract

Through this study, we were interested in the identification of the Enzymatic activities of fungal strains of local origin.

For this we have carried out a Sampling from an extreme environment "Soil near a thermal spring" Hammam Beni Guecha and Hammam Bouhamma in the wilaya of Mila.

The isolation of fungal strains was performed by the suspension-dilution technique Inoculated on PDA medium. Macroscopic and microscopic identification revealed 10 Fungal isolates. The macroscopic and microscopic study of the fungal strains showed That the ten mold strains isolated represent 4 genera namely *Penicillium*, *Aspergillus*, *Absidia* and *Cladosporium*. The statistical analysis showed in decreasing order That the majority genus was *Aspergillus* with a frequency of 50%, followed by the genus *Penicillium* with a percentage of 30% and finally *Absidia* and *Cladosporium* with a Percentage of 10%.

Enzyme activity tests: cellulase, amylase, protease, pectinase, esterase, and Lipase were performed on a specific medium for each enzymatic activity.

The Results obtained show that all the fungal strains present at least one Enzymatic activity. The enzymatic tests revealed that the strain *Aspergillus niger* is the most efficient for the production of all the enzymes.

The results indicate the richness of the collected sample of fungal strains capable of to produce important enzymatic activities. Indeed, the soil surrounding the hot springs is a potential source of enzymes that can be thermoresistant and therefore very interesting for their industrial applications.

key word: Fungal Strains, Isolation, Identification, Enzyme Activity, Thermal source

Présenté par : Harimi Aymen

Année universitaire : 2021/2022.

Khebbat Narimen

Belmouras Ourda

Intitulé : étude des propriétés enzymatiques de quelques moisissures thermales

Mémoire de fin de cycle pour l'obtention du diplôme de Master en biochimie appliqué

Résumé :

A travers cette étude, nous nous sommes intéressés à la mise en évidence des activités Enzymatiques des souches fongiques d'origine locale. Pour cela nous avons effectué un Échantillonnage à partir d'un milieu extrême « Sol proche d'une source thermale » Hammam Beni Guecha et Hammam Bouhamma dans la wilaya de Mila.

L'isolement des souches fongiques a été réalisé par la technique de suspension-dilution Ensemencé sur milieu PDA. L'identification macroscopique et microscopique a révélé 10 Isolats fongiques. L'étude macroscopique et microscopique des souches fongiques a montré Que les dix souches de moisissures isolées représentent 4 genres à savoir *Penicillium*, *Aspergillus*, *Absidia* et *Cladosporium*. L'analyse statistique a montré par ordre décroissant que le genre majoritaire était *Aspergillus* avec une fréquence de 50 %, suivi du genre *Penicillium* avec un pourcentage de 30 % et enfin *Absidia* et *Cladosporium* avec un Pourcentage de 10%.

Des tests d'activités enzymatiques : cellulase, amylase, protéase, pectinase, estérase, et Lipase ont été effectués sur un milieu spécifique pour chaque activité enzymatique. Les Résultats obtenus montrent que la totalité des souches fongiques présentent au moins une Activité enzymatique. Les tests enzymatiques ont révélé que la souche *Aspergillus niger* est la Plus performante pour la production de toutes les enzymes testées Les résultats indiquent la richesse de l'échantillon prélevé de souches fongiques capables De produire d'importantes activités enzymatiques. En effet, le sol environnant des sources Chaudes est une source potentielle d'enzymes pouvant être thermorésistantes et donc très Intéressantes pour leurs applications industrielles.

Mots clés : Souches fongiques, Isolement, Identification, Activité enzymatique, source Thermale

Jury d'évaluation :

Président du jury : : LALAAOUI Meriem

Rapporteur : BENSERRADJ Wafa

Examinatrice : HARRIECHE Ouahiba

Date de soutenance : 13/07/2022