



République Algérienne Démocratique et Populaire  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique  
Université Frères Mentouri – Constantine 1  
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie  
Département de Biochimie et Biologie Cellulaire et Moléculaire



Laboratoire de Génie Microbiologique et Applications

N° d'ordre : 77 / DS / 2017  
N° de Série : 02 / Bioch / 2017

Thèse présentée pour l'obtention du diplôme de

## Doctorat en Sciences

Spécialité :

**Biotechnologie et Génie Microbiologique**

Présentée par :

**Amel AIT KAKI ép. EL-HADEF EL-OKKI**

# **L' $\alpha$ -Amylase d'une nouvelle souche de *Rhizopus oryzae* FSIS4 isolée de blé des zones arides : Production, Purification, Caractérisation, Etude des propriétés et Essai de panification**

Soutenue le 13 Mai 2017, devant le jury composé de :

Président	M. KACEM-CHAOUCHE N.	Professeur, Univ. Frères Mentouri, Constantine 1
Directrice de Thèse	Mme MERAIHI Z.	Professeur, Univ. Frères Mentouri, Constantine 1
Examinatrice	Mme BEKHOUCHE F.	Professeur, Univ. Frères Mentouri, Constantine 1
Examinatrice	Mme BENDJEMANA K.	Professeur, Univ. Laghrour Abbès, Khenchela
Examineur	M. GUECHI A.	Professeur, Univ. Ferhat Abbas, Sétif 1
Examineur	M. YAHIAOUI B.	MCA., Univ. Ferhat Abbas, Sétif 1

# Dédicaces

*A ma très chère mère,  
A la plus merveilleuse de toutes les mères,  
A celle qui a sacrifié les plus belles années de sa vie pour mon éducation et mon bien être.  
A mon adorable Père,  
Pieux, vertueux et modèle de modestie,  
Tu as toujours incarné à mes yeux, la bonté, la sagesse et l'honnêteté.*

*Je sais très bien à quel point vous avez dû patienter pour me faire arriver à ce jour. Je n'oublierai jamais vos sacrifices et vos prières. Vos bénédictions, votre soutien moral, votre gentillesse sans égal, votre profond attachement m'ont été d'un grand secours pour mener à bien mes études. Aucun hommage ne pourra traduire mon amour, mon dévouement et ma reconnaissance envers vos sacrifices démesurés. Je remercie Dieu tout puissant d'avoir réalisé une partie de vos ambitions et j'espère que vous trouverez dans ce modeste travail le fruit de votre si longue attente, qu'il vous procure la joie et la satisfaction du devoir accompli. J'espère être digne de l'éducation et des précieux conseils que vous m'avez toujours prodigués.*

*Que Dieu tout puissant vous protège du mal, vous procure longue vie, santé et bonheur afin que je puisse vous rendre un minimum de ce que je vous dois. Que Dieu vous garde...*

*Amon marie Mohamed, Je ne peux trouver les mots justes et sincères pour t'exprimer mon affection et mes pensées ;*

*A mes enfants Ahmed Yacine, Yasmine, Raïd Salah et Manel ;*

*A mes neveux Fares, Sara, Yanis et Anes ;*

*A mes deux petits cœurs Mehdi et Chafik et leurs épouses.*

*Je serais toujours à votre disposition pour vous aider, vous conseiller et vous encourager.*

*Je vous souhaite une vie pleine de réussite, de bonheur, de santé et de prospérité.*

*Que Dieu vous bénisse et vous protège.*

*A la mémoire de mes grands parents qui ont tant sacrifié pour leurs enfants.*

*Que ce travail soit une prière pour le repos de vos âmes.*

*A tous les membres de ma famille Ait Kaki et Lakerhal*

*ainsi que ma belle famille El-Hadef El-Okki petits et grands.*

*Veillez trouver dans ce modeste travail l'expression de mon affection.*

*A mes très chères amies*

*Vous êtes pour moi des sœurs et des amies sur qui je peux compter.*

*Que Dieu vous donne le courage de réaliser toutes vos ambitions.*

*A tous mes enseignants depuis les classes primaires*

*A tous ceux qui m'aiment*

*Enfin, à tous ceux qui me sont chers et que j'ai omis de citer.*

*Amel Ait Kaki*

## Remerciements

Je tiens tout d'abord à exprimer toute ma gratitude à **Meraihi Zahia**, Professeur à l'Université Frères Mentouri Constantine 1, pour avoir dirigée cette thèse et m'avoir permis de la réaliser dans les meilleures conditions. Je tiens particulièrement à la remercier de la liberté d'action qu'elle m'a donné à chaque étape de cette aventure. J'espère avoir été digne de la confiance qu'elle m'a accordé et que ce travail est finalement à la hauteur de ses espérances. Je la remercie également pour sa grande disponibilité et pour le temps qu'elle a consacré à la critique de mes résultats en me faisant bénéficier de sa grande expérience. En plus, sa relecture finale méticuleuse de chacun des chapitres a été très appréciable. Je suis très honoré de l'avoir eu pour encadrant. Pour tout cela Merci.

Mes sincères remerciements vont également aux membres du jury qui ont consacré une part importante de leurs temps à la lecture et à l'évaluation de ce travail :

- **M. Kacem-Chaouche N.**, Professeur à l'université Frères Mentouri Constantine 1, qui m'a fait l'honneur de présider ce jury. Je tiens à lui exprimer mes remerciements pour l'honneur qu'il me fait en participant à ce jury.
- **Mme Bendjemana K.**, Professeur à l'Université Laghrour Abbès, Khenchela, qui a accepté de juger ce travail en tant qu'examinatrice. Je lui adresse mes sentiments les plus respectueux.
- **Mme Bekhouche F.**, Professeur à l'Université Frères Mentouri Constantine 1, pour l'intérêt qu'elle a manifesté à l'égard de mes travaux de recherche en acceptant d'examiner ce manuscrit et pour l'honneur qu'elle me fait en participant à ce jury.
- **M. Guechi A.**, Professeur à l'Université Ferhat Abbas Sétif 1, pour avoir accepté d'examiner ce travail. Qu'il trouve ici l'expression de toute ma reconnaissance et mon profond respect.
- **M. Yahiaoui B.**, Maître de Conférence A. à l'université Ferhat Abbas Sétif 1, d'avoir accepté d'examiner ce travail. Qu'il trouve ici l'expression de ma profonde gratitude.

C'est le moment d'exprimer ma gratitude à celles et ceux qui ont contribué à ce travail, qui m'ont aidé ou soutenu pendant toutes ces années :

- En premier lieu, mes plus profonds remerciements vont à mes chers parents qui ont su croire en moi et qui m'ont apporté toute leur aide quand j'en ai eu besoin, je ne vous remercierais jamais assez ;
- Je remercie mon très cher époux Mohamed pour son soutien quotidien indéfectible et son enthousiasme à l'égard de mes travaux. Notre couple a grandi en même temps que mon projet scientifique, le premier servant de socle solide à l'épanouissement du second ;

- Je remercie mes enfants : Ahmed Yacine, Yasmine, Raid Salah et Manel. Leur présence, leurs éclats de joie et les beaux moments de folie qu'on passe ensemble sont pour moi les piliers fondateurs de ce que je suis et de ce que je fais ;
- Ma reconnaissance va à ceux qui ont plus particulièrement assuré le soutien affectif : mes frères (Mehdi et Chafik) et leurs familles ;
- Un grand merci à tous les membres des familles : Ait Kaki, Lakehal, El-Hadef El-Okki et Berriche ;
- Un grand merci à tous les membres du Laboratoire de Génie Microbiologique et Applications et tous mes enseignants et collègues de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, UFMC1.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude et reconnaissance à l'Institut de la Nutrition, de l'Alimentation et des Technologies Agro-Alimentaires (UFMC1), à sa tête le Prof. Boudjellal Abdelghani, tous mes collègues ainsi que tout le personnel de l'institut. Je n'oublierai jamais leur aide précieuse pendant les périodes les plus difficiles. Je tiens à exprimer mes sincères remerciements à toute l'équipe Macquav du laboratoire de recherche "Biotechnologie et Qualité des Aliments", en particulier M. Gagaoua Mohammed et M<sup>me</sup> Hafid Kahina pour leur disponibilité et toute l'aide qu'ils m'ont apporté durant la purification de l'enzyme par le système TPP. Une grande reconnaissance à M. Chikhouné Anis pour son aide et ses encouragements. Je remercie également toute l'équipe du laboratoire de recherche "Nutrition et Technologie Alimentaire" en particulier M<sup>elle</sup> Bourekoua Hayet pour son aide dans la réalisation des essais de panification.

Je remercie vivement le Professeur Jean Philippe Bouchara, Laboratoire de Parasitologie et Mycologie à l'Hôpital d'Angers et Directeur de Laboratoire GEIHP (Groupe d'Etude des Interactions Hôte Pathogène, France) d'avoir accepté de nous faire l'identification moléculaire de la moisissure.

J'adresse mes très sincères remerciements à tous mes amis et collègues (en particulier Leila, Chahra, Moulouk, Yasmine, Lila, Naima, Kounouz, Nora, Faiza, Habiba, Maya, Meriem, Hania, Rym, Betty, Mira, Karima, ...). Je les remercie tous pour avoir rendus plus agréables les années que nous avons partagées.

Bien entendu, cette liste n'est pas exhaustive. J'ai fait tout mon possible pour n'oublier personne dans ces remerciements. Si je n'ai pas réussi dans cette tâche, que les absents ne m'en veuillent pas et qu'ils sachent que ma reconnaissance va bien au-delà de ces remerciements, et que le plaisir que j'ai eu à les rencontrer et à les connaître était réel et sincère.

**Amel Ait Kaki**

# Sommaire

Liste des abréviations  
Liste des figures  
Liste des tableaux

<b>Introduction</b> .....	1
---------------------------	---

## Chapitre 1 : Synthèse bibliographique

<b>1- Champignons filamenteux (moisissures)</b> .....	4
1-1- Définition et classification .....	4
1-2- Caractéristiques morphologiques des champignons filamenteux .....	5
1-3- Croissance des champignons filamenteux .....	7
1-4- Mode de nutrition des champignons filamenteux.....	7
1-5- Conditions de développement des champignons filamenteux .....	8
1-5-1- Eléments nutritifs.....	8
1-5-2- Activité en eau .....	8
1-5-3- pH .....	9
1-5-4- Température.....	9
1-5-5- Aération .....	10
1-5-6- Lumière.....	10
1-5-7- Interactions microbiennes.....	10
1-6- Ecologie des champignons filamenteux.....	10
<b>2- Champignons filamenteux thermophiles</b> .....	11
2-1- Champignons thermophiles et thermotolérants .....	11
2-2- Habitat des champignons thermophiles et thermotolérants .....	11
2-3- Adaptation physiologique des champignons filamenteux thermophiles aux températures élevées.....	12
<b>3- La moisissure <i>Rhizopus oryzae</i></b> .....	15
3-1- Taxonomie de <i>Rhizopus oryzae</i> .....	15
3-2- Caractères morphologiques de <i>Rhizopus oryzae</i> .....	15
3-3- La reproduction chez <i>Rhizopus oryzae</i> .....	17
3-4- Les fermentations réalisées par <i>Rhizopus oryzae</i> .....	17
3-5- La production d'enzymes .....	19
<b>4- Les enzymes amylolytiques</b> .....	21
4-1- L' $\alpha$ -amylase fongique .....	22
4-2- Structure de l' $\alpha$ -amylase .....	22
4-3- Les propriétés de l' $\alpha$ -amylase .....	25
4-3-1- Masse moléculaire .....	25
4-3-2- Température et pH optimum.....	25
4-3-3- Activateurs et inhibiteurs.....	26
4-4- Production de l' $\alpha$ -amylase .....	26
4-5- Purification de l' $\alpha$ -amylase.....	27

4-6- Système de répartition en trois phases .....	28
4-6-1- Sulfate d'ammonium .....	29
4-6-2- <i>t</i> -butanol .....	30
4-6-3- Avantages du système TPP .....	30
4-6-4- Autres utilisations du système TPP .....	30
4-7- Applications industrielles de l' $\alpha$ -amylase .....	31
4-7-1- Liquéfaction de l'amidon et saccharification .....	31
4-7-2- Pain et industrie de boulangerie .....	31
4-7-3- Désencollage des textiles .....	32
4-7-4- Détergence .....	32
4-7-5- Production de biocarburant .....	32
4-7-6- Bioraffinerie .....	33
4-7-7- Diagnostic et industries pharmaceutiques .....	33

## Chapitre 2 : Matériel et méthodes

<b>1- Isolement et identification des souches fongiques .....</b>	<b>34</b>
1-1- Matériel biologique .....	34
1-2- Isolement des moisissures thermophiles contaminant le blé .....	36
1-3- Purification des souches isolées .....	36
1-4- Identification des souches isolées .....	38
1-4-1- Etude des caractères cultureux .....	38
1-4-2- Etude des caractères morphologiques microscopiques .....	38
1-4-3- La préparation du matériel à observer .....	39
1-5- Test d'activité amyliques sur les souches de <i>Rhizopus</i> .....	40
1-6- Etude de la thermostabilité des souches performantes en la production de l' $\alpha$ -amylase .....	40
1-7- La souche FSIS4 .....	41
1-7-1- Identification moléculaire .....	41
1-7-2- Caractérisation physiologique de <i>Rhizopus oryzae</i> FSIS4 .....	43
<b>2- Production de l'<math>\alpha</math> amylase de <i>Rhizopus oryzae</i> FSIS4 sur un milieu à base de dattes déclassées .....</b>	<b>45</b>
2-1- Le milieu de base (farine de dattes) .....	46
2-1-1- Caractérisation physicochimique de la farine de dattes déclassées .....	46
2-1-2- Préparation du milieu de production à base de farine de dattes déclassées .....	48
2-2- Optimisation de la production de l' $\alpha$ -amylase de <i>Rhizopus oryzae</i> FSIS4 .....	48
2-2-1- Criblage des facteurs affectant la production de l' $\alpha$ -amylase de <i>Rhizopus oryzae</i> FSIS4 .....	49
2-2-2- Détermination des optima des facteurs sélectionnés .....	52
2-3- Cinétique de production de l' $\alpha$ -amylase de <i>Rhizopus oryzae</i> FSIS4 en fermenteur .....	55
<b>3- Purification de l'<math>\alpha</math>-amylase par le système de répartition en trois phases .....</b>	<b>57</b>
3-1- Préparation de l'extrait enzymatique .....	58
3-2- Optimisation des paramètres influençant le système TPP .....	58
3-3- Fractionnement et purification par le système TPP .....	59
3-4- Analyse par électrophorèse en conditions dénaturantes .....	59
3-4-1- Préparation des échantillons pour l'électrophorèse .....	61
3-4-2- Dépôts des échantillons .....	61
3-4-3- Fixation, coloration et décoloration des gels .....	61

3-5- Zymogramme .....	61
3-6- Chromatographie sur couche mince (CCM) .....	61
<b>4- Caractérisation de l'α-amylase partiellement purifiée .....</b>	<b>63</b>
4-1- Etude de l'activité en fonction de la température et du pH .....	63
4-2- Etude de la stabilité thermique et la stabilité au pH .....	63
4-3- Effet des ions métalliques, des composés chimiques et des surfactants sur l'activité amylasique .....	63
4-4- Tolérance de l'enzyme à l'alcool .....	64
4-5- Détermination des paramètres cinétiques ( $K_m$ et $V_{max}$ ) de l'enzyme .....	64
<b>5- Application de l'α- amylase partiellement purifiée en panification .....</b>	<b>65</b>
5-1- Matière première .....	65
5-2- Ingrédients .....	65
5-3- Panification .....	65
5-4- Evaluation de la qualité du pain .....	67
5-5- Analyse statistique .....	67

### Chapitre 3 : Résultats et discussions

<b>1- Isolement et identification de champignons thermophiles .....</b>	<b>68</b>
1-1- Isolement et purification de nouveaux champignons thermophiles .....	68
1-1-1- Identification des souches isolées .....	68
1-1-2- Etude macroscopique .....	68
1-1-3- Etude microscopique .....	69
1-2- Distribution des différents genres de moisissures thermophiles isolées à partir de blé dur .....	76
1-3- Mise en évidence de l'activité amylasique .....	77
1-4- Etude de la thermostabilité des 25 souches de <i>Rhizopus</i> productrice d'α-amylase .....	79
<b>2- Identification et caractérisation de la souche FSIS4 .....</b>	<b>82</b>
2-1- Identification morphologique et moléculaire .....	82
2-1-1- Identification morphologique .....	82
2-1-2- Séquençage des régions ITS1 et ITS2 de l'ADNr de la souche FSIS4 .....	84
2-2- Caractérisation physiologique de <i>Rhizopus oryzae</i> FSIS4 .....	85
2-2-1- Etude de la thermophilie .....	85
2-2-2- Détermination du taux optimale de l'inoculum de <i>Rhizopus oryzae</i> FSIS4 .....	86
2-2-3- Effet de la température sur la germination des spores .....	86
<b>3- Caractérisation de la farine de dattes déclassées .....</b>	<b>88</b>
<b>4- Optimisation de la production de l'α-amylase .....</b>	<b>90</b>
4-1- Criblage des facteurs .....	90
4-1-1- Effet de l'amidon .....	90
4-1-2- Effet de l'extrait de levure .....	92
4-1-3- Effet du $MgSO_4$ et $CaCl_2$ .....	92
4-1-4- Effet du $NaNO_3$ , $KH_2PO_4$ , pH et la vitesse d'agitation sur l'activité amylasique .....	93
4-2- Détermination des optima des facteurs sélectionnés par l'utilisation de la méthodologie des surfaces de réponses (RSM) .....	94
4-3- Validation du modèle quadratique .....	98

<b>5- Etude de la cinétique de croissance et de la production de l'<math>\alpha</math>-amylase de <i>Rhizopus oryzae</i> FSIS4 cultivé sur milieu optimisé à base de dattes déclassées en fermenteur .....</b>	<b>99</b>
<b>6- Purification de l'<math>\alpha</math>-amylase par le système de répartition en trois phases.....</b>	<b>102</b>
6-1- Optimisation des paramètres influençant le système TPP .....	102
6-1-1- Effet de la concentration en sulfate d'ammonium.....	102
6-1-2- Effet du Butanol tertiaire ( <i>t</i> -butanol) .....	102
6-1-3- Effet du pH .....	104
6-2- Fractionnement et purification par le système TPP .....	105
6-3- Le profil électrophorétique (SDS-PAGE).....	107
<b>7- Chromatographie sur couche mince (CCM) .....</b>	<b>109</b>
<b>8- Caractérisation de l'<math>\alpha</math>-amylase de <i>Rhizopus oryzae</i> FSIS4 partiellement purifiée.....</b>	<b>110</b>
8-1- Etude de l'activité et la stabilité de l'enzyme en fonction de la température. ....	110
8-2- Etude de l'activité et la stabilité de l'enzyme fonction du pH.....	112
8-3- Effet des ions métalliques, des composés chimiques et des surfactants sur l'activité amylasique de <i>Rhizopus oryzae</i> FSIS4.....	113
8-4- Tolérance de l'enzyme à l'alcool .....	117
8-5- Etude des paramètres cinétiques de l'enzyme .....	117
<b>9- Application de l'<math>\alpha</math>-amylase partiellement purifiée en panification .....</b>	<b>119</b>
<b>Conclusion générale.....</b>	<b>122</b>
<b>Références bibliographiques.....</b>	<b>141</b>
<b>Annexes</b>	
<b>Résumés</b>	



## Liste des abréviations

AACC	: American Association of Cereal Chemists.
$A_w$	: Activity of water
BLAST	: Basic local alignment search tool.
C/N	: Rapport carbone/azote.
CCD	: Central Composite Design.
CCM	: Chromatographie sur Couche Mince.
CFT	: Champignons Filamenteux Thermophiles.
$C_T$	: Cendres totales.
CYA	: Czapek yeast agar.
2D et 3D	: 2 et 3 dimension.
DEAE	: Diéthylaminoéthyle.
DNSA	: 3,5 dinitrosalicylique acide.
DTT	: Dithiothréitol.
EC	: Enzyme Commission.
EDTA	: Ethylène Diamine Tétracétique Acide.
$F$	: Valeur du test Fisher.
$^{\circ}F$	: Degré français.
FAO	: Food and Agriculture Organisation of the United Nations.
FDA	: Food and Drug Administration of the United States.
GEIHP	: Groupe d'Etude des Interactions Hôte-Pathogène, d'Angers (France).
GH	: Glycoside hydrolase.
GRAS	: Generally Recognised as Safe.
ITS	: Internal transcribed spacer.
KDa	: Kilodalton.
$K_m$	: Constante de Michaelis.
ME	: Mercaptoéthanol.
MS	: Matière sèche.
MWCO	: Molecular Weight Cut-Off's.
NCBI	: National Center of Biological Information.
PAGE	: Polyacrylamide gel electrophoresis.
PBD	: Plackett-Burman Design.
PCR	: Polymerase chain reaction.
PDA	: Potato Dextrose Agar.
PTA	: Plate test Agar.
rpm	: Tours par minute.
RSM	: Response Surface Methodology.
SDS	: Sodium dodécylsulfate.
<i>t</i> -BuOH	: Butanol tertiaire.
TPP	: Three phase partitioning.
UIBBM	: Union Internationale de Biochimie et de Biologie Moléculaire.
V/Vm	: Volume d'air par litre de milieu par minute.
$V_{max}$	: Vitesse maximale.

## Liste des figures

<b>Figure 1</b> : La classification des champignons.....	6
<b>Figure 2</b> : La moisissure <i>Rhizopus oryzae</i> .....	16
<b>Figure 3</b> : Le cycle biologique d'un zygomycète typique .....	18
<b>Figure 4</b> : Structure de l' $\alpha$ - amylase fongique .....	24
<b>Figure 5</b> : Carte de wilayas prospectées pour l'échantillonnage. ....	35
<b>Figure 6</b> : Schéma d'isolement par contact direct. ....	37
<b>Figure 7</b> : Emplacement des amorces ITS 4 et ITS 5 .....	42
<b>Figure 8</b> : Fermenteur de 5 litres Sartorius Biostat® Aplus. ....	56
<b>Figure 9</b> : Les étapes de précipitations des protéines. ....	58
<b>Figure 10</b> : Représentation schématique du système TPP.....	60
<b>Figure 11</b> : Diagramme de purification de l' $\alpha$ -amylase de <i>Rhizopus oryzae</i> FSIS4 par le système TPP. ....	60
<b>Figure 12</b> : Schéma de fabrication des pains .....	66
<b>Figure 13</b> : La répartition des moisissures isolées à partir de blé dur.....	76
<b>Figure 14</b> : Zones de lyse de l'amidon sous l'action de l' $\alpha$ -amylase des souches de <i>Rhizopus</i> .....	78
<b>Figure 15</b> : Plan principal de l'ACP et projection des 25 souches isolées du genre <i>Rhizopus</i> . en fonction du temps de demi-vie et du diamètre de la zone de lyse. ....	81
<b>Figure 16</b> : Caractères macroscopiques et microscopiques de la souche FSIS4. ....	83
<b>Figure 17</b> : L'arbre phylogénétique de <i>Rhizopus oryzae</i> FSIS4. ....	85
<b>Figure 18</b> : L'activité amylasique en fonction du taux de spores.....	87
<b>Figure 19</b> : Influence de la température d'incubation sur le taux de germinations des spores de <i>Rhizopus oryzae</i> FSIS4.....	87
<b>Figure 20</b> : Activités amylasiques en fonction de la concentration de farine de dattes.....	89
<b>Figure 21</b> : Courbes des surfaces de réponse pour la production d' $\alpha$ - amylase thermostable de <i>Rizopus oryzae</i> FSIS4. ....	97
<b>Figure 22</b> : Cinétique de la production de l' $\alpha$ -amylase de <i>Rhizopus oryzae</i> FSIS4 sur milieu optimisé et non optimisé.....	98
<b>Figure 23</b> : Etude cinétique de la croissance, de la consommation des glucides et de l'activité $\alpha$ -amylasique de <i>Rhizopus oryzae</i> FSIS4.....	101
<b>Figure 24</b> : Evolution cinétique des protéines et du pH au cours de la croissance de <i>Rhizopus oryzae</i> FSIS4.....	101
<b>Figure 25</b> : Effet de la concentration en $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ sur le rendement et le degré de purification de l' $\alpha$ -amylase de <i>Rhizopus oryzae</i> FSIS4.....	103
<b>Figure 26</b> : Effet du rapport extrait enzymatique : <i>t</i> -butanol sur le rendement et le degré de purification de l' $\alpha$ -amylase de <i>Rhizopus oryzae</i> FSIS4.....	103
<b>Figure 27</b> : Effet du pH sur le rendement et le degré de purification de l' $\alpha$ -amylase de <i>Rhizopus oryzae</i> FSIS4.....	105
<b>Figure 28</b> : Séparation en trois phases de l'extrait enzymatique de <i>Rhizopus oryzae</i> FSIS4 par le système TPP.....	106
<b>Figure 29</b> : Profil électrophorétique de l' $\alpha$ -amylase de <i>Rhizopus oryzae</i> FSIS4 purifiée par le système TPP. ....	108
<b>Figure 30</b> : Chromatographie sur couche mince des produits de dégradation de l'amidon par l' $\alpha$ -amylase de <i>Rhizopus oryzae</i> FSIS4 purifiée.....	109
<b>Figure 31</b> : Effet de la température sur (a) l'activité (b) la stabilité de l' $\alpha$ -amylase de <i>Rhizopus oryzae</i> FSIS4.....	111

<b>Figure 32</b> : Effet du pH sur (a) l'activité (b) la stabilité au pH de l' $\alpha$ -amylase de <i>Rhizopus oryzae</i> FSIS4.....	114
<b>Figure 33</b> : Effets des cations métalliques et quelques composés chimiques sur l'activité amylasique de <i>Rhizopus oryzae</i> FSIS4.....	115
<b>Figure 34</b> : Effets des surfactants sur l'activité amylasique de <i>Rhizopus oryzae</i> FSIS4.....	116
<b>Figure 35</b> : Paramètres cinétiques de l' $\alpha$ -amylase de <i>Rhizopus oryzae</i> FSIS4 selon la représentation de Lineweaver et Burk.....	118
<b>Figure 36</b> : Aspect du pain et des coupes transversales de la tranche centrale du pain.....	120

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1</b> : Classification des microorganismes en fonction de leurs températures cardinales	9
<b>Tableau 2</b> : Quelques habitats des champignons filamenteux thermophiles.....	13
<b>Tableau 3</b> : Les enzymes produites par <i>Rhizopus oryzae</i> et leurs applications industrielles ..	20
<b>Tableau 4</b> : Propriétés de l' $\alpha$ -amylase produite par quelques souches fongiques.....	23
<b>Tableau 5</b> : Comparaison des différents processus de purification de l' $\alpha$ -amylase microbienne d'après la littérature. ....	27
<b>Tableau 6</b> : Répartition des échantillons prélevés dans les localités. ....	35
<b>Tableau 7</b> : Générateurs des matrices pour N = 4, 8, 12, 16, et 20 essais du plan de Plackett - Burman .....	50
<b>Tableau 8</b> : Matrice du plan de Plackett-Burman pour l'étude de 11 variables avec 12 expériences. ....	50
<b>Tableau 9</b> : Les niveaux réels des facteurs utilisés dans la matrice du plan de Plackett - Burman. ....	51
<b>Tableau 10</b> : Relation entre les niveaux codés et les niveaux réels des facteurs utilisés dans le plan composite centré. ....	54
<b>Tableau 11</b> : Structure du plan composite centré à 4 facteurs.....	54
<b>Tableau 12</b> : Les caractères macroscopiques des souches isolées des 7 régions cultivées sur milieu Sabouraud.....	71
<b>Tableau 13</b> : Caractères microscopiques des souches isolées des 7 régions.....	73
<b>Tableau 14</b> : Résultats de l'activité amyliasique (zone de lyse) et de la thermostabilité (temps de demi-vie) des souches de <i>Rhizopus</i> isolées.....	78
<b>Tableau 15</b> : Croissance apicale (mm.h <sup>-1</sup> ) de <i>Rhizopus oryzae</i> FSIS4 après incubation.....	85
<b>Tableau 16</b> : Résultats de l'analyse physico-chimique de la farine de dattes déclassées.....	89
<b>Tableau 17</b> : Matrice et résultats du plan expérimental de Plackett-Burman.....	91
<b>Tableau 18</b> : Résultats de l'analyse statistique du plan expérimental de Plackett-Burman. ...	91
<b>Tableau 19</b> : Les valeurs observées et prédites de l'activité $\alpha$ -amyliasique de <i>Rhizopus oryzae</i> FSIS4 à partir du plan composite centré.....	94
<b>Tableau 20</b> : Coefficient de régression de l'équation de la production de l' $\alpha$ -amylase de <i>Rhizopus oryzae</i> FSIS4.....	95
<b>Tableau 21</b> : tableau de purification de l' $\alpha$ -amylase thermostable de <i>Rhizopus oryzae</i> FSIS4 par le système TPP.....	106
<b>Tableau 22</b> : Exemples d'enzymes purifiées par le système TPP. ....	107
<b>Tableau 23</b> : Effet des alcools sur l'activité amyliasique de <i>Rhizopus oryzae</i> FSIS4. ....	117
<b>Tableau 24</b> : Evaluation de l'effet de l' $\alpha$ -amylase sur le volume spécifique et le rapport hauteur / largeur du pain. ....	120

Thèse de Doctorat en Sciences  
**L' $\alpha$ -Amylase d'une nouvelle souche de *Rhizopus oryzae* FSIS4 isolée de blé des zones arides :**  
**Production, Purification, Caractérisation, Etude des propriétés et Essai de panification**  
Amel AIT KAKI ép. EL-HADEF EL-OKKI

# Introduction

# Introduction

Dans notre quotidien, nous consommons des biens qui sont issus des biotechnologies. Qu'il s'agisse d'un aliment, d'un médicament, d'une pièce de vêtement, d'un détergent, d'une crème hydratante ou parfois même de certaines matières plastiques, biocarburant ou d'un simple papier, une ou plusieurs des étapes de production de ces produits a vraisemblablement nécessité l'actions d'enzymes microbiennes (Kirk *et al.*, 2002).

Le champ d'application des enzymes ne cesse de s'élargir. Le marché mondial des enzymes est estimé à 7,4 milliard de dollars, avec une augmentation de 4 % par an (Deb *et al.*, 2013). Les amylases constituent une classe d'enzymes industrielles occupant environ 25 % du marché des enzymes (Sindhu *et al.*, 2017). En effet, le marché mondial de l' $\alpha$  amylase utilisée en boulangerie à lui seul devrait atteindre 320,1 millions de dollars d'ici 2024 (Sherry, 2016).

Certaines de ces enzymes présentent cependant des performances relativement médiocres au regard des contraintes liées aux procédés industriels. En effet, elles ne sont actives que dans des gammes de température ou de pH très réduites. Elles sont inactivées en présence de solvants, ou de concentrations salines inappropriées. De plus, la majorité des procédés doivent être effectués à des températures élevées ( $\geq 70$  °C). Les raisons principales qui justifient ce choix sont l'augmentation de la solubilité du substrat, de la vitesse de réaction et aussi la diminution des risques de contamination par d'autres microorganismes nuisibles (Sindhu *et al.*, 2017). Afin de répondre aux besoins de l'industrie, il devient donc primordial d'identifier de nouvelles enzymes possédant les propriétés particulières répondant aux conditions industrielles.

Ainsi nous avons ciblé la recherche d'enzymes issues de microorganismes extremophiles susceptibles de produire des enzymes particulières, surtout dans leur thermorésistance. Parmi les microorganismes, nous sommes intéressés aux Champignons Filamenteux Thermophiles (CFT) ou moisissures thermophiles réputées pour leur production en enzymes thermostables utilisées dans des procédés industriels (Nguyen *et al.*, 2002 ; Doss et Anand, 2013 ; Sethi *et al.*, 2016 et Simair *et al.*, 2017).

Les CFT sont caractérisés par des vitesses de croissance élevées, ce qui suppose une biosynthèse particulièrement rapide des produits issus de leur métabolisme (Cordova *et al.*, 1998). Par ailleurs, il y a de nombreuses évidences qui suggèrent l'existence d'une corrélation entre la thermophilie des champignons et la thermostabilité de leurs protéines, en particulier de leurs enzymes (Shen *et al.*, 2012 ; Suganthi *et al.*, 2015 et Sethi *et al.*, 2016). Ces dernières sont plus stables, que les enzymes des microorganismes mésophiles, vis-à-vis de la température, de la présence de solvants organiques ou encore d'agents chaotropiques (Dietrich et Guezennec, 2016). De plus, leur thermostabilité permet de prolonger la durée de leur stockage (Dix et Webster, 1995 et Jay, 1996). Les principaux défis dans la production commerciale des enzymes sont donc leur thermostabilité, leur coût de production et leur rendement.

Dans cette optique, notre thématique est axée sur la recherche d' $\alpha$ -amylase issues de moisissures thermophiles vivant dans un écosystème extrême. Cette enzyme perçue comme étant une enzyme importante en industrie. En effet, l'industrie des détergents utilise massivement cette enzyme, les industries alimentaires, textiles, papetières, pharmaceutiques ainsi que les tanneries, la cosmétique, la chimie fine et l'ingénierie moléculaire sont également des utilisateurs importants (Sindhu *et al.*, 2017).

Beaucoup de travaux ont étudié les propriétés de cette enzyme produite par des souches recombinantes et natives. Cependant la caractéristique la plus recherchée est la thermostabilité. Car la plupart des procédés industriels qui utilisent l' $\alpha$ -amylase sont effectués dans des conditions extrêmes de température (gélatinisation de l'amidon (100-110 °C) et sa liquéfaction (80-90 °C)). Ainsi, des amylases fonctionnant à des températures élevées sont découvertes (Freitas *et al.*, 2014 ; Adejuwon *et al.*, 2015 ; Suganthi *et al.*, 2015 et Sethi *et al.*, 2016).

Afin de réduire le coût de production de cette enzyme, principal obstacle qui freine les applications potentielles de l' $\alpha$ -amylase, nous avons opté pour un procédé de fermentation en milieu liquide sur un sous-produit agro-industriel (dattes déclassées), utilisé dans plusieurs travaux (Nancib *et al.*, 1997 ; Nancib *et al.*, 1999 ; Nancib *et al.*, 2005 et Kacem-Chaouche *et al.*, 2013).

D'un autre côté la purification de cette enzyme, pour des applications en industries agroalimentaire et pharmaceutique, par l'utilisation des méthodes classiques multi-étapes de purification des enzymes nécessitant des équipements coûteux à chaque étape, ce qui les rendent laborieuses, et peuvent entraîner des pertes du produit recherché (Arauzo *et al.*, 2009). Cependant, les extractions liquide-liquide tel que le système de répartition en trois phases (TPP : *Three Phase Partitioning*) constitue une alternative intéressante pour la purification dont les étapes de traitement peuvent être combinées en une seule opération.

Ce procédé est largement utilisé dans l'industrie chimique en raison de sa simplicité, faible coût, meilleur rendement et la facilité de sa mise en œuvre à l'échelle industrielle (Mazzola *et al.*, 2008 ; Rachana et Lyju Jose, 2014 et Gagaoua et Hafid, 2016 ). Enfin nous terminons notre étude par la caractérisation de l' $\alpha$ -amylase purifiée et son incorporation dans des essais de panification.

Afin de diagnostiquer l'état d'avance scientifique concernant le sujet abordé dans ce travail, instaurer les hypothèses, présenter et discuter les résultats, il est essentiel de faire une recherche bibliographique. La première partie de ce chapitre introduit l'écologie et la physiologie des champignons, en particulier les champignons thermophiles, en donnant des éléments sur leur thermophilie. On insistera sur la moisissure *Rhizopus oryzae*, étant donné que l'essentiel de cette thèse porte sur ce champignon filamenteux. La deuxième partie est consacrée à l'étude des  $\alpha$ -amylases, en présentant, la définition et en décrivant leur mécanisme d'action, leur production, leur purification et les applications de ces enzymes. Le deuxième chapitre est réservé à la description des protocoles expérimentaux employés au cours de l'étude. Vient ensuite le chapitre consacré aux résultats acquis au cours de la thèse. Le manuscrit se termine par les conclusions et les perspectives envisagées à ce travail.



Thèse de Doctorat en Sciences  
**L' $\alpha$ -Amylase d'une nouvelle souche de *Rhizopus oryzae* FSIS4 isolée de blé des zones arides :**  
**Production, Purification, Caractérisation, Etude des propriétés et Essai de panification**  
Amel AIT KAKI ép. EL-HADEF EL-OKKI

# Chapitre 1

## Synthèse bibliographique

## 1- Champignons filamenteux (moisissures)

Les champignons représentent l'un des plus importants groupes d'organismes sur Terre et jouent un rôle clé dans un grand nombre d'écosystèmes (Mueller et Schmit 2007). Si les recherches concernant les macromycètes sont déjà fort avancées, les travaux sur les micromycètes, tout particulièrement les moisissures, n'ont pris une certaine extension qu'au cours des dernières décennies. On estime à 1,5 millions le nombre d'espèces de champignons vivant sur Terre (Hawksworth, 2001). Les prédictions les plus conservatives et les plus basses considèrent un minimum de 700 000 espèces fongiques décrites, ce qui peut être expliqué par la difficulté de cultiver ces organismes en conditions de laboratoire mais aussi en raison d'un manque de connaissances et d'un sous-échantillonnage de ces organismes dans de nombreux biotopes de la planète (Julliard *et al.*, 2013).

### 1-1- Définition et classification

Les champignons ou Fungi sont des organismes eucaryotes ubiquitaires dépourvus de chlorophylle les qualifiant d'organismes hétérotrophes.

Les aliments sont généralement des milieux très favorables à leur développement, ils sont progressivement envahis par un fin duvet : le mycélium. Les moisissures acidifient, décolorent, font fermenter et rendent ces produits désagréables voire dangereux (Pitt, 1998). Plusieurs moisissures notamment les genres *Aspergillus*, *Penicillium* et *Fusarium* sont connues pour être des contaminants des produits agricoles et/ou pour leur capacité à produire sous certaines conditions des métabolites secondaires toxiques (Cahagnier *et al.*, 1998 ; Doyle *et al.*, 1998 et Meyer *et al.*, 2004).

Dans l'arbre du vivant, ils constituent un groupe à part au sein des eucaryotes. Classiquement, les champignons étaient regroupés dans un règne distinct, celui des eumycètes ou cinquième règne. Les classifications les plus récentes font apparaître les champignons dans le règne unique des eucaryotes et plus précisément dans le groupe des Opisthokonta (Carlotti, 2014). Différents rangs taxonomiques sont utilisés pour la classification des êtres vivants. Ces rangs hiérarchiques sont : le règne, l'embranchement ou division, la classe, l'ordre, la famille, le genre et l'espèce. Il existe des rangs intermédiaires comme par exemple le sous-embranchement ou la sous-division, la sous famille ou la sous-espèce qui peut elle-même se diviser en variétés. La nomenclature utilisée pour déterminer le nom scientifique des espèces est binomiale. Fait référence au genre puis à l'espèce. Cette nomenclature suit les règles énoncées par le naturaliste Carl von Linné (1753). La nomenclature des différents taxons présente une terminologie codifiée, le suffixe permettant de définir chaque rang taxonomique dans la classification hiérarchique.

Selon Lefier (2006), on distingue :

- -*mycota* pour la division,
- -*mycotina* pour la sous-division,
- -*mycètes* pour la classe,
- -*ales* pour l'ordre,
- Et, -*aceae* pour la famille.

Le règne des "champignons vrais" ou *Fungi*, appelé *Eumycota*, comprend actuellement 1 sous-règne, 7 divisions et 10 sous-divisions (Vági *et al.*, 2013). Le sous règne des *Dikarya* se divise en deux divisions, *Ascomycota* et *Basidiomycota*. Les autres divisions sont les *Glomeromycota*, les *Chytridiomycota*, les *Neocallimastigomycota*, les *Blastocladiomycota* et les *Microsporidiomycota*. La division des *Ascomycota* se scinde en trois sous-divisions *Pezizomycotina*, *Saccharomycotina* et *Taphrinomycotina*, tandis que la division des *Basidiomycota* se décompose en trois sous-divisions *Pucciniomycotina*, *Ustilaginomycotina* et *Agaricomycotina*. Les autres sous-divisions sont les *Mucoromycotina*, les *Entomophthoromycotina*, les *Kickxellomycotina* et les *Zoopagomycotina* (fig. 1).

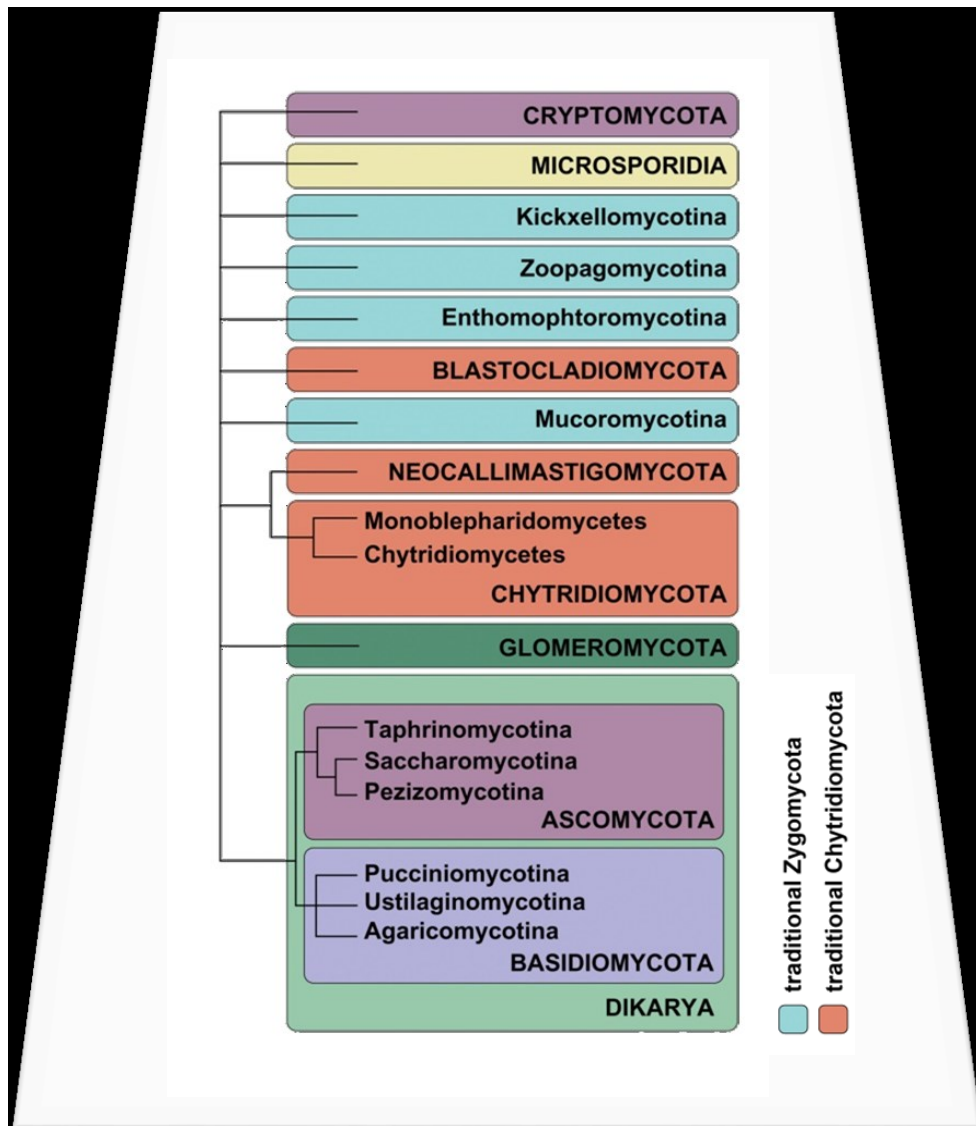
La classification des champignons est d'abord basée sur un mode de reproduction sexuée ou phase téléomorphe. Ce critère définit quatre des cinq groupes principaux : les chytridiomycètes, les zygomycètes, les basidiomycètes et les ascomycètes. Certaines moisissures sont le plus souvent ou exclusivement rencontrées à un stade de multiplication asexuée, dit anamorphe. Ces organismes sont alors classés d'après le mode de production des spores asexuées ou conidies. Selon Carlotti (2014), ces espèces sont classées dans le cinquième ordre des Deutéromycètes ou *Fungi imperfecti*.

## 1-2- Caractéristiques morphologiques des champignons filamenteux

Les champignons filamenteux se composent d'un appareil végétatif appelé thalle. Il est composé de filaments ou hyphes enchevêtrés les uns par rapport aux autres et l'ensemble des hyphes constituent un réseau appelé mycélium. Les hyphes sont diffus, tubulaires et fins avec un diamètre compris entre 2 et 15  $\mu\text{m}$  et sont plus ou moins ramifiés. Chez certaines moisissures, par exemple *Rhizopus*, les cellules ne sont pas séparées par une cloison transversale, le thalle est alors dit coenocytique ou "siphonné" alors que chez d'autres, par exemple *Aspergillus*, le thalle est cloisonné ou "septé". Les cloisons, appelées septa possèdent des perforations assurant la communication entre les cellules.

Les caractéristiques morphologiques de ces microorganismes sont liées à leur substrat nutritif. La colonisation du substrat est réalisée par extension et ramification des hyphes (Bocquet, 1993 et Carlotti, 2014). Les champignons filamenteux possèdent une paroi constituée essentiellement de polysaccharides, de glycoprotéines et de mannoprotéines. Les polysaccharides sont majoritairement la chitine, polymère de molécules de N-

acétylglucosamine liées entre elles par une liaison de type  $\beta$ -1,4 et les glucanes, polymères de molécules de D-glucose liées entre elles par des liaisons  $\beta$ . Ces deux polysaccharides assurent la protection des moisissures vis-à-vis des agressions du milieu extérieur. La chitine joue un rôle dans la rigidité de la paroi cellulaire, les glycoprotéines jouent un rôle dans l'adhérence et les mannoprotéines forment une matrice autour de la paroi (Bowman et Free, 2006).



**Figure 1** : La classification des champignons (d'après Vági *et al.*, 2013).

### 1-3- Croissance des champignons filamenteux

Le développement des moisissures comprend deux phases : une phase végétative et une phase reproductive. Pendant la phase végétative, qui correspond à la phase de croissance, l'appareil végétatif colonise le substrat par extension et ramification des hyphes. Il existe deux types de ramifications, la ramification par dichotomie (apex) ou par bourgeonnement (latéral). Cette phase correspond également à la phase de nutrition, les hyphes absorbant à travers leur paroi, l'eau ainsi que les éléments nutritifs contenus au sein du substrat tout en dégradant le substrat par émission d'enzymes et d'acides organiques. La forme mycélienne en expansion, qui constitue une phase active de développement, est responsable de la dégradation et de l'altération du substrat (Jennings et Lysek, 1996).

Les champignons se propagent sur différents substrats, par l'intermédiaire de spores qui sont des corpuscules de 2 à 250  $\mu\text{m}$  de diamètre. Les spores sont disséminées principalement par l'air ambiant ou par le contact des insectes ou de l'homme. Lorsqu'elles se déposent sur un substrat organique, elles germent si les conditions d'humidité et de température y sont favorables. Elles y pénètrent par voie chimique (production d'enzymes, de toxines) ou par voie mécanique en exerçant une pression sur le substrat (Bouchet *et al.*, 2005).

Le cycle de vie des champignons comprend deux types de reproduction :

- i. une reproduction asexuée, au cours de laquelle une spore ou un fragment de mycélium croît et se développe sur un substrat. Le mycélium émet des conidiophores à l'extrémité desquels des conidies sont émises puis disséminées;
- ii. la reproduction sexuée, implique la rencontre de deux mycéliums de signes sexuels opposés. Un mycélium à  $n$  chromosomes va rencontrer un autre mycélium à polarité complémentaire pour donner lieu à la fusion des cytoplasmes, ce qui engendre un nouveau mycélium à  $2n$  chromosomes. Les cycles de vie diffèrent d'un champignon à un autre selon leur type de spores (Webster et Weber, 2007).

### 1-4- Mode de nutrition des champignons filamenteux

Les champignons filamenteux étant cosmopolites et hétérotrophes, ils présentent différents types d'habitat au sein desquels ils vont établir des interactions différentes avec leur environnement et il existe donc différents modes de nutrition des champignons filamenteux. Le premier mode de nutrition est le saprophytisme.

Dans ce cas, les champignons dégradent la matière organique morte ou en décomposition afin de prélever les éléments minéraux essentiels. Ils jouent un rôle très important dans le recyclage des matières mortes comme les débris végétaux et animaux. Le deuxième mode de nutrition est la symbiose. Les champignons filamenteux obtiennent leurs nutriments grâce à un autre organisme en échange de certains bénéfices, tels une protection, de l'eau ou des sels minéraux. Les deux organismes sont alors qualifiés de symbiotes. Le troisième mode de nutrition est le commensalisme.

Les champignons filamenteux dits commensaux tirent un bénéfice de leur hôte sans leur nuire et sans leur apporter un quelconque avantage. Les bénéfices observés peuvent être la récupération des débris nutritifs de l'hôte, le transport ou le refuge.

Enfin, le quatrième mode de nutrition est le parasitisme. Dans ce cas, les champignons filamenteux extraient leurs nutriments de la matière vivante. Ils tirent profit de leurs hôtes en vivant à leurs dépens entraînant parfois leur mort (Dix et Webster, 1995 ; Carlile *et al.*, 2001 et Madingan *et al.*, 2012).

### **1-5-Conditions de développement des champignons filamenteux**

Bien qu'ils soient relativement peu exigeants, le développement des moisissures est dépendant de facteurs nutritifs et environnementaux.

#### **1-5-1- Eléments nutritifs**

Les plus importants sont le Carbone et l'Azote, utilisés sous forme de composés organiques, et des ions minéraux (potassium, phosphore, magnésium, calcium...) en quantités très faibles mais essentielles à la stimulation et l'orientation du développement fongique. Ces éléments nutritifs sont accessibles aux moisissures du fait qu'ils sont disponibles dans la nature (Roquebert, 1984).

Les moisissures modifient les substrats aux dépens desquels elles se développent. Elles prélèvent les éléments nécessaires pour édifier leur contenu cellulaire et produire l'énergie nécessaire à leurs processus vitaux, et les transforment grâce à de puissants systèmes enzymatiques (Dix et Webster, 1995).

#### **1-5-2- Activité de l'eau**

L'activité de l'eau ( $A_w$ ) d'un aliment dépend de sa composition chimique, *i.e.* de la quantité d'eau retenue par les sels, les sucres et les protéines, ainsi que de ses caractéristiques physiques (porosité, polarité). Ce paramètre peut varier de 0 (pour les substrats dans lesquels toute l'eau est retenue) à 1 (pour l'eau pure). Les moisissures sont, de façon schématique, plus xérotolérantes que d'autres microorganismes (bactéries, levures). La plupart des moisissures se développent bien pour des activités en eau voisines de 0,85. Par conséquent, beaucoup de produits dont l'activité hydrique ne permet pas la croissance bactérienne peuvent être colonisés par les moisissures.

Les moisissures appartenant aux genres *Aspergillus* et *Penicillium* sont généralement capables de se développer à des  $A_w$  voisines de 0,7 à 25 °C ; elles peuvent donc se développer dans les aliments pauvres en eau comme les céréales au cours de stockage, les fruits secs, les produits dont l'activité hydrique a été réduite (produits de salaison sèche, confitures, etc.). Par comparaison, les *Fusarium* ne peuvent pas se développer que pour des  $A_w$  supérieures à 0,9. Il s'agit donc d'espèces se développant au champ, sur les plantes vivantes (Castegnaro et Pfohl-Leskowicz, 2002).

### 1-5-3- pH

Les micromycètes peuvent se développer dans une large gamme de pH : compris entre 3 et 8. Néanmoins, leur croissance est normalement optimale entre pH 5 et 6. En raison de leur acidité (pH < 6) de nombreux aliments comme les légumes et les fruits sont beaucoup plus exposés à une altération fongique que bactérienne (Keller et Hohn, 1997).

### 1-5-4- Température

La température est l'un des facteurs les plus importants qui agissent sur la croissance des microorganismes. En effet, chaque microorganisme a un domaine de température optimale favorisant son développement. Des températures situées en dehors de ce domaine gênent sa croissance. En fonction de cette température optimale, on classe les microorganismes en plusieurs groupes dont les noms reflètent les divers domaines de tolérance thermique (tableau 1).

**Tableau 1** : Classification des microorganismes en fonction de leurs températures cardinales (Dix et Webster, 1995).

Microorganismes	Températures cardinales (°C)		
	Minimale	Optimale	Maximale
Psychrophiles	0	15	20
Psychrotolérants	0	25-30	35
Mésophiles	5	25-30	35
Thermo-tolérants	5	25-30	50
Thermophiles	20	45	> 50

En conséquence, tous les organismes se caractérisent par :

- Une température minimale, au-dessous de laquelle, il n'y a pas de croissance.
- Une température optimale, pour laquelle, la croissance est la plus rapide.
- Une température maximale, au-dessus de laquelle, la croissance n'est plus possible.

Ces trois températures sont appelées températures cardinales.

La température joue un rôle très important et souvent décisif pour la distribution des organismes sur la surface de la terre. Les champignons, comme tous les autres groupes de microorganismes, ont évolué pour s'adapter aux variations de températures environnementales et occuper un vaste domaine dans les écosystèmes, essentiellement terrestres. A des températures inférieures à 0 °C, les cellules fongiques peuvent survivre, mais, elles se développent rarement. Au-dessus de 40 °C, la plupart de champignons arrêtent leur croissance et sont détruits (Carlile *et al.*, 2001). De ce fait, la majorité de moisissures sont des microorganismes mésophiles et se développent normalement à une température comprise entre 5 et 35 °C, avec un optimum situé entre 25 et 30 °C. Exceptionnellement quelques champignons peuvent se développer à des températures supérieures à 50 °C (Suganthi *et al.*,

2015). Quelques autres champignons peuvent montrer une préférence pour les basses températures (Dix et Webster, 1995).

#### 1-5-5- Aération

Les champignons sont des microorganismes aérobies ; ils ont besoin d'oxygène pour une croissance normale. Toutefois, leur développement est peu affecté par des teneurs de 10 fois plus faibles (2,1 %) que celle de l'atmosphère. En conséquence, certaines espèces de moisissures pourront se développer sur les denrées alimentaires conservées dans une atmosphère pauvre en oxygène (Webster et Weber, 2007).

#### 1-5-6- Lumière

La lumière favorise la maturation des conidies et la germination des spores. Les moisissures sont, généralement, indifférentes à l'action de lumière. Toutefois, certaines espèces (les *Tuberales*) ne supportent pas la lumière et se développent dans des endroits obscurs (grottes) ; inversement, d'autres se développent sur les versants de montagne ensoleillés en permanence ou dans les régions désertiques (les *Discomycetes*) (Pfohl-Leszkowicz, 2001).

#### 1-5-7- Interactions microbiennes

La compétition pour les nutriments et l'espace est un phénomène rencontré fréquemment dans le monde vivant. La présence simultanée de plusieurs espèces de microorganismes dans le même milieu détermine des interactions entre les différentes espèces. Les conditions environnementales peuvent favoriser certaines espèces et défavoriser d'autres. Par exemple, les *Mucoraceae*, caractérisés par une vitesse de croissance apicale élevée envahissent rapidement le milieu en inhibant le développement des espèces se développant plus lentement. La synthèse des substances toxiques (mycotoxines) et leur accumulation dans le milieu peut aussi avoir un effet inhibiteur sur le développement d'autres espèces (Pfohl-Leszkowicz, 2001).

### 1-6- Ecologie des champignons filamenteux

Dans la nature, la plupart des champignons se développent le plus souvent comme des microorganismes saprophytes. Ils participent à la dégradation et au recyclage de la matière organique et minérale. Ces caractéristiques confèrent aux champignons, la possibilité de coloniser et d'explorer de nouveaux habitats et ainsi, d'occuper tous les environnements possibles : terrestres, aquatiques, régions tropicales et polaires (Dix et Webster, 1995).

L'écologie microbienne étudie le comportement des microorganismes dans leur environnement naturel. Le terme environnement fait allusion à tout ce qui entoure le microorganisme : les facteurs biologiques, chimiques et physiques qui agissent sur eux. L'écologie microbienne centralise ses études sur l'isolement, l'identification et sur le dénombrement des microorganismes dans leur habitat.



## 2- Champignons filamenteux thermophiles

### 2-1- Champignons thermophiles et thermotolérants

Un champignon est considéré comme thermophile lorsque les températures limites de sa croissance sont situées entre 20 °C et plus de 50 °C. Tandis qu'un champignon est considéré thermotolérant lorsque sa température maximale de croissance se situe aux environs de 50 °C et qu'il se développe également à des températures inférieures à 20 °C (tableau 1) (Cooney et Emerson, 1964 et Salar et Aneja, 2007).

Le premier champignon thermophile (*Mucor pusillus*) a été décrit en 1886 par Linot (in Cooney et Emerson, 1964). En 1899, *Humicola lanuginosa* a été répertorié par Tsikinskaya. En 1964, grâce aux études réalisées par Cooney et Emerson (1964), une quinzaine d'espèces thermophiles et thermotolérantes ont été décrites. Selon Salar et Aneja (2007), Il existe 42 espèces de champignons filamenteux thermophiles décrits avec cinq espèces appartenant aux Zygomycètes, vingt-trois aux Ascomycètes et quatorze aux Deutéromycètes (Mouchacca, 1997, 1999, 2001). Avec l'annonce de l'utilisation commerciale potentielle des champignons thermophiles, plusieurs recherches de nouvelles espèces ont été lancés (Yang *et al.*, 2015 et Robledo *et al.*, 2016).

### 2-2- Habitat des champignons thermophiles et thermotolérants

Les champignons thermophiles et thermotolérants sont plus fréquents dans les sols tropicaux chauds et ils sont distribués sur toutes les latitudes (Ellis, 1980). Le compostage des végétaux constitue aussi une des plus riches sources des champignons thermophiles, la participation de ces derniers dans le processus de compostage montre qu'ils sont très liés à la décomposition de la matière organique (protéines, lipides, fibres...) (Kane et Mullins, 1973). En effet plusieurs microorganismes sont capables de se développer sur des substrats solides, mais seuls les champignons filamenteux peuvent croître à des niveaux satisfaisants sur des milieux ayant des humidités initiales faibles (Roussos, 1985).

Les champignons filamenteux thermophiles sont capables d'utiliser différentes sources de carbone pour leur croissance. Ogundero (1981) a démontré la capacité de *Rhizomucor pusillus*, *Rhizopus microsporus* et *Aspergillus fumigatus*, à dégrader l'huile de la palme nigérienne, et possédant une activité amylolytique. L'utilisation de la cellulose comme source de carbone a été confirmé pour *A. fumigatus*. Chang *et al.* (1992) a confirmé la dégradation de l'hémicellulose par différents champignons filamenteux thermophiles ; Kane et Mullins (1973) ont montré le rôle important des champignons thermophiles dans la thermogenèse au cours du compostage et la décomposition de la cellulose. Finalement, la production d'un large spectre d'enzymes par les champignons joue un rôle primordial sur la distribution des

espèces. Cette capacité de dégrader différentes sources de carbone leur permet de coloniser des écosystèmes variés (tableau 2).

### **2-3- Adaptation physiologique des champignons filamenteux thermophiles aux températures élevées**

Le maintien de membranes biologiques stables et fonctionnelles est une première condition pour permettre la vie cellulaire en conditions extrêmes de température, pression ou salinité. Les membranes sont indispensables pour produire de l'énergie et compartimenter les activités biochimiques. Des modifications dans la composition des lipides membranaires des microorganismes permettent leur adaptation aux hautes et basses températures ainsi qu'aux très hautes pressions qui affectent la fluidité des membranes (Dix et Webster, 1995).

Chez les organismes non extremophiles, l'exposition à des conditions physico-chimiques "extrêmes" inactive voire dénature certaines protéines. L'adaptation extremophile consiste aussi à préserver l'assemblage des machines cellulaires et le repliement tridimensionnel des chaînes polypeptidiques qui constituent les protéines. Ce repliement est en effet responsable de l'activité biochimique des enzymes. Comprendre les mécanismes qui permettent de stabiliser les macromolécules biologiques dans des conditions extrêmes est non seulement utile pour comprendre les origines et les capacités d'expansion du vivant, les processus fondamentaux qui régissent le fonctionnement des protéines ainsi que les processus cellulaires universels destinés à entretenir l'intégrité de la machinerie cellulaire (Oger et Franzetti, 2012).

Une première stratégie largement utilisée par les extremophiles pour préserver leurs constituants cellulaires, consiste à synthétiser et accumuler dans le cytoplasme des petites molécules (tréhalose, bétaines, etc.) qui stabilisent les édifices moléculaires (Bhalla *et al.*, 2015). Le maintien de l'intégrité et de l'homéostasie des protéines met aussi en jeu une optimisation de systèmes chaperons et de modification des protéines destinés à empêcher leur agrégation, et à assister leur repliement ou à déclencher leur destruction rapide par des protéases intracellulaires. Les mécanismes cellulaires qui préservent l'intégrité des macromolécules biologiques demandent beaucoup d'énergie aux cellules. Voilà pourquoi les protéines des vrais extremophiles ont des propriétés fortement modifiées. Acquises au cours de l'évolution via des mutations, ces modifications stabilisent les protéines dans des conditions de températures élevées. La comparaison des structures cristallographiques de protéines issues d'organismes extremophiles avec leurs homologues mésophiles montre cependant peu de différences dans l'architecture globale des édifices. Par contre, les mutations sélectionnées génèrent des propriétés biophysiques très différentes. Par exemple, les protéines thermophiles sont "figées" à température ambiante en cause : une rigidification de l'édifice macromoléculaire due à l'optimisation des interactions intramoléculaires. De quoi conférer aux protéines une extraordinairement robustesse. Toutefois, si le maintien de l'édifice tridimensionnel est essentiel au fonctionnement des macromolécules biologiques,

**Tableau 2** : Quelques habitats des champignons filamenteux thermophiles.

Habitat d'isolement	Champignons isolés	Références
Environnement	<i>Myceliophthora thermophila</i>	Pereira <i>et al.</i> (2015)
Le compost de la paille du blé	<i>Aspergillus fumigatus</i> <i>Chaetomium thermophile</i> <i>Fuzarium culmorum</i> <i>Humicola insolens</i> ; <i>H. lanuginosa</i> <i>Mucor pusillus</i>	Chang <i>et al.</i> (1992)
Les sédiments aquatiques	<i>Aspergillus fumigatus</i> <i>Humicola grisea</i> <i>Thermomyces lanuginosus</i>	Ellis (1980)
Tourteau de Coprah	<i>Aspergillus fumigatus</i> <i>Rhizomucor pusillus</i> <i>Rhizopus microsporus</i>	Cordova <i>et al.</i> (1998)
Grignons d'olives et autres sous-produits oléicoles	<i>Aspergillus fumigatus</i> <i>Humicola grisea</i> ; <i>H. lanuginosa</i> <i>Malbranchea cinnamomea</i> <i>Myceliophthora thermophila</i> <i>Paecilomyces variotii</i> <i>Rhizomucor miehei</i> ; <i>R. pusillus</i> <i>Thermoascus aurantiacus</i>	Lamrani <i>et al.</i> (2006)
ensilage de maïs	<i>Aspergillus fumigatus</i> <i>Rhizomucor pusillus</i>	Robledo <i>et al.</i> (2016)
Les fientes (volailles)	<i>Humicola nsolens</i> <i>H. lanuginosus</i> <i>Mucor miehei</i> ; <i>M. pusillus</i> <i>Myriococcum albomyces</i> <i>Penicillium duponti</i>	Rajavaram <i>et al.</i> (2010)
Déchets municipaux	<i>Chaetomium thermophile dissitum</i> <i>Humicola lanuginosus</i> <i>Mucor miehei</i>	Rajavaram <i>et al.</i> (2010)
Déchets industriels	<i>Chaetomium thermophile</i> <i>Humicola lanuginosus</i> <i>Mucor miehei</i> ; <i>M. pusillus</i>	Rajavaram <i>et al.</i> (2010)

les protéines sont aussi dotées de propriétés dynamiques globales. Certaines régions doivent bouger pour reconnaître les substrats, les cofacteurs et permettre d'accomplir des fonctions biochimiques complexes (Vieille et Zeikus, 2001).

L'analyse comparative des structures associées à des travaux d'évolution et de simulation moléculaire a permis d'identifier des régions clé au sein de la structure des protéines. Au cours de l'évolution, des acides aminés ont été substitués dans ces régions (Coquelle *et al.*, 2007).

Les contraintes exercées sur les édifices moléculaires par les différents paramètres environnementaux ne sont pas les mêmes, ce qui se traduit par des stratégies adaptatives différentes. Ainsi, chez les thermophiles, le principal défi consiste à empêcher le dépliement des protéines. L'adaptation consiste à renforcer les forces qui stabilisent le repliement des protéines tout en maintenant une flexibilité importante dans les régions consacrées au fonctionnement biochimique des enzymes (Cavicchioli *et al.*, 2002).

### 3- La moisissure *Rhizopus oryzae*

*Rhizopus oryzae* est une moisissure saprophyte cosmopolite qui se développe sur différents milieux. Elle est très répandue dans les grandes variétés de sols, céréales, matières végétales en décomposition, les composts et les eaux usées (Ghosh et Ray, 2013 et Hoffmann et al., 2013). Elle peut envahir les cultures et empêcher le développement d'autres mycètes (moisissure envahissante). Elle est très utilisée en industries alimentaires : elle été utilisée pendant des siècles dans la production de Tempeh et d'autres aliments asiatiques (Botton et al., 1990 et Cantabrana et al., 2015).

#### 3-1- Taxonomie de *Rhizopus oryzae*

Les *Rhizopus* comme les autres mucorales sont rattachés à la division des *Zygomycota*, la famille des Mucoraceae (Schübler et al., 2001 ; James et al., 2006 ; Hibbett et al., 2007 ; Hoffmann et al., 2011 ; Jones et al., 2011<sub>a,b</sub> et Benny, 2012). Cette vaste famille très hétérogène a vu beaucoup de ses membres reclassés. En 2013, Hoffmann et al. proposent la création d'une nouvelle famille des *Rhizopodaceae*, de ce faite *R. oryzae* est classifiée comme suit :

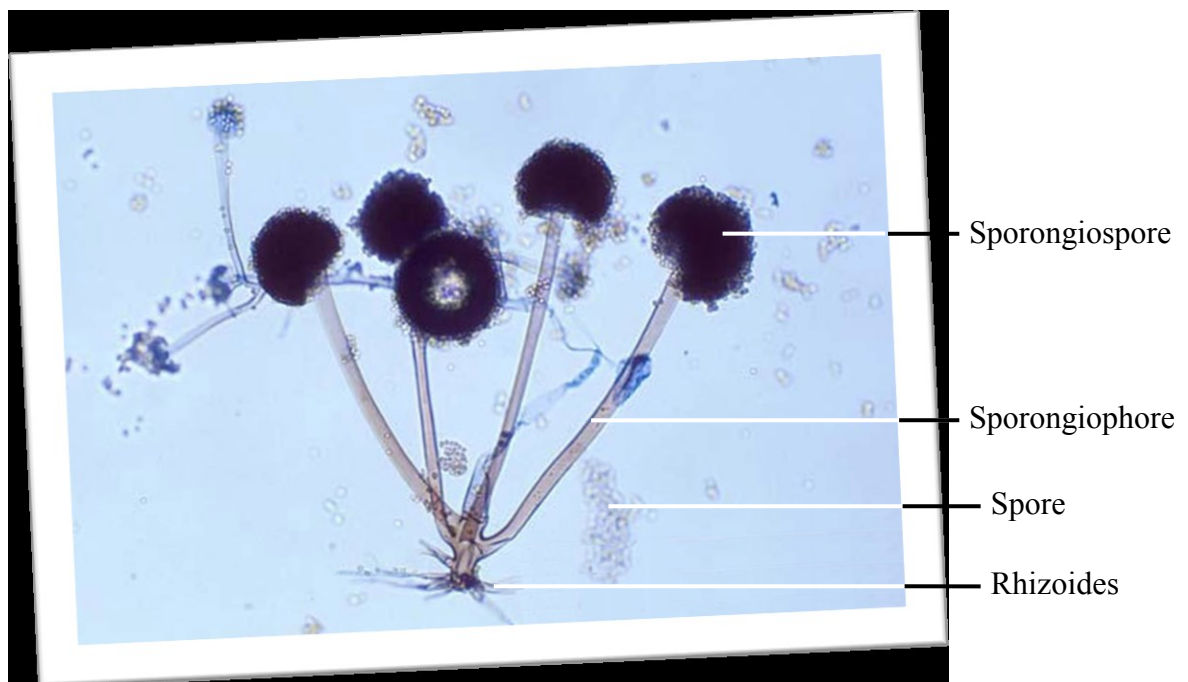
Règne	: Fungi
Division	: Zygomycota
Sousdivision	: Mucoromycotina
Classe	: Zygomycètes
Ordre	: Mucorales
Famille	: Mucoraceae (selon <a href="#">MycoBank</a> ) Rhizopodaceae (selon <a href="#">IndexFungorum</a> )
Genre	: <i>Rhizopus</i>
Espèce	: <i>Rhizopus oryzae</i>

#### 3-2- Caractères morphologiques de *Rhizopus oryzae*

Selon Domisch et al. (1980), Botton et al. (1990), Boiron (1996), Campbell et al. (1996), Ellis (1998), Smith (2002) et Larone (2011), les caractères morphologiques de *R. oryzae* se représentent ainsi :

- Un thalle à croissance extrêmement rapide sur le milieu CYA et Sabouraud remplissant la boîte de Pétri (20 mm par jours) atteignant 5 à 8 mm de hauteur, cotonneux blanc au début, gris brunâtre à noirâtre gris selon la sporulation ;

- Une formation d'appendices en forme de racines, nommés rhizoïdes, qui se forment à la base des sporocystophores (ou sporangiophores) et fixent le mycélium sur le substrat ;
- Un mycélium non septé ;
- Un sporangiophore seul ou en groupe de 2 à 5 de 150 à 2000  $\mu\text{m}$  de hauteur et de 6 à 14  $\mu\text{m}$  de diamètre ;
- Un sporocyste globuleux à paroi finement échinulée noir grisâtre de 30 à 120  $\mu\text{m}$  de diamètre ;
- Un chlamydospore globuleux ou cylindrique de 10 à 35  $\mu\text{m}$  de diamètre ;
- Des columelles globuleuses, subglobuleuses, ou ovoïdes larges ;
- Des spores irrégulières souvent anguleuses, gris clair ou brune 4 à 10  $\mu\text{m}$  de long ;
- Un rhizoïde brun jaune, peu ramifié ;
- Présence de stolons, hyphes aériennes grâce auxquelles le champignon se dissémine (fig. 2).



**Figure 2** : La moisissure *Rhizopus oryzae*.  
(<http://www.mold.ph/rhizopus.htm> ; consulté le 03 janvier 2016)

### 3-3- La reproduction chez *Rhizopus oryzae*

*Rhizopus oryzae* se reproduit par deux modes sexué et asexué. La reproduction asexuée débute par la formation d'hyphes aériens, l'extrémité d'un hyphe aérien (appelée spongiospore) est séparée de l'hyphe végétatif par un septum appelé columelle. Les éléments contenus dans le cytoplasme de l'extrémité d'un hyphe se différencient en un sporange contenant de nombreuses spores asexuées. Les spores contiennent des noyaux haploïdes issus des divisions mitotiques d'un noyau de mycélium végétatif. La dissémination des spores se fait par l'intermédiaire de l'eau et du vent (Nicklin *et al.*, 2000) (fig. 3). En cas de reproduction sexuée, deux noyaux de type sexué différent fusionnent, à l'intérieur d'une cellule spécialisée appelée zygospore. La fusion se fait au niveau de deux extrémités différentes des hyphes appelés "progametange", pour donner une zygospore, qui subit une méiose au cours de son développement (Nicklin *et al.*, 2000).

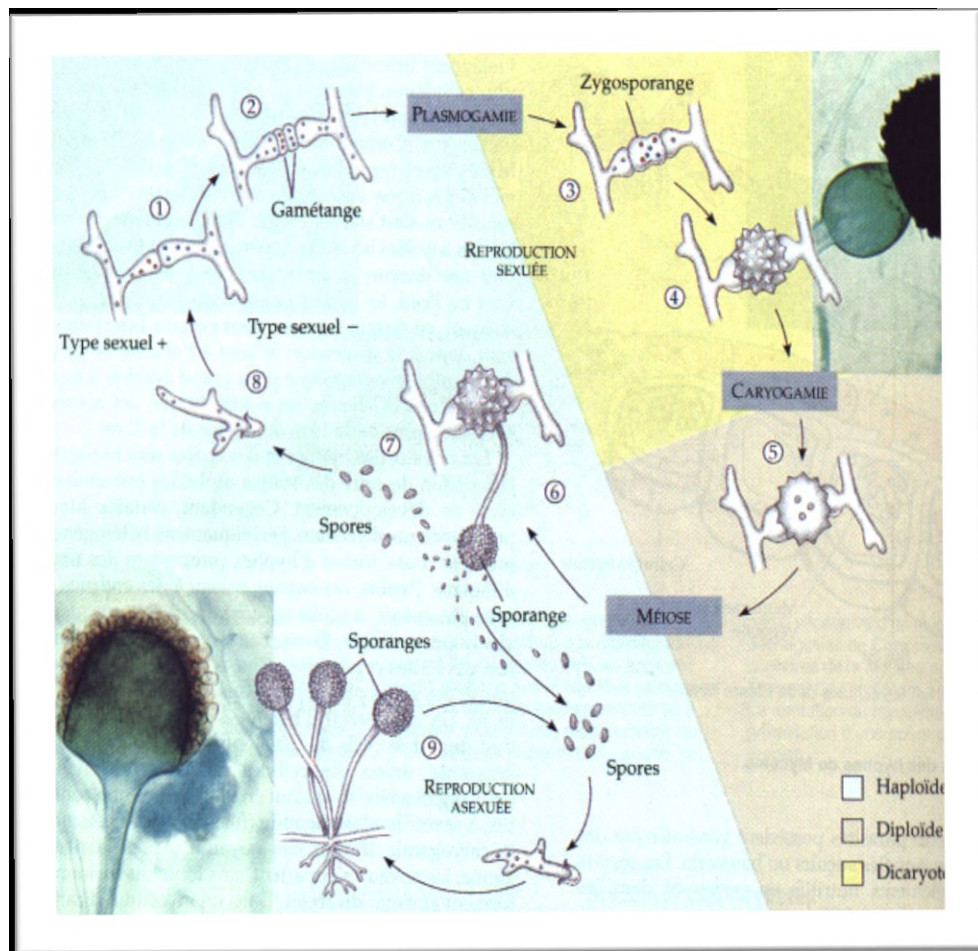
Trois des produits nucléaires dégénèrent, laissant seulement un noyau dans le mycélium germinatif (Boiron, 1996 ; Nicklin *et al.*, 2000 et Bouchet *et al.*, 2005).

### 3-4- Les fermentations réalisées par *Rhizopus oryzae*

La culture des microorganismes producteurs d'enzymes est une tradition plus que millénaire dans les pays d'orient. En effet, les espèces fongiques appartenant aux *Aspergillus* et *Rhizopus* ont de tout temps été des auxiliaires de la préparation par fermentation d'aliments et de boissons variés (Durand et Monsan, 1982). En effet, *Rhizopus oryzae* est utilisée dans la préparation du Tempeh, du Sufu et du Saké :

- Le Tempeh est un aliment indonésien obtenu à partir du développement de la moisissure *Rhizopus oryzae* sur des grains de soja entières cuites au préalable et ayant subi une fermentation acide (Shurtleff et Aoyagi, 2001 et Cantabrana *et al.*, 2015). Il est Digeste, riche en protéines, en vitamines (B6, B12, B13), et pauvre en lipides. Il constitue une source de cuivre, de potassium, de magnésium, d'acide folique, de zinc, de phosphore et de calcium. Il est aussi riche en fibres, en riboflavine (vitamine B2) et en acide pantothénique (vitamine B5) ;
- Le Sufu est un aliment traditionnel chinois préparé à partir de lait caillé de soja le procédé de fabrication comporte une fermentation fongique (*Mucor*, *Actinomucor* et *R. oryzae*) de 3 à 7 jours suivie d'une maturation pouvant durer plusieurs mois (Boiron, 1996) ;
- Pour le saké, l'amidon est cuit puis stérilisé et soumis en conditions aérobies à l'action de *R. oryzae* sécrétant une amyloglucosidase et d'une levure fermentant le sucre en alcool (Durand et Monsan, 1982).





**Figure 3 :** Le cycle biologique d'un zygomycète typique (<http://www.lesbeauxjardins.com/cours/botanique/4-champignons/classification.htm> ; consulté le 03 janvier 2016).



Des études récentes réalisées par [Cantabrana et al. \(2015\)](#) portant sur l'utilisation de cette moisissure dans la cuisine sur les Fruits, céréales, noix et les légumineuses engendre des changements sensoriels profonds très appréciés dans ces aliments et donne des saveurs variées et des textures appréciables, en fonction de la nourriture fermentée.

### 3-5- La production d'enzymes

La moisissure *Rhizopus oryzae* répond parfaitement aux critères d'un champignon à applications industrielles en particulier dans l'industrie agro-alimentaire :

- Elle est désignée comme GRAS (*Generally Recognised as Safe*) par la FAO (*Food and Agriculture Organisation of the United Nations*) et la FDA (*Food and Drug Administration of the United States*) ([Ghosh et Ray, 2013](#)). Ceci est particulièrement important surtout lorsque l'enzyme produite est utilisée dans les procédés alimentaires ([Sarrouh et al., 2012](#)) ;
- Aucun potentiel infectieux lié à *R. oryzae* n'a été démontré pour la population générale. A notre connaissance, aucune production de toxines par *R. oryzae* n'a été rapportée dans la littérature. Elle est utilisée comme agent détoxifiant contre les toxines alimentaires, comme l'ochratoxine A ([Varga et al., 2007](#)), et pour augmenter la digestibilité de certaines légumineuses ([Azeke et al., 2007](#)) ;
- Cette espèce présente des critères de pureté chimique et biologique qui répondent aux exigences relatives à l'emploi de préparations enzymatiques pour la fabrication de certaines denrées et boissons.

Au cours de la fermentation, la moisissure *Rhizopus oryzae* produit de nombreuses enzymes ([Botton et al., 1990](#) et [Ghosh et Ray, 2013](#)). Les processus de fermentation submergée dominant en tant que procédés pour la production d'un grand nombre d'enzymes d'importance industrielle. Les différentes enzymes produites par *Rhizopus oryzae* ainsi que leurs applications industrielles sont consignées dans le tableau 3.

**Tableau 3** : Les enzymes produites par *Rhizopus oryzae* et leurs applications industrielles.

Enzymes	Applications industrielles	Références
$\alpha$ -Amylase	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Boulangerie industrielle</li> <li>• Brasserie</li> <li>• Textile</li> <li>• Pharmacie</li> </ul>	Cuvellier (1999) Ghosh et Ray (2010) Freitas <i>et al.</i> (2014)
Amyloglucosidase et glucoamylase	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Boissons sucrées</li> <li>• Sirops de sucre</li> <li>• Confiserie</li> </ul>	Ghosh et Ray (2013)
Cellulase	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Textile</li> <li>• Pharmacie</li> </ul>	Karmakar et Ray (2011)
Lipase	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Industrie des détergents</li> <li>• Industrie fromagère</li> <li>• Pharmacie</li> <li>• Diagnostic médical</li> </ul>	Durand et Monsan (1982) Botton <i>et al.</i> (1990) Ghosh et Ray (2013)
Pectinase	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Cidre</li> <li>• Vin</li> </ul>	Ghosh et Ray (2013)
Phytase	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Alimentation des volailles</li> </ul>	Ghosh et Ray (2013)
Protéase	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Tannerie</li> <li>• Aide digestif</li> <li>• Panification</li> <li>• Hydrolyse des protéines de soja</li> </ul>	Botton <i>et al.</i> (1990) Ghosh et Ray (2011)
Xylanase	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Bio-blanchissement de la pâte de bois</li> <li>• Textiles</li> <li>• Fabrication des aliments pour animaux.</li> </ul>	Meussen <i>et al.</i> (2012)

## 4- Les enzymes amylolytiques

Les enzymes intervenant dans l'hydrolyse de l'amidon sont appelées enzymes amylolytiques ou amylases. Leur histoire a commencé en 1811, lorsque Kirchoff a découvert pour la première fois une enzyme dégradant l'amidon. L'amidon est le constituant polysaccharidique majeur des produits agricoles (maïs, blé, pomme de terre, riz, sorgho, manioc...) que la plante utilise comme substance de réserve stockée dans la graine ou le tubercule. Il contribue grandement à la propriété et la texture de nombreux aliments et est largement utilisé comme stabilisateur d'émulsion, agent gélifiant ou épaississant, agent de rétention d'eau (Pei-Ling *et al.*, 2010 ; Jaspreet-Singha *et al.*, 2007). Mais l'amidon se prête à des modifications chimiques ou enzymatiques permettant de lui donner des fonctionnalités les plus diverses. Le succès commercial des amylases (30 % des enzymes commerciales) est dû à l'industrie de l'amidon qui est l'une des plus grandes utilisatrices d'enzymes amylolytiques (Rajagopalan et Krishnan, 2008 et Singhania *et al.*, 2009). Les amylases appartiennent à la grande famille des hydrolases (qui représente 75 % des enzymes produites) et plus précisément le groupe des glycosides hydrolases (GH). Selon Gupta *et al.* (2003), Michelin *et al.* (2010) et l'Union Internationale de Biochimie et de Biologie Moléculaire (UIBBM), les GH peuvent être classées en trois grands groupes :

1. Les endo-amylases qui hydrolysent les liaisons  $\alpha$ -1,4 de l'amylose et l'amylopectine (les deux constituants de l'amidon) libérant ainsi des oligosaccharides et des dextrines. Dans ce groupe, nous retrouvons principalement l' $\alpha$ -amylase (EC 3.2.1.1) ;
2. Les exo-amylases, elles regroupent la  $\beta$ -amylase (EC 3.2.1.2), l' $\alpha$ -glucosidase (EC 3.2.1.20) et la glucoamylase ou l'amyloglucosidase (EC 3.2.1.3). Leur action libère des sucres de faibles poids moléculaires comme le glucose, le maltose et des oligosaccharides ;
3. Les enzymes de débranchement, elles hydrolysent les liaisons  $\alpha$ -1,6 de l'amylopectine : la pullulanase (EC 3.2.1.41) et l'isoamylase (EC 3.2.1.68) appartiennent à ce groupe ;

Généralement, ces trois groupes travaillent en synergie. L'action synergique trouvée dans les complexes amylolytiques est bénéfique pour l'hydrolyse de l'amidon, car elle augmente la vitesse de réaction globale et diminue la rétro-inhibition des produits (Castro *et al.*, 2011).

Les amylases les plus importantes pour les applications industrielles et biologiques sont : l' $\alpha$ -amylase, la glucosidase, la pullulanase et la  $\beta$ -amylase (Michelin *et al.*, 2010).

L' $\alpha$ -amylase est produite par une grande variété d'organismes vivants, allant des microorganismes aux plantes et aux animaux.

#### 4-1- L' $\alpha$ -amylase fongique

C'est une glycosidase (EC 3.2.1.1) qui rompt des liaisons osidiques  $\alpha$ -1,4 des polysaccharides (amidon et glycogène) en libérant du glucose, du maltose et des maltodextrines solubles de taille variable (Goesaert *et al.*, 2009 et Elleuche et Antranikian, 2013). Ces maltodextrines renferment des points de ramification car l'enzyme ne peut pas hydrolyser les points de branchement  $\alpha$ -1,6. Le substrat classique de l' $\alpha$ -amylase est l'amidon, composé d'amylose et l'amylopectine: l'amylose est un polymère linéaire constitué d'un maximum de 6000 unités de glucose avec les liaisons glycosidiques de type  $\alpha$ -1,4. L'amylopectine est constituée de courtes chaînes linéaires de 10 à 60 unités de glucose unis de manière linéaire par des liaisons  $\alpha$  1 $\rightarrow$ 4. Des ramifications apparaissent avec une liaison  $\alpha$  1 $\rightarrow$ 6 tous les 15 à 45 monosaccharides (Marc *et al.*, 2002 et Sindhu *et al.*, 2017) Les  $\alpha$ -amylases fongiques sont préférées aux autres sources microbiennes en raison de leur statut GRAS (*Generally Recognized As Safe*) (Gupta *et al.*, 2003).

L'histoire de la production industrielle d'enzymes remonte à l'époque où le Dr Jokichi Takamine a commencé la production d'une préparation d'enzymes digestives par culture d'*Aspergillus oryzae* dans du son de blé en 1894 (Aiyer, 2005).

La plupart des rapports sur les champignons qui produisent l' $\alpha$ -amylase sont limitées à quelques espèces de champignons mésophiles (*Aspergillus et Penicillium*) (Gupta *et al.*, 2003 et Kathiresan et Manivannan, 2006). En effet, *Aspergillus oryzae et Aspergillus niger*, produisent des quantités considérables d'enzymes qui sont largement utilisés dans l'industrie (Djekrif-Dakhmouche *et al.*, 2006 ; Hernández *et al.*, 2006 et Kammoun *et al.*, 2008). Le tableau 4 regroupe quelques caractéristiques de l' $\alpha$ -amylase produites par différentes souches fongiques citées dans la littérature.

#### 4-2- Structure de l' $\alpha$ -amylase

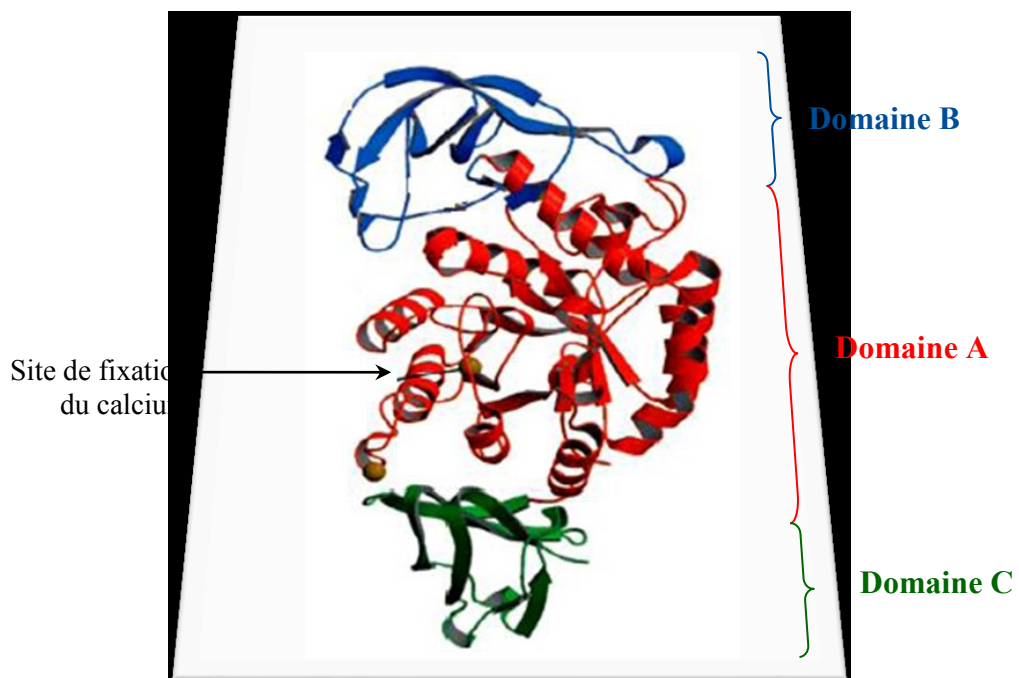
Les amylases appartiennent à la famille 13 des glycosides hydrolases (GH) (Henrissat et Davies, 1997). Se sont des enzymes multimodulaires composées de trois domaines, A, B et C.

- *Le Domaine A* : Ce domaine situé dans la plupart des cas à l'extrémité N-terminale de la protéine correspond au domaine catalytique et adopte une structure en tonneau ( $\beta/\alpha$ )<sub>8</sub> (Macgregor *et al.*, 1996). Le site actif comprend une triade catalytique formée d'un acide glutamique jouant le rôle du donneur de proton, d'un acide aspartique agissant comme nucléophile et d'un second acide aspartique intervenant dans la stabilisation de l'intermédiaire covalent glucosyl-enzyme (fig. 4) (Yoshioka *et al.*, 1997 et Uitdehaag *et al.*, 1999).

**Tableau 4** : Propriétés de l' $\alpha$ -amylase produite par quelques souches fongiques.

Microorganisme	pH optimum	Température optimal/stabilité	Inhibiteurs	Substrat	Activité Amylasique	Références
<i>Aspergillus awamori</i> ATCC 22342	4,8 - 5,0	50 °C / 40 °C (60 min)	Hg <sup>2+</sup> , Pb <sup>2+</sup>	-	-	Bhella <i>et al.</i> (1984)
<i>A. flavus</i>	6,0	55°C /50°C (1 h)	Ag <sup>2+</sup> , Hg <sup>2+</sup>	Amidon de tapioca	50 U/mL	Khoo <i>et al.</i> (1994)
<i>Pycnoporus sanguineus</i>	7,0	37°C	Glucose, maltose	Son de blé	-	De Almeida Siqueira <i>et al.</i> (1997)
<i>Mucor sp.</i>	5,0	60 °C /55°C (120 min) ; 60 °C (50 min)	EDTA	Amidon	-	Mohapatra <i>et al.</i> (1998)
<i>A. flavus</i>	-	-	-	Graines d'amarante	1920 U/g	Vishwanathan et Surlikar (2001)
<i>A. oryzae</i> NRRL 6270	-	-	-	Grain de brassage	6583 U/g	Francis <i>et al.</i> (2003)
<i>A. oryzae</i> 1042.72	5,0	30 °C	-	Déchet d'oranges	616 U/mL	Bennamoun <i>et al.</i> (2004)
<i>Cryptococcus flavus</i>	5,5	50 °C / 50 °C (60 min)	Hg <sup>2+</sup> , Fe <sup>2+</sup> , Cu <sup>2+</sup>	Amidon	0,25 U/mL	Wanderley <i>et al.</i> (2004)
<i>A. oryzae</i>	5,0	50 °C	Ca <sup>2+</sup> , K <sup>+</sup> , Na <sup>+</sup> , Mg <sup>2+</sup>	Son de blé	9196 U	Ramachandran <i>et al.</i> (2004)
<i>A. oryzae</i>	-	-	-	Tourteau	3 388 U/g	Ramachandran <i>et al.</i> (2004)
<i>Thermomyces lanuginosus</i> ATCC 58160	-	50 °C	-	Son de blé	250 U/g	Kunamneni <i>et al.</i> (2005)
<i>A. niger</i> UO-1	4,95	50 °C /hautement sensible à $\geq$ 70 °C	Cu <sup>2+</sup> , Hg <sup>2+</sup> , Zn <sup>2+</sup>	Eaux usées de brasseries et amidon	70,29 U/mL	Hernández <i>et al.</i> (2006)
<i>A. niger</i> ATCC 16404	5,0 - 6,0	30 °C	-	Déchet d'oranges	490U	Djekrif-Dakhmouche <i>et al.</i> (2006)
<i>A. niger</i> UO-1	4,95	50 °C	Cu <sup>2+</sup> , Hg <sup>2+</sup> , Zn <sup>2+</sup>	Déchets de l'industrie agroalimentaires	-	Hernández <i>et al.</i> (2006)
<i>Penicillium janthinellum</i> NCIM 4960	-	35 °C	-	Son de blé	300 U/g	Sindhu <i>et al.</i> (2009)
<i>Fusarium sp.</i>	6,5	50 °C / 70 °C (30 min)	Hg <sup>2+</sup> , Fe <sup>2+</sup>	Manioc et pomme de terre	2227 U/mL	Nwagu et Okolo (2011)
<i>Rhizopus oryzae</i> CCT3763	5,5	50 °C / 50 °C (60 min)	-	Farine de blé et bagasse	-	Freitas <i>et al.</i> (2014)

- *Le Domaine B* : Ce domaine correspond à une boucle située entre le brin  $\beta$ -3 et l'hélice  $\alpha$ -3 du tonneau  $(\beta/\alpha)_8$ . C'est un domaine qui est peu conservé et qui comprend des acides aminés très souvent impliqués dans la spécificité des enzymes de la famille 13 (Janecek *et al.*, 2011). A titre d'exemple, pour les  $\alpha$ -amylases du genre *Bacillus*, ce domaine présente une structure complexe en feuillets  $\beta$  (Machius *et al.*, 1995).
- *Le Domaine C* : C'est un domaine dit en "clé grecque" très conservé, et essentiellement formé de feuillets  $\beta$  reliés au domaine A. Plusieurs fonctions ont été attribuées à ce domaine. Sa fonction a été peu investiguée. Il est proposé par exemple qu'il contribue à la stabilisation du tonneau  $(\beta/\alpha)_8$  et qu'il facilite le parcours du substrat vers le site actif (Strobl *et al.*, 1998).



**Figure 4** : Structure de l' $\alpha$ - amylase fongique (d'après Das *et al.*, 2011).

En dehors de ces trois domaines, certaines enzymes de la famille possèdent aussi des modules supplémentaires.

En outre, l' $\alpha$ -amylase est une metallo-enzyme à calcium (Fugimoto *et al.*, 1998 ; Gomi *et al.*, 2000 et Savcheko *et al.*, 2002). Elle comporte au moins un ion de calcium par molécule. Chez l' $\alpha$ -amylase acide, on peut observer deux sites de fixations du calcium (Mathews *et al.*, 2000). Cependant, cet ion joue un grand rôle dans le maintien et la stabilité de la structure tertiaire de l'enzyme ainsi que dans son activité catalytique. Chez certaines  $\alpha$ -amylases, la présence d'un site de fixation d'ion  $\text{Cl}^-$  est également signalé (Mathews *et al.*, 2000 et Hwang *et al.*, 1997), et chez d'autres, l'ion  $\text{Zn}^{2+}$  (Gomi *et al.*, 2000).

Par ailleurs, l' $\alpha$ -amylase peut exister sous deux formes qui ont les mêmes propriétés enzymatiques, et diffèrent seulement dans leur mobilité électrophorétique (Mathews *et al.*, 2000 et Kohji *et al.*, 1999).

### 4-3- Les propriétés de l' $\alpha$ -amylase

#### 4-3-1- Masse moléculaire

La masse moléculaire des  $\alpha$ -amylases varie selon l'origine de l'enzyme de 40 à 70 kDa (Gupta *et al.*, 2003).

Il a été rapporté que l' $\alpha$ -amylase de *Chloroflexus aurantiacus* possède la masse moléculaire la plus élevée des  $\alpha$ -amylases avec 210 kDa (Ratanakhanokchai *et al.*, 1992). Par contre, la plus faible masse moléculaire est retrouvée chez *Bacillus caldolyticus* avec 10 kDa (Gupta *et al.*, 2003).

La masse moléculaire des  $\alpha$ -amylases peut être augmentée en raison de la glycosylation comme dans le cas de l'enzyme de *Thermoactinomyces vulgaris* avec 140 kDa (Abou Dohara *et al.*, 2011). Au contraire, la protéolyse diminue la masse moléculaire de l'enzyme comme dans le cas de l' $\alpha$ -amylase de *T. vulgaris* 94-2A avec 48 kDa (Hofemeister *et al.*, 1994).

#### 4-3-2- Température et pH optimum

La température et le pH du milieu joue un rôle important dans la production et la stabilité de l' $\alpha$ -amylase. En général, l'influence de la température sur la production d'amylase est liée à la croissance du microorganisme. Par conséquent, la température optimale dépend du fait que la culture soit mésophile, thermophile ou psychrophile. Pour les champignons la plupart des études sur la production d' $\alpha$ -amylase révèlent des rendements optimaux dans l'intervalle de 25 à 40 °C (Gupta *et al.*, 2003). Cependant, les champignons thermophiles, tels que *Thermomyces lanuginosus* (Mishra et Maheshwari, 1996), ont enregistré une production optimale de l'enzyme à 50 °C. Les températures optimales des  $\alpha$ -amylases bactérienne varient de 50 à 95 °C. Certaines souches hyperthermophiles peuvent résister à des températures supérieures à 100 °C (Sindhu *et al.*, 2017).



Les modifications du pH affectent la stabilité de l' $\alpha$ -amylase dans le milieu (Calamai *et al.*, 2005). Il est à noter que le site actif de l' $\alpha$ -amylase est constitué d'un grand nombre de groupements chargés (Lawson *et al.*, 1994; Strokopytov *et al.*, 1996 et Uitdehaag *et al.*, 1999) qui expliquent le fait que la plupart des  $\alpha$ -amylases ont un pH optimal dans une gamme acide à neutre (Pandey *et al.*, 2000 ; Sun *et al.*, 2010 et Bozic *et al.*, 2011).

#### 4-3-3- Activateurs et inhibiteurs

Dans les systèmes biologiques, les vitesses de nombreuses enzymes sont modifiées en présence d'autres molécules appelées effectrices (activateurs et inhibiteurs).

Comme nous l'avons déjà signalé, l' $\alpha$ -amylase est une métallo-enzyme à  $\text{Ca}^{2+}$ , avec au moins un atome de calcium par molécule d'enzyme (Mercier, 1985 ; Feller *et al.*, 1992 et Sindhu *et al.*, 2017)

Le calcium joue un rôle d'activateur allostérique et participe dans l'activité catalytique de l'enzyme et le maintien de sa structure tertiaire (Mathews *et al.*, 2000). Par ailleurs, la présence du calcium augmente la stabilité de l' $\alpha$ -amylase vis-à-vis de la dénaturation thermique, acide et par l'urée (Egas *et al.*, 1998). Les ions  $\text{Cl}^-$  (Baier et Clement, 2002),  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  et  $\text{Fe}^{2+}$  (Pedersen et Nielsen, 2000) sont également des activateurs de l' $\alpha$ -amylase.

Selon Chung *et al.* (1995), l'EDTA (agent chélateur du calcium) n'affecte pas l'activité  $\alpha$ -amylasique à température ambiante chez *Penicillium furiosus* et *Thermococcus profundus* respectivement. Mais à 90 °C pendant 30 min, 60 à 70 % du calcium est détaché de l'enzyme.

Le dithiothreitol et le  $\beta$ -mercaptoethanol sont des stimulateurs de l'activité amylasique (Adejuwon *et al.*, 2015). Le tableau 4 résume des inhibiteurs de quelques  $\alpha$ -amylases fongiques

#### 4-4- Production de l' $\alpha$ -amylase

La production d'enzymes microbiennes se fait soit par fermentation liquide ou par fermentation solide. Ces méthodes de production ont beaucoup été étudiées (Sindhu *et al.*, 2017).

Traditionnellement, la production se faisait par fermentation liquide en raison de la facilité de contrôle de différents paramètres (pH, température, aération et transfert d'oxygène et d'humidité). Mais, elle est exigeante et coûteuse. Les innovations biotechnologiques dans le domaine des enzymes et des technologies de fermentation, ont ouvert de nombreuses voies pour l'application de la fermentation solide. Celle-ci détient un énorme potentiel pour la production d'enzymes et elle est d'un intérêt particulier dans les procédés où le produit brut fermenté peut être utilisé directement comme source d'enzymes (Singhania *et al.*, 2009). En plus des avantages liés à ce type de production (faible coût, productivité supérieure, besoins en énergie réduits et absence de contrôle rigoureux), des résidus agro-industriels sont considérés comme les meilleurs substrats pour la production d'enzymes (Sindhu *et al.*, 2017)



Le tableau 4 montre la production d' $\alpha$ -amylases chez quelques moisissures par fermentation sur différents résidus agroindustriels.

#### 4-5- Purification de l' $\alpha$ -amylase

Les enzymes industrielles produites nécessitent généralement peu de traitement en aval et sont donc relativement utilisés à l'état brut. Par contre leurs applications dans les secteurs agroalimentaires, pharmaceutiques et cliniques nécessitent une grande pureté de l'enzyme (Gupta *et al.*, 2003 et Sindhu *et al.*, 2017), Différentes stratégies pour la purification des enzymes ont été étudiées, en exploitant les caractéristiques spécifiques de la biomolécule cible. Les laboratoires de purification à grande échelle pour l' $\alpha$ -amylase comprennent diverses combinaisons de techniques chromatographiques (gel filtration, la Chromatographie échangeuse d'ions et la chromatographie d'affinité, etc.) (tableau 5).

**Tableau 5** : Comparaison des différents processus de purification de l' $\alpha$ -amylase microbienne d'après la littérature.

Microorganisme	Etapes de purification	Taux de Purification / rendement (%)	Références
<i>A. flavus</i> LINK	50-90% (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , DEAE-Sephadex A50 (pH 6.5)	13.8/70	Khoo <i>et al.</i> (1994)
<i>Cryptococcus sp.</i> S-2	Ultrafiltration, a-Cyclodextrine couplé avec Sepharose6B (pH 7.0)	140/78	Iefuji <i>et al.</i> (1996)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> YPB-G	Ultrafiltration, b-Cyclodextrine Sepharose 6B, Sephadex G-100 (pH 4.5)	5/2	De Moraes <i>et al.</i> (1999)
<i>Penicillium janthinellum</i> (NCIM 4960)	Précipitation au sulfate d'ammonium chromatographie échangeuse d'anion DEAE	-/-	Sindhu <i>et al.</i> (2011)
<i>Aspergillus flavus</i>	Chromatographie gel-filtration	-/-	Bhattacharya <i>et al.</i> (2011)
<i>Rhizopus microsporus</i>	précipitation, au sulfate d'ammonium filtration Sephadex G25 et chromatographie DEAE-52 cellulose	-/-	Shen <i>et al.</i> (2012)
<i>Aspergillus oryzae</i> strain S2	Précipitation à l'acétone chromatographie d'exclusion moléculaire et chromatographie échangeuse d'anion	-/-	Sahnoun <i>et al.</i> (2012)
<i>Penicillium chrysogenum</i>	précipitation, au sulfate d'ammonium filtration Sephadex G50	-/-	Doss et Anand (2013)
<i>Bacillus subtilis</i> (ATCC 6633)	précipitation, au sulfate d'ammonium chromatographie DEAE-cellulose	6/-	Maity <i>et al.</i> (2015)

Pour l'extraction, différents solvants organiques sont utilisés tels que l'éthanol, l'acétone. Aussi, la précipitation au sulfate d'ammonium (Khoo *et al.*, 1994 et Hamilton *et al.*, 1999) et ultrafiltration ont été proposées (De Moraes *et al.*, 1999). Ces méthodes classiques multi-étapes nécessitent des équipements coûteux à chaque étape, ce qui les rendent laborieuses, et peuvent entraîner des pertes du produit recherché (Arauzo *et al.*, 2009). Cependant, les extractions liquide-liquide constituent une alternative intéressante pour la purification dont les étapes de traitement peuvent être combinées en une seule opération.

L'extraction liquide-liquide est le transfert de certains composants d'une phase à l'autre. Ce procédé est largement utilisé dans l'industrie chimique en raison de sa simplicité, faible coût, et la facilité sa mise en œuvre à l'échelle industrielle (Mazzola *et al.*, 2008).

#### 4-6- Système de répartition en trois phases

Le système de répartition en trois phases ou en anglais *three phase Partitioning* (TPP) a été conduit pour séparer un certain nombre de biomolécules. Le système TPP est relativement une nouvelle technique de bioséparation qui utilise l'opération collective des principes impliqués dans de nombreuses techniques pour la précipitation de protéines (Chaiwut *et al.*, 2010 et Gagaoua et Hafid, 2016). Cette technique implique l'emploi du butanol tertiaire (*t*-BuOH) et de sulfate d'ammonium pour former un système à deux phases dans lequel les macromolécules protéiques précipitent à l'interface, formant ainsi la troisième phase (Gagaoua et Hafid, 2016).

En général, les biomolécules sont récupérées après optimisation du système sous une forme purifiée à l'interphase, tandis que les contaminants volatils et polaires se concentrent principalement dans la phase supérieure du *t*-butanol et la phase aqueuse (phase inférieure). Cette méthode est facilement applicable et peut être mise en œuvre directement en utilisant des extraits bruts (Chaiwut *et al.*, 2010).

Rex Lovrien, de l'université du Minnesota, fut le premier à décrire le système de purification TPP. Il a suggéré que, dans des cellules, les enzymes n'opèrent pas dans un environnement purement aqueux, mais qu'en plus de l'eau, il y avait d'autres composés, y compris les sels et les composés organiques, pour établir quel effet ceux-ci pourraient avoir sur les enzymes. C'est ainsi que Lovrien a examiné l'activité enzymatique dans une variété de mélanges sels/solvants organiques et leurs effets sur les enzymes choisies (Tan et Lovrien, 1972).

Le système de répartition en trois phases consiste à utiliser le sulfate d'ammonium à une certaine saturation pour précipiter la protéine, et puis le *t*-butanol est ajouté pour faire trois couches, afin de séparer certains composés de faible poids moléculaire tels que les lipides, les composés phénoliques et quelques détergents (Gagaoua et Hafid, 2016).

La solubilité des protéines dépend, entre autres, de la concentration de sel dans la solution. À de faibles concentrations, la présence de sel stabilise les différents groupes chargés sur une molécule de protéine, attirant ainsi la protéine dans la solution et provoquant

l'amélioration de la solubilité de la protéine, ceci est connu sous le nom de salage ou *salting in*. Toutefois, quand la concentration en sel se trouve augmentée, un point de solubilité maximale de protéine est habituellement atteint et une augmentation supplémentaire de la concentration en sel implique qu'il y a de moins en moins d'eau pour solubiliser la protéine. Enfin, les protéines commencent à précipiter quand il n'y a pas suffisamment de molécules d'eau pour interagir avec des molécules de protéines. Ce phénomène de précipitation des protéines en présence d'un excès de sel est connu sous le nom de relargage ou *salting out* (Rachana et Lyju Jose, 2014).

L'addition de *t*-butanol, en présence de sulfate d'ammonium pousse la protéine hors de la solution. Le *t*-butanol adhère à la protéine et celle-ci forme un précipité interfacial (Roy et Gupta, 2002). La protéine partiellement purifiée apparaît comme une interface insoluble entre la phase du solvant organique supérieure et phase aqueuse inférieure (Mondal *et al.*, 2006).

Pike et Dennison (1989) ont montré que le partitionnement est affecté par le caractère hydrophile et la masse moléculaire de la protéine ainsi que les conditions physiques (température et pH) sous lequel le fractionnement est effectué. En faisant varier la concentration de sulfate d'ammonium, le rapport extrait enzymatique / *t*-butanol, la température, et le pH une sélectivité remarquable peut être obtenu (Gagaoua *et al.*, 2015 et Gagaoua et Hafid, 2016).

#### 4-6-1- Sulfate d'ammonium

Le sulfate d'ammonium ou  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  est un sel anti-chaotropique qui favorise la stabilité des protéines en favorisant les interactions hydrophobes, mais des concentrations élevées de sulfate d'ammonium favorisent des interactions hydrophobes également entre les solvants neutres (alcools) autrement miscibles à l'eau. En présence d'une forte concentration de sulfate d'ammonium, l'efficacité de la constante diélectrique de l'eau augmente considérablement de façon que des alcools, comme le *t*-butanol, agissent d'une manière plus lipophile, en associant les uns aux autres de manière hydrophobe, tout en étant exclues de l'eau (Ward, 2009).

De nombreux types de sels ont été employés pour effectuer la séparation et la purification des protéines par relargage. Parmi ces sels, le sulfate d'ammonium est le produit chimique le plus largement utilisé, en raison de sa haute solubilité et de sa force ionique élevée (qui est proportionnelle au carré de la charge de l'ion de sorte que la force ionique de 1 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  est trois fois supérieure à celle de 1 M de NaCl). Ces ions ne s'associent pas beaucoup avec les protéines, ce qui les rend intéressant car une telle association déstabilise généralement les protéines. Sa solubilité varie peu avec la température, il ne coûte pas cher, et même la densité d'une solution concentrée est inférieure à celle de la protéine, de sorte que la protéine peut être centrifugé vers le bas à partir de solutions concentrées (Rachana et Lyju Jose, 2014 et Gagaoua et Hafid, 2016).

#### 4-6-2- *t*-butanol

Presque tout le développement du système TPP jusqu'ici a dépendu du *t*-butanol, un alcool C4 qui est un solvant sélectif. Il a été constaté que d'autres solvants comme le méthanol ou l'éthanol n'étaient pas en mesure de former une troisième phase, il est donc recommandé d'utiliser le *t*-butanol.

Ainsi, le *t*-butanol est utilisé comme solvant car il est capable de former les trois phases du système TPP (Kulkarni et Rathod, 2014 ; Gagaoua *et al.*, 2014, 2015 et Gagaoua et Hafid, 2016).

Le *t*-butanol dans l'eau est également un promoteur puissant de la structure. Bien que le sulfate soit un anion et *t*-butanol est une molécule neutre, il est maintenant clair que ces paires de composés utilisés à concentrations assez importante se renforcent les uns les autres le comportement physico-chimique lorsque le solvant principal est l'eau (Dennison et Lovrien, 1997).

Dennison et Lovrien (1997) ont expliqué le mécanisme de TPP qui est basé sur l'effet anti-chaotropique (kosmotrope) des deux produits. Selon eux, ni le grand ion de sulfate hydraté, ni la molécule de *t*-butanol ne sont capable de pénétrer à l'intérieur des protéines, et donc cela favorise la stabilité de la structure des protéines.

#### 4-6-3- Avantages du système TPP

Le système de répartition en trois phases est un processus non chromatographique simple utilisé pour la purification et la concentration des protéines. Selon Rachana et Lyju Jose (2014), cette technique présente les avantages suivants :

- Processus simple avec une durée d'opération courte ;
- Le sulfate d'ammonium et le *t*-butanol, sont des produits chimiques peu coûteux faisant du TPP un protocole économique ;
- Les conditions du TPP ne sont pas dénaturantes ce qui assure le maintien de la structure et l'activité des protéines ;
- Ces opérations sont habituellement effectuées à température ambiante ;
- Le système TPP purifie et concentre la protéine, à la différence de la chromatographie, qui dilue la protéine purifiée ;
- Les rendements enregistrés dans le cas du TPP sont beaucoup plus importants que ceux réalisés par de simples procédures de *salting out* ;
- Le système TPP peut être employé directement sur l'extrait brut contenant des débris de cellules : aucune étape de pré-clarification n'est exigée.

#### 4-6-4- Autres utilisations du système TPP

Outre les protéines, les polymères glucidiques peuvent également être concentrés et purifiés par le système TPP. Parmi ceux étudiés à ce jour, on cite les alginates (Sharma

et Gupta, 2002), le chitosane (Sharma *et al.*, 2003) et l'amidon (Mondal *et al.*, 2004). Le système TPP a été également utilisé avec succès pour purifier l'ADN (Jánosi et Szamos, 2001) et dans l'extraction des huiles des graines oléagineuses (Shah *et al.*, 2004 et Sharma et Gupta, 2004).

Le système TPP a été également assisté par ultrasons pour l'extraction de l'acide urosolique et l'acide oléanolique à partir de feuilles de basilique *Ocimum sanctum* (Vetal et Rathod, 2015), et par micro-onde (MTPP) pour l'extraction de mangiférine à partir de feuilles de *Mangifera indica* (Kulkarni et Rathod, 2014).

#### **4-7- Applications industrielles de l' $\alpha$ -amylase**

Commercialisées pour la première fois en 1984 (Gupta *et al.*, 2003), les amylases sont d'une grande importance en biotechnologie. Elles trouvent des applications très diverses dans les secteurs de la détergence, de l'alimentaire, des bioénergies, de l'industrie du papier, des colles ou encore de l'industrie pharmaceutique (Sindhu *et al.*, 2017).

Environ 75 % des enzymes produites sont utilisées dans l'industrie des détergent 37 %, le textile 12 %, l'amidon 11 %, la panification 8 % et dans l'alimentation animale 6 %. Les amylases constituent une classe d'enzymes industrielles ayant environ plus de 25 % du marché des enzymes (Das *et al.*, 2011 ; Dahiya et Rathi, 2015 ; Djekrif *et al.*, 2016 et Sindhu *et al.*, 2017).

##### **4-7-1- Liquéfaction de l'amidon et saccharification**

Les enzymes amylolytiques sont très utilisées pour la production d'hydrolysats d'amidon, en particulier de sirops à haute teneur en fructose très utilisés comme édulcorants dans les boissons gazeuses. Le processus comprend deux étapes enzymatiques : la liquéfaction et la saccharification. Il exploite toute une panoplie d'enzymes qui, utilisées seules ou en synergie, donnent un ensemble varié de produits (Gavrilescu et Chisti, 2005 et Ghorai *et al.*, 2009).

##### **4-7-2- Pain et industrie de boulangerie**

Les amylases sont aussi largement employées en panification afin d'améliorer les propriétés texturales et rhéologiques de la pâte à pain. L'addition d'amylase à des doses spécifiques dans des farines à faible pouvoir diastasique permet d'améliorer les propriétés fermentaires de la pâte, permettant une amélioration du volume et de la texture du produit (Hamer, 1995 et Sahnoun *et al.*, 2013).

Lors du stockage, la mie est susceptible de devenir sèche et ferme, la croûte perd son croquant, le goût du pain est détérioré, la durée de vie du produit est réduite. Tous ces changements indésirables dans le pain sont connus sous le nom de rassissement. L'amidon et ses constituants (l'amylose et l'amylopectine) sont les molécules responsables du

rassissement. En effet, suite à la cuisson, l'organisation cristalline des grains d'amidon se trouve largement dégradée. Au cours du refroidissement et de la conservation, l'amylose et l'amylopectine ont tendance à recristalliser, ce qui conduit au rassissement du produit (Morgan *et al.*, 1997).

Les additifs classiquement utilisés pour empêcher le rassissement et améliorer la texture et la saveur du pain comprennent des produits chimiques, des émulsifiants (monoglycérides, diglycérides, esters de sucre, lécithine, etc.) (Azizi *et al.*, 2003). Une alternative consiste aussi à rajouter des amylases thermorésistantes pour limiter la vitesse de rassissement du pain en hydrolysant partiellement les zones amorphes de l'amidon rétrogradé.

#### **4-7-3- Désencollage des textiles**

Les procédés modernes de production de textiles exigent souvent l'application de fortes pressions entraînant le cassage des fils, notamment pendant le tissage. Pour remédier à cela, une couche de protection temporaire peut être appliquée sur les fils, dont l'amidon constitue un des matériaux attrayant par son faible coût et sa disponibilité. Il sera ensuite facilement éliminé par dégradation enzymatique à l'aide d'amylases (Hendriksen *et al.*, 1999).

#### **4-7-4- Détergence**

Les amylases sont les enzymes les plus utilisées dans la formulation des détergents enzymatiques derrière les protéases. Plus de 90 % des détergents liquides en contiennent (Gupta *et al.*, 2003). Ces enzymes sont utilisées pour dégrader les résidus de féculents tels que les pommes de terre, les sauces, crème, chocolat...

La stabilité des amylases est l'un des critères les plus importants pour leur utilisation dans les détergents qui sont très agressifs du fait du pH, de la température et de l'environnement très oxydant dû à la présence d'agents chlorés. De plus, ces enzymes montrent généralement une dépendance au calcium et leur stabilité se trouve gravement compromise dans un environnement pauvre en calcium, d'où la nécessité d'isoler des amylases calcium-indépendantes et stables dans des conditions extrêmes de pH et température (Nonaka *et al.*, 2003).

#### **4-7-5- Production de biocarburant**

Plus récemment, la commercialisation d'amylases a été fortement stimulée par le développement des biocarburants de première génération, en particulier pour la production de bioéthanol. L'amidon est, en effet, le substrat le plus utilisé en raison de son faible prix et de sa disponibilité (Chi *et al.*, 2009). La bioconversion de l'amidon en éthanol comprend une première étape de liquéfaction et de saccharification faisant intervenir des microorganismes amylolytiques, généralement suivie d'une étape de fermentation par la levure *Saccharomyces cerevisiae* (Öner, 2006). Suite à son activité thermostable, l'amylase

produite par *Bacillus licheniformis* est souvent décrite pour cette première étape d'hydrolyse des suspensions d'amidon (Sanchez et Cardona, 2008).

Afin d'obtenir une nouvelle souche de levure qui puisse directement produire de l'éthanol à partir d'amidon sans avoir recours à une pré-saccharification, la fusion de protoplastes a été réalisée entre la levure amylolytique *Saccharomyces fibuligera* et *S. cerevisiae* (Chi *et al.*, 2009).

#### 4-7-6- Bioraffinerie

La demande des enzymes amylolytiques a augmenté suite aux crises énergétiques pétrolières. Pour faire face à la raréfaction du pétrole, la bioraffinerie est apparue depuis 2006 (Rifkin, 2012).

Le concept de bioraffinerie se base sur l'hydrolyse enzymatique totale des polysaccharides (la cellulose et l'amidon) en glucose. Le glucose sera ensuite transformé en acide succinique pour la fabrication des films agricoles et en enrobage (*coating*) ou en sorbitol puis en isosorbides pour la fabrication des plastifiants.

Pour permettre l'essor des bioraffineries, des efforts de recherche sont encore indispensables pour augmenter la productivité des enzymes commerciales, notamment celle des enzymes amylolytiques thermostables ( $\alpha$ -amylase) et réduire le coût de production des enzymes, en utilisant des matières premières abondantes et bon marché (Octave et Thomas, 2009).

#### 4-7-7- Diagnostic et industries pharmaceutiques

Dans le domaine de diagnostic médical, le taux de l' $\alpha$ -amylase dans les liquides biologiques est un marqueur pour déceler certaines pathologies: insuffisance rénale, insuffisance cardiaque, oreillons, cancer du pancréas, etc. (Panday *et al.*, 2000 et Gupta *et al.*, 2003). Dans le domaine pharmaceutique, l' $\alpha$ -amylase est un anti-inflammatoire (Pandey *et al.*, 2000). Les  $\alpha$ -amylases fongiques (résistantes à l'acidité) en association avec des cellulases sont des médicaments aides digestifs pour éviter les dyspepsies et les fermentations intestinales (Rivière, 1975).

Thèse de Doctorat en Sciences  
**L' $\alpha$ -Amylase d'une nouvelle souche de *Rhizopus oryzae* FSIS4 isolée de blé des zones arides :**  
**Production, Purification, Caractérisation, Etude des propriétés et Essai de panification**  
Amel AIT KAKI ép. EL-HADEF EL-OKKI

## Chapitre 2

# Matériel et méthodes



## 1- Isolement et identification des souches fongiques

Les céréales, par leur richesse en nutriments, en particulier en amidon, sont sans doute les denrées alimentaires les plus fréquemment contaminées par les moisissures. La contamination peut avoir lieu avant la récolte, au champ, au cours du séchage, du stockage et après transformation des grains.

La caractérisation de ces moisissures nécessite la mise en place d'une stratégie et de méthodes permettant de les isoler, les cultiver et les sélectionner. Pour cet isolement, des échantillons appropriés, contenant une importante microflore naturelle, doivent être choisis très attentivement. L'identification des moisissures fait appel, généralement, aux caractères cultureux et aux caractéristiques morphologiques. Pour une expression correcte des caractères à étudier, les moisissures doivent être cultivées sur des milieux standards favorisant une bonne croissance. Quand les caractères morphologiques s'avèrent inefficaces, les méthodes chimiques et moléculaires peuvent permettre une bonne classification. Les moisissures peu différenciées et/ou sensibles aux conditions environnementales, sont mieux identifiées en adoptant l'approche moléculaire.

Pour cette partie nous nous sommes fixés les objectifs suivants :

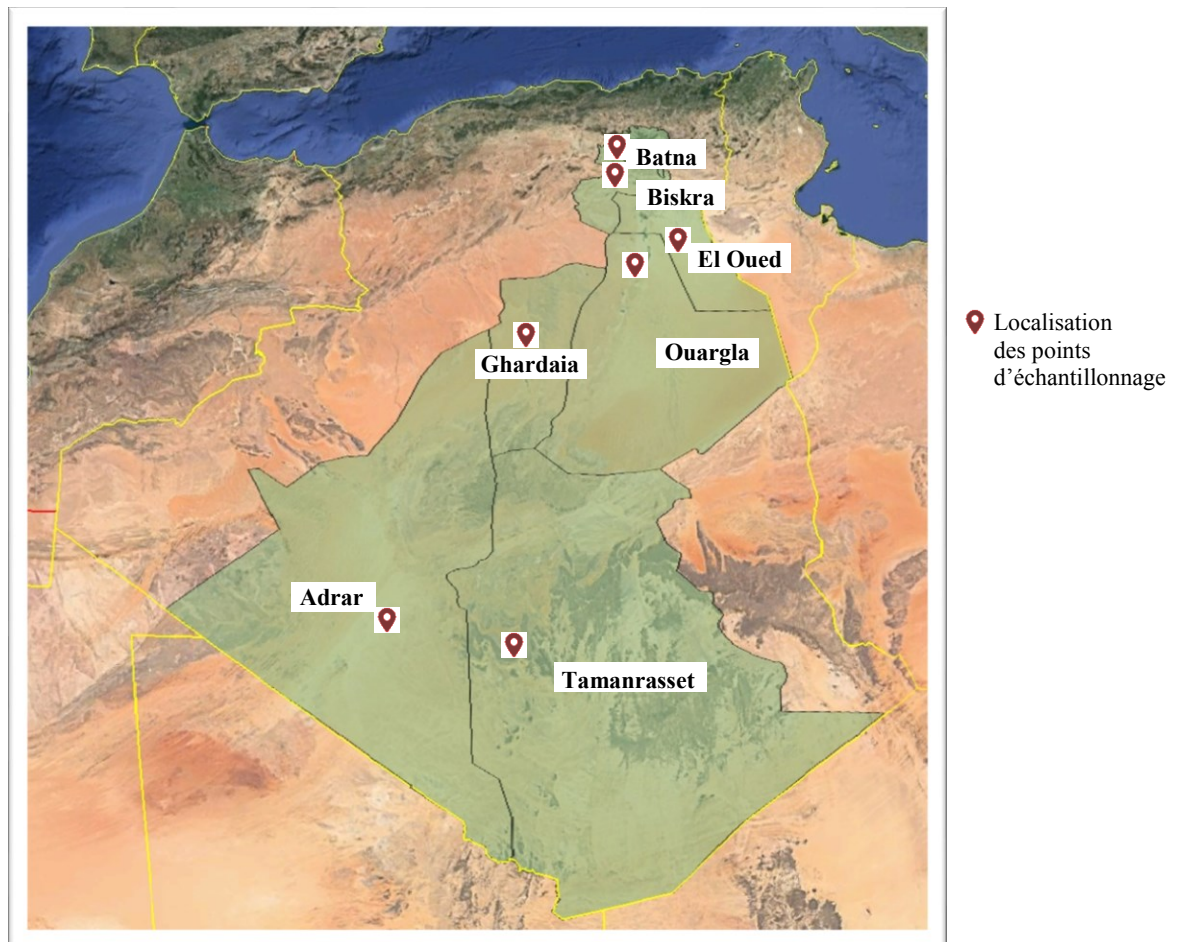
- 1- Etude de la biodiversité des moisissures thermophiles contaminant le blé dur cultivé dans plusieurs régions arides en Algérie ;
- 2- Isolement, purification, description et sélection de nouvelles souches thermophiles ;
- 3- Constitution d'une collection de moisissures thermophiles, à toute fin utile (production d'enzymes ...) ;
- 4- Identification morphologique et moléculaire de la souche FSIS4 caractérisée par une activité amylolytique importante et une thermostabilité particulière de son enzyme;
- 5- Enfin, caractérisation physiologique de la souche FSIS4.

### 1-1- Matériel biologique

Le matériel biologique à partir duquel sont isolées les souches fongiques est représenté par le blé dur (*Triticum durum* Desf.) cultivé dans les régions arides.

Ainsi, l'échantillonnage porte sur différentes variétés cultivées dans des régions à climat chaud (aride et saharien). Du nord au sud, les régions prospectées sont M'doukal (wilaya de Batna), Oumache (wilaya de Biskra), El-Meghaier (wilaya d'El-Oued), Tougourt (wilaya d'Ouargla), El-Goléa (wilaya de Ghardaia), In Salah (wilaya de Tamenrasset) et Reggane (wilaya d'Adrar) (fig. 5).

Le nombre d'échantillons prélevés est de 53 répartie sur les différentes localités choisies (tableau 6). Les coordonnées de ces régions sont rapportées dans l'annexe 1. Le prélèvement des échantillons est effectué entre 2010 et 2011 (tableau 6). Environ un kg de blé dur produit localement et destiné à la consommation humaine est prélevé directement dans les silos de stockage pour l'isolement de souches de moisissures.



**Figure 5** : Carte de wilayas prospectées pour l'échantillonnage.  
(Carte réalisée par Googlemap)

**Tableau 6** : Répartition des échantillons prélevés dans les localités.

Lieu de prélèvement		Nombre d'échantillons	Date de prélèvement
<b>M'doukal</b>	(W. Batna)	6	Octobre 2010
<b>Oumache</b>	(W. Biskra)	9	Octobre 2010
<b>El-Meghaier</b>	(W. El-Oued)	8	Décembre 2010
<b>Tougourt</b>	(W. Ouargla)	9	Décembre 2010
<b>El-Goléa</b>	(W. Ghardaia)	7	Septembre 2011
<b>In Salah</b>	(W. Tamanrasset)	8	Octobre 2011
<b>Reggane</b>	(W. Adrar)	6	Octobre 2011

### 1-2- Isolement des moisissures thermophiles contaminant le blé

Rarement, un biotope naturel contient uniquement un seul type de microorganisme. Dans la plupart des cas, une énorme variété de microorganismes est simultanément présente et c'est aux microbiologistes de concevoir la stratégie, les méthodes et les procédures qui permettront d'isoler, de cultiver et de sélectionner un microorganisme particulier. Pour cet isolement, des échantillons appropriés, contenant une importante microflore naturelle, doivent être choisis très attentivement. En particulier, il faut en premier aller chercher le microorganisme dans son habitat. La deuxième étape est la technique d'enrichissement qui est réalisée en ajoutant un échantillon dans un milieu de culture sélectif et en fixant ses conditions d'incubation.

L'objectif d'une culture d'enrichissement est l'obtention d'un champignon filamenteux spécifique en culture pure. Ceci fait appel à la technique d'étalement en surface ou à la technique de dilutions successives en milieu liquide jusqu'à l'épuisement de la microflore (Botton *et al.*, 1990 et Cuvellier *et al.*, 2009).

La stratégie d'isolement des moisissures utilisée est celle du contact direct (fig. 6) proposée par Pereira *et al.* (2003) et reprise par Perrone *et al.* (2007). En effet, le triage des grains se fait en fonction de la taille, la couleur et l'aspect des grains.

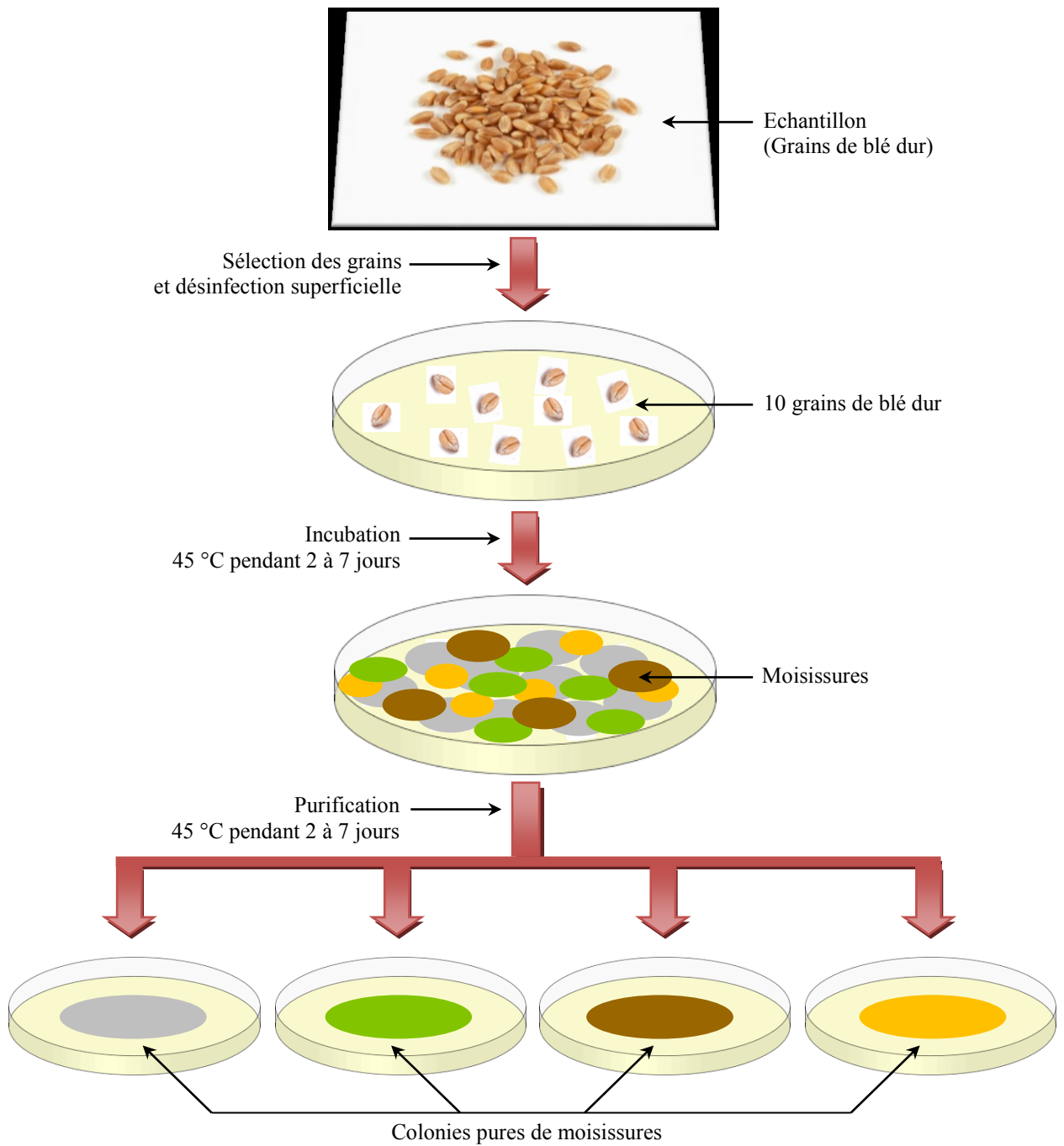
Une désinfection superficielle des grains est réalisée afin de récupérer spécifiquement la microflore interne. Les grains sont immergés dans une solution d'hypochlorite de sodium à 1,5 % pendant 2 minutes. Trois rinçages successifs sont effectués dans l'eau distillée stérile, les grains sont ensuite séchés avec du papier filtre stérile, et placés directement sur des milieux d'agar blanc à raison de 10 grains par boîte (voir composition du milieu en annexe 2). Les boîtes sont incubées à 45 °C pendant 2 à 7 jours pour l'isolement des moisissures thermophiles.

Des observations quotidiennes au binoculaire sont effectuées dès la germination des grains et apparition des mycéliums. Ces derniers sont repiqués sur les milieux Sabouraud et Potato Dextrose Agar (PDA) au chloramphénicol (0,25 g/l) pour inhiber toute prolifération bactérienne (Botton *et al.*, 1990 et Guiraud, 2012) (annexe 2).

### 1-3- Purification des souches isolées

Après isolement, plusieurs repiquages des souches sur milieu PDA et Sabouraud sont nécessaires avant d'obtenir une souche pure.

Au cours de la purification, le repiquage repose sur le choix des espèces à prélever. Tout détail quelconque est recherché pour différencier ou rapprocher deux thalles en tenant compte de tous les caractères visibles à l'œil nu :



**Figure 6 :** Schéma d'isolement par contact direct.

- la couleur des thalles ;
- la couleur des spores ;
- la présence d'un pigment diffusant ;
- la présence d'un organe de reproduction sexuelle ;
- la présence ou non d'un exsudat ;
- la vitesse de croissance apicale ;
- l'aspect, le contour et le revers du thalle.

Une fois celles-ci isolées en culture pure, elles sont repiquées sur milieux Sabouraud et Czapek Yeast Agar (CYA) pour mesurer leur vitesse de croissance apicale et observer les caractères macroscopiques et microscopiques.

Les souches purifiées sont conservées sur milieu PDA en tubes à 4 °C. Pour une longue durée, les souches sont conservées dans du glycérol (10 %) à -20 °C.

#### **1-4- Identification des souches isolées**

L'approche classique d'identification des champignons filamenteux est basée sur les critères de classification observables macroscopiquement et microscopiquement. La majorité des espèces de champignons filamenteux décrites jusqu'à présent sont des espèces morphologiques. En pratique, la délimitation des espèces s'appuie sur la recherche des traits caractéristiques de la morphologie et des cultures d'isolats sur milieu approprié.

L'identification des moisissures est effectuée en utilisant un schéma taxonomique basé sur les caractères morphologiques. Des cultures pures sont obtenues après 7 jours sur deux milieux standard : CYA et Sabouraud (Pitt et Hoking, 1997).

##### **1-4-1- Etude des caractères cultureux**

Les caractères étudiés sont :

- Au niveau du mycélium : la couleur du thalle (la pigmentation du mycélium, couleur des conidies) et sa texture (velouté, laineux, etc.), la couleur du revers de la colonie, le contour de la colonie, la présence des stries, le diamètre de la colonie, la vitesse de croissance apicale.
- Au niveau des spores : la densité sur le thalle, l'aspect des spores (granuleux, poudreux), l'uniformité de la couleur des spores, la présence de pigment diffusible, l'odeur, les exsudats (gouttelettes transpirées par le mycélium aérien) (Smith, 2002).

##### **1-4-2- Etude des caractères morphologiques microscopiques**

L'examen microscopique est effectué à l'état frais aux objectifs X10 et X40. Parmi les critères morphologiques, par observation microscopique, nous citons :

- *Pour le mycélium* : la vérification de la présence ou l'absence de cloisons, la détermination de sa couleur, l'ornementation et la largeur de ses parois, son mode de ramification et la différenciation des thallospores.
- *Pour les organes différenciés et leur contenu* : la forme, la couleur, la dimension, la texture des parois et l'ornementation.
- *Pour les caractéristiques de reproduction sexuée* (forme parfaite = téléomorphe), lorsqu'elle est connue, qui permettent par exemple de distinguer chez les champignons inférieurs les Zygomycètes (produisant des Zygosporés) et chez les champignons supérieurs les Ascomycètes (formant des asques et des ascospores) ou les Basidiomycètes (formant des basides et des basidiospores). Lorsque le mode de reproduction sexuée est inconnu ou non visible (forme imparfaite : Anamorphe), les champignons sont placés dans la classe des Deuteromycètes.
- *Pour les caractéristiques de multiplication végétative*, généralement spores endogènes chez les champignons inférieurs (sporocystospores dans des sporocystes portés par des sporocystophores), exogènes chez les champignons supérieurs (conidies, conidiophores, ontogénèse des conidies). Les Deuteromycètes sont classés selon leurs modes de production des spores de multiplication végétatives.

Plusieurs clés d'identification sont utilisées pour cette approche morphologique. Les clés d'identification des moisissures sont l'ensemble des caractères cultureux et morphologiques (macroscopiques et microscopiques) permettant de classer les souches des champignons filamenteux au sein d'un genre ou d'une espèce par rapport à des souches de référence.

Les différentes clés d'identification utilisées sont :

- La clé de [Dufresne \(2014\)](#) ;
- La clé de [Raper et Fennel \(1977\)](#) pour l'identification du genre *Aspergillus* ;
- La clé de [Pitt \(1980\)](#) pour l'identification du genre *Penicillium* ;
- La clé de [Cooney et Emerson \(1964\)](#) pour l'identification des champignons filamenteux thermophiles (CFT) ;
- La clé de [Schipper \(1978\)](#) pour l'identification des genres *Mucor* et *Rhizopus*.

#### **1-4-3- La préparation du matériel à observer**

L'échantillon est prélevé superficiellement dans la culture à l'aide d'un scalpel ou d'une anse, puis placé sur une lame dans une goutte de liquide de montage (lactophénol d'AMANN) (annexe 3) et si nécessaire, légèrement dilacéré ou écrasé pour éviter la réalisation d'une préparation trop dense et inobservable ([Moreau, 1991](#)). Dans le cas des moisissures à conidiogénèse abondante (*Aspergillus*, *Penicillium*), les spores en grand nombre masquent les structures et gênent l'observation. Il faut donc les éliminer avant montage, par lavages successifs et répétés de l'échantillon dans de l'alcool à 70 °C et dans de l'eau.



Le plus souvent, l'observation microscopique des moisissures ne requiert aucune coloration. Cependant une goutte de colorant mélangée au liquide de montage déposé sur la lame peut améliorer la qualité du contraste ou mettre en relief certains détails de la structure (ornementation des spores, cloisonnement des hyphes, etc.). Le colorant utilisé dans notre cas est le Bleu coton (Bleu coton : 0,05g ; Lactophénol : 100 ml).

L'observation se fait en deux temps : sur une culture jeune d'environ 5 jours puis au bout de 7 à 10 jours pour avoir des structures bien différenciées et caractéristiques. En effet, l'identification repose principalement sur la formation des spores qui se produit dans une culture jeune. Par contre, une éventuelle pigmentation, différenciation des conidies et des conidiophores peut se produire et ainsi faciliter l'observation des structures mieux contrastées. Les mesures des différentes structures sont réalisées avec un micromètre oculaire.

### **1-5- Test d'activité amylasique sur les souches de *Rhizopus***

L'activité  $\alpha$ -amylasique des 37 isolats de *Rhizopus* est estimé par la méthode de diffusion sur gélose (plate test Agar, PTA) (Leuchtenberger *et al.*, 1989). C'est une méthode semi-quantitative, elle permet de mettre en évidence et d'estimer l'activité amylolytique d'un liquide biologique. Une solution d'amidon soluble à 1 % est préparée, son pH est ajusté à 5, après addition de 1,5 % d'agar-agar, stérilisation et refroidissement, 500  $\mu$ l d'ampicilline par 250 ml de ce milieu sont ajouté pour éviter toute contamination bactérienne.

Le milieu est reparti dans des boites de pétri de 9 cm de diamètre à raison de 30ml / boîte. Après solidification et à l'aide d'une pipette pasteur, 4 puits de 6 mm de diamètre sont perforés dans la gélose. Les surnagants (issus d'une fermentation de 2 jours) sont disposés dans ces puits à raison de 60  $\mu$ l/puits. Les boites sont incubées à 4 °C pendant 2 heures (pour permettre la diffusion des surnagant dans la gélose), les boites sont ensuite transférées dans l'étuve à 40 °C pendant 48 heures.

La lecture se fait après addition du lugol (diluée au 1/10) qui réagit avec l'amidon pour donner la couleur bleu violacé. Un résultat positif du test s'exprime par l'apparition d'une zone non colorée autour du puits due à la dégradation d'amidon par l'amylase contenue dans les surnagants des souches. Les diamètres des zones d'hydrolyse sont mesurés dans chaque boîte. Les boites qui montrent un diamètre d'hydrolyse  $\leq 0,5$  cm sont considérées négligeable.

### **1-6- Etude de la thermostabilité des souches performantes en la production de l' $\alpha$ -amylase**

Sur les 37 souches de *Rhizopus* isolées, seules 25 souches présentent une zone de lyse supérieure à 0,5 cm. Elles sont donc retenues pour l'étude de la thermostabilité de leur  $\alpha$ -amylase et ceci dans le but de sélectionner la souche productrice d' $\alpha$ - amylase la plus thermostables.

La thermostabilité des enzymes est étudiée à 80 °C sur une durée variable de 30 à 150 min. La mesure de l'activité enzymatique résiduelle est en % par rapport à l'activité de l'extrait brut non incubé.

L'extrait enzymatique est réparti en volumes égaux de 10 ml dans des tubes placés au bain marie à 80 °C. Après la durée d'incubation pour chaque temps, les échantillons sont retirés les uns après les autres et refroidis instantanément dans un bain de glace (Pelmont, 2000). Le protocole de dosage de l'activité amylasique est appliqué à chaque échantillon (voir dosage d'activité amylasique méthode de (Bernfeld, 1955)).

## 1-7- La souche FSIS4

### 1-7-1- Identification moléculaire

La souche de FSIS4 la plus performante en la production de l' $\alpha$ -amylase thermostable est celle isolée de la région d'In Salah (wilaya de Tamenrasset). Cette souche a fait l'objet de l'identification moléculaire réalisée au niveau du Laboratoire de GEIHP (Groupe d'Etude des Interactions Hôte-Pathogène, d'Angers et à la Plateforme de l'ADN d'Angers, France).

L'ADN ribosomal (ADN<sub>r</sub>) de la région ITS (*internal transcribed spacer*) est amplifié. La région ITS est considérée comme la région de référence par les taxonomistes pour l'identification des espèces fongiques (Hibbett *et al.*, 2007). En effet, une partie de cette région est très conservée chez la majorité des espèces fongiques et une partie de cette région présente une variabilité pouvant être utilisée pour la phylogénie des champignons filamenteux.

Le protocole utilisé est le suivant :

Le champignon est cultivé sur gélose de Sabouraud additionnée de chloramphénicol (0,25 g/L) Après culture, le mycélium est récupéré par raclage de la surface gélosée, puis broyé en azote liquide au mortier et l'ADN génomique est extrait à partir de la poudre ainsi obtenue selon un protocole classique au phénol-chloroforme. Les membranes plasmiques et nucléaires sont lysées par addition de 1 ml de tampon Tris-HCl 200 mM pH 8,3 additionné de NaCl 250 mM, EDTA 25 mM (acide éthylène diamine tétra-acétique), SDS 1 % (dodécyl sulfate de sodium) et 2-ME 2 % (2-mercaptoéthanol). Après incubation à 65 °C pendant une heure, le lysat est centrifugé pendant 10 min à 15000 g de manière à éliminer les débris cellulaires et les organites intracytoplasmiques, puis le surnageant est transvasé dans un nouveau microtube stérile.

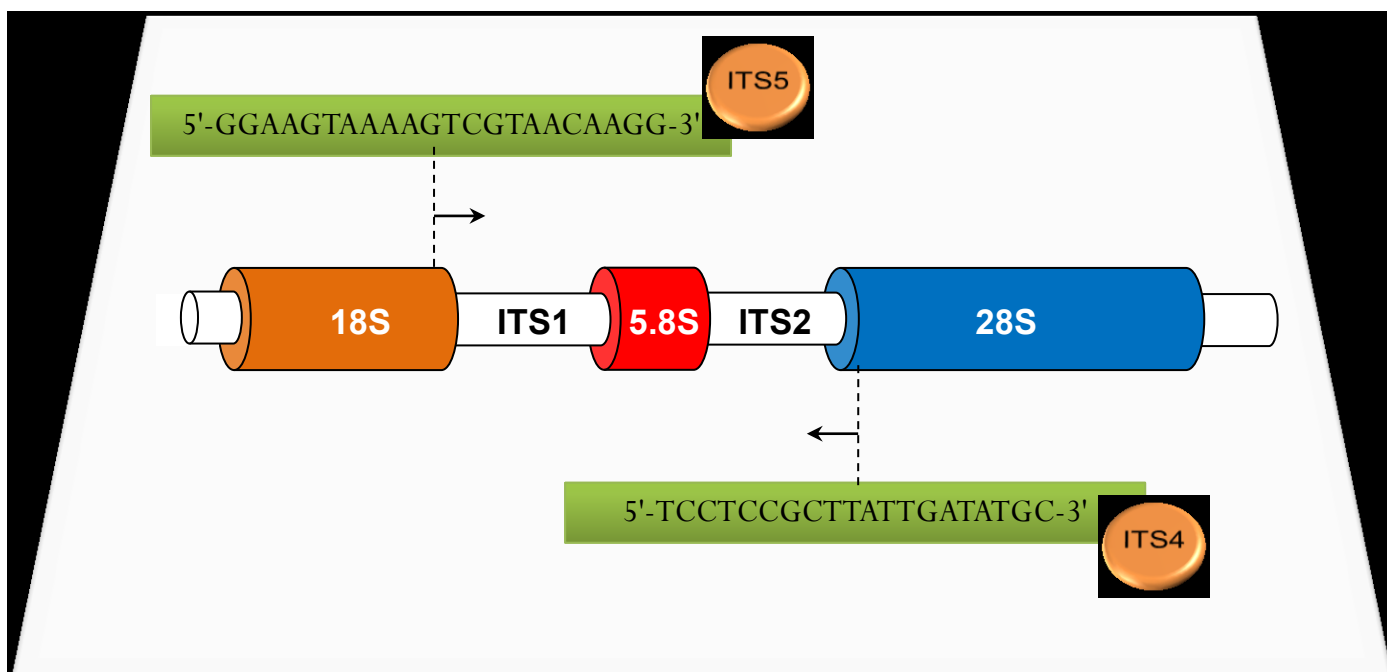
De la ribonuclease A est alors ajoutée au surnageant de manière à obtenir une concentration finale de 10 mg/ml. Après homogénéisation et incubation pendant 30 min à 37 °C, l'ADN est purifié par addition d'un volume égal de phénol:chloroforme:alcool isoamylique (25:24:1). Une centrifugation de 10 min à 1500 g permet de séparer la phase organique comprenant les protéines de la phase aqueuse contenant l'ADN. Puis, l'ADN est purifié à partir de la phase aqueuse par précipitation à l'éthanol (addition d'1 ml d'éthanol pur) et centrifugation à 15000 g pendant 15 min. Remettre ensuite le culot en suspension



délicatement dans 1 ml d'éthanol à 70 %. Après une nouvelle centrifugation de 15 min, laisser l'éthanol s'évaporer pendant 12 h et reprendre le culot par du tampon Tris-HCl 10 mM pH 8 contenant 1 mM EDTA.

L'ADN est ensuite dosé sur fluorimètre Qubit® (Invitrogen) qui utilise une sonde fluorophore produisant une fluorescence après liaison aux acides nucléiques.

L'amplification est réalisée par PCR (*polymerase chain reaction*) à l'aide d'un couple d'amorces ciblant les régions ITS 1 et 2 des ADN<sub>r</sub>. En l'occurrence, nous avons utilisé les amorces ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') pour l'amorce *forward* (amorce sens) et ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3) pour l'amorce *reverse* (anti-sens) (fig. 7). Après purification, le produit d'amplification obtenu est séquencé par un prestataire de service (GATC Biotech AG, Constance, Allemagne).



**Figure 7** : Emplacement des amorces ITS4 et ITS5 (White *et al.*, 1990).

Enfin, les séquences obtenues sont comparées à la base de données GenBank (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) en utilisant la méthode de recherche BLAST (*basic local alignment search tool*) afin de trouver des régions ayant des zones de similitude entre deux ou plusieurs séquences. Des alignements des séquences obtenues et des séquences de la base de données du National Center of Biological Information (NCBI) sont effectués en utilisant le programme ClustalW (Thompson *et al.*, 1994) qui est un programme d'alignement multiple de séquences. L'arbre phylogénétique est ensuite construit dans MEGA 6.0 (Tamura *et al.*, 2013).

### 1-7-2- Caractérisation physiologique de *Rhizopus oryzae* FSIS4

#### 1-7-2-1- Vitesse de croissance apicale

Elle correspond à la vitesse d'élongation du mycélium cultivé sur une surface solide. Cette élongation est mesurée quotidiennement à l'aide d'une règle graduée. La vitesse de croissance apicale est exprimée en millimètres rapportés au temps de culture en heure. L'inoculation se fait au centre de la surface gélosée de la boîte de Pétri (Carlile *et al.*, 2001).

La croissance apicale est calculée par la formule suivante :

$$Va_{moy} = \frac{\left(\frac{D_{max}}{2}\right)}{temps}$$

$Va_{moy}$  : vitesse de croissance apicale moyenne du mycélium en mm/h.

$D_{max}$  : Diamètre de la colonie en mm du dernier jour.

#### 1-7-2-2- Etude de la thermophilie de *Rhizopus oryzae* FSIS4

L'étude de la thermophilie de la souche est réalisée en utilisant le milieu rapporté par Hankin et Anagnostakis (1975) et Lamrani (2009) (annexe 2).

Les températures utilisées sont les suivantes : 19, 25, 45, 50, 55 et 60 °C.

La seule mesure faite, en plus de la description macroscopique du thalle, est le calcul de la croissance apicale toutes les 24 h selon la vitesse de croissance de la souche

#### 1-7-2-3- Production de spores de *Rhizopus oryzae* FSIS4

La moisissure *R. oryzae* est sporulée dans des erlenmeyers, contenant le milieu (PDA) incubé à 45 °C pendant 7 jours. Après sporulation, les spores sont décollées par addition de 50 ml d'eau distillée stérile avec agitation vigoureuse à l'aide d'un barreau magnétique (Solis-Pereira *et al.*, 1993). La suspension de spores va servir à l'inoculation des milieux de cultures et de production de la moisissure *R. oryzae* FSIS4.

Le dénombrement des spores est réalisé avec la cellule de Thoma (0,0025 mm<sup>2</sup>/0,1 mm) par mesure de l'absorbance à 650 nm par référence à une courbe d'étalonnage établie à partir d'une série de dilutions d'une solution mère de spores (annexe 4). Plusieurs taux d'ensemencement (10<sup>4</sup>, 10<sup>5</sup>, 10<sup>6</sup> et 10<sup>7</sup> cellules/ml) sont testés pour déterminer le taux d'ensemencement optimal pour la production  $\alpha$ -amylasique.

#### 1-7-2-4- Etude de l'effet de la température sur la germination des spores de *Rhizopus oryzae* FSIS4

La germination des spores des champignons filamenteux est conditionnée par la somme des changements morphologiques et biochimiques qui interviennent lors de la reprise du développement du mycélium. Elle succède à l'étape de la sporulation. C'est aussi le premier stade irréversible qui est observable comme étant différent de l'organisme en dormance. Ce changement d'état peut s'observer avec des critères morphologiques,

cytologiques, physiologiques ou biochimiques. Selon [Roussos \(1985\)](#) une spore a germé lorsque le tube germinatif atteint une longueur égale ou supérieure au diamètre le plus large de la spore. Une suspension de spores de la souche de la moisissure *R. oryzae* FSIS4 est utilisée pour inoculer un sous-produit agricole (farine de dattes déclassées à 20 %). La culture est réalisée sous différentes températures d'incubation 19, 25, 45, 55 et 60 °C pendant 12 h ([Lamrani, 2009](#)).

La germination des spores est évaluée selon [Frossard et Oertli \(1982\)](#). Elle consiste à prélever un échantillon du milieu fermenté chaque 2 heures et le placé sur une lame, colorée avec 2-3 gouttes de lactophénol bleu coton. Sous le microscope (X40), pour chaque zone sélectionnée, les spores germées et non germées sont alors comptées. Dix zones représentatives sont sélectionnées au hasard. La somme de spores germées sur le total des spores présentes indique le pourcentage de germination pour l'espèce au moment de l'échantillonnage ([Iraqi Houssaïni, 2002](#) et [Hassouni et al., 2006](#)).

## 2- Production de l' $\alpha$ amylase de *Rhizopus oryzae* FSIS4 sur un milieu à base de dattes déclassées

L' $\alpha$ -amylase est d'une grande importance en biotechnologie. Elle trouve des applications très diverses dans les secteurs de la détergence, de l'alimentaire, des bioénergies, de l'industrie du papier, des colles, ou encore de l'industrie pharmaceutique. Différents microorganismes ont été intensivement utilisés pour la biosynthèse des enzymes amylolytiques. Les résidus agro-industriels sont considérés comme les meilleurs substrats pour la production d'enzymes (Sindhu *et al.*, 2017). Parmi les agro-ressources décrites comme étant des milieux riches susceptibles de supporter la croissance microbienne et la production enzymatique, les dattes déclassées est un support prometteur. En effet, la datte a toujours été depuis les temps immémoriaux un élément important de l'alimentation tant pour les humains que pour les animaux. Sa production mondiale s'élève à plus de 58 millions de tonnes plaçant ainsi l'Algérie au 6<sup>ème</sup> rang des pays producteurs de dattes avec 470 000 t/an, dont 30 % sont des dattes communes à faibles valeurs marchandes pour la plupart destinées à l'alimentation du bétail (Boucherba, 2015).

Les dattes sont particulièrement riches en sucres et en éléments minéraux, notamment en K, Ca et Mg. Les fruits de dattes, y compris les variétés sèches, sont un véritable concentré de calories avec plus de 50 % de sucres par rapport à la matière sèche (Kacem-Chaouche *et al.*, 2013 et Boucherba, 2015). Aujourd'hui grâce aux procédés biotechnologiques, il est possible de valoriser les dattes communes de faible valeur marchande et de mettre sur le marché local et international une nouvelle génération de produits à hautes valeurs ajoutées tel que l'acétone, le butanol et l'éthanol, des acides organiques comme l'acide acétique, l'acide butyrique (Abou-Zeid et Khoja, 1993 ; Boucherba, 2015) et l'acide lactique (Nancib *et al.*, 2005). La production d'aliment pour animaux, la production de biomasse par *Saccharomyces cerevisiae* (Nancib *et al.*, 1997), de ferments de *Streptococcus thermophilus* (Nancib *et al.*, 1999) ou et différentes enzymes comme la catalases (Kacem-Chaouche *et al.*, 2013). Toutefois, les fortes teneurs en sucres induisent une pression osmotique très importante qui peut inhiber l'action de certains microorganismes (Djelal *et al.*, 2012).

Pour cette partie, nous nous sommes fixés les objectifs suivants :

- 1- Faire la caractérisation physicochimique de la farine des dattes déclassées et déterminer sa concentration optimale pour la production de l' $\alpha$ -amylase ;
- 2- Optimiser la production de l' $\alpha$ -amylase sur un milieu à base de farine de dattes déclassées par l'emploi de la planification expérimentale basée sur le plan statistique de Plackett-Burman et la méthodologie des surfaces de réponses *via* le plan composite centré ;
- 3- Suivre la cinétique de la production de l' $\alpha$ -amylase en fermenteur sur milieu optimisé ;

- 4- Optimiser le système de répartition en trois phases (TPP : *Three Phase Partitionning*) pour la purification de l' $\alpha$ -amylase produite par *R. oryzae* FSIS4 ;
- 5- Purifier l' $\alpha$ -amylase produite par *R. oryzae* FSIS4 en utilisant le système TPP ;
- 6- La caractérisation de l'enzyme purifié ;
- 7- Enfin, réaliser une application de l' $\alpha$ -amylase produite par *R. oryzae* FSIS4 dans la panification.

## **2-1- Le milieu de base (farine de dattes)**

Les dattes utilisées dans notre étude correspondent à un mélange de 3 variétés "Mech-Degla, Degla-Beïda et Tantboucht". Ces dattes proviennent des palmeraies de la région de Mlili (wilaya de Biskra). Elles représentent des déchets de triage (fruits avec défauts de texture, fruits altérés par les microorganismes et les insectes). Elles sont dénoyautées et séchées dans une étuve à une température de  $45 \pm 2$  °C pendant 4 jours. Elles sont ensuite broyées et tamisées à travers un tamis d'ouverture de maille de 0,1 mm. La farine de dattes obtenue est stockée dans des flacons hermétiquement fermés et conservée dans un réfrigérateur à une température de 4 °C.

### **2-1-1- Caractérisation physicochimique de la farine de dattes déclassées**

La farine de dattes obtenue est caractérisé par :

#### ***2-1-1-1- Matière sèche***

La détermination de la matière sèche (MS) est réalisée selon la norme NF-V03-707 (AFNOR, 1991). Cette méthode consiste à sécher la farine de dattes dans une étuve isotherme à une température de 105 °C jusqu'à poids constant. Le taux de matière sèche est exprimé en %.

La prise d'essai est de  $5 \pm 0.001$  g de farine de dattes.

#### ***2-1-1-2- Cendres***

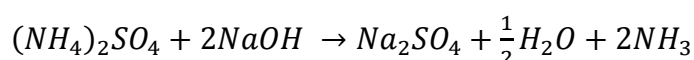
Les cendres( $C_T$ ) représentent la partie minérale d'un produit et permettent d'avoir une idée sur son apport en sels minéraux. Elles sont quantifiées par la méthode décrite dans la norme NF- V03-720 (AFNOR, 1991). Ainsi, l'échantillon de farine de dattes est incinéré dans un four à moufle, à une température de 550 °C, jusqu'à obtention de cendres blanches. Le taux des cendres est exprimé en %.

La prise d'essai est de  $2 \pm 0.001$  g de farine de dattes.

#### ***2-1-1-3- Protéines totales***

La teneur en protéines totale est déterminée par la méthode AOAC (2016), basée sur la transformation de l'azote organique en azote minéral sous forme ammoniacale  $(NH_4)_2SO_4$  par l'action oxydative de l'acide sulfurique fumant sur la matière organique en présence d'un catalyseur.

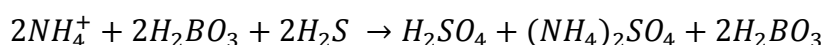
1 g d'échantillon est introduit dans un matras de Kjeldahl, puis 2mL d'acide sulfurique concentré et une pincée de catalyseur de minéralisation ( $\text{Na}_2\text{SO}_4 + \text{CaSO}_4 + \text{Se}$ ) (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) y sont ajoutés. La minéralisation se fait sur une rampe électrique à 400 °C. Le liquide de minéralisation devient incolore au bout de 2 h. Dans l'appareil à distiller semi-automatique Gerhardt (Vapodest 4S, Paris France), le contenu du matras de Kjeldahl est additionné de lessive de soude (soude à 10 N). Il se produit la réaction suivante :



L'ammoniaque dégagée se combine instantanément avec la vapeur d'eau pour donner l'hydroxyde d'ammonium. Celui-ci, entraîné par la vapeur, se condense dans le réfrigérant et est finalement récupéré dans une solution d'acide borique contenant un indicateur coloré (vert de bromocrésol et rouge de méthyle (3 % (p/v)) (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France), vert en milieu alcalin et rose en milieu acide). Il se forme le borate d'ammonium selon la réaction suivante :



La solution vire au vert à cause du caractère alcalin du borate. Lors du dosage semi-automatique, le borate d'ammonium est déplacé par un acide fort ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ , 0,01 N), et le sulfate d'ammonium est alors reformé selon la réaction :



Le moindre excès d'acide sulfurique provoque le virage au rose de la solution. Le volume de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (0,01N) versé correspond à l'ammonium contenu dans le tube de départ. Un essai à blanc (sans échantillon) est effectué dans les mêmes conditions.

Le pourcentage d'azote dans la matière sèche est enfin déduit de la formule :

$$\% N = \frac{[(V_1 - V_0) \times 0,14 \times 10^{-3} \times 10^2] \times 10^2}{m}$$

Avec :  $V_1$  : volume de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  utilisé pour la titration de l'échantillon (mL) ;  
 $V_0$  : volume de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  utilisé pour la titration de l'essai à blanc (mL) ;  
 m : masse de l'échantillon (g).

La teneur en protéines totale est calculée en utilisant le facteur de conversion 6,25 (AOAC, 2016). Les résultats exprimés représentent la moyenne de trois essais.

#### **2-1-1-4- Lipides totaux**

Les lipides sont déterminés par différence de poids après extraction au Soxhlet. Pour ce faire, l'échantillon est placé dans une cartouche préalablement séchée pendant 1 h dans une étuve à 105 °C et refroidie dans un dessiccateur. Ensuite, les lipides contenus dans la farine sont extraits durant 6 h, à l'aide d'éther diéthylique et d'éther de pétrole. Ensuite, le mélange

de solvants est évaporé et les lipides extraits sont pesés. Les résultats exprimés représentent la moyenne de trois essais (Lecoq, 1965).

La prise d'essai est de  $5 \pm 0.001$  g de farine de dattes.

#### **2-1-1-5- Sucres totaux**

Les sucres totaux sont déterminés par la méthode "phenol-sulfuric-acid" (Dubois *et al.*, 1956). Les oses sont dégradés en présence d'acide sulfurique concentré, en composés furfuriques. Ces produits se condensent avec le phénol pour donner un complexe jaune orangé.

1 ml de phénol à 5 % et 5 ml d'acide sulfurique concentré sont ajoutés à 1 ml d'extrait soluble de farine de dattes. Le mélange est laissé au repos pendant 10 min à température ambiante, puis chauffé à une température de 30 °C pendant 20 min. L'apparition du complexe jaune orange est suivie en mesurant la densité optique à 488 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV/Visible (Jenway, Staffordshire, UK) par rapport à une gamme d'étalonnage établie avec une solution mère de 100 µg/ml de glucose (annexe 4).

#### **2-1-1-6- Sels**

La teneur en minéraux (Mg, Ca, K et P) est déterminée par spectroscopie d'absorption atomique après solubilisation des cendres en milieu acide au niveau du Centre de Biotechnologie de Constantine (CRBT).

### **2-1-2- Préparation du milieu de production à base de farine de dattes déclassées**

L'extrait soluble de la farine de dattes, se référant au milieu de base dans cette étude, est préparé comme suit : la farine de dattes est suspendue dans l'eau distillée (100g/L). Le mélange est mis sous agitation à 100 rpm pendant deux heures à 50 °C. La suspension est centrifugée à 1500 g pendant 30 min. Ainsi l'extrait soluble de la farine de dattes est récupéré. Afin de déterminer la concentration optimale pour la production de l' $\alpha$ -amylases, plusieurs dilutions de farine de dattes (10,20, 30,40, 50, 60, 70, 80, 90 et 100 %) sont mises en essai.

### **2-2- Optimisation de la production de l' $\alpha$ -amylase de *Rhizopus oryzae* FSIS4**

La recherche des conditions optimales pour la production industrielle en fermentation nécessite, de la fiole d'erenmeyer au bioréacteur, une bonne connaissance des divers paramètres maîtrisables ainsi que leur contrôle. Pour cela, il est nécessaire de recenser les paramètres importants puis de déterminer les valeurs optimales en fonction des réponses souhaitées : c'est la méthodologie de la recherche expérimentale.

En effet, l'optimisation des milieux et des conditions de culture en fermentation nécessite l'étude d'un plus grand nombre possible de paramètres maîtrisables. La démarche classique qui consiste à faire varier successivement chacun des facteurs en maintenant les autres constants, conduit à un nombre prohibitif d'expériences pour des résultats discutables.

Par ailleurs, les interactions entre facteurs ne sont pas prises en compte et l'optimum réel n'est souvent pas atteint. Aussi, l'utilisation de la méthodologie de la recherche expérimentale (plans d'expérimentations) permet de réaliser le criblage d'un grand nombre de facteurs, de déterminer l'influence des paramètres retenus et leurs interactions, et optimiser une ou plusieurs réponses expérimentales. Ces objectifs peuvent être atteints par étapes successives où chacune d'elles constitue une série homogène d'expériences formant ainsi une matrice d'expériences.

Un plan d'expériences peut comporter une série de matrices d'expériences et vise à obtenir, avec un minimum d'essais, le plus grand nombre d'informations valables (Larpen-Gourgaud et Sanglier, 1992).

Les plans les plus populaires sont ceux de Plackett-Burman (Plackett et Burman, 1946) et le Plan Composite Centré basé sur la Méthodologie des Surfaces de Réponses (Box et Wilson, 1951). La première est un outil efficace pour déterminer rapidement l'effet de différentes variables sur la réponse étudiée. Il est utilisé pour réduire le nombre de variables pour des études d'optimisation. Le second est une approche mathématique efficace appliquée pour l'optimisation des procédés de fermentation (Zhao *et al.*, 2011 et Prajapati *et al.*, 2015).

Afin d'optimiser la production de l' $\alpha$ -amylase thermostable produite par la nouvelle souche (FSIS4) de *R. oryzae*, isolée à partir des grains de blés cultivés et stockés dans la région d'In Salah (wilaya de Tamanrasset), en utilisant un sous-produit (dattes déclassées) en tant que milieu de base. Des statistiques d'optimisation sont effectuées comme suit :

- i. Le criblage des facteurs affectant la production de l' $\alpha$ -amylase en utilisant les matrices de Plackett-Burman (PBD, Plackett-Burman Design);
- ii. L'optimisation des facteurs affectant significativement la production par la méthodologie de surface de réponse (RSM, Response Surface Methodology) en utilisant le plan composite central (CCD, Central Composite Design);
- iii. La validation du modèle développé dans les conditions optimales.

### **2-2-1- Criblage des facteurs affectant la production de l' $\alpha$ -amylase de *Rhizopus oryzae* FSIS4**

#### **2-2-1-1- Construction du plan de Plackett-Burman**

Les matrices de Plackett et Burman (PBD, Plackett-Burman Design) fournissent une méthode efficace pour sélectionner un grand nombre de variables et identifier les plus importantes.

Ces plans ont été déjà utilisés par plusieurs auteurs pour la sélection des facteurs influençant la production d' $\alpha$ -amylases microbiennes (Bennamoun *et al.*, 2004 ; Djekrif-Dakhmouche *et al.*, 2006 ; Sumrin *et al.*, 2011 ; Ait Kaki – El-Hadef El-Okki *et al.*, 2012 ; Shabbiri *et al.*, 2012 ; Djekrif *et al.*, 2014 ; Prajapati *et al.*, 2015 et Uygut et Tanyildizi, 2016).



Ces plans permettent de mettre en évidence l'effet de  $k$  facteurs à 2 niveaux sur la production enzymatique étudiée avec un nombre d'expériences  $N$ , tel que  $N = k+1$ ). Chaque ligne représente une expérience et chaque colonne représente une variable. Ce sont donc des matrices carrées établies à partir d'un générateur de base (tableau 7).

**Tableau 7** : Générateurs des matrices pour  $N = 4, 8, 12, 16,$  et  $20$  essais du plan de Plackett - Burman (Plackett et Burman, 1946).

Nombre d'essais	Générateur (1 <sup>e</sup> ligne de la matrice)																		
N = 04	+	+	-																
N = 08	+	+	+	-	+	-	-												
N = 12	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-								
N = 16	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-				
N = 20	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	
N = 24	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	.....

Niveau supérieur +, niveau inférieur -

Le nombre de facteurs étudiés est dans notre cas 11, ce qui fait que la matrice comprend 12 expériences, *i.e.*  $N = 12$  (tableau 8). D'après Plackett et Burman (1946), la 1<sup>e</sup> ligne du tableau correspond à celle du générateur choisi dans le tableau 7. Pour les lignes 2 à 11, elles sont obtenues par permutation circulaire à partir du générateur. La dernière ligne du plan d'expérience étant toujours au niveau inférieur (-1) (tableau 8).

**Tableau 8** : Matrice du plan de Plackett-Burman pour l'étude de 11 variables avec 12 expériences.

N° d'essai	Facteurs										
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>4</sub>	X <sub>5</sub>	X <sub>6</sub>	X <sub>7</sub>	X <sub>8</sub>	X <sub>9</sub>	X <sub>10</sub>	X <sub>11</sub>
1	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-
2	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+
3	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-
4	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-
5	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-
6	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+
7	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+
8	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+
9	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-
10	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+
11	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+
12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

X<sub>1</sub> : pH ; X<sub>2</sub> : amidon ; X<sub>3</sub> : extrait de levure ; X<sub>4</sub> : erreur ; X<sub>5</sub> : NaNO<sub>3</sub> ;  
X<sub>6</sub> : KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ; X<sub>7</sub> : CaCl<sub>2</sub> ; X<sub>8</sub> : erreur ; X<sub>9</sub> : MgSO<sub>4</sub> ; X<sub>10</sub> : vitesse agitation ; X<sub>11</sub> : erreur  
+, niveau supérieur ; -, niveau inférieur

Les 8 variables réelles sont : amidon ( $X_2$ ), extrait de levure ( $X_3$ ),  $\text{NaNO}_3$  ( $X_5$ ),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ( $X_6$ ),  $\text{CaCl}_2$  ( $X_7$ ),  $\text{MgSO}_4$  ( $X_9$ ) et les paramètres de culture : pH ( $X_1$ ) et vitesse d'agitation ( $X_{10}$ ). Les 3 facteurs restants ( $X_4$ ,  $X_8$  et  $X_{11}$ ) sont désignés comme variables erreurs pour évaluer l'erreur expérimentale qui permettra de calculer l'erreur standard.

### 2-2-1-2- Les niveaux réels

Les différents niveaux de chaque variable sont consignés dans le tableau 9.

**Tableau 9** : Les niveaux réels des facteurs utilisés dans la matrice du plan de Plackett - Burman.

Facteurs	Niveau (-)	Niveau (+)	Unité
$X_1$ : pH	5	6	-
$X_2$ : Amidon	0	5	g/l
$X_3$ : Extrait de levure	0	2	g/l
$X_4$ : Erreur	-	-	
$X_5$ : $\text{NaNO}_3$	0	2	g/l
$X_6$ : $\text{KH}_2\text{PO}_4$	0	0,2	g/l
$X_7$ : $\text{CaCl}_2$	0	0,5	g/l
$X_8$ : Erreur	-	-	
$X_9$ : $\text{MgSO}_4$	0	0,1	g/l
$X_{10}$ : Vitesse d'agitation	100	150	rpm
$X_{11}$ : Erreur	-	-	

### 2-2-1-3- Analyse statistique du plan de Plackett-Burman

A la fin de l'expérience, les coefficients des facteurs explicatifs de la production de l' $\alpha$ -amylase de *R. oryzae* FSIS4 sont estimés par la méthode des moindres carrés et assortis du test *t* de Student à un seuil critique  $\alpha = 0,05$ . Des sous-modèles sont alors sélectionnés pour chacun des facteurs à expliquer. La réponse théorique  $Y$ , pour chaque facteur analysé, s'écrit de la forme suivante :

$$\hat{Y} = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_4 X_4 + \beta_5 X_5 + \beta_6 X_6 + \beta_7 X_7 + \beta_8 X_8 + \beta_9 X_9 + \beta_{10} X_{10} + \beta_{11} X_{11}$$

Où  $\beta_0$  : constante  
 $\beta_1, \dots, \beta_{11}$  : coefficients de régression  
 $X_1, \dots, X_{11}$  : facteurs explicatifs.

L'effet de chaque variable ( $E$ ) est déterminé par la différence des moyennes des réponses entre le niveau supérieur (+) et le niveau inférieur (-), comme suit :

$$E_{(X_i)} = \frac{\sum Y^{(+)}}{r} - \frac{\sum Y^{(-)}}{r}$$

Avec :  $Y^{(+)}$  est la valeur de la réponse au niveau supérieur (+)

$Y^{(-)}$  est la valeur de la réponse au niveau inférieur (-).

$r$  est le nombre d'apparition du facteur au niveau supérieur ou inférieur.

L'erreur expérimentale ( $E_E$ ) est définie par la moyenne des effets des erreurs ( $Ed$ ) :

$$E_E = \frac{\sum(Ed)}{n}$$

$E_E$  est la variance des effets et  $n$  est le nombre des variables erreurs.

L'erreur standard ( $SE$ ) est déterminée comme la racine carrée de la variance:

$$SE = \sqrt{E_E}$$

La signification de chaque facteur est déterminée par le test de Student :

$$t_{(ddl,\alpha)} = \frac{E_{(X_i)}}{SE}$$

$E_{(X_i)}$  est l'effet ;  $SE$  est l'erreur standard.

Si le test  $t$  est significatif, l'effet est dû au changement du niveau du facteur étudié. Cet effet peut être positif ou négatif.

### 2-2-2- Détermination des optima des facteurs sélectionnés

La méthodologie des surfaces de réponses a été utilisée dans plusieurs travaux d'optimisation de la production de l' $\alpha$ -amylase microbienne (Shabbiri *et al.*, 2012 ; Djekrif *et al.*, 2014 ; Prajapati *et al.*, 2015 ; Mustafa *et al.*, 2016 et Uygut et Tanyildizi, 2016). Cette approche mathématique est basée sur l'emploi d'un plan composite centré (CCD, central composite design).

#### 2-2-2-1- Construction du plan CCD

Pour les quatre variables indépendantes, sélectionnées à partir du plan PBD (soit  $X_1$  : amidon,  $X_2$  : extrait de levure,  $X_3$  :  $\text{CaCl}_2$  et  $X_4$  :  $\text{MgSO}_4$ ), le plan étudié comprend cinq niveaux de chacune de ces variables ( $-\alpha$ ,  $-1$ ,  $0$ ,  $+1$  et  $+\alpha$ ). Ainsi, la structure du plan CCD utilisé est représentée dans les tableaux 10 et 11. Il est composé de 3 parties :

- Un plan factoriel complet à deux niveaux : ce plan comprend  $2^k$  expériences ( $k$  est le nombre de facteurs). Avec  $k = 4$  facteurs, ce plan comporte 16 essais (tableau 11).
- $2k$  points axiaux : ces points sont représentés sur les axes de chaque facteur ( $-\alpha$  et  $+\alpha$ ), et leurs valeurs varient en fonction du nombre de variables utilisées. Pour 4 variables, le nombre d'essais correspond à 8 et la valeur de  $\alpha$  est égale à 2.
- Répétitions au centre du domaine expérimental ( $0$ ) : afin de calculer l'erreur expérimentale ce qui permet d'analyser ce plan, 6 répétitions sont effectuées.

L'analyse du plan CCD permet d'obtenir une équation du deuxième degré :

$$\hat{Y} = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_4 X_4 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{33} X_3^2 + \beta_{44} X_4^2 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{14} X_1 X_4 + \beta_{23} X_2 X_3 + \beta_{24} X_2 X_4 + \beta_{34} X_3 X_4$$

$\hat{Y}$  : réponse.

$\beta_0$  : la constante.

$\beta_i$  : les coefficients de régression.

$X_i$  : les variables explicatives.

Les dérivés par rapport à 0, permettent de déterminer les coordonnées codées des extremums qui seront ensuite transformées en valeurs réelles.

Les solutions des dérivés des équations d<sub>1</sub>, d<sub>2</sub>, d<sub>3</sub> et d<sub>4</sub> sont obtenues après le traitement de la matrice du plan composite centré. Ils nous permettent de déterminer les positions des extremums de ces fonctions.

$$d = \frac{[\text{Concentration ou valeur du facteur étudié}] - y}{z}$$

y est la valeur de la réponse au niveau 0 du facteur étudié,

z est le pas choisi par le manipulateur.

### **2-2-2-2- Analyse statistique et modélisation**

Les résultats des modèles expérimentaux du PBD et du CCD sont analysées et interprétées en utilisant le logiciel statistique : Design Expert Version 9.0 (Stat-Ease Inc., Minneapolis, Minnesota, USA).

### **2-2-2-3- Validation du modèle quadratique**

Pour valider la prédiction du modèle, une fermentation en condition optimale est réalisée sur un milieu optimisé (farine de dattes à 20 % supplémenter avec 5,42 g/L d'amidon, 2,30 g/L d'extrait de levure, 0,47 g/L de CaCl<sub>2</sub> et 0,39 g/L de MgSO<sub>4</sub>) et non optimisé (farine de dattes à 20 % sans aucune supplémentation) afin de comparer la production amylasique dans les deux conditions.

Cette cinétique est réalisée en erlenmeyers de 250 ml à raison de 50 ml de milieu optimisé et non optimisé par erlen. Après stérilisation (110 °C pendant 20 min) et ensemencement (10<sup>6</sup> spores/ml de *R. oryzae* FSIS4), les erlens sont ensuite incubés à 50 °C pendant 48<sup>H</sup> dans un bain marie agitateur à 100 rpm.

Trois prélèvements sont effectués toutes les 4 heures. Après filtration sur papier filtre Whatman n° 2, l'activité amylasique est dosée suivant la méthode de Bernfeld ([Bernfeld, 1955](#)).

Cette méthode est basée sur la mesure du pouvoir réducteur du maltose libéré lors de l'hydrolyse enzymatique de l'amidon. Le dosage est déterminé par une réaction colorimétrique due à la présence de l'acide 3,5-dinitrosalicylique (DNSA voir sa composition en annexe 3). L'activité enzymatique est exprimée par UI (unité internationale) correspondant à 1 μmole de maltose libéré par minute à 40 °C et à pH 5.

**Tableau 10** : Relation entre les niveaux codés et les niveaux réels des facteurs utilisés dans le plan composite centré.

Facteurs	Niveau des facteurs					Unité
	$-\alpha(-2)$	-1	0	+1	$+\alpha(+2)$	
X <sub>1</sub> : Amidon	4	4,5	5	5,5	6	g/L
X <sub>2</sub> : Extrait de levure	1	1,5	2	2,5	3	g/L
X <sub>3</sub> : CaCl <sub>2</sub>	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	g/L
X <sub>4</sub> : MgSO <sub>4</sub>	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	g/L

**Tableau 11** : Structure du plan composite centré à 4 facteurs.

N° d'essais	Niveaux des facteurs			
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>4</sub>
01	-1	-1	-1	-1
02	+1	-1	-1	-1
03	-1	+1	-1	-1
04	+1	+1	-1	-1
05	-1	-1	+1	-1
06	+1	-1	+1	-1
07	-1	+1	+1	-1
08	+1	+1	+1	-1
09	-1	-1	-1	+1
10	+1	-1	-1	+1
11	-1	+1	-1	+1
12	+1	+1	-1	+1
13	-1	-1	+1	+1
14	+1	-1	+1	+1
15	-1	+1	+1	+1
16	+1	+1	+1	+1
17	$-\alpha(-2)$	0	0	0
18	$+\alpha(+2)$	0	0	0
19	0	$-\alpha(-2)$	0	0
20	0	$+\alpha(+2)$	0	0
21	0	0	$-\alpha(-2)$	0
22	0	0	$+\alpha(+2)$	0
23	0	0	0	$-\alpha(-2)$
24	0	0	0	$+\alpha(+2)$
25	0	0	0	0
26	0	0	0	0
27	0	0	0	0
28	0	0	0	0
29	0	0	0	0
30	0	0	0	0

A 0,5 ml de l'extrait enzymatique sont ajoutés 0,5 ml de substrat (solution d'amidon 1 % dans le tampon phosphate 0,1 M à pH 5). Le mélange est incubé à 40 °C pendant 30 min. La réaction est arrêtée par addition de 1ml de DNSA, suivie d'un chauffage à 100 °C pendant 5 min. Après refroidissement dans un bain de glace, 10 ml d'eau distillée sont ajoutés. L'absorbance est lue à 540 nm contre le blanc. La concentration des sucres réducteurs correspondant est déterminée à partir d'une courbe d'étalonnage établie avec des concentrations de maltose variant entre 0 et 2 mg/ml (annexe 4).

### 2-3- Cinétique de production de l' $\alpha$ -amylase de *Rhizopus oryzae* FSIS4 en fermenteur

La cinétique de production de l' $\alpha$ -amylase par *R. oryzae* FSIS4, est réalisée dans un fermenteur de 5 litres Biostat® Aplus (Sartorius Stedim Biotech GmbH, Allemagne) à raison de 3000 ml de milieu de production (fig. 8). Le système est géré par le logiciel BioPAT® MFCS / Win, version 3 (Sartorius Stedim Biotech GmbH, Allemagne) qui permet l'enregistrement automatique des données et le contrôle des périphériques externes. Une suspension de  $10^6$  spores par ml de milieu constitue l'inoculum ; dans les conditions suivantes : la température est maintenue à 50 °C, le pH à 5, l'agitation à 100 tours/minute et un taux d'aération de l'ordre de 1,0 vvm. Au cours de la croissance, le pH n'est pas régulé. La mousse, qui se forme avec l'agitation, est contrôlée par addition de l'huile de colza stérile, quand il est nécessaire. La cinétique de production de l'enzyme est suivie pendant 72 heures. Des prélèvements sont effectués chaque 4 h, puis centrifugés à 1500 g pendant 10 minutes. Le surnageant obtenu est utilisé pour le dosage des activités amylasique, des protéines et des sucres.

- Le pH est mesuré automatiquement par le logiciel connecté au fermenteur.
- Dosage de l'activité amylasique est réalisé par la Méthode [Bernfeld \(1955\)](#) (citée ci-dessus) ;
- Dosage des sucres est réalisé par la méthode [Dubois \*et al.\* \(1956\)](#) (citée ci-dessus) ;
- Dosage des protéines est réalisé par la méthode [Bradford \(1976\)](#) : dont le principe est basé sur la réaction entre le bleu de Coomassie et les protéines. En milieu acide, il se forme un complexe bleu qui présente un maximum d'absorption à 595 nm (voir la composition du réactif de Bradford en annexe 3). La concentration des protéines correspondant est déterminée à partir d'une courbe d'étalonnage établie avec le sérum albumine bovine (BSA) de concentration connue (2 mg/ml) (annexe 4).



**Figure 8** : Fermenteur de 5 litres Sartorius Biostat® Aplus.

### 3- Purification de l' $\alpha$ -amylase par le système de répartition en trois phases

Le système de répartition en trois phases (TPP) est une technique simple et rapide utilisée avec succès pour la séparation et la purification des enzymes et des protéines au cours des dernières années (Bayraktar et Onal, 2013 ; Gagaoua *et al.*, 2014, 2015, et Gagaoua et Hafid, 2016). Elle est facilement appliquée et peut être employée directement sur la suspension brute d'un extrait enzymatique ou protéique (Sharma et Gupta, 2001).

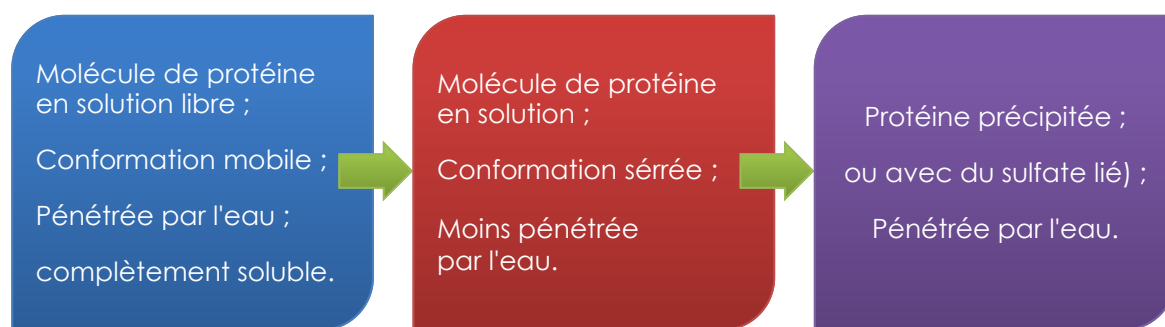
Le TPP consiste à utiliser le sulfate d'ammonium à une certaine saturation pour précipiter la protéine, et puis le *t*-butanol est ajouté pour faire 3 phases en séparant certains composés de faible poids moléculaire tels que les lipides et les composés phénoliques (Chaiwut *et al.*, 2010). L'addition de *t*-butanol, en présence de sulfate d'ammonium (à une concentration qui est inférieure à ce qui est requis pour un *salting out* conventionnelle de la protéine) pousse la protéine hors de la solution. Le *t*-butanol adhère à la protéine et celle-ci forme un précipité interfacial (Roy et Gupta, 2002). Selon Mondal *et al.* (2004), la protéine partiellement purifiée apparaît comme une interface insoluble entre la phase du solvant organique supérieure et phase aqueuse inférieure.

Pike et Dennison (1989) ont montré que le partitionnement est affecté par le caractère hydrophile et le poids moléculaire de la protéine ainsi que les conditions physiques (température et pH) sous lequel le fractionnement est effectué. En faisant varier la concentration de sulfate d'ammonium, le rapport phase aqueuse / *t*-butanol, et la température, une sélectivité remarquable peut être obtenu.

La solubilité des protéines dépend, entre autres, de la concentration de sel dans la solution, à de faibles concentrations, la présence de sel stabilise les différents groupes chargés sur une molécule de protéine, attirant ainsi la protéine dans la solution et provoquant l'amélioration de la solubilité de la protéine, ceci est connu sous le nom de salage, ou *Salting in*. Toutefois, quand la concentration en sel se trouve augmentée, un point de solubilité maximale de protéine est habituellement atteint et une augmentation supplémentaire de la concentration en sel implique qu'il n'y a de moins en moins d'eau pour solubiliser la protéine. Enfin, les protéines commencent à précipiter quand il n'y a pas suffisamment de molécules d'eau pour interagir avec des molécules de protéines. Ce phénomène de précipitation des protéines en présence d'un excès de sel est connu sous le nom de relargage ou *Salting out* (Voet *et al.*, 2013).

La capacité du système TPP à précipiter les protéines provient du pouvoir des anions sulfates et du *t*-butanol à assurer les deux réactions suivantes (fig. 9) :





**Figure 9** : Les étapes de précipitations des protéines (d'après [Rachana et Lyju Jose, 2014](#)).

### 3-1- Préparation de l'extrait enzymatique

L'extrait enzymatique issu d'une fermentation en conditions optimales est centrifugé à 1500 g pendant 15 min. Le surnageant constitue l'extrait enzymatique brut.

### 3-2- Optimisation des paramètres influençant le système TPP

Pour déterminer les conditions appropriées du système pour une meilleure purification de l' $\alpha$ -amylase, l'optimisation des paramètres du processus doit être étudiée.

Il s'agit de la concentration en  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , du rapport extrait brut : *t*-butanol et du pH et de leurs effets sur le rendement et le degré de purification de l' $\alpha$ -amylase de *R. oryzae* FSIS4. L'influence de ces paramètres sur le système est déterminée selon les recommandations de ([Dennison et Lovrien 1997](#) et [Gagaoua et al., 2015](#)).

- L'effet de la concentration en sel (30, 40, 50, 60, 70 et 80 %) (p/v) sur l'extrait brut de l'enzyme est étudié en fixant le rapport du *t*-butanol : extrait brut à 1:1 et le pH à 5
- Différents ratios de *t*-butanol (extrait brut: *t*-butanol; 1:0,5 ; 1:0,75 ; 1:1 ; 1:1,25 ; 1:1,5 ; 1:1,75 et 1:2) sont testés avec une saturation constante en sulfate d'ammonium à 50 % (concentration optimal) et à température ambiante.
- Après optimisation du *t*-butanol et du sulfate d'ammonium, l'effet de différentes valeurs du pH est étudié : L'extrait brut est saturé à 50 % de sulfate d'ammonium et le pH est ajusté à 3, 4, 5, 6, 7 et 8, Le *t*-butanol est ensuite ajouté à un rapport extrait brut : *t*-butanol de 1,0 : 1,50.
- Le dosage des protéines est réalisé par la méthode [Bradford \(1976\)](#) (citée ci-dessus)
- Le dosage de l'activité amylasique est réalisé par la Méthode [Bernfeld \(1955\)](#) (citée ci-dessus)

### 3-3- Fractionnement et purification par le système TPP

L'extrait enzymatique brut subi une saturation jusqu'à 50 % en rajoutant des cristaux de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (selon la table de [England et Seifter, 1990](#)) à raison de 0,3 g/min, sous agitation à 4 °C (dans un bain de glace). Après solubilisation complète du sel, le *t*-butanol est ajouté avec un ratio de 1,0:1,5. Le mélange est laissé au repos durant 1 heure environ à 4 °C, en agitant 30 secondes chaque 15 min. Puis, la solution est centrifugée à 1500 g pendant 10 minutes et à 5 °C. Après centrifugation, il y a formation de trois phases en accord à ce qui a été rapportée dans la littérature (fig. 10) :

- Une phase supérieure contenant le *t*-butanol (contient les composés polaires) ;
- Une interphase très fine (phase intermédiaire) ;
- Une phase inférieure très saline (phase aqueuse).

Après l'élimination de la phase supérieure, les deux autres phases (inférieure et intermédiaire) sont séparément récupérées. La phase intermédiaire est solubilisée dans du tampon acétate 30 mM, pH 5,5 puis dialyser (avec un seuil de coupure (MWCO) de 10 kDa) contre le même tampon pendant 12h à 4 °C et sous agitation modérée (fig. 11).

Après dialyse, sont mesurés l'activité amylasique (Méthode Bernfeld, 1955) et taux protéique (Méthode Bradford, 1976) pour les deux phases. Notre enzyme est retrouvée dans la phase intermédiaire qui servira pour la suite du travail.

Les activités spécifiques, le rendement ainsi que le facteur de purification sont calculés par les formules suivantes :

$$\text{Activité spécifique (U/mg)} = \frac{\text{Activité enzymatique}}{\text{Concentration en protéines}}$$

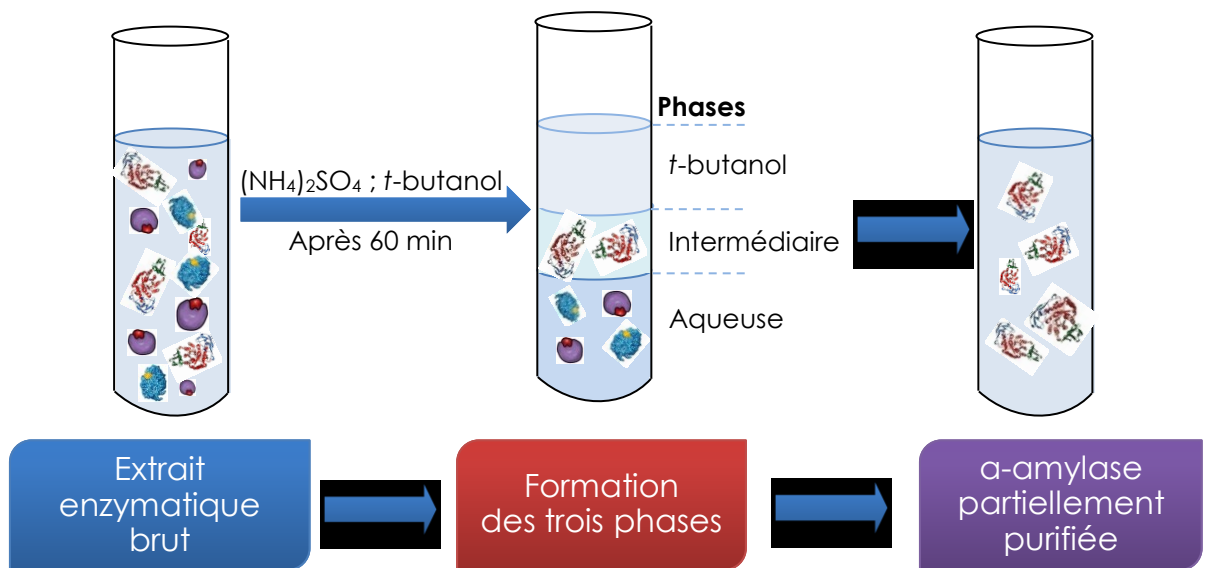
$$\text{Rendement de purification (\%)} = \frac{\text{Activité enzymatique de l'extrait purifié}}{\text{Activité enzymatique de l'extrait brut}} \times 100$$

$$\text{Facteur de purification} = \frac{\text{Activité spécifique de l'extrait}}{\text{Activité spécifique de l'extrait brut}}$$

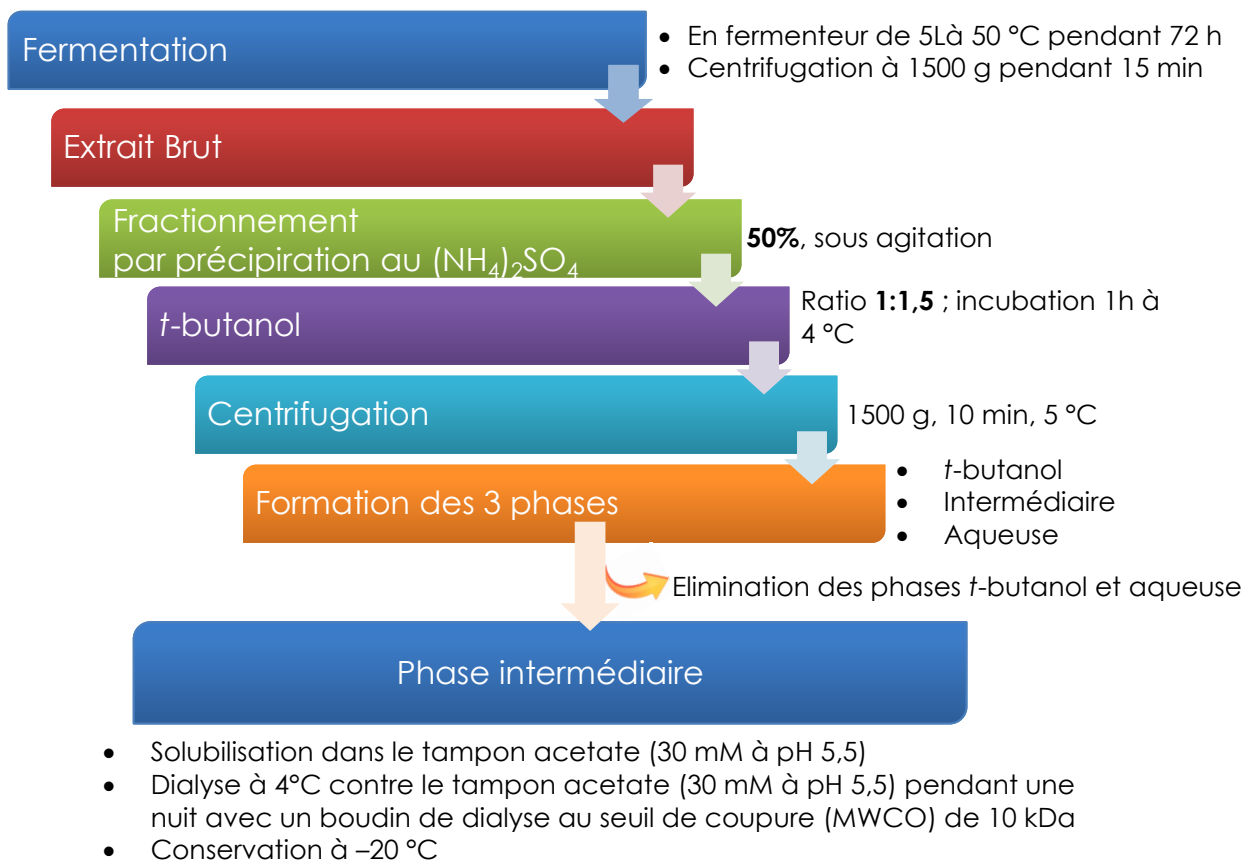
### 3-4- Analyse par électrophorèse en conditions dénaturantes

Selon la méthode décrite par [Laemmli \(1970\)](#). La séparation des différentes fractions protéiques contenues dans l'extrait enzymatique est faite par électrophorèse en gel de polyacrylamide à 10% contenant du dodécylsulfate de sodium (SDS-PAGE). Le gel est un réseau avec des mailles de tailles variables en fonction des proportions d'acrylamide et de bis-acrylamide dont il est constitué. Il se comporte donc comme un tamis moléculaire

. Le SDS, en solubilisant les protéines et en leur conférant une charge négative identique, permet la séparation des protéines uniquement sur la base de leur poids moléculaire. Leur vitesse de migration sera donc en fonction du poids moléculaire des protéines et de la taille des mailles du gel ([Voet et Voet, 2005](#)).



**Figure 10** : Représentation schématique du système TPP.



**Figure 11** : Diagramme de purification de l'α-amylase de *Rhizopus oryzae* FSIS4 par le système TPP.

### 3-4-1- Préparation des échantillons pour l'électrophorèse

Un échantillon de 200 µL de la phase intermédiaire et un autre de l'extrait dialysé est mélangé avec 200 µL du tampon dénaturant. Ce dernier est composé de 100 mM Tris/HCl, 1 % SDS (p/v), 0,75 % DTT (p/v), agent réducteur des ponts S-S, 0,02 % bleu de Coomassie (R250) (p/v) et 20 % glycérol (p/v) ; ajusté à pH 6,8 (Haider *et al.*, 2012 et Gagaoua *et al.*, 2014). Les échantillons sont ensuite chauffés 5 min dans un bain-marie à une température de 75 °C afin de compléter la dénaturation. L'échantillon est conservé à -20 °C jusqu'à son utilisation.

### 3-4-2- Dépôts des échantillons

10 µg d'échantillons sont déposés dans les puits formés dans les gels polymérisés et en présence de marqueurs protéiques de masses moléculaires connues (10, 15, 20, 37, 50, 75 et 100 KDa). Le tampon de migration est composé de Tris 25 mM, Tricine 25 mM et SDS 0,05 % (Gagaoua *et al.*, 2014). La migration des protéines, est faite en fixant le voltage à 80 volts pendant 15 à 20 minutes afin de concentrer les protéines dans le premier gel de concentration (gel de stacking), puis à 140 volts jusqu'à la fin de migration pendant 3 à 4 heures environ pour une très haute résolution de la séparation.

### 3-4-3- Fixation, coloration et décoloration des gels

Après migration, les protéines sont fixées dans une solution de fixation (éthanol 30 %, acide acétique 5 %). Le gel est ensuite coloré à l'aide d'une solution contenant 40 % éthanol, 10 % acide acétique et 2,9 mM du bleu de Coomassie R 250. La coloration est réalisée pendant une nuit sous agitation modérée. Le gel est ensuite décoloré par des lavages successifs et sous agitation dans la solution de décoloration, qui est la même solution qui a servi à la fixation. La décoloration se poursuit jusqu'à bonne visibilité des bandes protéiques.

### 3-5- Zymogramme

Le zymogramme qui permet de mettre en évidence l'activité amylasique est réalisé dans les mêmes conditions que SDS-PAGE, sauf que le gel polyacrylamide ne contient pas d' SDS (Laemmli, 1970). L'activité amylasique est évaluée par placement du gel native dans du gel d'Agarose contenant 1 % d'amidon à 50 °C pendant 30 min. Le gel d'agarose est ensuite coloré dans un bain constitué par 2 % I<sub>2</sub> et 0,2 % KI. L'activité amylasique est détectée sous forme de bandes transparentes sur un fond bleu foncé (Ravi-Kumar *et al.*, 2004 et Sahnoun *et al.*, 2016).

### 3-6- Chromatographie sur couche mince (CCM)

La chromatographie est une technique d'analyse chimique utilisée pour séparer et identifier les substances chimiques présentes dans un mélange. Elle nécessite un support comme du papier ou une plaque à chromatographie et une phase liquide appelée éluant.

Une chromatographie sur couche mince (CCM) est réalisée dans le but de déterminer les produits de dégradation du substrat de notre enzyme ; pour définir une exoenzyme ou une endoenzyme (Fontana *et al.*, 1988). L' $\alpha$ -amylase purifiée est mise en incubation à 60 °C dans du tampon phosphate 100 mM, pH 5,0, renfermant 1 % d'amidon. Des échantillons sont prélevés après 30 min, 1, 2, 3 et 24 heures d'incubation. L'hydrolyse est arrêtée par chauffage des échantillons dans l'eau bouillante pendant 3 min. Le standard utilisé est un mélange de 3 sucres : glucose, maltose et maltotriose. L'éluant utilisé est un mélange de solvants (butanone-2 : acide acétique : méthanol 3:1:1) qui entraîne les espèces à analyser par capillarité, alors que la phase fixe c'est une plaque en silice (DC-Alufolien Kieselgel 60, Merck) qui les retient. Les corps purs migrent plus ou moins vite, ce qui permet leur séparation. La révélation est réalisée avec le Réactif de Molish : 0,25 g de naphthol<sup>-1</sup>, 50 mL d'éthanol, 50 mL d'acide sulfurique à 20 %.

## 4- Caractérisation de l' $\alpha$ -amylase partiellement purifiée

L' $\alpha$ -amylase de *R. oryzae* FSIS4 partiellement purifiée est caractérisé et ses paramètres cinétiques sont déterminés

### 4-1- Etude de l'activité en fonction de la température et du pH

L'effet thermique sur l'activité amylasique est étudié à pH 5. Une gamme de température variant de 30 à 90 °C avec un intervalle de 10 °C, est utilisée afin de déterminer la température optimale de l'enzyme.

Le pH optimal est déterminé sur une gamme de pH de 2,0 à 8,0, en utilisant les tampons suivants :

- Tampon glycine-HCl 50 mM (pH 2,0 – 3,0),
- Tampon citrate 50 mM (pH 4,0 – 5,0),
- Tampon phosphate sodium 50 mM (pH 6,0–7,0),
- Tampon Tris–HCl 50 mM (pH 8,0).

### 4-2- Etude de la stabilité thermique et la stabilité au pH

La thermostabilité de l'enzyme est étudiée à différentes températures variant de 30 à 90 °C avec un intervalle de 10 °C pendant 180 min. Les différents échantillons sont retirés les uns après les autres chaque 30 min et refroidis instantanément dans un bain de glace. Après chaque traitement thermique, l'activité amylasique est mesurée (Pelmont, 2000). Les activités enzymatiques résiduelles sont déterminées selon les conditions standards.

La stabilité au pH est déterminée à différents pH variant de 2,0 à 8,0 pendant 180 min avec des prélèvements chaque 30 min. L'activité résiduelle de chaque prélèvement est mesurée selon les conditions standards.

### 4-3- Effet des ions métalliques, des composés chimiques et des surfactants sur l'activité amylasique

Pour visualiser l'effet des ions sur l'activité amylasique, l'enzyme purifiée est pré-incubé pendant 1 heure à 50 °C en présence de différents ions à une concentration de 5 mM : FeCl<sub>3</sub>, ZnSO<sub>4</sub>, HgCl<sub>2</sub>, CuSO<sub>4</sub>, MgCl<sub>2</sub>, CaCl<sub>2</sub>, NaCl, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> et CdCl<sub>2</sub>

D'autres substances chimiques sont également testées à 5 mM : EDTA, SDS,  $\beta$ -mercapto-éthanol et l'urée. Les activités enzymatiques relatives sont déterminées selon les conditions standards après une incubation de l'enzyme avec chaque réactif pendant 1 heure. Pour étudier l'effet des surfactants sur l'activité  $\alpha$ -amylasique, différents agents tensio-actifs non ioniques sont testés à raison de 0,1 % (p/v) : Tween 20, le Tween 80 et le Triton X-100. (Sethi *et al.*, 2016)

#### **4-4- Tolérance de l'enzyme à l'alcool**

L' $\alpha$ -amylase purifiée est pré-incubées avec deux alcools (10 – 30 %), à savoir le méthanol et l'éthanol pendant 1 heure à température ambiante.

#### **4-5- Détermination des paramètres cinétiques ( $K_m$ et $V_{max}$ ) de l'enzyme**

Différentes concentrations du substrat, variant de 1 à 10 % d'amidon soluble, sont testées afin de déterminer les paramètres cinétiques ( $V_{max}$  et  $K_m$ ) de l' $\alpha$ -amylase, par représentation en coordonnées inverses de [Lineweaver et Burk \(1934\)](#).

## 5- Application de l' $\alpha$ - amylase partiellement purifiée en panification

La performance de la préparation enzymatique de l' $\alpha$ -amylase thermostable produite par *R. oryzae* FSIS4 est testée dans le processus de fabrication du pain à base de farine et comparé à la même enzyme importé et utilisé localement dans la fabrication du pain

### 5-1- Matière première

La farine utilisée dans notre étude est une farine panifiable produite et commercialisée par une minoterie locale (Kenza Sarl., Didouche Mourad, Wilaya de Constantine). La caractérisation de cette farine est réalisée par le Laboratoire de Nutrition et Technologie Alimentaire (LNTA), Institut de la Nutrition, de l'Alimentation et des Technologies Agro-Alimentaires (INATAA), Université Frères Mentouri Constantine 1. Les résultats obtenus sur la farine utilisée sont :

- Humidité :  $14,66 \pm 0,41$  % ;
- Cendres :  $0,57 \pm 0,02$  % de MS ;
- Protéines totales :  $9,22 \pm 0,30$  % de MS ;
- Lipides totaux :  $0,80 \pm 0,07$  % de MS ;
- Sucres totaux :  $89,41 \pm 0,15$  % de MS.

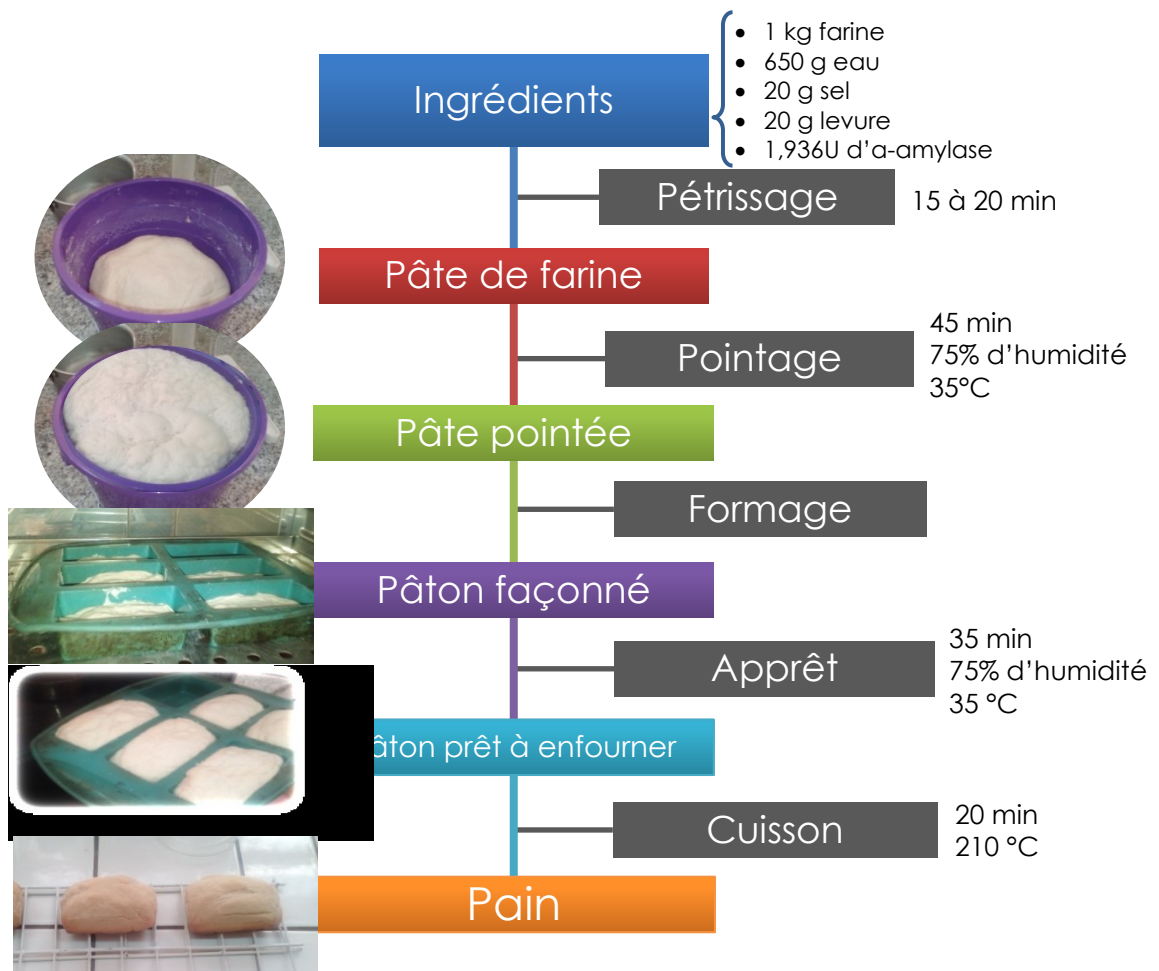
### 5-2- Ingrédients

- *Eau et sel* : dans les essais de panification réalisés, l'eau utilisée est une eau potable (de robinet) caractérisée par une dureté d'environ 30 °F.
- *Levure* : la levure boulangère utilisée (*Saccharomyces cerevisiae*) est de marque "Salf Instant" (originaire de France).
- *Préparation enzymatique*: un volume de l'extrait enzymatique partiellement purifié est mélangé avec trois volumes d'amidon déshydratés, le mélange est ensuite séché à 42 °C pendant 48 heures (Sahnoun *et al.*, 2013).

### 5-3- Panification

La fabrication du pain est réalisée selon les diagrammes de Ndangui *et al.* (2014) (fig. 12). Selon la formulation suivante : 1 Kg de farine, 20 g de levure boulangère, 20 g de chlorure de sodium, 650 g d'eau et 1,936 U d' $\alpha$ -amylase (Sahnoun *et al.*, 2013). Deux types d' $\alpha$ -amylase sont utilisés, il s'agit de l'enzyme de la présente étude produite par *R. oryzae* FSIS4 et celle commercialisée d'*Aspergillus oryzae* (Fungamyl®  $\alpha$ -amylase de Novozymes, Danemark). Après mélange et pétrissage pendant 20 min à l'aide d'un pétrin, la pâte obtenue est laissée au repos pendant 45 min dans une enceinte de fermentation à 35 °C et à une humidité relative de 75 %.





**Figure 12** : Schéma de fabrication des pains (Ndangui *et al.*, 2014).

La pâte résultante est ensuite divisée en morceaux de 70 g et mise en moule et laissés en deuxième fermentation (apprêt) à 35 °C pendant 35 min avant la cuisson dans un four électrique à 210 °C pendant 20 min. Un contrôle (témoin) est préparé avec le même protocole et dans les mêmes conditions, sans  $\alpha$ -amylase.

#### 5-4- Evaluation de la qualité du pain

La caractérisation du pain est faite après une heure de post-cuisson, elle concerne le volume spécifique et le rapport hauteur / largeur du pain.

- Le volume spécifique est évalué par la méthode de déplacement du colza selon l'American Association of Cereal Chemists (AACC, 2009), méthode approuvée 10.05, dans laquelle le pain est placé dans un récipient d'un volume connu rempli par de petites grains de colza. Le volume des semences déplacées par le pain est directement indiqué. Le volume spécifique ( $\text{cm}^3/\text{g}$ ) d'un pain individuel est calculé en divisant le volume / poids. Les analyses sont répétées 3 fois ;
- Le rapport Hauteur/ largeur est mesurée par la capture de l'image de la tranche centrale du pain avec un scanner HP ScanJet G3110 en présence d'échelle.

#### 5-5- Analyse statistique

Afin de comparer l'effet de l'addition de l' $\alpha$ -amylase de *R. oryzae* FSIS4 et l' $\alpha$ -amylase commercialisée utilisée en panification, une analyse de la variance (Anova) est réalisée sur les paramètres mesurés : volume spécifique et le rapport hauteur / largeur par le logiciel R (R Development Core Team, 2016).

Thèse de Doctorat en Sciences  
**L' $\alpha$ -Amylase d'une nouvelle souche de *Rhizopus oryzae* FSIS4 isolée de blé des zones arides :**  
**Production, Purification, Caractérisation, Etude des propriétés et Essai de panification**  
Amel AIT KAKI ép. EL-HADEF EL-OKKI

## Chapitre 3

# Résultats et discussions

## 1- Isolement et identification de champignons thermophiles

Les recherches sur les Champignons Filamenteux Thermophiles (CFT) ou moisissures thermophiles ont déjà acquis un grand intérêt, principalement pour la production des enzymes thermostables utilisées dans des procédés industriels (Barbier, 1994 et Maheshwari *et al.*, 2000). Les CFT sont caractérisés par des vitesses de croissance élevées, ce qui suppose que la biosynthèse des produits issus de leur métabolisme serait particulièrement rapide (Cordova *et al.*, 1998). Par ailleurs, il y a de nombreuses évidences qui suggèrent l'existence d'une corrélation entre la thermophilie des champignons et la thermostabilité de leurs protéines, en particulier de leurs enzymes (Suganthi *et al.*, 2015 et Sethi *et al.*, 2016).

Par conséquent, une des principales contributions de cette première partie de résultats consiste à la recherche des nouveaux champignons thermophiles ayant des propriétés originales et potentielles au niveau industriel.

Cette partie décrit dans un premier temps l'isolement et l'identification de champignons thermophiles à partir de 53 échantillons de blé dur collectés dans 7 régions à climat chaud (aride et saharien) en Algérie.

### 1-1- Isolement et purification de nouveaux champignons thermophiles

A partir des échantillons prélevés, notre stratégie d'isolement est planifiée en deux étapes. D'abord, pour favoriser la croissance des champignons thermophiles, un milieu d'enrichissement sélectif, en combinaison avec une température élevée d'incubation des cultures, sont utilisés. Ensuite, pour purifier les différents champignons obtenus à partir d'un même échantillon, des repiquages successifs sont réalisés sur le milieu d'enrichissement contenant un antibiotique spécifique.

#### 1-1-1- Identification des souches isolées

L'identification des genres fongiques est réalisée essentiellement selon La clé de Cooney et Emerson (1964) pour l'identification des Champignons Filamenteux Thermophiles (CFT) la clé de détermination de Botton *et al.* (1990), la clé de Dufresne (2014), La clé de Raper et Fennel (1977) pour l'identification du genre *Aspergillus*. La clé de Pitt (1980) pour l'identification du genre *Penicillium* et La clé de Schipper (1978) pour l'identification des *Mucor* et des *Rhizopus*. Ainsi, 246 souches de moisissures thermophyles sont isolées, purifiées et identifiées.

#### 1-1-2- Etude macroscopique

Les caractères macroscopiques des différentes souches isolées sont étudiés sur différents milieux

Le tableau 12 résume l'aspect du mycélium des souches isolées, la surface et la consistance des colonies, ainsi que la présence ou l'absence de pigments caractéristiques de chaque souche cultivée sur milieu Sabouraud

### 1-1-3- Etude microscopique

L'étude microscopique porte sur l'observation des structures caractéristiques des souches fongiques isolées (mycélium, conidiophore, conidies, etc.). Elle permet de mettre en évidence huit (08) genres de moisissures (tableau 13) :

- 88 souches (dont les codes : FSMD<sub>1à3</sub>, FSM<sub>1à4</sub>, FST<sub>27à29</sub>, FSG<sub>1à9</sub>, FSR<sub>4</sub>, FSO<sub>3</sub>, FST<sub>23à26</sub>, FSM<sub>5</sub>, FSG<sub>10</sub>, FSMD<sub>6</sub>, FSO<sub>4,5</sub>, FST<sub>22</sub>, FSG<sub>11</sub>, FSIS<sub>33,34</sub>, FSG<sub>22à25</sub>, FSMD<sub>11à13</sub>, FSIS<sub>25</sub>, FSG<sub>26,27</sub>, FSR<sub>21</sub>, FSO<sub>10,11</sub>, FST<sub>14 à 17</sub>, FSIS<sub>23,24</sub>, FSG<sub>28</sub>, FSO<sub>12à15</sub>, FSM<sub>23,24</sub>, FSR<sub>22à30</sub>, FSO<sub>16</sub>, FSM<sub>25à30</sub>, FSIS<sub>17à22</sub>, FSG<sub>29à32</sub>, FSO<sub>17,18</sub>, FSIS<sub>16</sub>) ont les caractéristiques suivantes :
  - Thalle à mycélium cloisonné
  - Conidiophores nombreux, dressés, non ramifiés, terminés en vésicules
  - Phialides formés directement sur la vésicule
  - Conidies en chaînes divergentes
  - Cellules à paroi épaisse

Ces souches semblent appartenir au genre *Aspergillus*

- 40 souches (dont les codes : FSMD<sub>9</sub>, FSO<sub>6</sub>, FSM<sub>9,12</sub>, FSIS<sub>32</sub>, FSG<sub>41</sub>, FSO<sub>28</sub>, FSM<sub>34,35</sub>, FSMD<sub>18</sub>, FSO<sub>29,30</sub>, FSIS<sub>7à10</sub>, FSR<sub>35</sub>, FSG<sub>42</sub>, FSR<sub>33,34</sub>, FSO<sub>31à36</sub>, FSM<sub>36</sub>, FSR<sub>15à20</sub>, FSO<sub>1,2</sub>, FSMD<sub>4,5</sub>, FST<sub>30</sub>) présentent les caractères suivants :
  - Conidiophores à croissance sympodiale, noirs
  - Conidies bourgeonnées, en chaînes acropétales, noires, souvent en forme de massue, cloisonnées longitudinalement et transversalement

Ces souches appartiennent probablement au genre *Alternaria*

- 37 souches (dont les codes : FSMD<sub>10</sub>, FSO<sub>7</sub>, FSM<sub>19</sub>, FSG<sub>21</sub>, FSIS<sub>28à30</sub>, FSR<sub>12,13</sub>, FSG<sub>43</sub>, FSMD<sub>19à22</sub>, FSM<sub>37,38</sub>, FSR<sub>37</sub>, FST<sub>6</sub>, FSIS<sub>5,6</sub>, FSG<sub>44,45</sub>, FSR<sub>36</sub>, FSO<sub>37à41</sub>, FST<sub>1à5</sub>, FSIS<sub>1à4</sub>) présentent :
  - Un mycélium non septé.
  - Un sporosystophore très grand terminé en entonnoir, en bouquet de 2 à 6 présentant à la base des rhizoïdes.
  - Des columelles brunes, globuleuses ou semi-globuleuses.

Ces souches semblent appartenir au genre *Rhizopus*

- 33 souches (dont les codes : FSM<sub>D7,8</sub>, FSM<sub>6a8</sub>, FSG<sub>12,13</sub>, FSR<sub>5</sub>, FSG<sub>33,34</sub>, FSM<sub>D14a16</sub>, FSO<sub>19,20</sub>, FSIS<sub>15</sub>, FSG<sub>35</sub>, FSR<sub>31</sub>, FSO<sub>21a27</sub>, FSR<sub>1a3</sub>, FSM<sub>31</sub>, FSIS<sub>11a14</sub>) ont les caractéristiques suivantes :
  - Conidiophores isolés, simples ou ramifiés, terminés par un pénicille
  - Pénicilles constitués de phialides branchés directement à l'extrémité du conidiophore
  - Conidies disposées en longue chaînes, globuleuses, cylindriques ou fusiformes, lisses ou rugueuses

Ces souches appartiennent probablement au genre *Penicillium*

- 23 souches (dont les codes : FSM<sub>13a18</sub>, FST<sub>19a21</sub>, FSG<sub>14a20</sub>, FSIS<sub>31</sub>, FSR<sub>6a11</sub>) caractérisées par :
  - Conidiophores parfois très ramifiés
  - Phialides plus ou moins allongées pouvant produire deux types de conidies : des macroconidies fusiformes, des microconidies septées fusiformes ou ovoïdes.

Ces souches semblent appartenir au genre *Fusarium*

- 11 souches (dont les codes : FSG<sub>36a40</sub>, FSM<sub>D17</sub>, FSM<sub>32,33</sub>, FSR<sub>32</sub>, FST<sub>7,8</sub>) présentent les caractères suivants :
  - Mycélium non cloisonné.
  - Sporocytophore dressé, terminé par un sporocyste globuleux.
  - Columelle mulisporés.

Ces souches semblent appartenir au genre *Mucor*

- 09 souches (dont les codes : FSO<sub>8,9</sub>, FSM<sub>20a22</sub>, FST<sub>18</sub>, FSIS<sub>26,27</sub>, FSR<sub>14</sub>) ont les caractères suivants :
  - Thalle blanc, lisse formant de nombreuses arthrospores par désarticulation du mycélium au niveau de double cloison.

Ces souches semblent appartenir au genre *Geotrichum*

- 05 souches (dont les codes : FST<sub>9a13</sub>) ont les caractères suivants :
  - Mycélium cloisonné, fragment en arthrospores ;
  - Hyphes se prolongeant par une chaîne de conidies ;
  - Conidies unicellulaires en chapelets ramifiées sur un conidiophore.

Ces souches semblent appartenir au genre *Moniliella*

**Tableau 12** : Les caractères macroscopiques des souches isolées des 7 régions cultivées sur milieu Sabouraud.

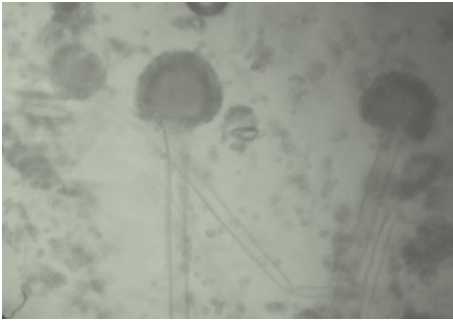
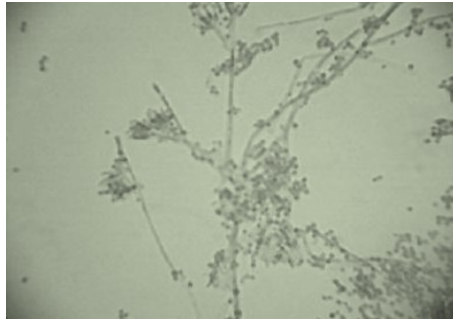
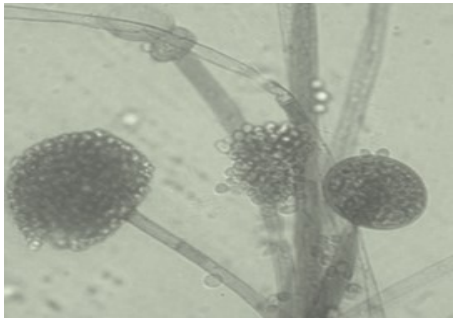
Code des souches	Mycélium aérien	Mycélium du substrat	Colonie et sa consistance	Surface	Autres caractéristiques (pigments)
FSMD <sub>1-3</sub> ; FSM <sub>1-4</sub> ; FST <sub>27-29</sub> ; FSO <sub>1,2</sub> ; FSG <sub>1-9</sub> ; FSR <sub>4</sub>	Jaune orange qui vire aussi tôt au marron	Jaune à marron	floconneuse	En dôme au centre de la colonie	Pigment orange
FSMD <sub>4,5</sub> ; FSO <sub>3</sub> ; FST <sub>23-26</sub> ; FSM <sub>5</sub> ; FSG <sub>10</sub> ; FSR <sub>1 à 3</sub>	Jaune avec le temps devient vert olive	Marron claire	granuleuse	Plane	Aucun pigment
FSMD <sub>6</sub> ; FSO <sub>4,5</sub> ; FST <sub>22</sub> ; FSG <sub>11</sub> ; FSIS <sub>33,34</sub>	Noir	Blanc à jaune pâle	granuleuse	Plane	Aucun pigment
FSMD <sub>7,8</sub> ; FSM <sub>6-8</sub> ; FSG <sub>12,13</sub> ; FSR <sub>5</sub>	Vert foncé	Jaune	glabre	Plane au début puis plissé en dôme	Pigment jaune
FSMD <sub>9</sub> ; FSO <sub>6</sub> ; FSM <sub>9-12</sub> ; FSIS <sub>32</sub>	Rose pâle au centre qui devient aussitôt vert foncé	Vert grisâtre à noir	Duveteuse	En dôme au centre puis plane autour	Pigment noir
FSM <sub>13-18</sub> ; FST <sub>19-21</sub> ; FSG <sub>14-20</sub> ; FSIS <sub>31</sub> ; FSR <sub>6-11</sub>	Blanc à rose clair	Crème	Duveteuse	plane	Pas de pigment
FSMD <sub>10</sub> ; FSO <sub>7</sub> ; FSM <sub>19</sub> ; FSG <sub>21</sub> ; FSIS <sub>28-30</sub> ; FSR <sub>12,13</sub>	Blanchâtre au début puis devient gris à noir	Crème	Laineuse	Cérébriforme et colle au couvercle de la boîte de pétri	Pas de pigment
FSO <sub>8,9</sub> ; FSM <sub>20,21</sub> ; FST <sub>18</sub> ; FSIS <sub>26,27</sub> ; FSR <sub>14</sub>	Orange au centre avec un contour marron claire	Orange	Duveteuse	plane	Pigment orange
FSG <sub>22-25</sub> ; FSR <sub>15-20</sub> ; FSMD <sub>11-13</sub> ; FSM <sub>22</sub> ; FSIS <sub>25</sub>	Noir	Jaune fonce	Granuleuse	plane	aucun pigment

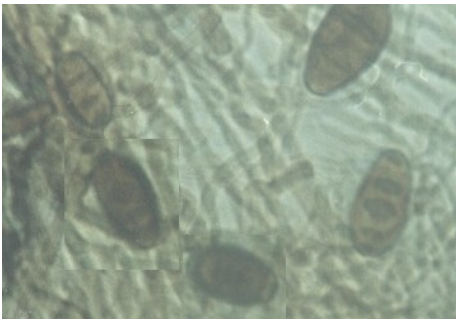
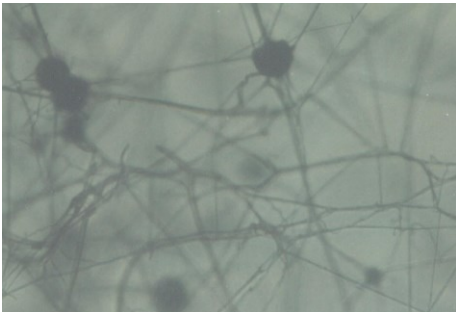
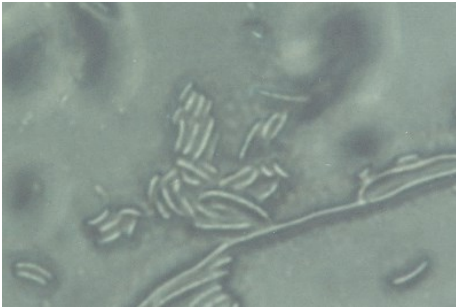
FSG <sub>26,27</sub> ; FSR <sub>21</sub> ; FSO <sub>10,11</sub> ; FST <sub>14-17</sub> ; FSIS <sub>23,24</sub>	Blanchâtre au début avec le temps devient vert olive	Crème	granuleuse	Plane	Aucun pigment
FSG <sub>28</sub> ; FSO <sub>12-15</sub> ; FSM <sub>23,24</sub> ; FSR <sub>22-30</sub>	Blanchâtre au début puis il vire au gris foncé	Crémé à jaune pâle	Floconneuse et granuleuse	Plane	Aucun pigment
FSO <sub>16</sub> ; FSM <sub>25-30</sub> ; FSIS <sub>17-22</sub>	Blanc qui vire au vert grisâtre puis au noir	Vert grisâtre et noir au centre	Duveteuse et granuleuse	Plane	Aucun pigment
FSG <sub>29-32</sub> ; FSO <sub>17,18</sub> ; FST <sub>9-13</sub> ; FSIS <sub>16</sub>	Noir	Blanc à jaune pâle	granuleuse	Plane	Aucun pigment
FSG <sub>33,34</sub> ; FSM <sub>14-16</sub> ; FSO <sub>19,20</sub> ; FSIS <sub>15</sub>	Vert olive	Vert	Duveteuse et granuleuse	Plane	Vert
FSG <sub>35</sub> ; FSR <sub>31</sub> ; FSO <sub>21-27</sub> ; FSM <sub>31</sub> ; FSIS <sub>11-14</sub>	Vert foncé	Jaune	Glabre	Plane au début puis plissé en dôme	Pigment jaune
FSG <sub>36-40</sub> ; FSM <sub>17</sub> ; FSM <sub>32,33</sub> ; FSR <sub>32</sub> ; FST <sub>7,8</sub>	Rose clair au centre avec un contour vert grisâtre	rose orange avec un contour marron et vert	duveteuse	En dôme au centre puis plane autour	pigments orange et vert
FSG <sub>41</sub> ; FSO <sub>28</sub> ; FSM <sub>34,35</sub>	Vert au centre avec un contour plus foncé qui vire au noir	Vert gris à noir	Duveteuse	En dôme au centre puis plane autour	Pigment noir
FSM <sub>18</sub> ; FSO <sub>29,30</sub> ; FSIS <sub>7-10</sub> ; FSR <sub>35</sub> ; FST <sub>30</sub>	Rose au centre avec un contour vert	Noir	Duveteuse	En dôme	Pigment orange
FSG <sub>42</sub> ; FSR <sub>33,34</sub> ; FSO <sub>31-36</sub> ; FSM <sub>36</sub>	Rose clair au centre avec un contour vert grisâtre	Rose orange avec un contour marron et vert	Duveteuse	En dôme au centre puis plane autour	Pigment orange et vert
FSG <sub>43</sub> ; FSM <sub>19-22</sub> ; FSM <sub>37,38</sub> ; FSR <sub>37</sub> ; FST <sub>6</sub> ; FSIS <sub>5,6</sub>	Blanchâtre au début puis devient gris à noir	Crème	Laineuse	Cérébriforme et colle au couvercle de la boîte de pétri	Pas de pigment
FSG <sub>44,45</sub> ; FSR <sub>36</sub> ; FSO <sub>37-41</sub> ; FST <sub>1-5</sub> ; FSIS <sub>1-4</sub>	Blanchâtre au début puis devient gris à noir	Crème	Laineuse	Cérébriforme et colle au couvercle de la boîte de pétri	Pas de pigment

FSMD : souche isolé du blé de M'doukal ; FSO : souche isolé du blé de Oumache ; FSM : souche isolé du blé de El-Meghaier ; FST : souche isolé du blé de Tougourt ; FSG : souche isolé du blé de El-Goléa ; FSIS : souche isolé du blé de in Salah ; FSR : souche isolé du blé de Reggane



**Tableau 13** : Caractères microscopiques des souches isolées des 7 régions

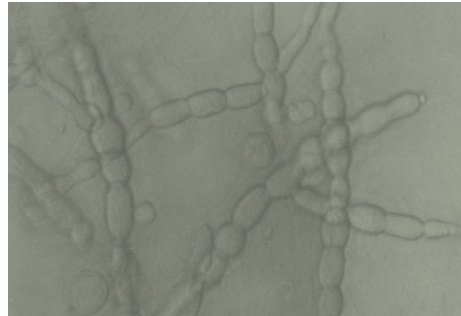
Identification du genre	Etude microscopique	Photo (x250)	Code des souches
<i>Aspergillus</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Mycélium cloisonné incolore.</li> <li>- Tête aspergillaire bisériée.</li> <li>- Conidiophore lisse</li> <li>- Vésicule globuleuse et une métule brunâtre et des conidies globuleuses.</li> </ul>		<p>FSMD<sub>1a3</sub>, FSM<sub>1a4</sub>, FST<sub>27a29</sub>, FSG<sub>1a9</sub>, FSR<sub>4</sub>, FSO<sub>3</sub>, FST<sub>23a26</sub>, FSM<sub>5</sub>, FSG<sub>10</sub>, FSMD<sub>6</sub>, FSO<sub>4,5</sub>, FST<sub>22</sub>, FSG<sub>11</sub>, FSIS<sub>33,34</sub>, FSG<sub>22a25</sub>, FSMD<sub>11a13</sub>, FSIS<sub>25</sub>, FSG<sub>26,27</sub>, FSR<sub>21</sub>, FSO<sub>10,11</sub>, FST<sub>14 à 17</sub>, FSIS<sub>23,24</sub>, FSG<sub>28</sub>, FSO<sub>12a15</sub>, FSM<sub>23,24</sub>, FSR<sub>22a30</sub>, FSO<sub>16</sub>, FSM<sub>25a30</sub>, FSIS<sub>17a22</sub>, FSG<sub>29a32</sub>, FSO<sub>17,18</sub>, FSIS<sub>16</sub></p>
<i>Penicillium</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Mycélium cloisonné</li> <li>- Conidiophores isolés, ramifiés terminés par un pénicille.</li> <li>- Pénicilles constitués de phialides branchés directement à l'extrémité du conidiophore (mono verticillés),</li> </ul>		<p>FSMD<sub>7,8</sub> ; FSM<sub>6-8</sub> ; FSG<sub>12,13</sub> ; FSR<sub>5</sub> ; FSG<sub>33-34</sub> ; FSMD<sub>14-16</sub> ; FSO<sub>19,20</sub> ; FSIS<sub>15</sub> ; FSG<sub>35</sub> ; FSR<sub>31</sub> ; FSO<sub>21-27</sub> ; FSR<sub>1-3</sub> ; FSM<sub>31</sub> ; FSIS<sub>11-14</sub></p>
<i>Mucor</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Mycélium non cloisonné.</li> <li>- Sporocytophore dressé, terminé par un sporocyste globuleux.</li> <li>- Columelles multisporeées.</li> <li>-spores cylindriques.</li> </ul>		<p>FSG<sub>36a40</sub>, FSMD<sub>17</sub>, FSM<sub>32,33</sub>, FSR<sub>32</sub>, FST<sub>7,8</sub></p>

<p><i>Alternaria</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Conidiophore septé noir, lisse</li> <li>- Conidies en chaîne, brunes irrégulières en forme de massue, cloisonnées longitudinalement et transversalement.</li> </ul>		<p>FSMD<sub>9</sub>, FSO<sub>6</sub>, FSM<sub>9,12</sub>, FSIS<sub>32</sub>, FSG<sub>41</sub>, FSO<sub>28</sub>,          FSM<sub>34,35</sub>, FSMD<sub>18</sub>, FSO<sub>29,30</sub>, FSIS<sub>7à10</sub>, FSR<sub>35</sub>,          FSG<sub>42</sub>, FSR<sub>33,34</sub>, FSO<sub>31à36</sub>, FSM<sub>36</sub>, FSR<sub>15à20</sub>,          FSO<sub>1,2</sub>, FSMD<sub>4,5</sub>, FST<sub>30</sub></p>
<p><i>Rhizopus</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Un mycélium non septé.</li> <li>- Un sporosystophore très grand terminé en entonnoir, en bouquet de 2 à 6 présentant à la base des rhizoïdes.</li> <li>- Des columelles brunes, globuleuses ou semi-globuleuses.</li> </ul>		<p>FSMD<sub>10</sub>, FSO<sub>7</sub>, FSM<sub>19</sub>, FSG<sub>21</sub>, FSIS<sub>28à30</sub>,          FSR<sub>12,13</sub>, FSG<sub>43</sub>, FSMD<sub>19à22</sub>, FSM<sub>37,38</sub>, FSR<sub>37</sub>,          FST<sub>6</sub>, FSIS<sub>5,6</sub>, FSG<sub>44,45</sub>, FSR<sub>36</sub>, FSO<sub>37à41</sub>, FST<sub>1à5</sub>,          FSIS<sub>1à4</sub></p>
<p><i>Fusarium</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Conidiophores ramifiés formant sur le thalle des coussinets.</li> <li>- Phialides plus ou moins allongés produisant des macroconidies fusiformes, souvent courbées, pluriséptées.</li> </ul>		<p>FSM<sub>13à18</sub>, FST<sub>19à21</sub>, FSG<sub>14à20</sub>, FSIS<sub>31</sub>, FSR<sub>6à11</sub></p>

---

*Geotrichum*

- Thalle blanc, lisse formant de nombreuses arthrospores cylindriques arrondies aux extrémités.

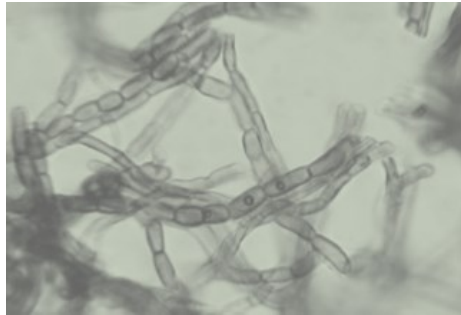


FSO<sub>8,9</sub>, FSM<sub>20a22</sub>, FST<sub>18</sub>, FSIS<sub>26,27</sub>, FSR<sub>14</sub>

---

*Moniliella*

-Mycélium cloisonné, fragment en arthropores ;  
-Hyphes se prolongeant par une chaîne de conidies ;  
-Conidies unicellulaires en chapelets ramifiées sur un conidiophore.



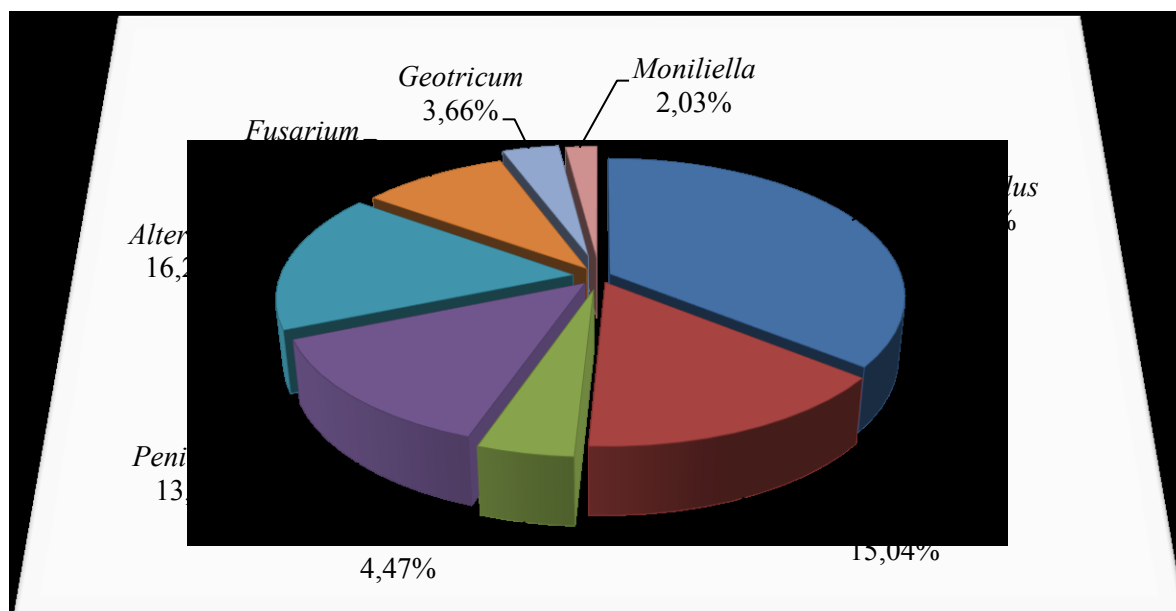
FST<sub>9-13</sub>

## 1-2- Distribution des différents genres de moisissures thermophiles isolées à partir de blé dur

Les 246 souches de moisissures isolées se répartissent sur 8 genres différents, à savoir : *Alternaria*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Geotricum*, *Mucor*, *Moniliella*, *Penicillium* et *Rhizopus* (fig. 13). La figure montre la séquence d'abondance suivante :

*Aspergillus* > *Alternaria* > *Rhizopus* > *Penicillium* > *Fusarium* > *Mucor* > *Geotricum* > *Moniliella*

Selon la littérature plus de 150 espèces de moisissures filamenteuses sont isolées à partir de grains de céréales (Jouany et Yiannikouris, 2002). En effet, dans les travaux de Belkacem-Hanfi (2010) qui portent sur l'étude de la Mycoflore du blé dur au cours du stockage en silos en Tunisie, 139 souches de moisissures post-récolte sont isolées. Les principaux genres de moisissures contaminants le blé de stockage sont répartis comme suit : *Aspergillus* (52 %); *Rhizopus* (23 %), *Mucor* (11 %), *Penicillium* (6 %), *Alternaria*, (1 %), autres genres (7 %). En effet, les grains sont naturellement en contact avec des spores fongiques avant, pendant et après la récolte, durant le transport et le stockage. La croissance fongique est régie par de nombreux paramètres physico-chimiques, notamment la quantité d'eau libre ( $A_w$ ), la température, la présence d'oxygène, la nature du substrat et le pH (Jouany et Yiannikouris, 2002).



**Figure 13** : La répartition des moisissures isolées à partir de blé dur.

Les moisissures se développant aux champs nécessitent une forte humidité pour leur croissance (20 à 25 %), alors que les moisissures de stockage sont capables de croître sur des substrats contenant de 10 à 18 % d'humidité (Molinie *et al.*, 2005).

Les céréales sont contaminées par des espèces rassemblant les moisissures qui s'implantent sur le grain avant la récolte (flore de champ). La plupart de ces espèces appartenant notamment aux genres *Alternaria*, *Chaetomium*, *Cladosporium*, *Epicoccum*, *Fusarium*, *Helminthosporium*, *Trichoderma*, etc. (Akinsanmi *et al.*, 2004). Au cours du stockage en silo, se développe une flore composée de champignons moins cellulotiques et plus osmophiles, éliminant peu à peu les champignons du champ et provoquant une acidification du substrat ; ce sont essentiellement des *Aspergillus* (*A. candidus*, *A. ochraceus*, *A. versicolor*), des *Eurotiums* (*E. amstelodami*, *E. chevalieri*, *E. repens*) et des *Penicilliums* (*P. cyclopium*, *P. glabrum*, *P. spinulosum*, *P. stoloniferum*) ainsi que *Absidia*, *Mucor* et *Rhizopus* (*R. oryzae*) (Botton *et al.*, 1990).

Une troisième catégorie de moisissures constitue la flore intermédiaire et regroupe des germes capables d'un développement limité, mais qui peuvent prédominer largement en conditions particulières, tels que ; *Cladosporium*, *Trichoderma* et surtout les mucorales comme *Rhizopus*, *Absidia*, *Mucor*, accompagnée avec des levures du genre *Candida* et *Torulopsis* (Magan et Lacey, 1988 et Godon et Loisel, 1997).

Le genre *Rhizopus* attire notre intérêt, à cet effet les 37 souches isolées appartenant au genre *Rhizopus* sont testés pour leur activité amylasiques.

### 1-3- Mise en évidence de l'activité amylasique

L'activité amylasique des 37 isolats de *Rhizopus* est estimée par la mesure du diamètre de zone de lyse de l'extrait enzymatique de ces souches, incubé à 40 °C pendant 2 jours, sur un milieu à base d'amidon (fig. 14).

D'après les résultats obtenus, toutes les souches testées (37 souches) sont positives à la production de l' $\alpha$ -amylase extracellulaire. Ceci peut s'expliquer par la richesse des grains de blé en amidon qui est le substrat inducteur de l' $\alpha$ -amylase (Sharma *et al.*, 2014 et Prajapati *et al.*, 2015).

En moyenne, les souches isolées de la région de Reggane (FSR) présentent le diamètre le plus faible alors que celles isolées de la région d'El-Golea (FSG) enregistrent le diamètre le plus élevé (tableau 14). Cependant, l'analyse de la variance (Anova) effectuée ne révèle pas de différences significatives entre les différentes souches ( $F = 0,855$  ;  $p = 0,546$ ).

Parmi ces 37 souches, 25 isolats seulement sont potentiellement amylolytiques (zone de lyse > 0,5 cm) (fig. 14). Ils sont retenus pour l'étude de la thermostabilité de leurs enzymes.



**Figure 14** : Zones de lyse de l'amidon sous l'action de l' $\alpha$ -amylase des souches de *Rhizopus*

**Tableau 14** : Résultats de l'activité amylasique (zone de lyse) et de la thermostabilité (temps de demi-vie) des souches de *Rhizopus* isolées.

Souches	Zone de lyse (cm)	Temps de demi-vie (min)
FSG	$1,67 \pm 0,22_a$	$151,03 \pm 2,65_b$
FSIS	$1,29 \pm 0,50_a$	$196,28 \pm 3,65_d$
FSM	$1,34 \pm 0,97_a$	$145,69 \pm 1,15_b$
FSMD	$1,18 \pm 0,11_a$	$120,36 \pm 0,22_a$
FSO	$1,14 \pm 0,18_a$	$136,88 \pm 2,11_{ab}$
FSR	$0,94 \pm 0,06_a$	$182,60 \pm 1,54_c$
FST	$1,17 \pm 0,59_a$	$167,65 \pm 2,13_c$

*a,b,c,d* : groupes homogènes selon le test post-hoc de Student-Newman-Keuls.

#### 1-4- Etude de la thermostabilité des 25 souches de *Rhizopus* productrice d' $\alpha$ -amylase

La thermostabilité des enzymes est étudiée à 80 °C sur une durée variable de 30 à 150 min. Les résultats obtenus montrent que les 25 souches testées sont plus ou moins thermostables à 80 °C. Leurs demi-vies sont très variables (tableau 14).

L'Anova effectuée montre un effet région hautement significatif ( $F = 382,21$  ;  $p < 0,001$ ). Les souches isolées de la région d'In Salah s'avèrent les plus thermostables parmi les souches étudiées. La demi-vie de leurs enzymes n'est atteinte qu'au bout de 196,28 min. En effet, la région d'In Salah est caractérisée par un climat désertique chaud (Classification de Köppen BWh) typique de la zone saharienne hyper-aride, caractérisé par un été torride. La température est caniculaire pendant de nombreux mois : In Salah est un des points les plus chauds de tous les déserts, appelée le "triangle de feu", puisque le thermomètre y affiche régulièrement 50 °C à l'ombre durant les mois les plus chauds.

Par ailleurs, l'analyse en composantes principales (ACP), réalisée sur les données de l'activité amylasique (diamètre de la zone de lyse) et la thermostabilité (temps de demi-vie), permet de regrouper la totalité de l'information (100 %) sur les 2 premiers axes (fig. 15). Le premier axe (50,22 %) montre que les deux variables évoluent ensemble, alors que le deuxième axe est représenté positivement par la demi-vie et négativement par la zone de lyse. La projection des 25 souches étudiées sur ces deux axes montre que la souche FSIS4 produit l' $\alpha$ -amylase la plus thermostable (fig. 15). En effet, cette souche enregistre le temps de demi-vie le plus important, soit 201,52 min à 80 °C et un diamètre de zone de lyse de  $1,98 \pm 0,24$  cm. Cette thermostabilité peut être expliquée par un certain nombre de mécanismes adaptatifs des molécules (protéines) que l'on retrouve uniquement chez les (hyper)thermophiles (Coquelle *et al.*, 2007).

En effet, les protéines des organismes thermophiles et hyperthermophiles sont plus thermostables que celles de leurs homologues mésophiles et fonctionnent de manière optimale à haute température. Néanmoins, il n'existe aucune règle générale permettant d'expliquer cette thermostabilité. Chaque protéine adoptant sa propre stratégie de stabilisation (Oger et Franzetti, 2012), soit par des modifications mineures de leurs séquences en acides aminés favorisant le repliement de la protéine sous une forme compacte, avec un nombre réduit de cavités internes et un nombre élevé de ponts ioniques, et/ou par des liaisons avec les ions métalliques tels que  $Mg^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  et  $Co^{2+}$  (Saxena et Singh, 2011 et Smitha *et al.*, 2015).

La proportion des acides aminés hydrophobes est plus élevée dans les protéines des microorganismes thermophiles que celles des mésophiles. Sachant que plus les protéines sont hydrophobes, plus elles sont thermostables à des températures élevées (Yeoman *et al.*, 2010 et Bhalla *et al.*, 2015).

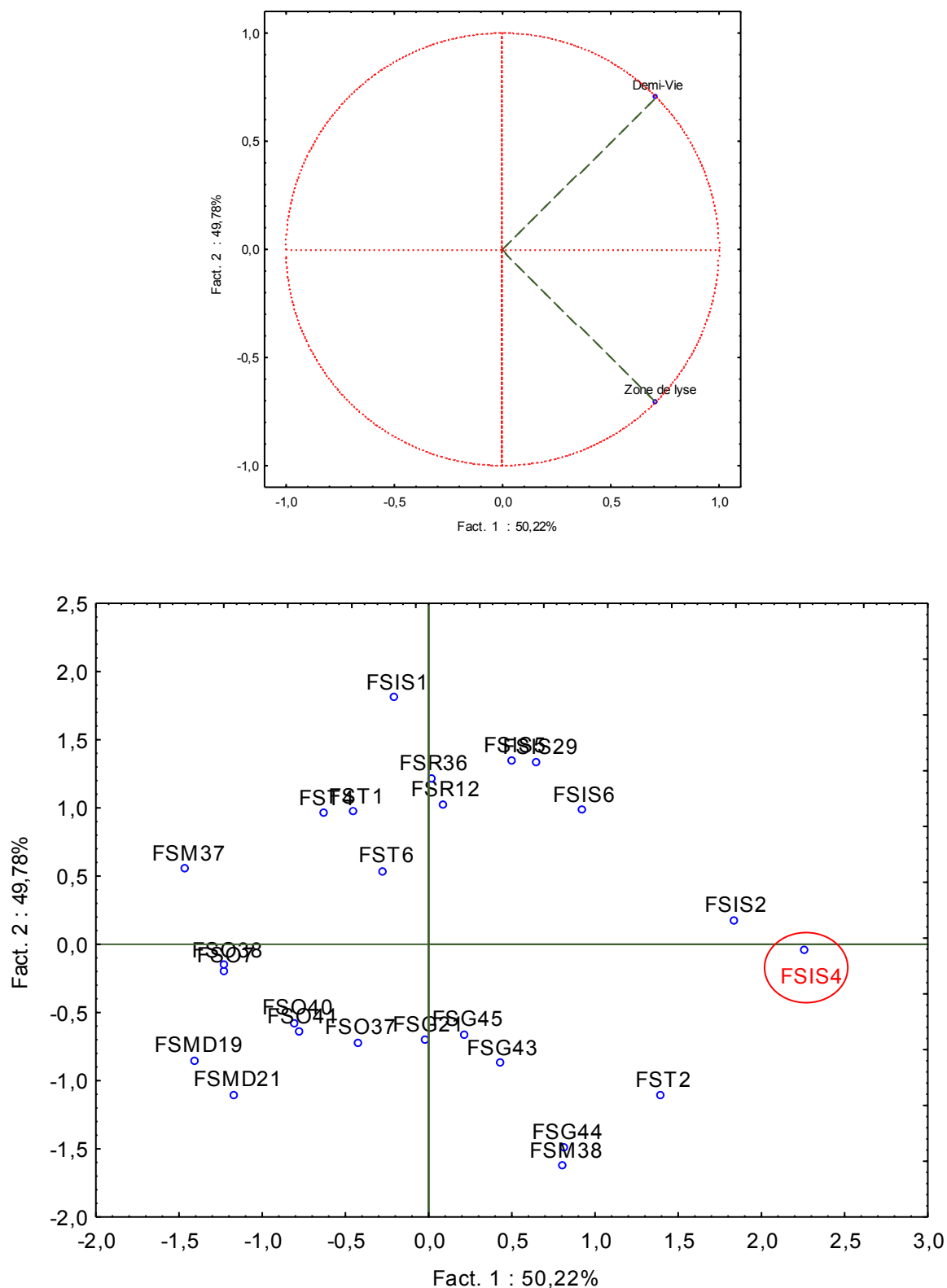
Les protéines chaperonnes permettent aussi d'améliorer la thermostabilité des enzymes (Jay, 1996 et Vieille et Zeikus, 2001).

D'un autre côté, l'étude et la comparaison de composition en acides gras des lipides de 15 souches des Mucorales thermophiles, thermotolérants, mésophiles et psychrophiles a mis évidence que les acides gras des membranes cellulaires des souches psychrophiles présentent un degré d'insaturation similaire à ceux des souches mésophiles.

Au fur et à mesure que la température d'incubation augmente, les champignons thermophiles et thermotolérants modifient la composition en acides gras de leurs lipides membranaires ; en devenant de moins en moins insaturée (Sumner *et al.*, 1969). De plus, il est important de signaler qu'à toutes les températures d'incubation, les champignons thermophiles ont une tendance à produire des lipides avec une teneur plus élevée en acides gras saturés par rapport à ceux des mésophiles. Ce point, peut être crucial pour expliquer pourquoi les champignons thermophiles ne sont pas capables de se développer à des températures au-dessous de 20 °C. La réponse pourrait être aussi simple que leur incapacité de produire suffisamment des lipides insaturés à basse températures, du fait que les champignons thermophiles n'ont pas de désaturases, ou bien, que ces enzymes ne sont pas actives à des basses températures (Dix et Webster, 1995).

Par ailleurs, la thermostabilité des enzymes est énormément affectée par la richesse en paires de base CG des mRNA (Hickey et Singer, 2004 ; Paz *et al.*, 2004 et Trivedi *et al.*, 2006).





**Figure 15** : Plan principal de l'ACP et projection des 25 souches isolées du genre *Rhizopus*. en fonction du temps de demi-vie et du diamètre de la zone de lyse.

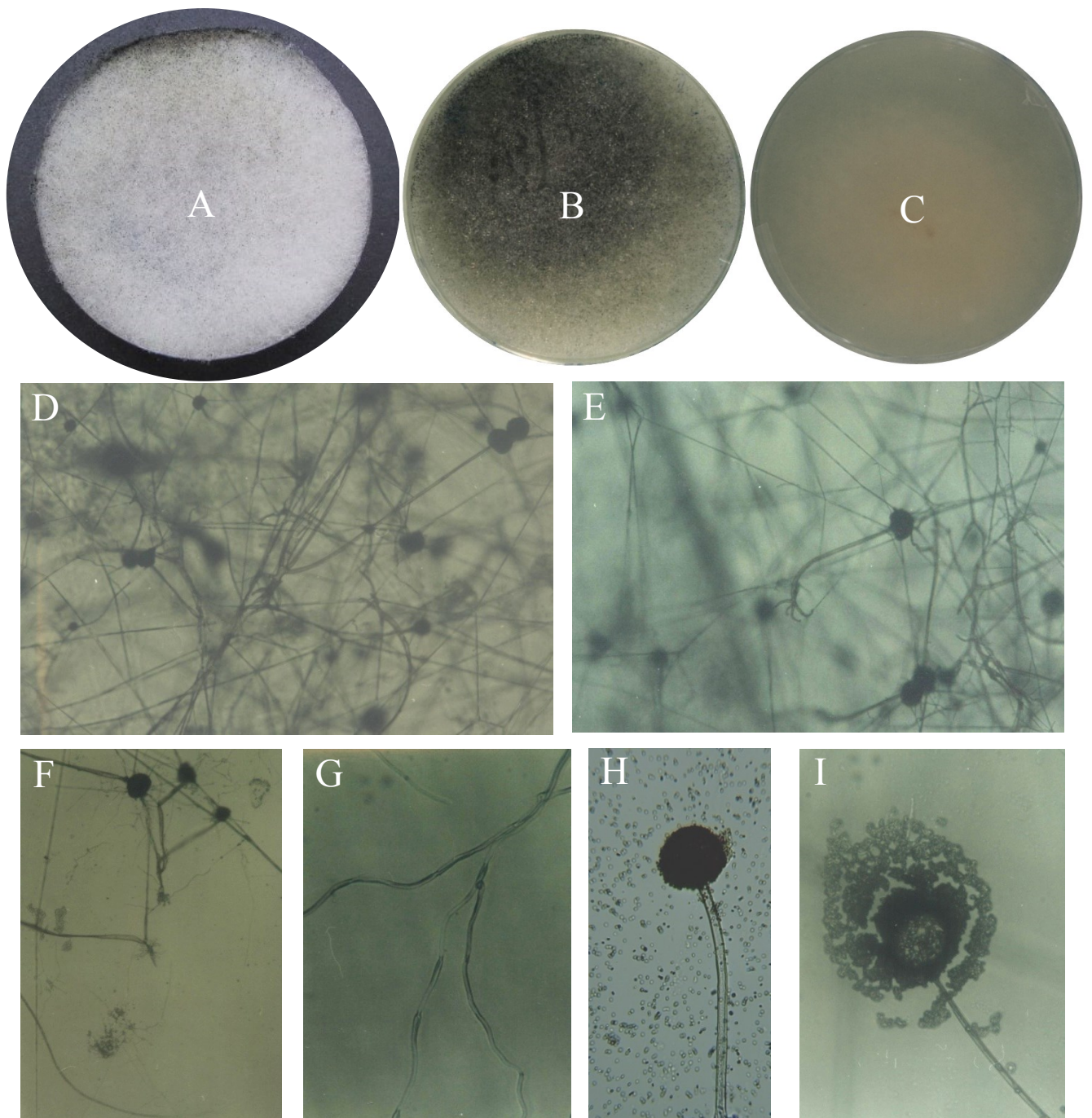
## 2- Identification et caractérisation de la souche FSIS4

### 2-1- Identification morphologique et moléculaire

#### 2-1-1- Identification morphologique

Les études macroscopique et microscopique approfondies de la souche (FSIS4) révèlent les caractères suivants (fig. 16) :

- Thalle à croissance extrêmement rapide sur PDA, Sabouraud et CYA à 45 °C et à 50 °C avec un diamètre de croissance de 6 à 7 cm au bout de 24 heures. En 48 heures, les souches envahissent la boîte jusqu'au couvercle.
- Les autres caractères macroscopiques enregistrés sont
  - Mycélium blanchâtre au début puis devient gris à noir lors de la sporulation, il est de 10 à 20 mm de longueur.
  - Colonies laineuses cérébriformes et collent au couvercle de la boîte de pétri
  - Absence de pigment avec un revers de colonie de couleur crémée
- L'étude microscopique ainsi que les mesures micrométriques effectuées ont révélé les observations suivantes
  - Mycélium non septé ;
  - Différenciation du mycélium en stolons et rhizoïdes ;
  - Sporangiohores isolés ou par bouquet de 2 à 4 de 4 à 5  $\mu\text{m}$  de diamètre ;
  - Sporocyste globuleux noir de 28  $\mu\text{m}$  de diamètre ;
  - Columelles globuleuses ;
  - Rhizoïdes bruns situés en opposé du sporangiohore, peu ramifiés de 10  $\mu\text{m}$  de longueur ;
  - Spores anguleuses, brunes striées (3 à 5  $\mu\text{m}$  de long) ;
  - Présence de clamydospores.



**Figure 16 :** Caractères macroscopiques et microscopiques de la souche FSIS4.

A : Aspect des colonies avant sporulation sur milieu Sabouraud ;

B : Aspect des colonies après sporulation sur milieu Sabouraud ;

C : Revers de colonie ;

D : Aspect général de la souche FSIS4 (X250) ;

E : Aspect des rhizoïdes (X250) ;

F : Sporangiophore en bouquet de 3 (X250) ;

G : Mycélium non cloisonné (X250) ;

H et I : Aspect du sporangiospore et des spores (X400).

Les différents caractères présentés par les souches FSIS4 se rapprochent beaucoup de ceux correspondant à la moisissure *Rhizopus oryzae* citées par plusieurs auteurs Domisch *et al.* (1980) ; Botton *et al.* (1990) ; Boiron (1996) ; Campbell *et al.* (1996) ; Ellis (1998) ; Smith (2002) ; Larone (2011) et Dufresne (2014).

### 2-1-2- Séquençage des régions ITS1 et ITS2 de l'ADNr de la souche FSIS4

Le séquençage des produits PCR des régions ITS1 et ITS2 de l'ADNr de la souche FSIS4 permet d'obtenir deux séquences : la première d'une taille de 283 paires de bases (pb) pour ITS1 et la seconde d'une taille de 189 pb pour ITS2.

Les séquences obtenues sont comparées à la base de données GenBank (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) en utilisant la méthode de recherche Blast (*Basic local alignment search*) afin de trouver des régions ayant des zones de similitude entre deux ou plusieurs séquences. Des alignements des séquences obtenues et des séquences de la base de données NCBI sont effectués en utilisant le programme ClustalW (Thompson *et al.*, 1994) qui est un programme d'alignement multiple de séquences. Les séquences ont montré une similitude de 99 % avec de nombreuses souches de *Rhizopus oryzae* (voir résultat du Blast en annexe 5). La séquence ITS1 est déposée dans GenBank de NCBI avec le numéro d'accès KU726976.1 (*Accession No*: KU726976.1) (annexe 6).

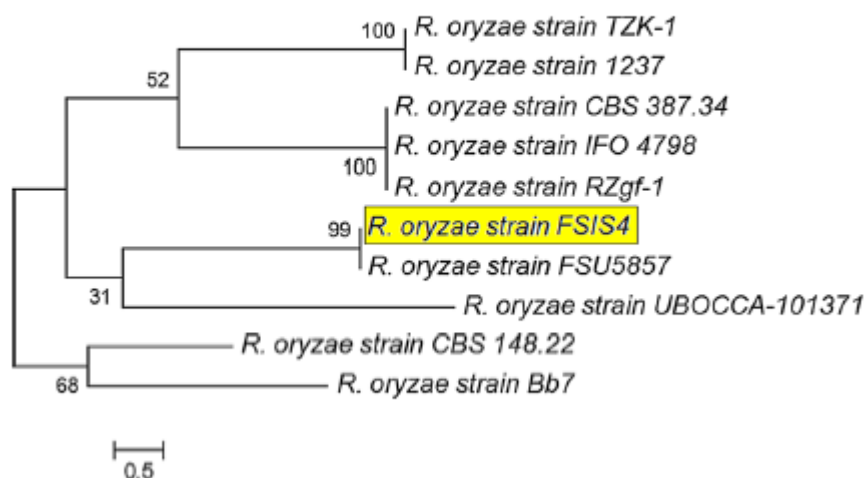
Sur la base des résultats du Blast, un arbre phylogénétique est ensuite construit par le logiciel MEGA 6.0 (Tamura *et al.*, 2013) (fig. 17). Cet arbre permet d'établir des liens de parenté entre les espèces, à partir de l'analyse de séquences, par l'intermédiaire d'un alignement multiple contrairement au Blast qui est basé sur un alignement local. La construction prend en compte les changements survenus au cours de l'évolution. L'arbre phylogénétique est construit en utilisant la méthode du maximum de vraisemblance, basée sur la recherche de l'arbre optimal en attribuant une probabilité à chaque changement dans les séquences "Neighbor-Joining" (Saitou et Nei, 1987). La fiabilité et la robustesse de la topologie obtenue est évaluée par la méthode du *Bootstrap* qui met en évidence la proximité entre les différents taxons (Felsenstein, 1985). Les distances génétiques sont calculées en utilisant la méthode du maximum de vraisemblance entre les souches (Tamura *et al.*, 2013).

Séquence obtenue avec l'amorce ITS5 pour ITS1

```
TAATTATGTTAAAGCGCCTTACCTTAGGGTTTCCTCTGGGGTAAGTGATTG
CTTCTACACTGTGAAAATTTGGCTGAGAGACTCAGACTGGTCATGGGTAGA
CCTATCTGGGGTTTGATCGATGCCACTCCTGGTTTCAGGAGTACCCTTCAT
AATAAACCTAGAAATTCAGTATTATAAAGTTAATAAAAAACAACCTTTTAAACA
ATGGATCTCTTGTTCTCGCATCGATGAAGAACGTAnCAAAGTGCGATAAC
TAGTGTGAATTGCATATTCAGTGAATnnT
```

Séquence obtenue avec l'amorce ITS4 pour ITS2

```
TAGTTTGAAAGTTACTGGATTATACTCTTGTACTTTACTTCCnGGnnGAACC
AAAAAAAAAAGATCCTGAGACCAGCGTAATATTCCTGCCTAGCAAGCCAGAC
AGAAAATCACACACATTTTtaggtgctcactGnAATAAAACAGCGATGCGACC
CATCACCACATAAACAAATGTTATGTGTGGGTTT
```



**Figure 17** : L'arbre phylogénétique de *Rhizopus oryzae* FSIS4.

## 2-2- Caractérisation physiologique de *Rhizopus oryzae* FSIS4

### 2-2-1- Etude de la thermophilie

La croissance apicale de *Rhizopus oryzae* FSIS4 en fonction de la température d'incubation : 19, 25, 35, 45, 50, 55 et 60 °C, est récapitulée dans le tableau 15 suivant.

**Tableau 15** : Croissance apicale (mm.h<sup>-1</sup>) de *Rhizopus oryzae* FSIS4 après incubation à différentes températures.

Température (°C)	Croissance apicale (mm.h <sup>-1</sup> )
19	0
25	0,1 ± 0,02
35	0,15 ± 0,07
45	1,08 ± 0,23
50	1,09 ± 0,18
55	0,97 ± 0,16
60	0,05 ± 0,02

Les résultats montrent que l'espèce isolée est capable de se développer dans une large gamme de températures allant de 25 °C à 60 °C avec un optimum à 50 °C. Une absence de croissance à 19 °C et un développement au delà de 50 °C confirme que la souche isolée est thermophile. Ces dernières sont fréquemment isolées de milieux extrêmes (Dix et Webster, 1995).

### 2-2-2- Détermination du taux optimale de l'inoculum de *Rhizopus oryzae* FSIS4

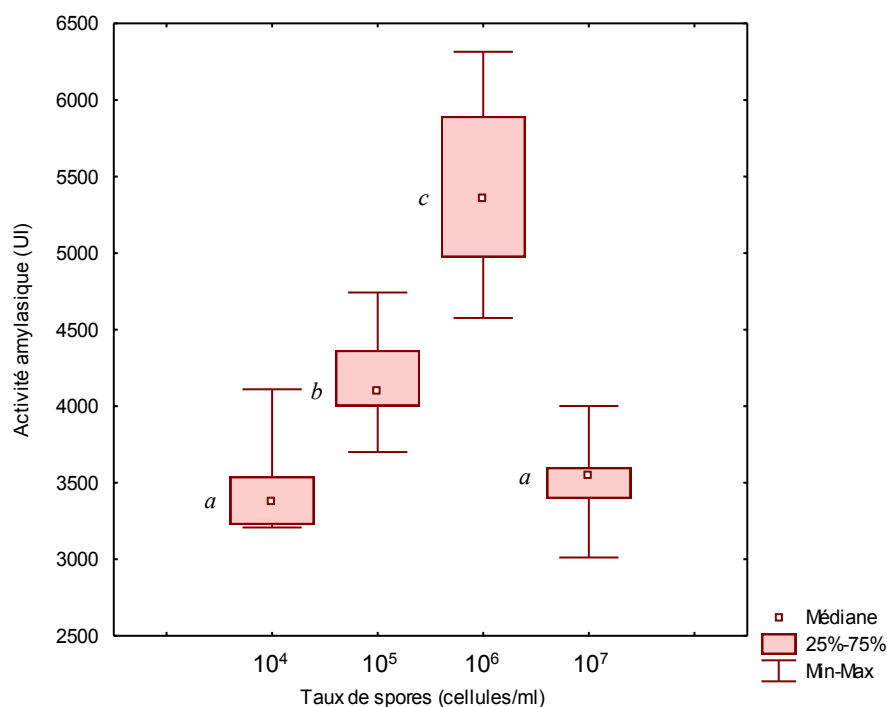
Différents taux d'ensemencement ( $10^4$ ,  $10^5$ ,  $10^6$  et  $10^7$  cellules/ml) sont testés pour déterminer le taux optimal pour la production de l' $\alpha$ -amylase de *Rhizopus oryzae* FSIS4. Les résultats montrent que la production de l' $\alpha$ -amylase augmente en fonction de l'augmentation du taux de spores jusqu'à  $10^6$  cellules/ml. Pour le dernier taux testé ( $10^7$ ), la production diminue considérablement pour atteindre en moyenne 3517,8 UI (fig. 18). L'Anova effectuée révèle un effet taux de spores hautement significatif sur la production de l'enzyme ( $F = 26,56$  ;  $p < 0,001$ ). D'après le test post-hoc de Student-Newman-Keuls, l'activité amylasique la plus importante est enregistrée avec le taux de spores de  $10^6$  cellules/mL ce qui correspond au taux optimal, retenu pour toutes les fermentations ultérieures.

Le même taux de spores est recommandé par plusieurs auteurs pour la production d' $\alpha$ - amylase fongique (Bennamoun *et al.*, 2004 ; Djekrif *et al.*, 2006 et Ait Kaki – El-Hadef El-Okki *et al.*, 2012).

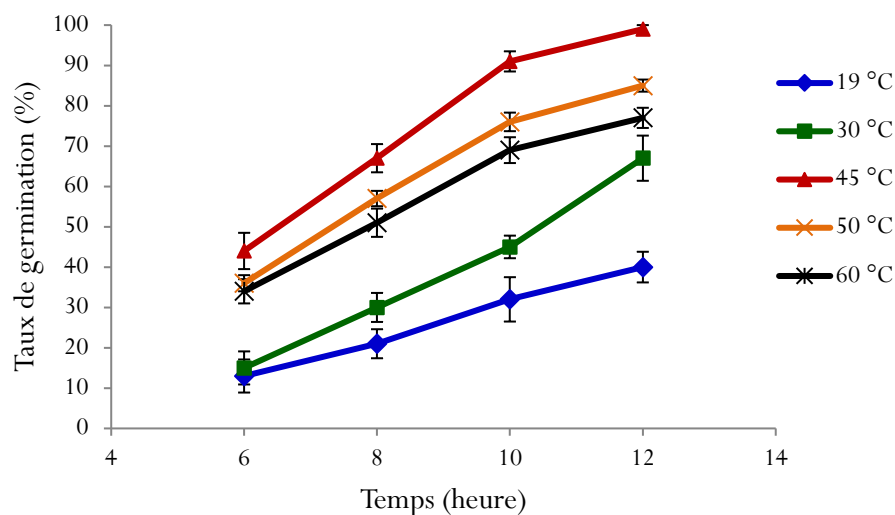
### 2-2-3- Effet de la température sur la germination des spores

La germination des spores des champignons filamenteux est conditionnée par la somme des changements morphologiques et biochimiques qui interviennent lors de la reprise du développement du mycélium. L'effet de la température sur la germination et le métabolisme des moisissures est démontré par plusieurs auteurs (Roussos, 1985 ; Maheshwari *et al.*, 2000 et Carlile *et al.*, 2001). De ce fait, l'effet de différentes températures sur la germination des spores de *R. oryzae* FSIS4 est étudié.

La figure 19 montre l'effet de la température d'incubation sur le taux de germinations des spores de *R.oryzae* FSIS4. Cette dernière présente une bonne germination à 45 °C, à 50 °C et à 60 °C avec un optimum à 45 °C, contrairement à 30 °C et à 19 °C où la germination devient moins rapide. Ces résultats montrent qu'effectivement la température influence la germination et sa vitesse (Carlile *et al.*, 2001)



**Figure 18** : L'activité amylasique en fonction du taux de spores.  
*a,b,c*: groupes homogènes selon le test post-hoc de Student-Newman-Keuls



**Figure 19** : Influence de la température d'incubation sur le taux de germinations des spores de *Rhizopus oryzae* FSIS4.



### 3- Caractérisation de la farine de dattes déclassées

Parmi les agro-ressources décrites comme étant des milieux riches susceptibles de supporter la croissance microbienne et la production enzymatique, les dattes déclassées sont un support prometteur, par leur richesse en glucides fermentescibles (tableau 16).

La farine de datte présente un taux de matière sèche de 94,83 %. La teneur en eau des dattes varie en fonction des variétés. Les dattes de consistances molles ont une humidité supérieure à 20 %, par contre les dattes sèches ont une humidité inférieure à 20 % (Açourène et Ammouche, 2012). Le pH de la farine de datte est légèrement acide (5,04). Ce pH est préjudiciable aux bactéries mais approprié au développement de la flore fongique (Keller et Hohn, 1997).

Les sucres sont les constituants majeurs de la datte. L'analyse des sucres totaux de la farine de datte révèle un taux de 81,1 %. La teneur en sucres totaux est très variable et dépend de la variété et du climat et des stades de maturation de la datte. Elle varie entre 60 et 80 % du poids de la pulpe fraîche (Kacem-Chaouche *et al.*, 2013 et Boucherba, 2015).

La farine de dattes est caractérisée par une faible teneur en protéines (3,1 %). Malgré cette faible teneur, les protéines de la datte sont équilibrées qualitativement. La composition en acides aminés des protéines de la pulpe de datte révèle la présence de 6 à 8 acides aminés indispensables (Kacem-Chaouche *et al.*, 2013).

La farine de datte présente un taux de matière grasse de 0,8 %. La datte renferme une faible quantité de lipides. Leur taux varie entre 0,43 et 1,9 %, en fonction de la variété et du stade de maturation de la datte.

La datte est l'un des fruits les plus riches en éléments minéraux, essentiellement le potassium, le magnésium, le phosphore et le calcium (Kacem-Chaouche *et al.*, 2013 et Boucherba, 2015). La farine de datte analysée présente les taux suivants : calcium 59,8 %, phosphore 46,9 %, magnésium 49,06 % et potassium 451,8 %.

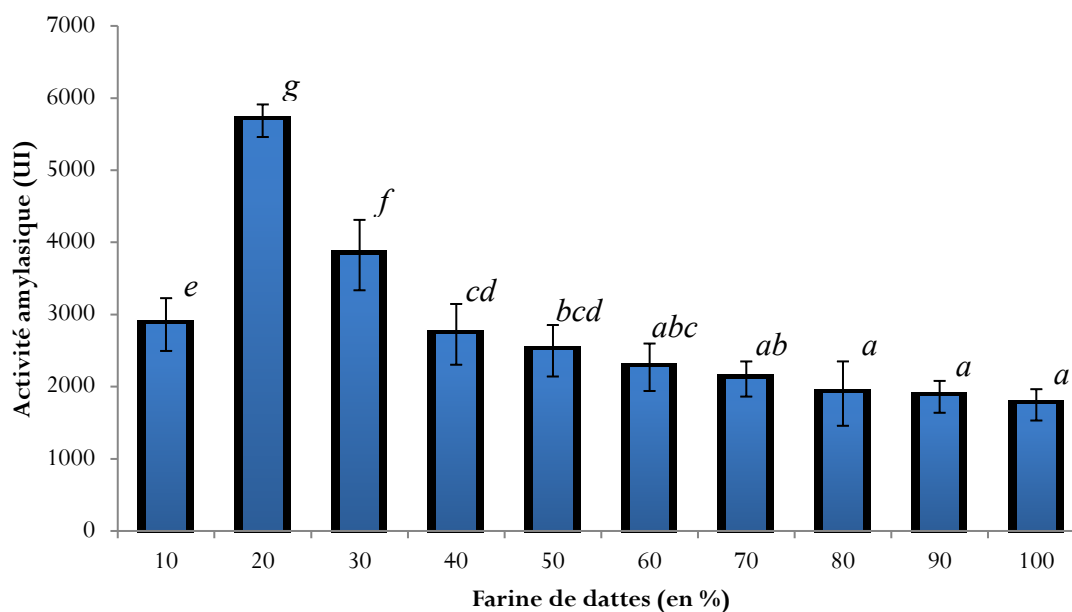
Le calcul du rapport carbone/azote (C/N) de la farine de datte est égal à 64/1. Selon Botton *et al.* (1990), ce ratio est insuffisant pour la croissance des moisissures et la production de l' $\alpha$ -amylase. Le rapport C/N recommandé pour la croissance fongique est de 20/1. Pour cette raison l'optimisation de ce milieu à base de farine de dattes s'avère indispensable.

Afin de déterminer la concentration optimale de la farine de dattes pour la production de l' $\alpha$ -amylase, les concentrations testées sont 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 et 100 %. Les résultats obtenus montrent que l'activité enzymatique est maximale pour un taux de 20 % de la farine de dattes, alors qu'elle diminue avec l'augmentation des taux de cette farine (fig. 20). L'Anova effectuée révèle une différence hautement significative entre les concentrations testées ( $F = 36,44$  ;  $p < 0,001$ ). D'après le test post-hoc de Student-Newman-Keuls, il ressort que le taux 20 % de la farine de dattes est la concentration optimale ; taux retenu pour la suite du travail.



**Tableau 16** : Résultats de l'analyse physico-chimique de la farine de dattes déclassées.

Paramètres	Unité	Résultats
pH	-	5,04
MS	%	94,83 ± 0,1
Cendre MM	%	2,1 ± 0,0
Matière grasse	%	0,8 ± 0,11
Sucre totaux	%	81,1 ± 0,7
Protéines	%	3,1 ± 0,1
Azote total	%	0,5 ± 0,07
Calcium	mg/100 g	59,8 ± 0,24
Phosphore	mg/100 g	46,9 ± 0,13
Magnésium	mg/100 g	49,06 ± 0,2
Potassium	mg/100 g	451,8 ± 0,35

**Figure 20** : Activités amylasiques en fonction de la concentration de farine de dattes.  
*a,b,c,d,e,f*: groupes homogènes selon le test post-hoc de Student-Newman-Keuls

## 4- Optimisation de la production de l' $\alpha$ -amylase

### 4-1- Criblage des facteurs

L'ensemble des résultats expérimentaux du plan de Plackett-Burman (PBD) est résumé dans le tableau 17. Il exprime les activités de l' $\alpha$ -amylase thermostable de *R. oryzae* FSIS4 en fonction de la composition du milieu.

L'effet des facteurs testés sur l'activité amylasique,  $t_{(xi)}$ ,  $p$  et le niveau de confiance de chaque facteur sont résumés dans le tableau 18 .

Les facteurs sont criblés sur la base de leurs effets significatifs (au seuil de 5 %). Lorsque le facteur montre une signification au niveau ou au-dessus du niveau de confiance de 95 %, avec effet négatif, il est considéré comme efficace pour la production. Néanmoins, il est à noter que la quantité requise peut être inférieure à la faible concentration (niveau -1) indiquée dans les expériences. Par ailleurs, si l'effet est positif, une concentration supérieure à la concentration indiquée (niveau +1) est nécessaire.

L'amidon, l'extrait de levure, le  $\text{CaCl}_2$  et le  $\text{MgSO}_4$  présentent des niveaux de signification supérieurs à 95 % (hautement significatifs). Cependant, le pH,  $\text{NaNO}_3$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  et la vitesse d'agitation ont montré des niveaux de signification inférieurs à 95 % et ne semblent pas avoir un effet sur l'activité amylasique de *R. oryzae* FSIS4.

L'analyse du plan PBD permet d'obtenir l'équation de régression suivante :

$$Y = 6773,5 + 359,3 \times \text{amidon} + 279 \times \text{extrait de levure} + 191,3 \times \text{CaCl}_2 + 241,0 \times \text{MgSO}_4$$

D'après l'Anova effectuée, la valeur  $F$  est de 22,07 ( $p = 0,014$ ) implique que le modèle retenu est significatif.

#### 4-1-1- Effet de l'amidon

L'amidon présente un effet hautement significatif sur la production de l' $\alpha$ -amylase thermostable avec un niveau de signification de 99,7 % ( $p < 0,01$ ). L'addition de l'amidon dans le milieu augmente la production enzymatique de 11,2 %. La source de carbone est un des facteurs importants qui affectent la production enzymatique, en particulier lorsqu'elle joue le rôle d'inducteur d'enzyme. Les  $\alpha$ -amylases sont des enzymes extracellulaires et leur production est induite par leur substrat à une certaine concentration (Sharma *et al.*, 2014 et Prajapati *et al.*, 2015).

**Tableau 17** : Matrice et résultats du plan expérimental de Plackett-Burman.

Essai	Facteurs											Activité amylasique (UI)
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>4</sub>	X <sub>5</sub>	X <sub>6</sub>	X <sub>7</sub>	X <sub>8</sub>	X <sub>9</sub>	X <sub>10</sub>	X <sub>11</sub>	
1	+1	+1	-1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	6569
2	+1	-1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	+1	7495
3	-1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	+1	+1	6684
4	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	+1	+1	-1	7430
5	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	6931
6	+1	-1	-1	-1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	+1	6703
7	-1	-1	-1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	+1	+1	5838
8	-1	-1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	+1	+1	-1	6741
9	-1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	+1	+1	-1	-1	7639
10	+1	-1	+1	+1	-1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	6923
11	-1	+1	+1	-1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	6643
12	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	5686

+1 : niveau supérieur ; -1 : niveau inférieur  
 Les facteurs X<sub>4</sub>, X<sub>8</sub> et X<sub>11</sub> représentent des erreurs

**Tableau 18** : Résultats de l'analyse statistique du plan expérimental de Plackett-Burman.

Facteurs	Effets	Coefficients	<i>t</i>	<i>p</i>	Niveau de signification (%)
X <sub>1</sub> : pH	-175,67	-87,83	-2,07	0,130	87,0
X <sub>2</sub> : amidon	718,67	359,33	8,47	0,003	99,7
X <sub>3</sub> : extrait de levure	558,00	279,00	6,58	0,007	99,3
X <sub>5</sub> : NaNO <sub>3</sub>	88,33	44,17	1,04	0,375	62,6
X <sub>6</sub> : KH <sub>2</sub> PO <sub>3</sub>	106,67	80,33	1,89	0,155	84,5
X <sub>7</sub> : CaCl <sub>2</sub>	382,67	191,33	4,51	0,020	98,0
X <sub>9</sub> : MgSO <sub>4</sub>	482,00	241	5,68	0,011	98,9
X <sub>10</sub> : vitesse d'agitation	-12,67	-6,33	-0,15	0,891	10,9

Étant une source inépuisable de carbone, par rapport à d'autres sources, l'amidon est considéré comme le meilleur substrat pour la production d' $\alpha$ -amylase fongique et bactérienne (Bennamoun *et al.*, 2004 et Sharma *et al.*, 2014). Selon Sahnoun *et al.* (2012), Bhanja Dey et Banerjee (2015) et Sahnoun *et al.* (2016), l'amidon est le substrat qui présente la plus grande affinité vis-à-vis de l' $\alpha$ -amylase d'*Aspergillus oryzae*, et la plus importante activité amylasique est enregistrée en sa présence. En plus de son rôle inducteur, l'amidon est considéré comme un stabilisateur de l' $\alpha$ -amylase (De Mot et Verachlert, 1987 ; Djekrif-Dakhmouche *et al.*, 2006 ; Djekrif-Dakhmouche *et al.*, 2014 et Sahnoun *et al.*, 2016).

#### 4-1-2- Effet de l'extrait de levure

L'extrait de levure affecte de manière hautement significative la production de l' $\alpha$ -amylase thermostable (signification de 99,3 %). En effet, Les sources d'azote supplémentaires favorisent la production de nombreuses enzymes, à savoir l' $\alpha$ -amylase (Pedersen et Nielsen, 2000). La source d'azote utilisée pour la production d' $\alpha$ -amylase peut être inorganique ou organique. plusieurs rapports montrent que diverses sources d'azote inorganiques, améliorent considérablement la croissance microbienne et la sécrétion de l' $\alpha$ -amylase (Narang et Satyanarayana, 2001 ; Sharma *et al.*, 2014 et Prajapati *et al.*, 2015). Pour les sources organiques, la plus couramment utilisée et la plus recommandée pour optimiser la production de l' $\alpha$ -amylase c'est l'extrait de levure (Bennamoun *et al.*, 2004 ; Riaz *et al.*, 2008 ; Suman et Ramesh, 2010 ; Ait Kaki – El-Hadef El-Okki *et al.*, 2012 ; Uygut et Tanyildizi, 2016 et Simair *et al.*, 2017). Ce nutriment potentiel pour la fermentation, contient des vitamines et des acides aminés libres (Gao *et al.*, 2008).

#### 4-1-3- Effet du $MgSO_4$ et $CaCl_2$

$MgSO_4$  et  $CaCl_2$  ont un effet positif hautement significatif ( $p < 0,05$ ) sur la production de l' $\alpha$ -amylase thermostable de *Rhizopus oryzae* FSIS4 (98 % et 98,9 % de niveaux de signification, respectivement). La supplémentation des ions métalliques dans les milieux de production des enzymes assure une bonne croissance et influence de manière significative le rendement des enzymes (Gupta *et al.*, 2003).

Suman et Ramesh (2010), Dakhmouche *et al.* (2014) et Prajapati *et al.* (2015) rapportent que le  $CaCl_2$  améliore la production de l' $\alpha$ -amylase microbienne.

La plupart des  $\alpha$ -amylases sont des métallo-enzymes à calcium dont la production y est dépendante (Asgher *et al.*, 2007). Les ions  $Ca^{2+}$  jouent des rôles importants pour l' $\alpha$ -amylase (Sindhu *et al.*, 2017). En effet, le calcium intervient dans le métabolisme et la physiologie des microorganismes, il est nécessaire pour le maintien de la conformation de l'enzyme, et joue ainsi un rôle important dans la stabilité et l'activité de l'enzyme (Gupta *et al.*, 2003 ; Asgher *et al.*, 2007 et Atspha *et al.*, 2015), il protège l'enzyme contre les protéases (Sarikaya et Gurgun, 2000). Enfin, il améliore la stabilité thermique de l' $\alpha$ -amylase (Boel *et al.*, 1990 et Gangadharan *et al.*, 2008).

Aussi, Gupta *et al.* (2003), Zareian *et al.* (2010) et Asha *et al.* (2013) montrent l'effet très significatif des cations  $Mg^{2+}$  sur la production de l' $\alpha$ -amylase. Ces auteurs indiquent que si ce métal ne figure pas dans le milieu, le rendement de la production en  $\alpha$ -amylase sera réduit de 50 %.

#### 4-1-4- Effet du $NaNO_3$ , $KH_2PO_4$ , pH et la vitesse d'agitation sur l'activité amylasique

Bien que le  $NaNO_3$  est utilisé comme source d'azote inorganique par plusieurs auteurs pour la production de l' $\alpha$ -amylase (Malhotra *et al.*, 2000 et Shabbiri *et al.*, 2012), dans notre cas il ne présente aucun effet significatif sur la production de l' $\alpha$ -amylase de *R.oryzae* FSIS4, apparemment l'azote contenu dans le milieu de base (dattes déclassées) et l'azote fourni par l'extrait de levure semble être suffisant pour la production de l' $\alpha$ -amylase.

Le  $KH_2PO_4$  aussi, ne présente aucun effet significatif sur la production de l' $\alpha$ -amylase, bien qu'il soit connue pour son effet tampon, le  $KH_2PO_4$  est aussi une source d'ions  $K^+$  et  $PO_4^{3-}$  nécessaires aux différentes activités physiologiques (Prescott *et al.*, 2010).

La variation du pH de 5 à 6 n'a pas d'effet significatif sur la production de l' $\alpha$ -amylase thermostable de *R. oryzae* FSIS4. Selon Lucio de Souza *et al.* (1996), une légère variation du pH de 4 à 5,6 ne présente pas d'effet significatif sur l'activité amylasique de *R. oryzae*. En effet, l' $\alpha$ -amylase fongique est stable dans une gamme de pH de 3 à 8 avec un optimum se situant entre 4 et 5 (Møller *et al.*, 2004). Selon Bennamoun *et al.* (2004) et Djekrif-Dakhmouche *et al.* (2006), la production optimale de l' $\alpha$ -amylase d'*Aspergillus oryzae* et *Aspergillus niger* est à pH 5,0.

La vitesse d'agitation est importante pour un bon mélange tout au long de la fermentation, ce qui assure le transfert suffisant d'oxygène dans les cultures aérobies, et par conséquent améliore la croissance cellulaire et la synthèse de métabolites. Dans cette étude, la variation de l'agitation de 100 à 150 rpm ne révèle aucun effet significatif sur la production de l' $\alpha$ -amylase. Ce résultat est en accord avec Amanullah *et al.* (2001) qui concluent que la production de l' $\alpha$ -amylase et l'amyloglucosidase est indépendantes de la vitesse d'agitation. En outre, Bennamoun *et al.* (2004) indique qu'un changement limité de la vitesse d'agitation n'a aucun effet sur la production des protéines, alors que son effet sur la biomasse est nettement positif. Selon Gao et Gu (2007), des vitesses d'agitation trop élevées ( $\geq 200$  rpm) peuvent causer des dommages dans la structure cellulaire et conduisent à une diminution du rendement en métabolites secondaires.

La méthodologie du PBD est donc jugée très utile pour l'identification des facteurs affectant significativement la production de l' $\alpha$ -amylase thermostable de *R. oryzae* FSIS4, à savoir l'amidon, l'extrait de levure, le  $CaCl_2$  et le  $MgSO_4$ . Ces facteurs sont retenus pour l'étape suivante qui consiste en une optimisation plus poussée des effets principaux de ces facteurs et de leurs interactions conduisant à une production maximale de l' $\alpha$ -amylase thermostable de la souche *R. oryzae* FSIS4.

#### 4-2- Détermination des optima des facteurs sélectionnés par l'utilisation de la méthodologie des surfaces de réponses (RSM)

Le plan composite centré (CCD) est utilisé pour étudier l'interaction entre les quatre facteurs sélectionnés par le PBD et déterminer leurs valeurs optimales. Dans le présent travail, les expériences sont prévues pour obtenir un modèle quadratique constitué de 30 essais. Afin d'étudier l'effet combiné des composants du milieu, les expériences sont réalisées avec différentes combinaisons. Le tableau 19 résume le plan utilisé avec les valeurs observées et prédites de la réponse (activité amylasique) pour chaque expérience individuelle.

**Tableau 19** : Les valeurs observées et prédites de l'activité  $\alpha$ -amylasique de *Rhizopus oryzae* FSIS4 à partir du plan composite centré.

Essai	Facteurs				Activité $\alpha$ -amylasique (IU)	
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>4</sub>	Valeurs observées	Valeurs prédites
01	4,5	1,5	0,4	0,2	6473	6191
02	5,5	1,5	0,4	0,2	9218	8780,6
03	4,5	2,5	0,4	0,2	7995	7261,9
04	5,5	2,5	0,4	0,2	7951	7725
05	4,5	1,5	0,6	0,2	5899	5470,4
06	5,5	1,5	0,6	0,2	4622	6074
07	4,5	2,5	0,6	0,2	7352	7587,8
08	5,5	2,5	0,6	0,2	6287	6064,9
09	4,5	1,5	0,4	0,4	4887	4476,9
10	5,5	1,5	0,4	0,4	7792	8157,5
11	4,5	2,5	0,4	0,4	8734	7883,3
12	5,5	2,5	0,4	0,4	9641	9437,4
13	4,5	1,5	0,6	0,4	4192	5019,3
14	5,5	1,5	0,6	0,4	6613	6713,9
15	4,5	2,5	0,6	0,4	9667	9472,3
16	5,5	2,5	0,6	0,4	8157	9040,3
17	4	2	0,5	0,3	5268	6170,6
18	6	2	0,5	0,3	9200	8328,3
19	5	1	0,5	0,3	4887	4277,8
20	5	3	0,5	0,3	7035	7675,1
21	5	2	0,3	0,3	6801	8174,3
22	5	2	0,7	0,3	8399	7056,6
23	5	2	0,5	0,1	7062	7367,3
24	5	2	0,5	0,5	8903	8628,3
25	5	2	0,5	0,3	9394	9181,5
26	5	2	0,5	0,3	9155	9181,5
27	5	2	0,5	0,3	9320	9181,5
28	5	2	0,5	0,3	9020	9181,5
29	5	2	0,5	0,3	9145	9181,5
30	5	2	0,5	0,3	9055	9181,5

X<sub>1</sub> : Amidon ; X<sub>2</sub> : Extrait de levure ; X<sub>3</sub> : CaCl<sub>2</sub> ; X<sub>4</sub> : MgSO<sub>4</sub>

Elle montre la production d' $\alpha$ -amylase (en UI) correspondant à l'effet combiné des quatre composants dans les intervalles indiqués. Les niveaux optimaux des facteurs sont obtenus en résolvant l'équation de régression et en analysant le contour de la surface de réponse (Abdelhay *et al.*, 2008). L'équation de régression obtenue donne une estimation du niveau de production d' $\alpha$ -amylase en fonction de la concentration de l'amidon, l'extrait de levure, le  $\text{CaCl}_2$  et le  $\text{MgSO}_4$ .

L'analyse des résultats expérimentaux à partir des expériences du plan CCD (tableau 19) montre que les termes linéaires d'amidon ( $X_1$ ), d'extrait de levure ( $X_2$ ), les interactions  $X_1 \times X_2$ ,  $X_1 \times \text{CaCl}_2$  ( $X_3$ ),  $X_2 \times \text{MgSO}_4$  ( $X_4$ ) et les coefficients quadratiques :  $X_1^2$ ,  $X_2^2$  et  $X_3^2$  ont un grand impact sur la production de l' $\alpha$ -amylase (tableau 20).

**Tableau 20** : Coefficient de régression de l'équation de la production de l' $\alpha$ -amylase de *Rhizopus oryzae* FSIS4.

Facteurs	Coefficients de régression	F	P
Constante	9181,5	6,14	0,001
Amidon	539,4	8,62	0,010
Extrait de levure	849,3	21,36	0,000
$\text{CaCl}_2$	-279,4	2,31	0,149
$\text{MgSO}_4$	315,3	2,94	0,107
Amidon $\times$ Extrait de levure	-531,6	5,58	0,032
Amidon $\times$ $\text{CaCl}_2$	-496,5	4,87	0,043
Amidon $\times$ $\text{MgSO}_4$	272,8	1,47	0,244
Extrait de levure $\times$ $\text{CaCl}_2$	261,6	1,35	0,263
Extrait de levure $\times$ $\text{MgSO}_4$	583,9	6,73	0,020
$\text{CaCl}_2 \times \text{MgSO}_4$	315,8	1,97	0,181
(Amidon) <sup>2</sup>	-483	7,9	0,013
(Extrait de levure) <sup>2</sup>	-801,3	21,73	0,000
( $\text{CaCl}_2$ ) <sup>2</sup>	-391,5	5,19	0,038
( $\text{MgSO}_4$ ) <sup>2</sup>	-295,9	2,96	0,106

R = 0,923; R<sup>2</sup> = 0,851; Adj. R<sup>2</sup> = 0,713; CV = 11,8 %

Ainsi, l'équation de régression qui en résulte est la suivante :

$$Y = 9181,5 + 539,4 X_1 + 849,3 X_2 - 531,6 X_1 X_2 - 496,5 X_1 X_3 + 583,9 X_2 X_4 - 483,0 X_1^2 - 801,3 X_2^2 - 391,5 X_3^2$$

Avec : Y : activité de l' $\alpha$ -amylase (en UI);

$X_1$  : amidon (en g/L) ;

$X_2$  : extrait de levure (en g/L) ;

$X_3$  :  $\text{CaCl}_2$  (en g/L) ;

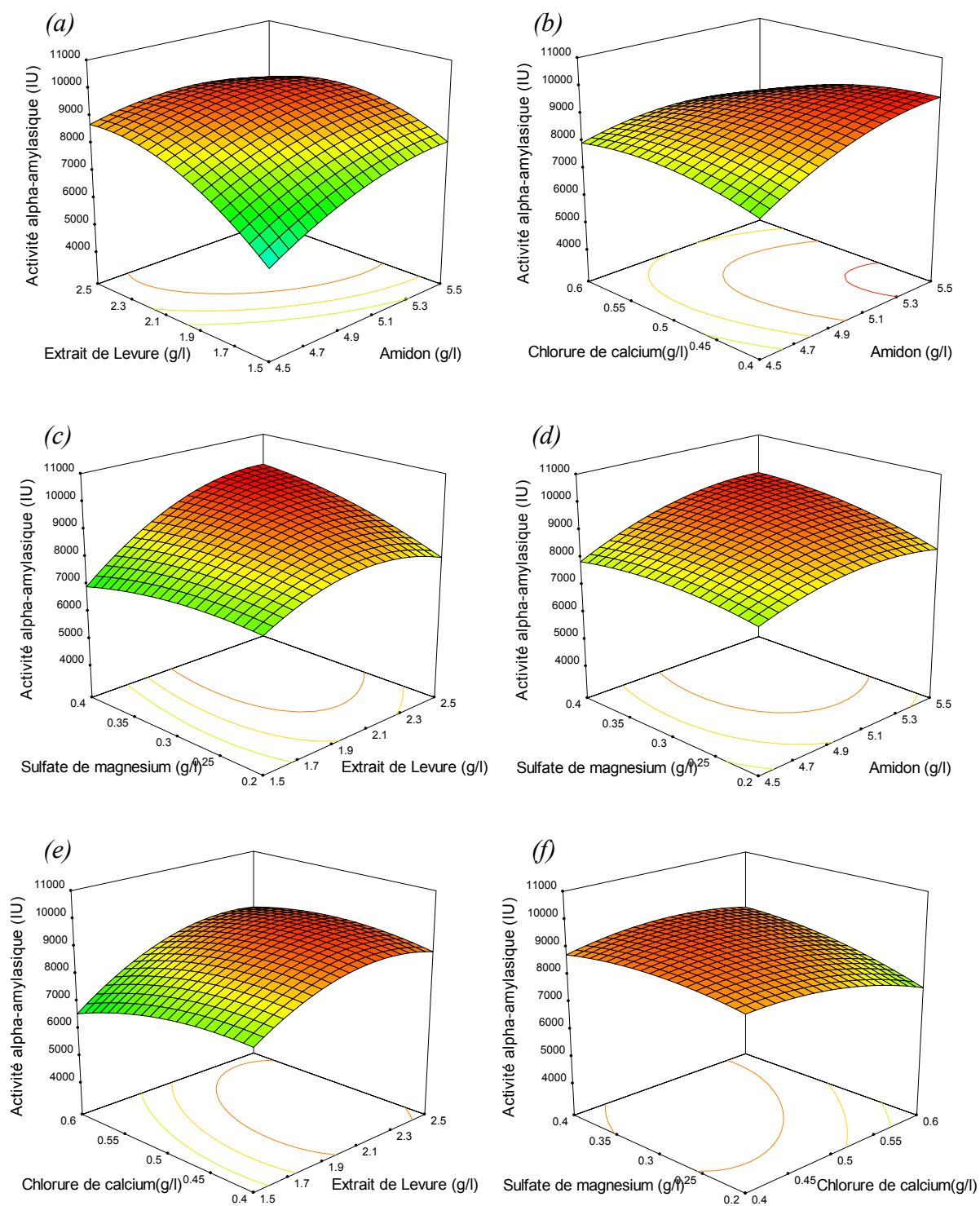
$X_4$  :  $\text{MgSO}_4$  (en g/L).

L'équation ne comporte que les paramètres dont l'effet est significatif (au seuil de 5 %). Cette équation permet de déterminer les valeurs prédites de la production amyliques pour chaque expérience réalisée (tableau 19). En comparant les deux réponses, l'Anova montre que le modèle de régression obtenu est hautement significatif ( $F = 6,14$  ;  $p < 0,001$ ).

L'ajustement du modèle est également exprimé par le coefficient de détermination ( $R^2$ ) qui indique aussi que le modèle explique 85,1 % de la variabilité dans la réponse. Pour sa part, le  $R^2$  ajusté explique 71,3 % ce qui indique un bon accord entre les valeurs expérimentales et les valeurs prédites. En outre, la faible valeur du coefficient de variation (11,84 %) montre la fiabilité des expériences réalisées.

D'une façon générale, les résultats montrent que le modèle obtenu est valable pour la prédiction de l'activité amylasique de *R. oryzae* FSIS4. Ainsi, les surfaces de réponse obtenues à partir des interactions entre les variables étudiées peuvent être utilisées pour prédire les valeurs optimales de ces variables afin d'obtenir l'activité amylasique maximale. Le tracé d'iso-réponses de la production de l' $\alpha$ -amylase est généré à partir de l'équation du modèle obtenu. La figure 21 représente les surfaces de réponse 3D et les contours 2D des interactions des différents facteurs influençant l'activité amylasique. Les courbes de contour développées aux valeurs minimale et maximale des niveaux considérées augmentent la réponse pour la zone de production. Selon [Montgomery \(2008\)](#), les contours elliptiques sont obtenus quand une parfaite interaction existe entre les variables indépendantes. La figure 21 montre différentes formes des tracés de contour correspondants à différents types d'interactions entre les quatre variables (amidon, extrait de levure,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{MgSO}_4$ ). La surface de réponse et le contour des parcelles de l'activité enzymatique en fonction de l'amidon et de l'extrait de levure sont représentés dans la figure 21a. Le caractère elliptique du contour indique que cette interaction est importante dans la réponse. Ceci montre que l'addition de l'amidon ou de la source d'azote (l'extrait de levure) augmente la production de l' $\alpha$ -amylase de *R. oryzae* FSIS4. En effet, l'amidon et l'extrait de levure sont rapportés pour être inducteurs et efficaces pour la production des  $\alpha$ -amylases ([Pedersen et Nielsen, 2000](#)). Par conséquent, le maximum d'activités enzymatiques enregistré dans ces conditions est de 9448 UI, ce qui correspond aux intervalles optimaux de l'amidon (5,0 à 5,3 g/L) et de l'extrait de levure (2,1 à 2,4 g/L), respectivement. Des interactions significatives sont aussi enregistrées entre l'amidon et le  $\text{CaCl}_2$  (fig. 21b), l'extrait de levure et le  $\text{MgSO}_4$  (fig. 21c). Il apparaît que  $\text{MgSO}_4$  est lié à la réponse par son plus haut niveau (+ $\alpha$ ) alors que le  $\text{CaCl}_2$  enregistre une situation inverse (*i.e.* son plus bas niveau, - $\alpha$ ). En effet, le contour elliptique peut être obtenu en diminuant la concentration de  $\text{CaCl}_2$  à moins de 0,4 g/L et en augmentant celle  $\text{MgSO}_4$  à plus de 0,4 g/L. Par ailleurs, les interactions entre les variables indépendantes sont non significatives entre l'amidon et le  $\text{MgSO}_4$  (fig. 21d), l'extrait de levure et le  $\text{CaCl}_2$  (fig. 21e) et le  $\text{CaCl}_2$  et le  $\text{MgSO}_4$  (fig. 21f).





**Figure 21** : Courbes des surfaces de réponse pour la production d' $\alpha$ - amylase thermostable de *Rizopus oryzae* FSIS4.

(a) Effet de L'extrait de levure et de l'amidon ; (b) Effet  $\text{CaCl}_2$  et de l'amidon ; (c) Effet du  $\text{MgSO}_4$  et de l'extrait de levure ; (d) Effet du  $\text{MgSO}_4$  et l'amidon ; (e) Effet  $\text{CaCl}_2$  et de l'extrait de levure ; (f) Effet du  $\text{MgSO}_4$  et du  $\text{CaCl}_2$

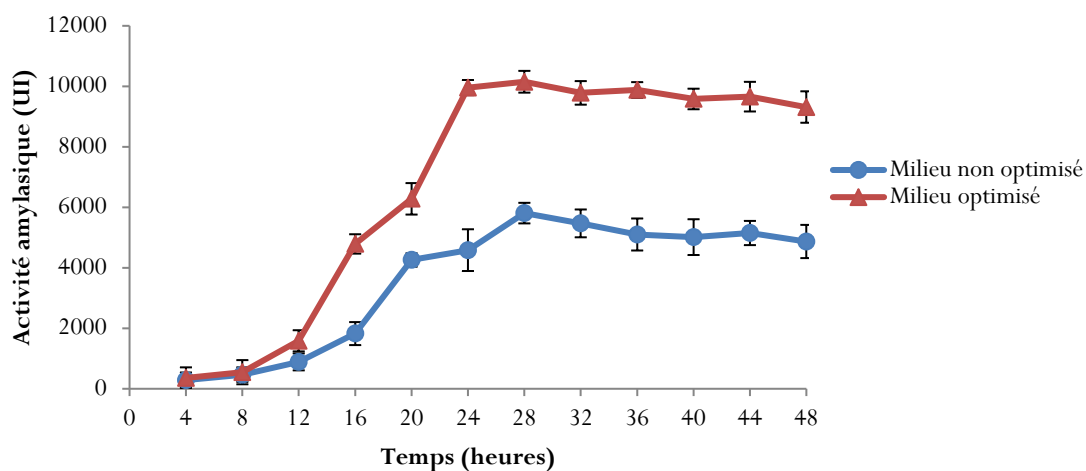
Les valeurs optimales des variables indépendantes à partir de l'analyse du plan CDD sont donc :

- L'amidon : 5,42 g/L ;
- L'extrait de levure : 2,30 g/L ;
- Le CaCl<sub>2</sub> : 0,47 g/L ;
- Le MgSO<sub>4</sub> : 0,39 g/L.

#### 4-3- Validation du modèle quadratique

La validation du modèle est effectuée dans le but de comparer la valeur prédite au résultat obtenu de l'expérience réalisée dans les conditions optimales. Selon le modèle, la valeur prédite de la production de l' $\alpha$ -amylase de *R. oryzae* FSIS4 est de 9847 UI. Pour l'expérience menée sur un milieu non optimisé (milieu de base) et un autre optimisé. Cette expérience aboutie à des activités amylasiques maximales de l'ordre de 5808 et 10151 UI, respectivement, et ceci au bout de 28 h de fermentation (fig. 22), soit une augmentation de 1,8 fois de l'activité amylasique sur milieu optimisé.

Les résultats obtenus montrent clairement d'un coté, l'importance de l'utilisation des dattes déclassées comme milieu de fermentation, contribuant ainsi à la réduction du coût de production de l'enzyme et d'un autre coté la fiabilité, la rapidité et l'efficacité des plans d'expériences utilisés pour l'optimisation de la production de l'enzyme. En effet, la production de l' $\alpha$ -amylase thermostable de *R. oryzae* FSIS4 a presque doublé après optimisation du milieu de base. Les résultats rapportés dans cette étude sont donc d'un grand intérêt, en comparaison avec ceux obtenus dans les travaux de production d' $\alpha$ -amylases en fermentation submergée en utilisant d'autres sous-produits, où les activités amylasiques maximales enregistrés sont de 616 UI pour *Aspergillus oryzae* Ahlburg (Cohen) 1042.72 (Bennamoun *et al.*, 2004) 490 UI pour *Aspergillus niger* ATCC 16404 (Djekrif-Dakhmouche *et al.*, 2006), 2227 UI pour *Fusarium sp* (Nwagu et Okolo, 2011) et 6610 UI pour *M. foliorum* (Roohi, 2014).



**Figure 22** : Cinétique de la production de l' $\alpha$ -amylase de *Rhizopus oryzae* FSIS4 sur milieu optimisé et non optimisé.

## 5- Etude de la cinétique de croissance et de la production de l' $\alpha$ -amylase de *Rhizopus oryzae* FSIS4 cultivé sur milieu optimisé à base de dattes déclassées en fermenteur

La cinétique de croissance de *R. oryzae* FSIS4, sur le milieu optimisé à base de dattes déclassées, est similaire aux cinétiques classiques de la croissance des microorganismes avec une phase de latence, une phase exponentielle, une phase stationnaire et enfin la phase de déclin (fig. 23). D'après la figure, la phase de latence : elle suit immédiatement l'ensemencement de la moisissure, il s'agit d'une période d'adaptation, dans le cas de la présente étude, elle est de 6 heures pour *R. oryzae* FSIS4. Au cours de cette période la moisissure synthétise les enzymes qui lui sont nécessaires pour métaboliser les substrats présents dans le milieu. Au cours de cette phase, il n'y a pas de production cellulaire, la vitesse de croissance est pratiquement nulle. La durée de cette phase varie principalement avec la taille de l'inoculum ayant servi à l'ensemencement ainsi que l'âge des cellules (Guiraud, 2012).

La multiplication cellulaire augmente exponentiellement en fonction du temps jusqu'à 24 heures ou elle atteint son maximum, puis devient linéaire jusqu'à 56 heures. Dans cette phase, la concentration cellulaire est à son maximum et demeure pratiquement constante. En effet, les cellules conservent une activité métabolique mais leur structure biochimique subie des modifications (Cuvellier *et al.*, 2009).

Après 56 heures, c'est le début de la phase du déclin. Durant cette période, la concentration de cellules viables diminue du fait de la mortalité qui augmente progressivement à cause des conditions défavorables du milieu (accumulation de produits d'excrétion du métabolisme) et de la lyse mycélienne suite à l'action des enzymes cellulaires (Guiraud, 2012)

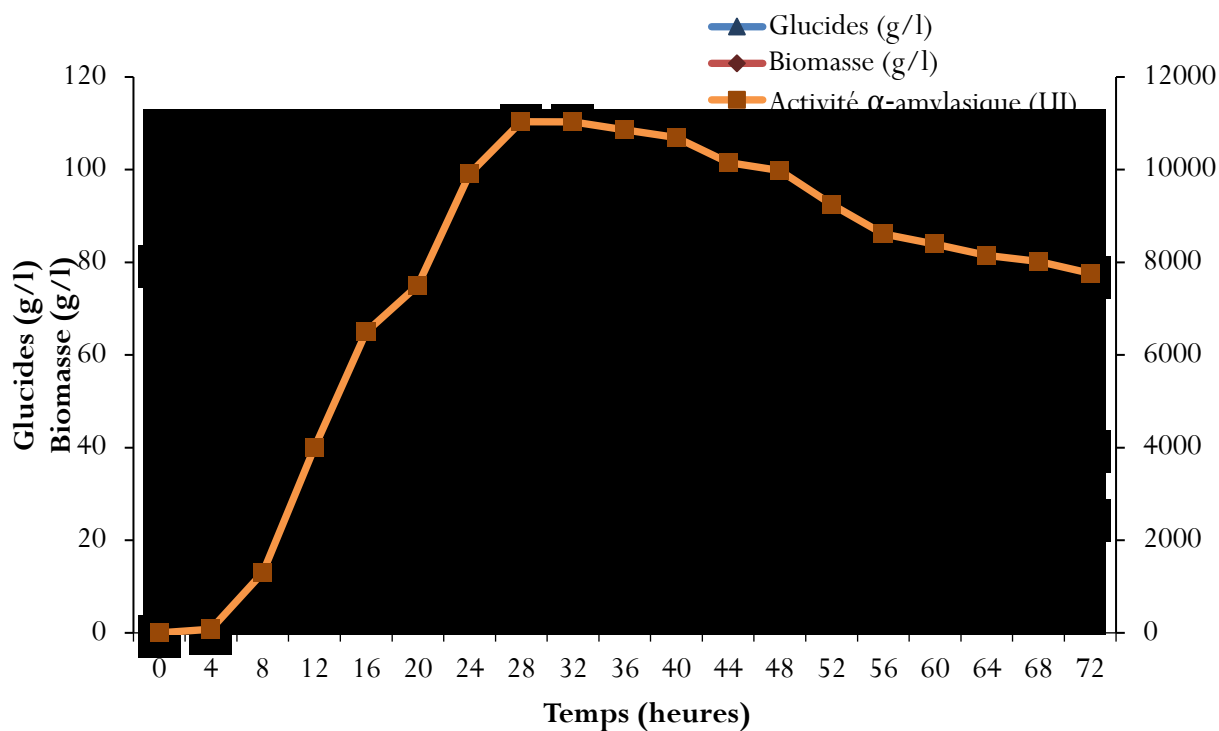
Pour ce qui est de la production de l' $\alpha$ -amylase elle débute pendant la phase exponentielle de la croissance de *R. oryzae* FSIS4 pour arriver à la valeur maximale (11034 UI) au bout de 28 heures de fermentation qui correspond au début de la phase stationnaire.

Une augmentation du pH et des protéines est concomitante à cette production enzymatique. La période, au cours de laquelle une enzyme est obtenue à partir de la culture, est un facteur important dans la production d'enzymes. La plupart des rapports de la littérature confirment que la sécrétion maximale d'enzymes se produit généralement à la fin de la phase exponentielle et au début de la phase stationnaire. Selon Gupta *et al.* (2003), la sécrétion d'enzyme se produit au maximum à la fin de la phase de la croissance en raison de la réduction de la répression catabolique car les nutriments sont épuisés dans le milieu de croissance.

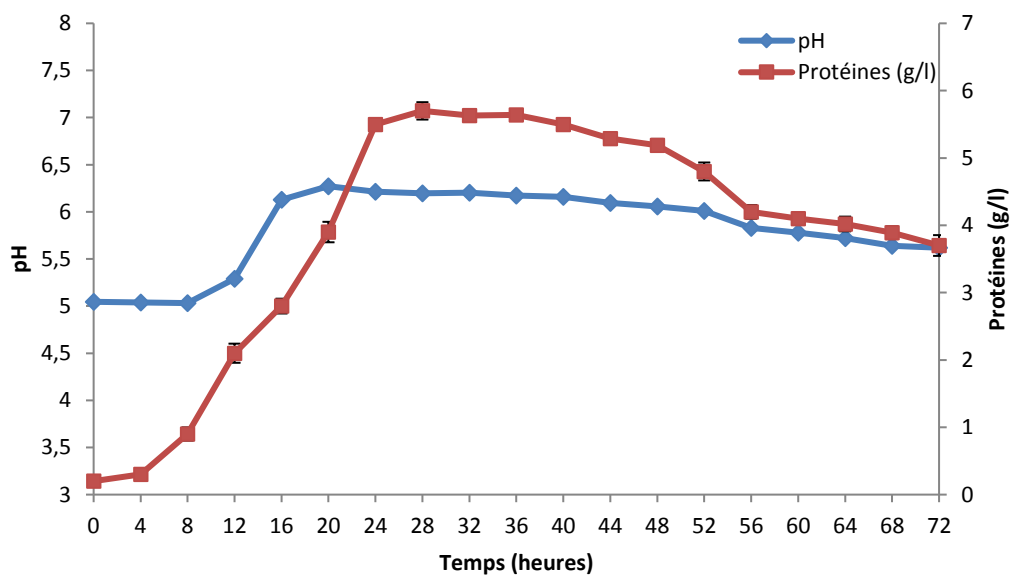
Chez les moisissures *Lichtheimia ramosa* (mésophile) et *Thermoascus aurantiacus* (thermophile), La production d'amylase la plus élevée est observée après 96 heures de culture, atteignant 41720 UI et 14450 UI respectivement (De Oliveira *et al.*, 2016). Alors que pour l' $\alpha$ -amylase alcaline et thermostable de *Bacillus circulans* PN5, Joshi (2011) enregistre une phase de latence de 8 heures. Un maximum de biomasse au bout de 32 heures de fermentation alors que le maximum d'activité amylasique est enregistré en phase stationnaire au bout de 40 heures de fermentation. Pour l' $\alpha$ -amylase de *Bacillus licheniformis* MTCC1483 l'activité amylasique la plus importante (21600 UI) est enregistrée au bout de 24 heures d'incubation (Dahiya et Rathi, 2015).

La consommation des glucides par *R.oryzae* FSIS4 commence dès la phase de latence et pendant toute la période de croissance (fig. 23).

En ce qui concerne le pH, il augmente avec l'accroissement du taux des protéines qui libèrent progressivement des acides aminés puis les ions ammonium dans le milieu (Botton *et al.*, 1990) jusqu'à sa valeur maximale de 6,27 au bout de 20 heures de fermentation, puis il reste presque stable. Une légère diminution du pH est observée à partir de 56 heures probablement suite à la libération d'acides organiques dans le milieu (fig. 24). En effet, Saito *et al.* (2003) enregistrent une chute de pH de 5 à 3,8 au cours des fermentations réalisées par *Rhizopus oryzae* ATCC 34612 suite à la synthèse de l'acide fumarique et l'acide lactique qui s'accumulent dans le milieu.



**Figure 23** : Etude cinétique de la croissance, de la consommation des glucides et de l'activité  $\alpha$ -amylasique de *Rhizopus oryzae* FSIS4.



**Figure 24** : Evolution cinétique des protéines et du pH au cours de la croissance de *Rhizopus oryzae* FSIS4.

## 6- Purification de l' $\alpha$ -amylase par le système de répartition en trois phases

### 6-1- Optimisation des paramètres influençant le système TPP

#### 6-1-1- Effet de la concentration en sulfate d'ammonium

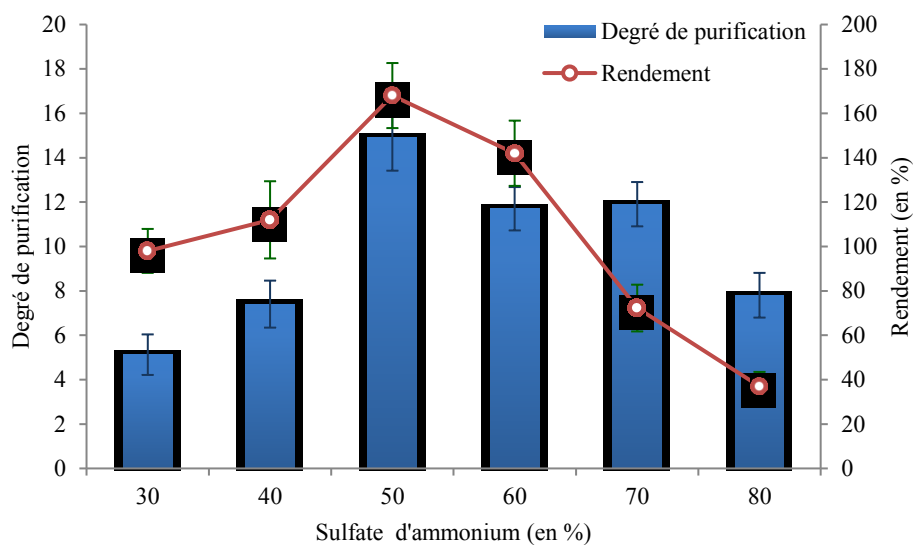
La précipitation saline au  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  ou *Salting-out* est très importante dans le cas de la purification des protéines d'une manière générale et dans le cas des enzymes en particulier (Ward, 2009). L'efficacité de saturation des protéines au sulfate d'ammonium dépend d'abord de la concentration en sel et en second lieu, de la charge nette des protéines (Burgess et Deutscher, 2009). Dans notre protocole et afin de déterminer la précipitation adéquate en  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , une gamme de concentration (30, 40, 50, 60, 70 et 80 %) est testée en maintenant les paramètres expérimentaux comme suit : le rapport extrait brut : *t*-butanol (v/v) de 1 : 1 ; temps de recouvrement 1h et pH 5,0 (Gagaoua *et al.*, 2014, 2015). L'influence des différents taux de précipitation saline sur le rendement et le degré de purification est illustrée dans la figure 25.

Dans la figure 25, nous remarquons une augmentation du rendement et du degré de purification jusqu'à la saturation de 50 %. Cependant au-delà de 50 % de sulfate d'ammonium, nous constatons une diminution de ces deux paramètres, probablement en raison de la réduction de la sélectivité de l'extraction (Gagaoua *et al.*, 2015). L'Anova réalisée montre des effets de concentration du  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  hautement significatif sur le rendement ( $F = 54,29$  ;  $p < 0,001$ ) et le degré de purification ( $F = 44,2$  ;  $p < 0,001$ ). D'après le test post-hoc de Student-Newman-Keuls, le taux de 50 % correspond à la concentration optimale de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  nécessaire pour précipiter l' $\alpha$  amylase de *R. oryzae* FSIS4 en phase intermédiaire. Ce résultat corrobore avec celui obtenu par plusieurs auteurs dans la purification par TPP de la  $\alpha$ -galactosidase d'*Aspergillus niger* (Gu *et al.*, 2012), de la laccase de *Pleurotus ostreatus* (Kumar *et al.*, 2011) de protéases alcalines animale et végétale (Ketnawa *et al.*, 2014 et Gagaoua *et al.*, 2015).

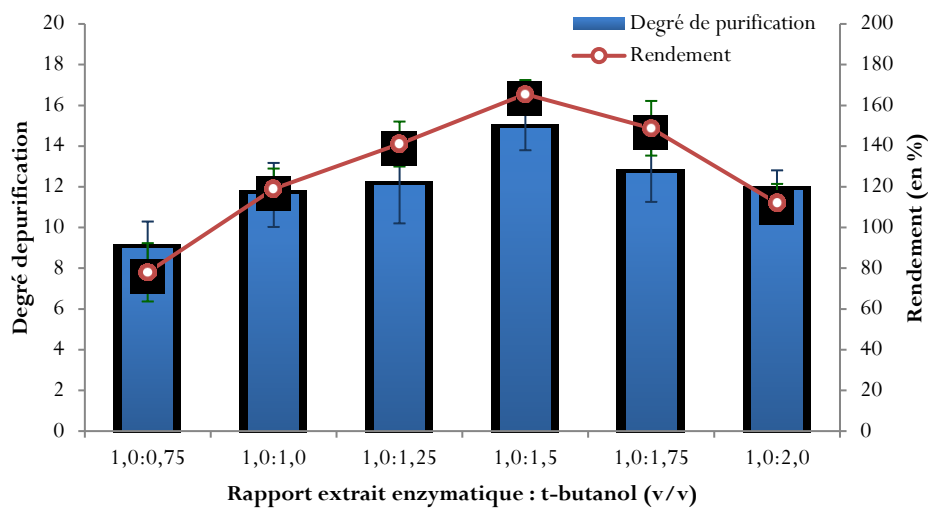
#### 6-1-2- Effet du Butanol tertiaire (*t*-butanol)

Après optimisation de la saturation en  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , le rapport du volume extrait brut : *t*-butanol est également un facteur très important pour la performance du système TPP (Rachana et Lyju Jose, 2014 et Gagaoua *et al.*, 2015).

La quantité relative du *t*-butanol est d'une importance critique et doit être optimisée. Le *t*-butanol est un solvant organique approprié pour purifier l' $\alpha$ -amylase *via* des systèmes TPP, il ne pénètre pas facilement à l'intérieur de la protéine souhaitée, de sorte que moins de dénaturation peut se produire (Özer *et al.*, 2010). La quantité de sulfate d'ammonium et le pH dans ce système TPP sont fixés à 50 % et 5 respectivement. Les rapports extrait brut : *t*-butanol (v/v) testés sont de 1:0,5 ; 1:0,75 ; 1:1 ; 1:1,25 ; 1:1,5 ; 1:1,75 et 1:2 (Gagaoua *et al.*, 2015). Les résultats montre (fig. 26) que les deux paramètres testés (taux de purification



**Figure 25** : Effet de la concentration en  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  sur le rendement et le degré de purification de l' $\alpha$ -amylase de *Rhizopus oryzae* FSIS4.



**Figure 26** : Effet du rapport extrait enzymatique : *t*-butanol sur le rendement et le degré de purification de l' $\alpha$ -amylase de *Rhizopus oryzae* FSIS4.

et rendement) augmentent jusqu'à obtenir le meilleur effet (facteur de purification de 14,84 fois, 165,40 % de rendement de l' $\alpha$ -amylase) avec le rapport de l'extrait brut au *t*-butanol (v/v) de 1:1,5. Au delà de ce rapport, le rendement et le degré de purification diminuent progressivement. Ceci peut s'expliquer par le fait qu'il n'y a pas de synergie adéquate entre le sulfate d'ammonium et une quantité faible de *t*-butanol. Au contraire, une concentration plus élevée de *t*-butanol dans le système TPP est susceptible de provoquer une dénaturation des protéines, diminuant ainsi l'efficacité de l'extraction enzymatique souhaitée (Rachana et Lyju Jose, 2014).

L'Anova réalisée montre des effets du rapport extrait brut : *t*-butanol hautement significatif sur le rendement ( $F = 31,23$  ;  $p < 0,001$ ) et le degré de purification ( $F = 7,30$  ;  $p < 0,001$ ). D'après le test post-hoc de Student-Newman-Keuls, le rapport 1:1,5 correspond au rapport (extrait brut : *t*-butanol) optimal pour la purification de l' $\alpha$  amylase de *R. oryzae* FSIS4. Le même rapport est préconisé pour la purification de la  $\alpha$ -galactosidase d'*Aspergillus niger* (Gu *et al.*, 2012) et l' $\alpha$ -galactosidase de *Solanum muricatum* (pepino ou poire-melon) (Sen *et al.*, 2011). Cependant, d'autres rapports sont utilisés et varient en fonction de la nature et l'origine de l'enzyme. En effet, Bayraktar et Önal (2013), Duman et Kaya (2013b) et Özer *et al.* (2010) préconisent l'utilisation du rapport 1,0:1,0 pour la purification de l' $\alpha$ -galactosidase, la catalase et l'invertase, respectivement. Gagaoua *et al.* (2014) rapportent que le rapport de 1,0:0,75 permet de récupérer l'activité maximale de la ficaine à partir du latex de figuier.

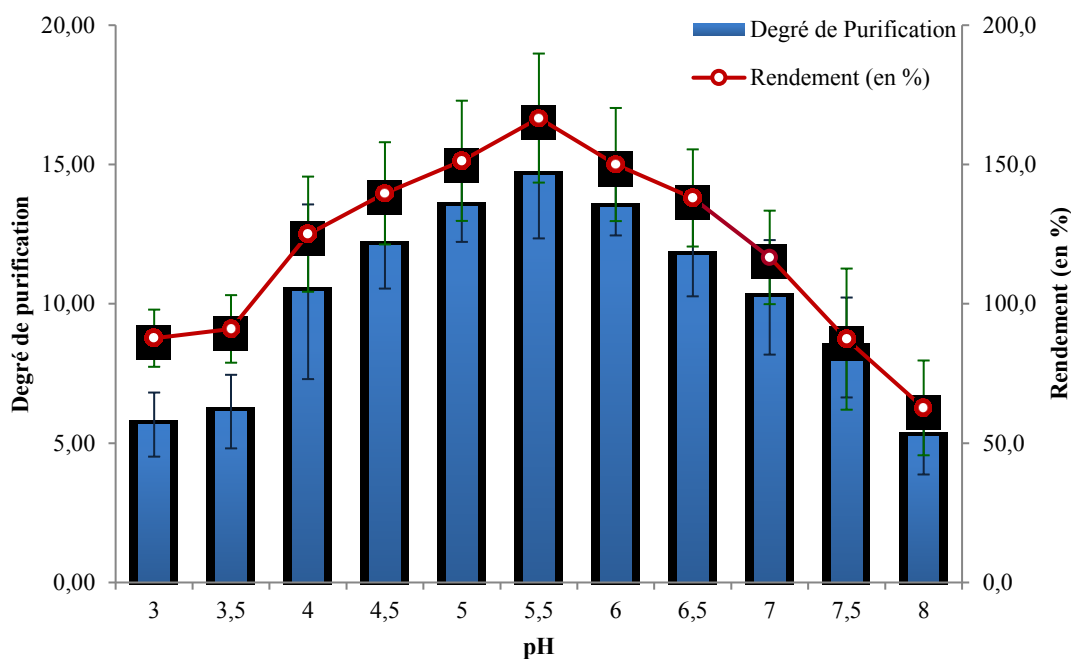
### 6-1-3- Effet du pH

Le pH du milieu réactionnel est l'un des paramètres les plus importants qui influence le rendement et l'efficacité du système TPP. La précipitation saline (*Salting out*) dépend de la charge nette des protéines présentes dans le milieu qui sont fortement dépendantes du pH. Par conséquent, différents niveaux de pH des systèmes TPP peuvent conduire à des comportements différents de l'enzyme (Özer *et al.*, 2010 et Dennison, 2011).

L'effet du pH sur le fractionnement de l' $\alpha$ -amylase est étudié. Pour cela, l'extrait brut est saturé à 50 % en  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (taux optimal) et le pH est ajusté sur une gamme allant de 3 à 8. Le *t*-butanol est ajouté par la suite en respectant le rapport optimal 1,0:1,5. Après 1 heure de réaction, l'enzyme est fractionnée sélectivement dans la phase intermédiaire. La figure 27 montre une augmentation du rendement et du degré de purification de l'enzyme avec l'augmentation du pH jusqu'à 5,5, qui enregistre le facteur de purification le plus élevé (14,65) et le rendement optimale de 167,4 %. Au delà de ce pH, les deux paramètres tendent à diminués. Les systèmes TPP changent habituellement rapidement autour du pI de l'enzyme requise. Nous pensons que les composants électrostatiques des réactions lorsque les anions sulfate se lient aux cations des protéines sont impliqués (Çalci *et al.*, 2009). L'Anova réalisée montre des effets de pH hautement significatif sur le rendement ( $F = 9,24$  ;  $p < 0,001$ ) et le degré de purification ( $F = 10,71$  ;  $p < 0,001$ ). D'après le test post-hoc de Student-



Newman-Keuls, le pH 5,5 correspond au pH optimal pour la purification de l' $\alpha$  amylase de *R. oryzae* FSIS4. Les travaux menés sur l'optimisation de la purification par le système TPP enregistrent un pH optimal de 7 pour la ficaine et la zingibaine (Gagaoua *et al.*, 2014, 2015) et de 6,0 pour la peroxydase de *Citrus sinenses* (Vetal et Rathod, 2015).

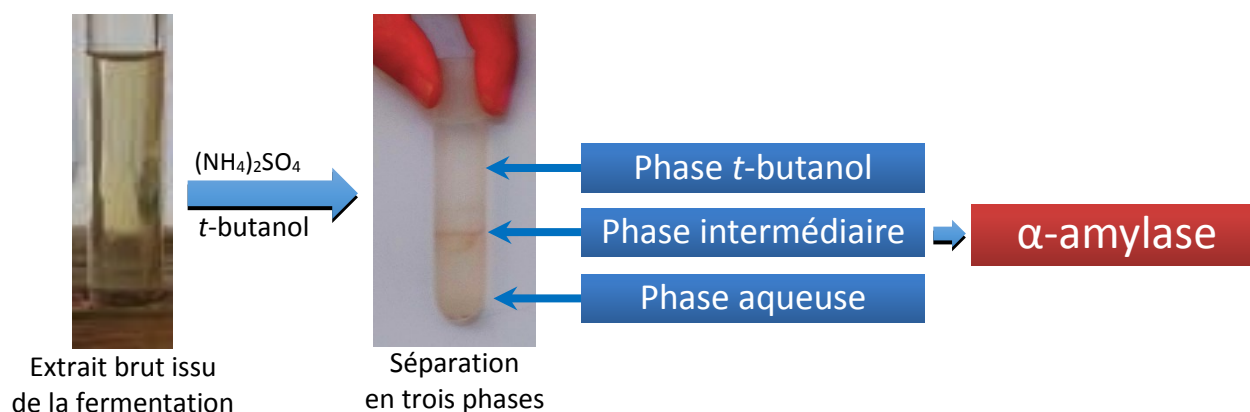


**Figure 27** : Effet du pH sur le rendement et le degré de purification de l' $\alpha$ -amylase de *Rhizopus oryzae* FSIS4.

## 6-2- Fractionnement et purification par le système TPP

Le protocole de purification mis en place (après optimisation) lors de cette étude consiste en une précipitation de l'extrait enzymatique par le sulfate d'ammonium à 50 % à pH 5,5 puis un fractionnement par l'addition du *t*-butanol en utilisant un rapport extrait enzymatique : *t*-butanol (v/v) de (1 :1,5) et enfin une stabilisation par une dialyse.

Le *t*-butanol est normalement complètement miscible avec l'eau, mais lors de l'addition de sulfate d'ammonium, l'ion sulfate hydraté favorise la captivité de l'eau, de sorte qu'elle soit moins disponible au *t*-butanol et aux protéines. Avec moins d'eau disponible, la protéine va se trouver en équilibre avec les nouvelles proportions disponibles de *t*-butanol et d'eau, l'addition supplémentaire de sulfate d'ammonium captive éventuellement l'eau de façon suffisante pour amener la protéine à sa limite de solubilité, à quel point elle précipite et la solution se sépare ainsi en deux phases, une phase aqueuse inférieure et une phase supérieure (*t*-butanol). Toutefois, à ce stade, la protéine sera équilibrée avec une prépondérance de *t*-butanol, qui se lie probablement à la surface des taches hydrophobes et diminue sa densité de telle sorte que la protéine flotte et se sépare en une troisième phase, intermédiaire entre la phase aqueuse inférieure et le *t*-butanol supérieure (fig. 28) (Dennison, 2011).



**Figure 28** : Séparation en trois phases de l'extrait enzymatique de *Rhizopus oryzae* FSIS4 par le système TPP.

Cette technique est très adéquate pour le fractionnement des protéines et montre son efficacité dans l'élimination de plusieurs contaminants protéiques. (Bayraktar et Önal, 2013, Duman et Kaya, 2013<sub>a,b</sub> et Gagaoua *et al.*, 2014, 2015). Dans notre cas, Le dosage de l'activité amylasique dans la phase intermédiaire et aqueuse révèle que notre enzyme se trouve dans la phase intermédiaire.

L'activité amylasique, le taux de protéine, l'activité spécifique, le degré de purification ainsi que le rendement en  $\alpha$ -amylase sont récapitulés dans le tableau 21 suivant :

**Tableau 21** : tableau de purification de l' $\alpha$ -amylase thermostable de *Rhizopus oryzae* FSIS4 par le système TPP.

Etape de Purification	Activité totale (UI)	Protéines totales (mg)	activité spécifique (U/mg)	Degré de Purification	Rendement (%)
Extrait brut	5,84	2,03	2,87	1	100
Phase intermédiaire	9,86	0,23	42,87	14,94	168,83
Phase aqueuse	-	0,16	-	-	-

Plusieurs études sont effectuées sur la purification de l' $\alpha$ -amylase microbienne. Les protocoles utilisés incluent au moins deux étapes et l'une d'entre elles est certainement chromatographique (voir tableau 5 en bibliographie). Ces dernières sont coûteuses et demandent beaucoup de temps. Par contre le système de purification en trois phases (TPP) mis en place implique une seule étape réaffirmant ainsi que cette technique est simple, rapide, efficace et rentable (des rendements supérieurs à 100 %) et peut être aisément appliquée pour la purification des enzymes amylolytiques.

Cette technique est utilisée par plusieurs auteurs pour la purification de différentes enzymes le tableau 22 suivant récapitule quelques enzymes purifiées par le système TPP avec les rendements et les degrés de purification obtenus à chaque fois.

**Tableau 22** : Exemples d'enzymes purifiées par le système TPP.

Enzyme	Origine	Rendement	Degré de purification	Références
Catalase	Les tubercules de pommes de terre ( <i>Solanum tuberosum</i> ).	262 %	14,1	Duman et Kaya (2013 <sub>b</sub> )
$\beta$ -galactosidase	Pois chiches ( <i>Cicer arietinum</i> )	133 %	10,1	Duman et Kaya (2013 <sub>a</sub> )
Invertase	Les tubercules de pommes de terre ( <i>Solanum tuberosum</i> )	156 %	12,8	Duman et Kaya (2014)
Protéase alcaline	viscères de poisson	220 %	6	Ketnawa <i>et al.</i> (2014)
Ficaïne	Latex de ( <i>Ficus carica</i> )	167 %	6,04	Gagaoua <i>et al.</i> (2014)
Zingibaine	<i>Zingiber officinale</i>	215 %	14,9	Gagaoua <i>et al.</i> (2015)
$\beta$ -amylase	<i>Abrus precatorius</i>	156,2 %	10,17	Sagu <i>et al.</i> (2015)

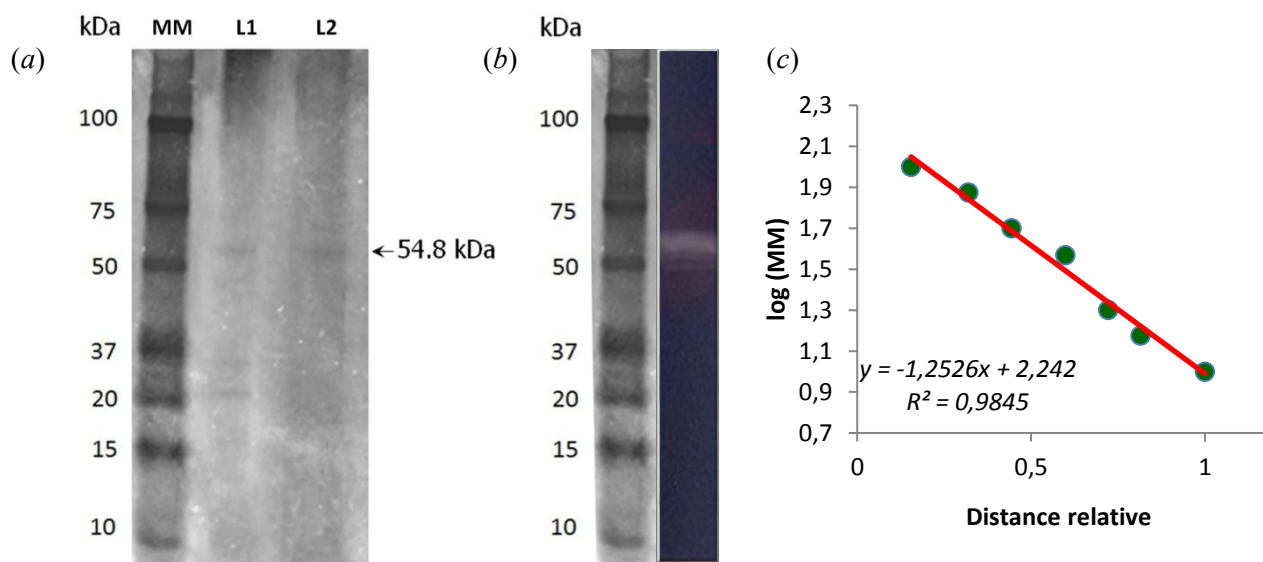
### 6-3- Le profil électrophorétique (SDS-PAGE)

L'électrophorèse en conditions dénaturantes réalisée sur l'extrait brut dialysé et la phase intermédiaire nous permet de vérifier la pureté des protéines à chaque étape du protocole et de calculer la masse moléculaire de l'enzyme partiellement purifiée (fig. 29). Cette dernière montre clairement que l' $\alpha$ -amylase purifiée par TPP se trouve dans la phase intermédiaire. L'enzyme correspond à une bande protéique homogène d'une masse moléculaire de 54,8 kDa. Le résultat est confirmé par un zymogramme qui présente une zone transparente correspondant à la même bande. Elle montre l'hydrolyse de l'amidon par l'enzyme purifiée (fig. 29).

La masse moléculaire des  $\alpha$ -amylases varie d'une origine à une autre et d'une espèce à une autre. En effet, la masse moléculaire des  $\alpha$ -amylases s'échelonne entre 40 à 70 kDa (Gupta *et al.*, 2003). Cette dernière peut être augmentée en raison de la glycosylation comme dans le cas de l'enzyme de *Thermoactinomyces vulgaris* qui atteint 140 kDa (Abou Dohara *et al.*, 2011). Alors que, la protéolyse diminue la masse moléculaire de l'enzyme comme dans le cas de l' $\alpha$ -amylase de *T. vulganis* 94-2A (Hofemeister *et al.*, 1994).

Notre résultat est comparable à plusieurs autres études ayant purifié l' $\alpha$ -amylase fongique, En effet, Bhanja Dey et Banerjee (2015) purifient une  $\alpha$ -amylase d'*Aspergillus oryzae* IFO-30103 ayant une masse moléculaire de 51,3 kDa, alors que Sahnoun *et al.* (2013) rapportent une masse moléculaire de 45 kDa pour l' $\alpha$ -amylase d'*Aspergillus oryzae* CBS

819.72. Valaparla (2010) purifie l' $\alpha$ -amylase thermostable de *Acremonium sporosulcatum* et note une masse moléculaire de 58 KDa, valeur proche de celle de l' $\alpha$ -amylase produite par une souche mutante d'*Aspergillus* (57KDa) (Evstatieva *et al.*, 2010). Une masse moléculaire plus important de 75 KDa est enregistré chez l' $\alpha$ -amylase produite par *Paecilomyces variotii* (Michelin *et al.*, 2010) et *Rhizopus microsporus* (Shen *et al.*, 2012).



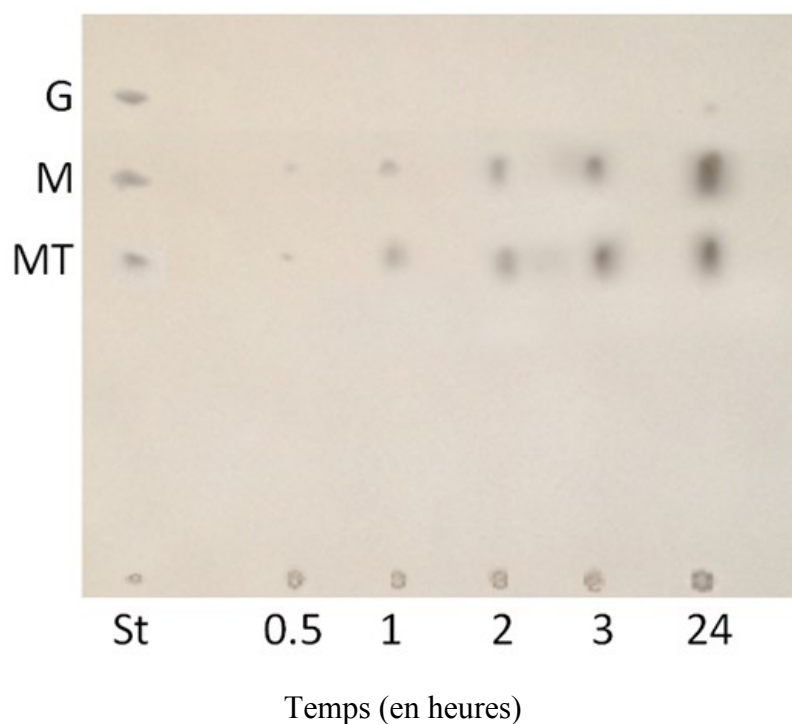
**Figure 29** : Profil électrophorétique de l' $\alpha$ -amylase de *Rhizopus oryzae* FSIS4 purifiée par le système TPP.

(a) SDS-PAGE (10 % de gel de séparation) ; MM : marqueur de taille; L1 : extrait brut dialysé; L2 : enzyme purifiée (phase intermédiaire); (b) Le zymogramme, la zone transparente montre l'hydrolyse de l'amidon par l'enzyme récupérée ; (c) Courbe d'étalonnage pour la détermination de la masse moléculaire de l' $\alpha$ -amylase tel que généré par le logiciel UN-SCAN-IT Gel 6.1.

## 7- Chromatographie sur couche mince (CCM)

Afin de déterminer les produits de dégradation du substrat de notre enzyme qui est l'amidon et définir si c'est une exoenzyme ou endoenzyme. Une chromatographie sur couche mince (CCM) est réalisée avec l'enzyme purifiée (fig. 30).

Après une période de réaction de 0,5 à 24 h, les produits de dégradation de l'amidon par l'enzyme purifiée sont principalement du maltose et des maltotrioses. Ces résultats indiquent le caractère endo-amylolytique de l'enzyme, qui est classée comme une  $\alpha$ -amylase (Michelin *et al.*, 2010 et Bhanja Dey et Banerjee, 2015).



**Figure 30** : Chromatographie sur couche mince des produits de dégradation de l'amidon par l' $\alpha$ -amylase de *Rhizopus oryzae* FSIS4 purifiée  
Temps d'hydrolyse sont 0,5 ; 1 ; 2 ; 3 et 24 heures.  
Standard (St) est un mélange de 1 mg/mL de glucose (G), maltose (M) et maltotriose (MT).

## 8- Caractérisation de l' $\alpha$ -amylase de *Rhizopus oryzae* FSIS4 partiellement purifiée

La détermination des caractéristiques physico-chimiques des enzymes impliquées dans les processus biotechnologiques est importante, compte tenu de l'optimisation de leur production, avec des possibilités d'applications futures à l'échelle industrielle.

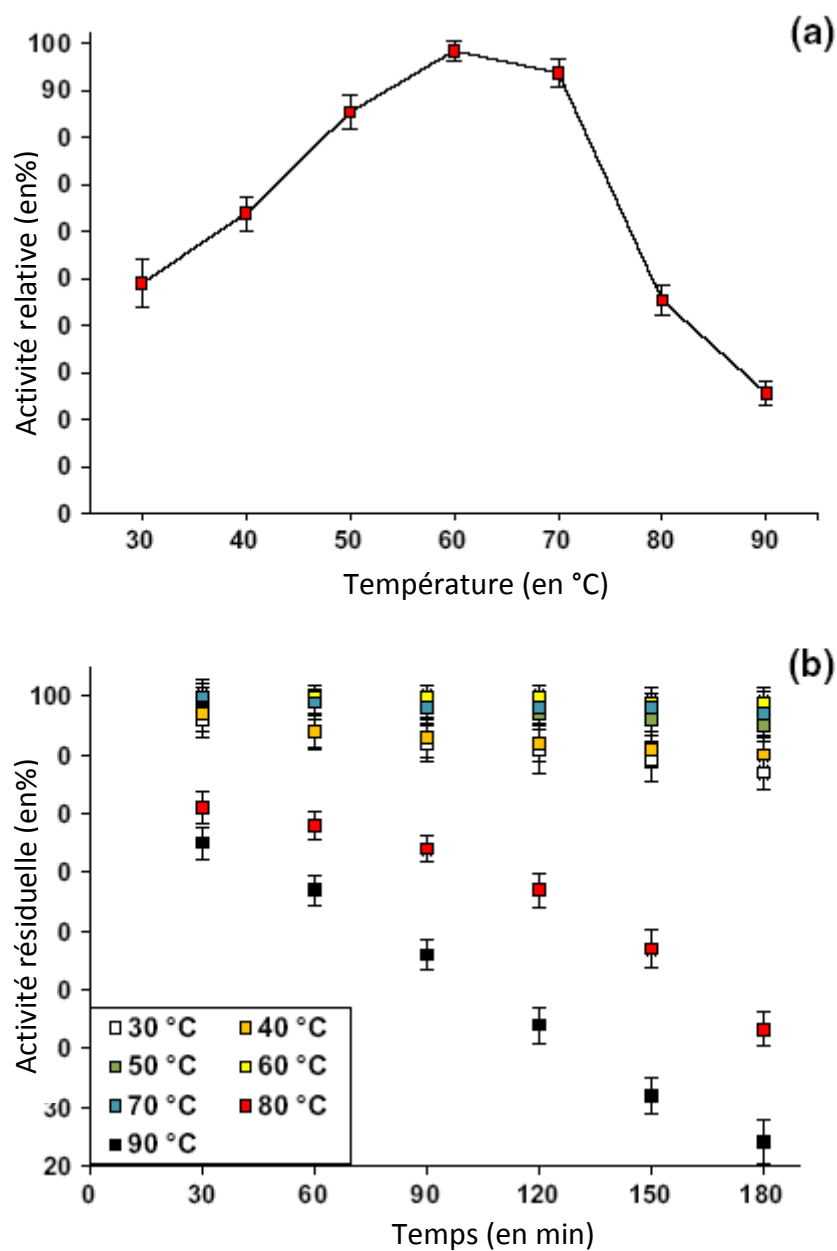
### 8-1- Etude de l'activité et la stabilité de l'enzyme en fonction de la température.

L'effet de la température sur l'activité relative de l' $\alpha$ -amylase de *R. oryzae* FSIS4 est représenté dans la figure 31a. L'activité amylasique augmente jusqu'à sa valeur maximale qui est de 60 °C puis diminue pour atteindre son minimum à 90 °C. L'Anova effectuée révèle un effet température hautement significatif sur la production de l'enzyme ( $F = 387,3$  ;  $p < 0,001$ ). D'après le test post-hoc de Student-Newman-Keuls, l'activité amylasique la plus importante est enregistrée à 60 °C qui correspond à la température optimale de l'enzyme

En effet, la plupart des amylases fongiques sont produites par des organismes mésophiles qui croissent dans une gamme de température variant de 25 °C à 37 °C (Gupta *et al.*, 2003). La température optimale des  $\alpha$ -amylases produites par des souches fongiques thermophyles est supérieure à celles produites par les mésophiles, qui ne dépasse pas les 50 °C (Freitas *et al.*, 2014 et Adejuwon *et al.*, 2015), plutôt elle se rapproche de celles des souches bactériennes thermophyles dont la température optimale se situe entre 60 °C et 70 °C (Suganthi *et al.*, 2015).

En effet, Michelin *et al.* (2010) dans la caractérisation de l' $\alpha$ -amylase thermostable produite par *Paecilomyces variotii* enregistrent une température optimale de 60 °C, le même résultat est noté avec l'enzyme produite par *Penicillium chrysogenum* (Doss et Anand, 2013) et *Aspergillus terreus* NCFT 4269.10 (Sethi *et al.*, 2016). Alors que les  $\alpha$ -amylases thermostables de *Thermomyces lanuginosus* ATCC 34626 et *Rhizopus microsporus* présentent un optimum à 70 °C (Nguyen *et al.*, 2002 et Shen *et al.*, 2012) et celle de *Bacillus subtilis* isolée de sources thermales a un optimum à 45 °C (Al-Johani *et al.*, 2017) alors que *Bacillus* sp. BCC 01-50 sont optimum est à 65 °C (Simair *et al.*, 2017). La même température optimale est enregistrée chez l'enzyme produite par la souche recombinante de *Geobacillus stearothermophilus* SR74 (Gandhi *et al.*, 2015).

L'étude de la stabilité à la température de l' $\alpha$ -amylase produite par *R. oryzae* FSIS4 est testée après un traitement thermique de 3 heures de l'enzyme purifiée à sept températures différentes : 30, 40,50, 60, 70, 80 et 90 °C (fig. 31b). Plus de 90 % de l'activité de l'enzyme est maintenu après 180 min de chauffage à des températures allant de 30 à 70 °C.



**Figure 31** : Effet de la température sur (a) l'activité (b) la stabilité de l' $\alpha$ -amylase de *Rhizopus oryzae* FSIS4

La demi-vie de l'enzyme à 80 °C est de 165 min, alors qu'à 90 °C elle est de 105 min. La thermostabilité de l' $\alpha$ -amylase de *R. oryzae* FSIS4 est importante et dépasse celles de certaines  $\alpha$ -amylases produites par des moisissures thermophyles et des souches recombinantes. En effet, *Aspergillus flavus* LINK est stable pendant 1 h à 50 °C (Khoo *et al.*, 1994), alors que Nwagu et Okolo (2011) rapportent que *Fusarium* sp., conserve plus de 78 % de son activité à 70 °C après 30 min d'incubation. Alors que la souche recombinante de *Geobacillus stearothermophilus* SR74 présente un temps de demi vie de 88 min à 60 °C (Gandhi *et al.*, 2015) et celle de *Bacillus amyloliquefaciens* garde plus de 80 % de son activité à 100 °C pendant 4 heures (Wang *et al.*, 2016)

Cette thermostabilité s'explique probablement par l'influence de la nature de l'habitat d'où notre souche est isolée (zone aride), qui oblige le microorganisme à s'adapter aux conditions extrêmes et à l'enzyme qui doit acquérir sa stabilité structurale, soit par une glycosylation excessive (Vieille et Zeikus, 2001), soit par la présence de certaines liaisons dans leurs structures tertiaires (liaisons hydrogènes, liaisons hydrophobes, interactions ioniques et ponts disulfures) et les cofacteurs (Roovers *et al.*, 2004 et Suganthi *et al.*, 2015). Les éléments déterminés par des séquences particulières en acides aminés situées à des endroits stratégiques, participent certainement au maintien de la structure spatiale de l'enzyme malgré les traitements thermiques subis.

L' $\alpha$ -amylase produite par *R. oryzae* FSIS4 isolée de blé cultivé dans la zone la plus chaude du Désert Algérien (In Salah) est parmi les  $\alpha$ -amylases fongiques les plus thermoactives et les plus thermostables décrites à ce jour, puisqu'elle garde 70 % de son activité initiale après deux heures de traitement à 80 °C et une heure à 90 °C.

Ces propriétés particulières prédisposent l'enzyme à des applications industrielles, et renforcent le potentiel de cette enzyme pour les applications dans des procédés impliquant des températures élevées.

### 8-2- Etude de l'activité et la stabilité de l'enzyme fonction du pH

L'effet du pH sur l'activité amylasique de *R. oryzae* FSIS4 est représenté dans la figure 32a. L'activité augmente jusqu'à sa valeur maximale à pH 5, à partir du pH 6 l'activité amylasique diminue pour atteindre son minimum à pH 8.

L'Anova effectuée révèle un effet pH hautement significatif sur la production de l'enzyme ( $F = 25,4$  ;  $p < 0,001$ ). D'après le test post-hoc de Student-Newman-Keuls, l'activité amylasique la plus importante est enregistrée à pH 5, qui correspond au pH optimal de l'enzyme.

En effet, de nombreux systèmes enzymatiques peuvent fonctionner à un taux pratiquement optimal sur une gamme de pH étendue pouvant atteindre 3 unités et plus (Pelmont, 2000). L' $\alpha$ -amylase fongique est stable dans une gamme de pH de 5 à 8 avec



un optimum se situant entre 4 et 5 (Larpent-Gourgaud et Sanglier, 1992 et Xian *et al.*, 2015). L'activité des enzymes n'est pas toujours facile à interpréter car le pH intervient à 3 niveaux : il modifie l'intégrité physique de la protéine; influence l'affinité de l'enzyme pour son substrat (par le changement de  $k_m$ ) et varie la vitesse de la réaction enzymatique (par le changement de  $V_m$ ) (Pelmont, 2000).

Nos résultats sont comparables à ceux obtenus par Bhanja Dey et Banerjee (2015) ; Sethi *et al.* (2016) et Wang *et al.* (2016) dont le pH optimum de l' $\alpha$ -amylase d'*Aspergillus oryzae* IFO-30103, d'*Aspergillus terreus* NCFT 4269.10 et de la souche recombinante de *Bacillus amyloliquefaciens* sont respectivement 5,5 et 5. Alors que l'optimum pour l' $\alpha$ -amylase thermostable de *Paecilomyces variotii* est de 4 et celui de la souche recombinante de *Geobacillus stearothermophilus* SR74 est de 7 (Michelin *et al.*, 2010 et Gandhi *et al.*, 2015).

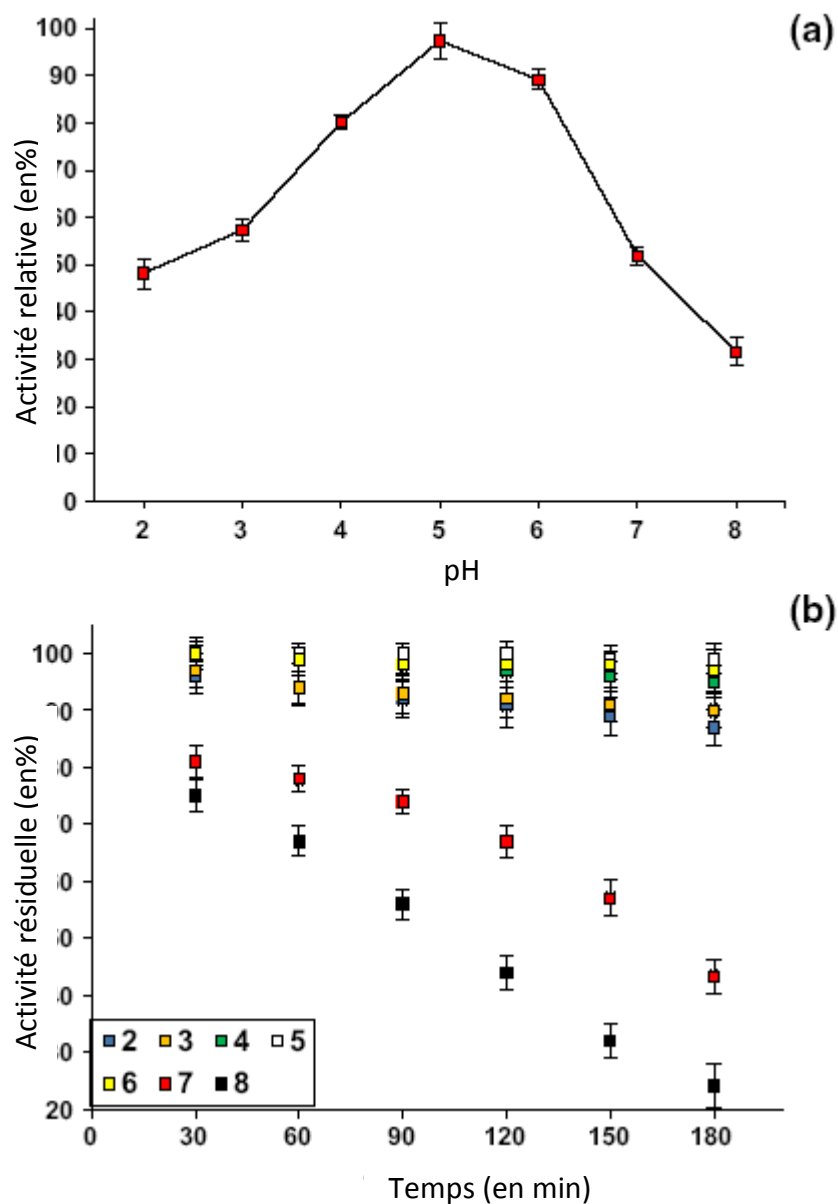
La stabilité au pH de l'enzyme est aussi examinée à différents pH allant de 2 à 8 (fig. 32b). Plus de 70 % de l'activité amylasique est maintenue sur une gamme de pH 2,0 à pH 7,0 ; après 90 min d'incubation. à pH 5,0, l' $\alpha$ -amylase conserve 100 % et 99 % de son activité après 60 min et 120 min d'incubation respectivement. Par contre à pH 4, l'enzyme ne perd que 8 % de son activité après 90 min d'incubation, à pH 7 et 8, l'enzyme perd 43 % et 80 % de son activité après 180 min d'incubation (fig. 32b). Nos résultats sont en accord avec ceux obtenus par Michelin *et al.* (2010) pour l' $\alpha$ -amylase thermostable de *Paecilomyces variotii*. Aussi, l' $\alpha$ -amylase d'*Aspergillus oryzae* IFO-30103 est stable dans une gamme de pH allant de 4,5 à 7,2 (Bhanja Dey et Banerjee, 2015). Cependant, l' $\alpha$ -amylase de la souche recombinante de *Geobacillus stearothermophilus* SR74 est stable entre pH 6 et 8 (Gandhi *et al.*, 2015).

### **8-3- Effet des ions métalliques, des composés chimiques et des surfactants sur l'activité amylasique de *Rhizopus oryzae* FSIS4.**

L'effet des ions métalliques monovalents et divalents (5mM) sur l'activité amylasique est présenté dans la figure 33.

En effet, le  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{NH}_4^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  augmentent l'activité de l' $\alpha$ -amylase de *R. oryzae* FSIS4 par contre elle est inhibée par tous les autres ions métalliques ( $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$  et  $\text{Cd}^{2+}$ ).

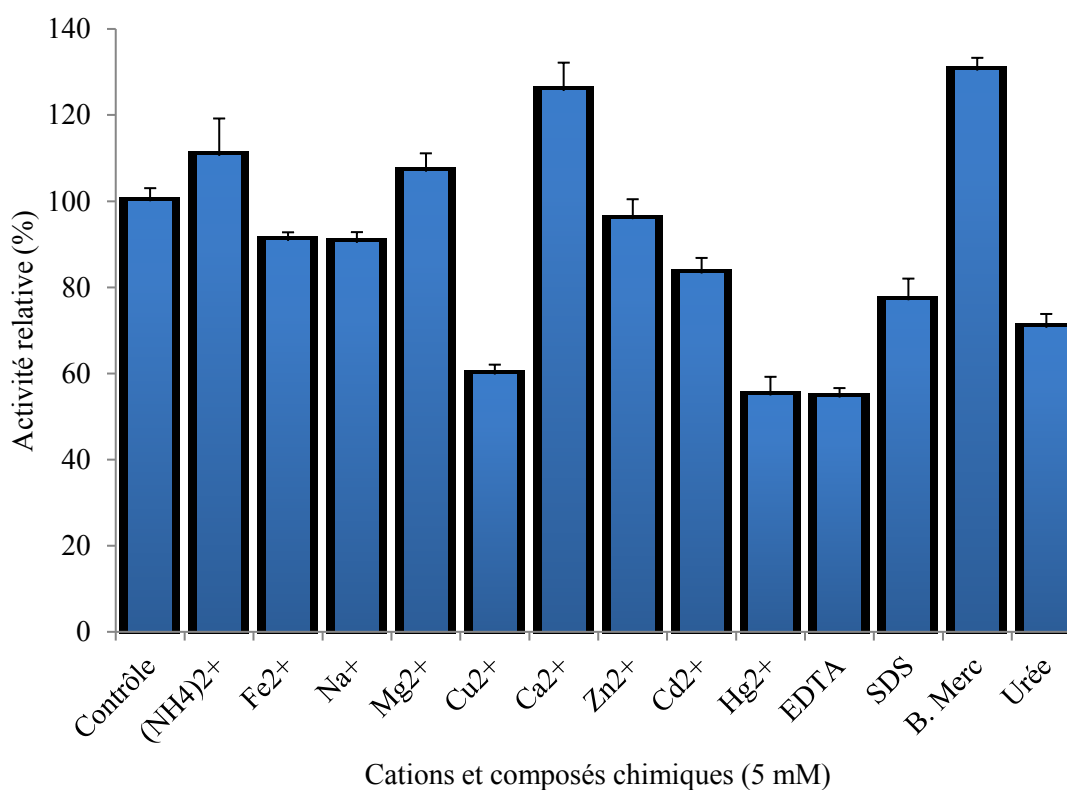
Les résultats suggèrent que l' $\alpha$ -amylase requiert le  $\text{Ca}^{2+}$  pour son activité catalytique et ainsi améliore l'activité de l'enzyme. Les  $\alpha$ -amylases contiennent au moins un ion  $\text{Ca}^{2+}$  dans leur structure et leur affinité avec le  $\text{Ca}^{2+}$  est beaucoup plus forte que celle des autres ions (Gupta *et al.*, 2003 et Bai *et al.*, 2012). En effet, Suganthi *et al.* (2015) rapportent une activation de l' $\alpha$ -amylase produite par *Bacillus vallismortis* TD6 (HQ992818) en présence de  $\text{Ca}^{2+}$  (135 %) et de  $\text{Mg}^{2+}$  (109 %). Selon la littérature, les ions métalliques activateurs ( $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{Mg}^{2+}$ ) protègent l'enzyme contre la dénaturation thermique et jouent un rôle vital dans le maintien de la configuration active de l'enzyme à des températures élevées (Gupta *et al.*,



**Figure 32** : Effet du pH sur (a) l'activité (b) la stabilité au pH de l' $\alpha$ -amylase de *Rhizopus oryzae* FSIS4

2003). Une légère inhibition de l'activité est observée en présence des métaux,  $Zn^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Na^{2+}$  et  $Cd^{2+}$ , dont l'activité relative étant supérieure à 70 %. Un effet inhibiteur plus fort est observé en présence de  $Cu^{2+}$  et de  $Hg^{2+}$ , résultat comparable à celui obtenu avec l' $\alpha$ -amylase de *Aspergillus terreus* NCFT 4269.10 (Sethi *et al.*, 2016). En effet, l'inhibition par  $Hg^{2+}$  peut indiquer l'importance des résidus d'acides aminés indole dans la fonction enzymatique (Gupta *et al.*, 2003). L'inhibition de l' $\alpha$ -amylase de *R. oryzae* FSIS4 par  $Cu^{2+}$  peut s'expliquer par la compétition entre les cations exogènes et les cations associés aux protéines, ce qui entraîne une diminution de l'activité de la métalloenzyme (Wanderley *et al.*, 2004).

Le SDS et l'EDTA montrent une inhibition de l'activité enzymatique (fig. 33). L'inactivation par l'agent chélateur EDTA suggère qu'un cation divalent joue un rôle crucial pour l'activité et / ou la stabilité de cette enzyme. Une telle observation est récemment rapportée avec l'amylase de *Bacillus vallismortis* TD6 (HQ992818) (Suganthi *et al.*, 2015) et de *Aspergillus terreus* NCFT 4269.10 (Sethi *et al.*, 2016). Ce résultat confirme que l' $\alpha$ -amylase de *R. oryzae* FSIS4 est une métalloenzyme et qu'elle contient au moins un ion calcium activant ou stabilisant l'enzyme.



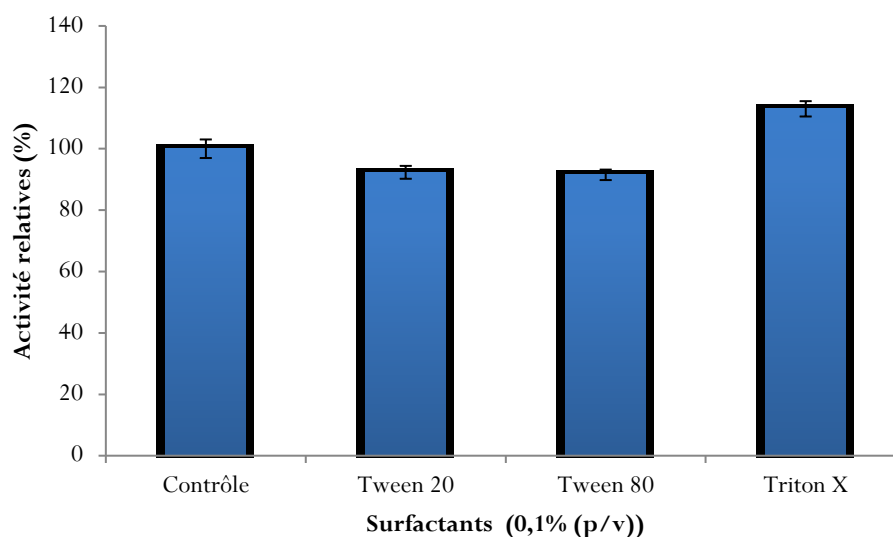
**Figure 33** : Effets des cations métalliques et quelques composés chimiques sur l'activité amylasique de *Rhizopus oryzae* FSIS4.

Le  $\beta$ -mercaptoéthanol améliore l'activité de l' $\alpha$ -amylase (130,33 %) (fig. 33) ; ceci indique que les résidus cystéine ne participent pas à la catalyse, comme pour ceux de l' $\alpha$ -amylase de *Rhizopus arrhizus* (Adejuwon *et al.*, 2015). Cette activation est attribuée à la réduction de la taille des agrégats en détruisant les liaisons disulfure intermoléculaires et la protection des groupes thiol qui stabilisent la structure tridimensionnelle de l'enzyme (Khedher *et al.*, 2008).

L'addition de l'urée à 5 mM conduit à une diminution de l'activité amylasique de 30 %. En effet, l'urée à certaines concentrations, joue un rôle important dans le repliement des protéines, il déroule la structure tertiaire à un degré tel que les sites actifs cachés présents à l'intérieur de l'enzyme soient exposés au substrat, augmentant ainsi l'activité. Par contre, à des concentrations plus élevées, l'urée dénature toute la structure et la fonction enzymatique (Negi et Banerjee, 2009 et Sethi *et al.*, 2016).

L'enzyme n'est pas affecté par l'action des surfactants tween 20 et le tween 80 (à 0,1 %) dont les activités relatives sont de l'ordre de 92,31 % et 91,5 % respectivement (fig. 34). Ces résultats corroborent avec ceux obtenus pour l' $\alpha$ -amylase d'*Aspergillus oryzae* IFO-30103 (Bhanja Dey et Banerjee, 2015). Alors que Sethi *et al.* (2016) enregistrent un effet négatif du tween 20 sur l'activité amylasique d'*Aspergillus terreus* NCF 4269.10.

Le Triton X-100 à 0.1% augmente l'activité amylasique de *R. oryzae* FSIS4 de 13 %. Le mécanisme d'activation du triton X est confirmé par Bhanja Dey et Banerjee (2015) pour l' $\alpha$ -amylase d'*Aspergillus oryzae* IFO-30103 où une augmentation de 18 % de l'activité amylasique est enregistrée.



**Figure 34** : Effets des surfactants sur l'activité amylasique de *Rhizopus oryzae* FSIS4.

#### 8-4- Tolérance de l'enzyme à l'alcool

La tolérance de l'enzyme à l'alcool est testée avec l'éthanol et le méthanol (10 à 30 %). L'enzyme purifiée semble être très stable en présence des deux alcools aussi bien à 10,20 et 30 % (tableau 23), ce résultat est en accord avec celui obtenu pour l' $\alpha$ -amylase d'*Aspergillus oryzae* IFO-30103 dont la stabilité est remarquable pour ces deux alcools (Bhanja Dey et Banerjee, 2015). Ces auteurs suggèrent que tels enzymes peuvent être utilisés dans tous les procédés contenant des solvants organiques. Aussi, le gène de ces enzymes peut être cloné et exprimé dans *Saccharomyces Cerevisiae* pour la production d'alcool à partir de l'amidon ainsi que dans le brassage de boissons alcoolisées (Sindhu *et al.*, 2017)

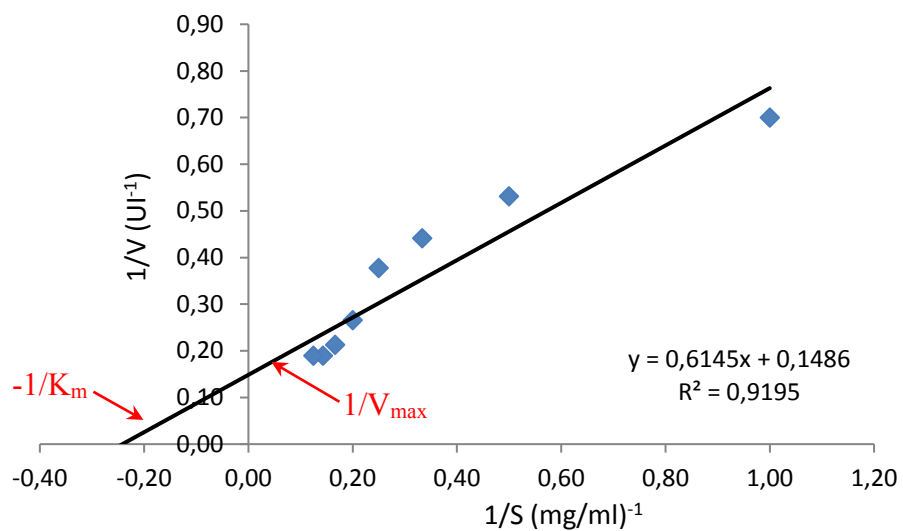
**Tableau 23** : Effet des alcools sur l'activité amylasique de *Rhizopus oryzae* FSIS4.

Alcool	Concentration	Activité relative (%)
Méthanol	10 %	97,90 $\pm$ 3,11
	20 %	96,25 $\pm$ 2,82
	30 %	95,87 $\pm$ 1,71
Ethanol	10 %	97,81 $\pm$ 1,22
	20 %	96,59 $\pm$ 2,56
	30 %	95,52 $\pm$ 1,38

#### 8-5- Etude des paramètres cinétiques de l'enzyme

Les paramètres cinétiques de l' $\alpha$ -amylase de *R. oryzae* FSIS4 sont déterminés par la représentation de Lineweaver et Burck (fig. 35). La Constante de Michaelis de l'enzyme  $K_m = 4,16$  g/L alors que la vitesse maximale  $V_{max} = 6760$  UI.

Les paramètres cinétiques de l' $\alpha$ -amylase divergent en fonction de l'origine de l'enzyme. En effet, pour l' $\alpha$ -amylase de *Rhizopus microsporus*, Shen *et al.* (2012) enregistrent un  $K_m$  de 5,2 g/L. Pour les  $\alpha$ -amylases d'*Aspergillus oryzae* IFO-30103, de *Bacillus licheniformis* SKB4 et de *Bacillus sp.* strain B-10 ces paramètres sont respectivement ( $K_m$  : 5 g/L , 6,2 g/L 1,4 g/L et  $V_{max}$  : 1000 UI, 1040 UI et 6200 UI) (Bhanja Dey et Banerjee, 2015 ; Samanta *et al.*, 2014 et Singh *et al.*, 2016). Par contre, les  $K_m$  et les  $V_{max}$  des deux isoformes d'une  $\alpha$ -amylase végétale sont respectivement  $K_m = 0,57$  g/L et 0,4 g/L et  $V_{max} = 476,19$  UI et 250 UI (Agbo *et al.*, 2017).



**Figure 35** : Paramètres cinétiques de l' $\alpha$ -amylase de *Rhizopus oryzae* FSIS4 selon la représentation de Lineweaver et Burk.

## 9- Application de l' $\alpha$ -amylase partiellement purifiée en panification

La quantité de sucres directement fermentescibles présente dans la farine n'est pas suffisante pour assurer la totalité de la fermentation. L'action combinée de l' $\alpha$ -amylase et de la  $\beta$ -amylase présentes naturellement dans la farine et d'autre part l'action de l'amyloglucosidase consistent à fractionner l'amidon en sucres que la levure transforme ensuite en CO<sub>2</sub> et en alcool. (Goesaert *et al.*, 2006 et Goesaert *et al.*, 2009).

L' $\alpha$ -amylase fongique a une action liquéfiant importante au cours des premières minutes de la cuisson : l'activité de l'amylase augmente jusqu'à 55 °C entraînant un assouplissement de la pâte et facilitant sous l'effet du CO<sub>2</sub> le développement des pâtons. Elle est principalement utilisée pour améliorer la fraîcheur et la souplesse (résilience) de la mie (Kim *et al.*, 2006 et Hemalatha *et al.*, 2010). Elle a également une action anti rassissement.

Tout le sucre formé suite à l'action de l' $\alpha$ -amylase n'est pas consommé par la levure. Il participe à la coloration de la croûte. Au cours de la cuisson, les sucres se caramélisent et forment avec les protéines des complexes de couleurs brunes (Réaction de Maillard). Le surdosage en  $\alpha$ -amylase, entraînent le collant de la pâte voire de la mie (Goesaert *et al.*, 2005).

Les résultats obtenus à partir des essais de panifications effectués avec les  $\alpha$ -amylases formulées, commerciales et un témoin sans enzyme sont résumés dans la figure 36. Les résultats révèlent que l'application de l' $\alpha$ -amylase formulée donne une couleur de croûte de pain satisfaisante (fig. 36c) similaire à celle obtenus avec l'enzyme commerciale utilisée par les fabricants locaux (fig. 36b). La couleur de la croûte pâle ou grisâtre obtenue avec le témoin (fig. 36a) indique un manque de sucres résiduels qui peut résulter d'une fermentation pauvre (Van Dam et Hille, 1992).

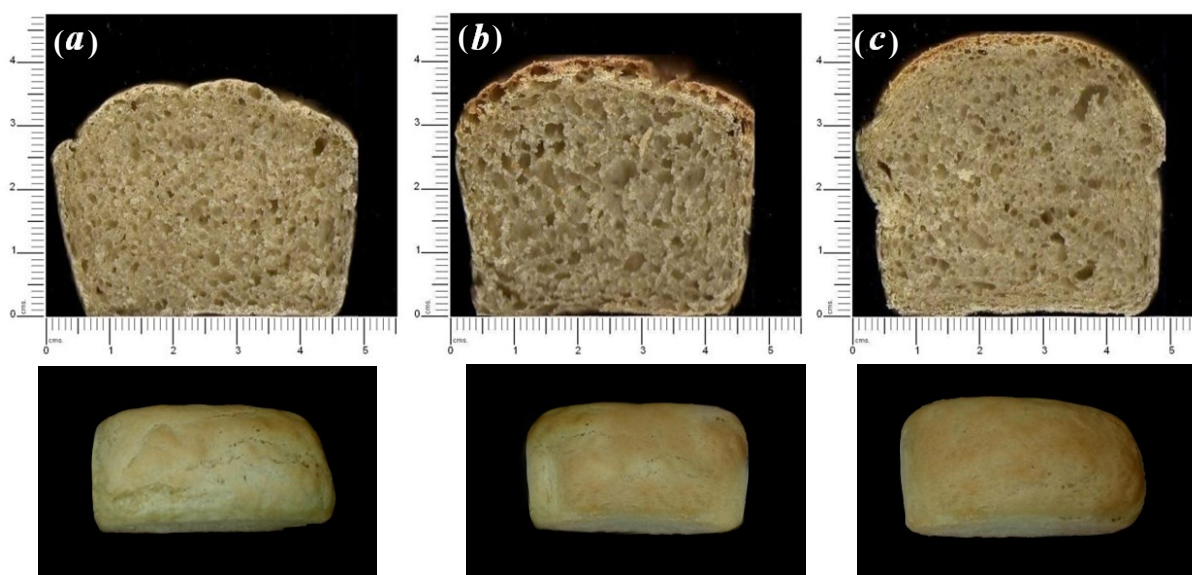
L'analyse d'images révèle que le pain obtenu avec l' $\alpha$ -amylase formulée contient un nombre plus élevé d'alvéoles, alors que le pain obtenu avec de l' $\alpha$ -amylase commerciale contient des alvéoles plus volumineuses. Dans les deux cas, les pains présentent une structure aérée (fig. 36b,c), qui est susceptible d'être le résultat d'une production optimale de dioxyde de carbone dans la pâte pour une texture uniforme (Veluppillai *et al.*, 2010). Ceci est vraisemblablement lié à la réduction de la viscosité de la pâte au cours de la gélatinisation de l'amidon suite à l'action de l'enzyme (Goesaert *et al.*, 2009). Afin d'obtenir un bon volume de pain, la pâte doit avoir une résistance suffisante pour développer et maintenir les cellules gazeuses et l'amidon gélatinisé doit résister à l'expansion rapide des cellules pendant la phase initiale de la cuisson (Pongjaruvat *et al.*, 2014).

L'addition de l' $\alpha$ -amylase formulée est notée pour induire une augmentation du volume spécifique et du rapport hauteur / largeur du pain, de 0,72 et 0,2 respectivement (tableau 24), par rapport au témoin. Cette augmentation (volume du pain et du rapport hauteur / largeur)

**Tableau 24** : Evaluation de l'effet de l' $\alpha$ -amylase sur le volume spécifique et le rapport hauteur / largeur du pain.

	Volume spécifique (cm <sup>3</sup> /g)	Rapport Hauteur / Largeur
Sans $\alpha$ -amylase	1,99 ± 0,21 <sub>a</sub>	0,79 ± 0,01 <sub>a</sub>
Avec l' $\alpha$ -amylase commerciale	2,48 ± 0,08 <sub>b</sub>	0,89 ± 0,02 <sub>b</sub>
Avec l' $\alpha$ -amylase de <i>R. oryzae</i> FSIS4	2,71 ± 0,14 <sub>c</sub>	0,98 ± 0,02 <sub>c</sub>

*a,b,c*: groupes homogènes d'après le test post-hoc de Student-Newman-Keuls.



**Figure 36** : Aspect du pain et des coupes transversales de la tranche centrale du pain.  
(a) : témoin sans  $\alpha$ -amylase ; (b) : avec l' $\alpha$ -amylase commerciale; (c) : avec l' $\alpha$ -amylase de *Rhizopus oryzae* FSIS4



est aussi supérieure à celle induite par l' $\alpha$ -amylase commerciale, qui atteint 0,49 et 0,1 respectivement (des différences hautement significatives avec  $F = 33,85$  et  $p < 0,001$  pour le volume spécifique et  $F = 74,72$  et  $p < 0,001$  pour le rapport hauteur / largeur). D'après le test post-hoc de Student-Newman-Keuls, l' $\alpha$ -amylase de *R. oryzae* FSIS4 formulée à une concentration de 1,936 U par kg de farine révèle les meilleurs résultats (volume spécifique et rapport hauteur / largeur du pain) par rapport à l'enzyme importé utilisée dans le commerce, de ce fait c'est une enzyme qui a des potentialités intéressantes pour des applications industrielles en panification,

En effet, Les additifs classiquement utilisés pour empêcher le rassissement et améliorer la texture et la saveur du pain comprennent des produits chimiques, des émulsifiants (monoglycérides, diglycérides, esters de sucre, lécithine, etc.) (Azizi *et al.*, 2003), donc l'utilisation de l' $\alpha$ -amylase de *R. oryzae* FSIS4 constitue une alternative intéressante pour limiter la vitesse de rassissement du pain, en hydrolysant partiellement les zones amorphes de l'amidon rétrogradé, et améliorer les propriétés texturales et rhéologiques du pain.

Thèse de Doctorat en Sciences  
**L' $\alpha$ -Amylase d'une nouvelle souche de *Rhizopus oryzae* FSIS4 isolée de blé des zones arides :**  
**Production, Purification, Caractérisation, Etude des propriétés et Essai de panification**  
Amel AIT KAKI ép. EL-HADEF EL-OKKI

# Conclusion générale

# Conclusion générale

La thématique de ce travail repose sur l'observation que les moisissures thermophiles présentent une croissance rapide à des hautes températures d'incubation. De ce fait, nous pourrions supposer que la biosynthèse des produits issus de leur métabolisme serait rapide, en particulier, la production de leurs enzymes. Etant donné l'adaptation de ces moisissures à des températures élevées, nous pourrions également supposer que leurs enzymes produites seraient thermostables. Par ailleurs, nous savons que les  $\alpha$ -amylases ont des propriétés très diverses (spécificité d'hydrolyse, pH optimum, thermostabilité, etc.) qui découlent de leur origine de production. Ce qui suggère qu'une  $\alpha$ -amylase spécifique pour un procédé pourrait être recherchée chez un microorganisme nouveau. Aussi, les principaux défis dans la production commerciale des enzymes sont leur thermostabilité, leur coût de production et leur rendement. A partir de ces hypothèses, nous avons structuré la présente thèse.

Dans un premier temps, des souches de moisissures thermophiles sont isolées du blé dur cultivé dans 7 régions arides en Algérie. Ainsi, 246 souches de moisissures thermophiles sont isolées à partir de 53 échantillons. Après purification, 8 genres sont identifiés et répartis comme suit : *Aspergillus* (35,77 %), *Alternaria*, (16,26 %), *Rhizopus* (15,04 %), *Penicillium* (13,41 %), *Fusarium* (9,35), *Mucor* (4,47 %), *Geotricum* (3,66 %) et *Moniliella* (2,03 %).

37 isolats appartenant au genre *Rhizopus* sont testés pour la production de l' $\alpha$ -amylase, seule 25 souches présentent une zone de lyse supérieure à 0,5 cm. Ces souches sont testées pour leur thermostabilité à 80 °C. Les résultats révèlent que les  $\alpha$ -amylases les plus thermostables sont celles des souches isolées de la région d'In Salah, caractérisée par un climat désertique chaud. La souche FSIS4 est avérée la plus performante en la production de l' $\alpha$ -amylase et en thermostabilité de l'enzyme. De ce fait, elle est retenue pour la suite du travail.

L'identification moléculaire par le séquençage des produits PCR des régions ITS1 et ITS2 de l'ADN<sub>r</sub> de la souche FSIS4 permet d'obtenir deux séquences qui sont soumises à un alignement de séquences multiples en utilisant le programme BLAST du NCBI. Les séquences montrent une similitude de 99 % avec de nombreuses souches de *R. oryzae*. La séquence ITS1 est déposée dans GenBank de NCBI avec le numéro d'accès (Accession No: KU726976.1).

En vue de produire l' $\alpha$ -amylase thermostable de *R. oryzae* FSIS4, nous avons opté pour une agro-ressource de faible coût : les dattes déclassées. L'optimisation de la production de l'enzyme sur ce milieu, par l'emploi de la planification expérimentale, permet de

sélectionner 4 facteurs à effets significatifs sur la production de l'enzyme à savoir : l'amidon, l'extrait de levure, le  $\text{CaCl}_2$  et le  $\text{MgSO}_4$ . Les optima de ces facteurs déterminés par la méthodologie des surfaces de réponses, sont respectivement 5,42 g/L, 2,30 g/L, 0,47 g/L et 0,39 g/L. Ces valeurs optimales permettent d'atteindre une activité amylasique maximale d'environ 10151 UI, soit une augmentation de 1,8 fois par rapport à l'activité enregistrée dans le milieu non optimisé. Les résultats obtenus montrent clairement d'un côté, l'importance de l'utilisation des dattes déclassées comme milieu de fermentation, contribuant ainsi à la réduction du coût de production de l'enzyme et d'un autre côté la fiabilité, la rapidité et l'efficacité des plans d'expériences utilisés pour l'optimisation de la production de l'enzyme.

L'étude cinétique en fermenteur révèle un optimum de croissance à 24 h de fermentation, et une production maximale de 11034 UI au bout de 28 h d'incubation.

Pour la séparation et la purification de l' $\alpha$ -amylase, un protocole simple, efficace et économique est optimisé. Il s'agit du système de répartition en trois phases (TPP). Par cette méthode l' $\alpha$ -amylase est fractionnée sélectivement dans une phase tandis que les autres protéines se sont retrouvées dans une autre phase. Ce système permet de purifier l' $\alpha$ -amylase de *R. oryzae* FSIS4 et la concentrer dans la phase intermédiaire avec un rendement de 168,83 % et un degré de purification de 14,94. Cette technique s'avère très adéquate pour le fractionnement des protéines et permet d'obtenir des rendements importants

L'électrophorèse en conditions dénaturantes et le zymogramme réalisés sur la phase intermédiaire permet de vérifier la pureté de la protéine et de calculer la masse moléculaire de l'enzyme qui est de 54,8 kDa. La caractérisation de l'enzyme partiellement purifiée révèle un pH et une température optimale de 5 et 60 °C, respectivement. L'enzyme est stable à 80 °C avec une demi-vie de 165 min alors qu'à 90 °C, elle est de 105 min. L' $\alpha$ -amylase de *R. oryzae* FSIS4 est donc parmi les  $\alpha$ -amylases les plus thermoactives et les plus thermostables décrites à ce jour, en comparaison à celles produites par d'autres souches microbiennes (recombinantes et natives).

Par ailleurs, à 5 mM les ions  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{NH}_4^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  augmentent l'activité de l' $\alpha$ -amylase de *R. oryzae* FSIS4 alors que les ions  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$  et  $\text{Cd}^{2+}$ , l'urée et le SDS inhibent modérément l'enzyme. Un effet inhibiteur plus fort est observé en présence de  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$  et l'EDTA alors que le  $\beta$ -mercaptoéthanol améliore l'activité de l' $\alpha$ -amylase de 30,33 %.

L' $\alpha$ -amylase produite par *R. oryzae* FSIS4 est stable en présence d'éthanol et de méthanol jusqu'à 30 %, les surfactants tween 20 et 80 (0.1%) n'affectent pas l'activité amylasique alors que le triton-x augmente l'activité enzymatique de 13 %. Les paramètres cinétiques de l'enzyme calculés sont de 4,16 g/L pour le  $K_m$  alors que la  $V_{\max}$  est de 6760 UI.

Les essais d'incorporation de l' $\alpha$ -amylase thermostable de *R. oryzae* FSIS4 formulée dans la fabrication du pain induit une augmentation du volume spécifique et du rapport hauteur / largeur du pain, de 0,72  $\text{cm}^3/\text{g}$  et 0,2 respectivement. Cette augmentation est supérieure à celle induite par l' $\alpha$ -amylase commerciale, qui atteint 0,49  $\text{cm}^3/\text{g}$  et 0,1 respectivement. Ces résultats suggèrent l'intérêt de l'application de cette enzyme en

panification pour remplacer les amylases importé et les additifs constitués de produits chimiques et d'émulsifiants classiquement utilisé en panification afin d'améliorer les propriétés texturales, rhéologiques et la saveur du pain d'une part et d'autre part, limiter la vitesse de rassissement du pain.

Ces résultats ouvrent des perspectives qui consistent en :

- Une identification moléculaire des toutes les souches thermophiles isolées afin d'établir l'arbre phylogénétique des espèces Algériennes de moisissures thermophiles, contaminant le blé.
- Une analyse spatio-temporelle de la distribution des genres de moisissure de post-récolte contaminant le blé dur cultivé et stocké en Algérie
- Une exploitation de notre collection de moisissures qui est très riche et contient une diversité de souches capables de produire une variété de molécules d'intérêt.
- Une analyse du sécrétome de la moisissure *R. oryzae* FSIS4 par LC-MSMS (*Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry*), *i.e.* l'étude de la totalité des protéines sécrétées par cet organisme, qui revêt d'une importance particulière, car par ces protéines les champignons acquièrent des nutriments et communiquent avec leur environnement.
- Le Couplage de la technique de TPP avec d'autres méthodes à savoir les techniques MLFTPP (*Macroaffinity Ligand-Facilitated Three-Phase Partitioning*) pour une meilleure efficacité du système.
- La Vérification de la stabilité de l' $\alpha$ -amylase produite dans le temps.
- L'optimisation de la concentration de l' $\alpha$ -amylase à incorporée en panification en mesurant l'évolution des différents paramètres : texture, dureté, élasticité, cohésion, etc.

Thèse de Doctorat en Sciences  
**L' $\alpha$ -Amylase d'une nouvelle souche de *Rhizopus oryzae* FSIS4 isolée de blé des zones arides :**  
**Production, Purification, Caractérisation, Etude des propriétés et Essai de panification**  
Amel AIT KAKI ép. EL-HADEF EL-OKKI

# Références bibliographiques

## Références bibliographiques

- AACC. (American Association of Cereal Chemists). 2009.** AACC International. Approved Methods of Analysis, 11<sup>th</sup> Ed. Method 10-05.01. Guidelines for Measurement of Volume by Rapeseed Displacement. AACC International, St. Paul, MN, USA.
- Abdelhay A., Magnin J.P., Gondrexon N., Baup S., Willison J., 2008.** Optimization and modeling of phenanthrene degradation by *Mycobacterium sp.* 6PY1 in a biphasic medium using response surface methodology. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 78(5): 881–888. doi:10.1007/s00253-008-1365-x
- Abou Dohara M.I., El-Sayed A.K., El-Fallal A.A., Omar N.F., 2011.** Production and partial characterization of high molecular weight extracellular  $\alpha$ -amylase from *Thermoactinomyces vulgaris* isolated from Egyptian soil. *Polish J. Microbiol.*, 60(1): 65–71.
- Abou-zeid A.A., Khoja S.M., 1993.** Utilisation of date in the fermentative formation of citric acid by *Yarrowia lipolytica*. *Zentralbl. Microbiol.*, 148: 213–221.
- Açourène S., Ammouche A., 2012.** Optimization of ethanol, citric acid, and  $\alpha$ -amylase production from date wastes by strains of *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus niger* and *Candida guilliermondii*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 39(5): 759–766. doi: 10.1007/s10295-011-1070-0
- Adejuwon A.O., Ajayi A.A., Ladokun O.A., 2015.** Alpha-Amylase from *Rhizopus arrhizus* Fisher. *J. Plant Sci.*, 10(3): 99–107. doi: 10.3923/jps.2015.99.107
- AFNOR. (Agence Française de Normalisation), 1991. Contrôle de la Qualité des Produits Alimentaires. Recueil des Normes Françaises, 3<sup>e</sup> Ed., Paris, France, 360 p.
- Agbo K.U., Eze S.O., Okwuenu P.C., Ezike T.C., Ezugwu A.L., Chilaka F.C., 2017.** Extraction, purification and characterization of sprouting pearl millet alpha-amylase for biotechnological applications. *J. Plant Biochem. Physiol.*, 5: 1. doi: 10.4173/2329-9029.1000174
- Ait Kaki El-Hadef El-Okki A., Leghlimi H., Dakhmouche S., Bennamoun L., Meraihi Z., 2012.** Utilisation de la planification expérimentale pour l'optimisation de la production de l' $\alpha$ -amylase par *Rhizopus oryzae*. *Rev. Microbiol. Ind. San. Environn.*, 6(1): 1–17.
- Aiyer P.V., 2005.** Amylases and their applications. *Afri. J. Biotechnol.* 4: 1525–1529.
- Akinsanmi O.A., Mitter V., Simpfendorfer S., Backhouse D., Chakraborty S., 2004.** Identity and pathogenicity of *Fusarium spp* isolated from wheat fields in Queensland and northern New South Wales. *Aust. J. Agric. Res.*, 55, 97–107.
- Al-Johani N.B., Al-Seeni M.N., Ahmed Y.M., 2017.** Optimization of alkaline  $\alpha$ -amylase production by thermophilic *Bacillus subtilis*. *Afr. J. Tradit. Complement Altern. Med.*, 14(1): 288-301. doi: 10.21010/ajtcam.v14i1.31
- Amanullah A., Leonildi E., Nienow A., Thomas C., 2001.** Dynamics of mycelial aggregation in cultures of *Aspergillus oryzae*. *Bioprocess Biosyst. Eng.*, 24(2): 101–107. doi: 10.1007/s004490100235
- AOAC. (Association of Official Analytical Chemists), 2016.** Official Methods of Analysis of AOAC International. 20<sup>th</sup> Ed., Washington, D.C., USA.
- Arauzo L.J., Jozalaa A.F., Mazzolab P.G., Penna T.C.V., 2009.** Nisin biotechnological production and application: A review. *Trends Food Sci. Technol.*, 20: 146–154.
- Asgher M., Asad M.J., Rahman S.U., Legge R.L., 2007.** A thermostable  $\alpha$ -amylase from a moderately thermophilic *Bacillus subtilis* strain for starch processing. *J. Food Eng.*, 79(3): 950–955. doi:10.1016/j.jfoodeng.2005.12.053
- Asha R., Niyonzima F.N., Sunil S.M., 2013.** Purification and properties of pullulanase from *Bacillus halodurans*. *Int. Res. J. Biol. Sci.*, 2(3): 35–43.

- Atsbha T., Haki G.D., Abera S., Gezmu T., 2015.** Thermo-stable, calcium independent alpha amylase from two *Bacillus* species in Afar, Ethiopia. *Int. Res. J. Pure Appl. Chem.*, 6(1): 9–18.
- Azeke M.A., Fretzdorff B., Buening-Pfaue H., Betsche T., 2007.** Comparative effect of boiling and solid substrate fermentation using the tempeh fungus (*Rhizopus oligosporus*) on the flatulence potential of African yambean (*Sphenostylis stenocarpa* L.) seeds. *Food Chem.*, 103(4): 1420–1425.
- Azizi M.H., Rajabzadeh N., Riahi E., 2003.** Effect of mono-diglyceride and lecithin on dough rheological characteristics and quality of flat bread. *LWT. Food Sci. Technol.*, 36(2): 189–193.
- Bai Y., Huang H., Meng K., Shi P., Yang P., Luo H., Luo C., Feng H., Zang W., Yao B., 2012.** Identification of an acidic  $\alpha$ -amylase from *Alicyclobacillus* sp. A4 and assessment of its application in the starch industry. *Food Chem.*, 131(4): 1473–1478. doi: 10.1016/j.foodchem.2011.10.036
- Baier S.K., Mc Clements D.J., 2005.** Influence of cosolvent systems on the gelation mechanism of globular protein: thermodynamic, kinetic, and structural aspects of globular protein gelation. *Compr. Rev. Food Sci. F.*, 4(3): 43–54.
- Barbier G., 1994.** Microorganismes thermophiles et enzymes thermostables. *Bull. Soc. Fr. Microbiol.*, 9: 13–18.
- Bayraktar H., Önal S., 2013.** Concentration and purification of  $\alpha$ -galactosidase from water melon (*Citrullus vulgaris*) by three phase partitioning. *Sep. Purif. Technol.*, 118, 835–841.
- Belkacem-Hanfi N., 2010.** Mycoflore et mycotoxines du blé dur au cours du stockage en silos. These de Doctorat, Faculté des Science de Tunis, Tunisie.
- Bennamoun L., Meraihi Z., Dakhmouche S., 2004.** Utilisation de la planification expérimentale pour l'optimisation de la production de l' $\alpha$ -amylase par *Aspergillus oryzae* Ahlburg (Cohen) 1042.72 cultivé sur milieu à base de déchets d'oranges. *J. Food Eng.*, 64: 257–264.
- Benny G.L., 2012.** Current systematics of the zygomycotan fungi with a brief discussion of their biology. In: Misra J.K., Tewari J.P., Deshmukh S.K. (eds): *Systematics and Evolution of Fungi. Progress in Mycological Research.* Science Publishers, Enfield, New Hampshire, USA., pp. 55–105.
- Bernfeld P., 1955.** Amylase  $\alpha$  and  $\beta$ . In: Colowick S.P. et Kaplan O.N. (eds): *Methods in Enzymology.* Academic Press. New York, USA., pp. 140–146.
- Bhalla A., Bischoff K.M., Sani R.K., 2015.** Highly thermostable xylanase production from a thermophilic *Geobacillus* sp. Strain wsucf1 utilizing lignocellulosic biomass. *Front. Bioeng. Biotechnol.*, 3: 84. doi: 10.3389/fbioe.2015.00084
- Bhanja Dey T., Banerjee R., 2015.** Purification, biochemical characterization and application of  $\alpha$ -amylase produced by *Aspergillus oryzae* IFO-30103. *Biocatal. Agric. Biotechnol.*, 4: 83–90.
- Bhattacharya S., Bhardwaj S., Das A., Anand S., 2011.** Utilization of sugarcane bagasse for solid- state fermentation and characterization of  $\alpha$ -amylase from *Aspergillus flavus* isolated from Muthupettai mangrove, Tamil Nadu, India. *Aust. J. Basic Appl. Sci.*, 5(12): 1012–1022.
- Bhella R.S., Altosaar I., 1984.** Purification and some properties of the extracellular  $\alpha$ -amylase from *Aspergillus awamori*. *Can. J. Microbiol.*, 31: 149–153.
- Bocquet J., 1993.** Généralités sur les Microorganismes. In: Sriban R. (ed.): *Biotchnologie.* Lavoisier Tec & Doc., Paris, France, pp. 38–46.
- Boel E., Brady L., Brozowski A.M., Derewanda Z., Dodson G.G., Jensen V.J., Petersen S.B., Swift H., Thim L., Wöldike H.F., 1990.** Calcium binding in  $\alpha$ -amylase:



- an X-ray diffraction study at 2,1 Å resolution of two enzymes from *Aspergillus*. *Biochem.*, 29: 6244–6249.
- Boiron P., 1996.** Organisation et Biologie des Champignons. Ed. Nathan. pp. 30–35.
- Botton B., Breton A., Fèvre M., Gauthier S., Guy P., Larpent J.P., Reymond P., Sanglier J.J., Vayssier Y., Veau P., 1990.** Moisissures Utiles et Nuisibles : Importance Industrielle. 2<sup>e</sup> Ed., Masson, Paris, France, 512 p.
- Boucherba N., 2015.** Valorisation des résidus agro-industriels. Cours en ligne, Département de Microbiologie, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Abderrahmane Mira de Béjaïa.
- Bouchet P., Guignard J.L., Pouchus Y.F., Vihard J., 2005.** Les champignons. Mycologie Fondamentale et Appliquée. 2<sup>e</sup> Ed., Elsevier Masson, Paris, France, 191 p.
- Bowman S.M., Free S.J., 2006.** The structure and synthesis of the fungal cell wall. *Bioessays*, 28(8): 799–808.
- Box G.E.P., Wilson K.B., 1951.** On the experimental attainment of optimum condition. *Royal Stat. Soc. (Ser B.)*, 13: 1–45.
- Bozic N., Ruizb J., López-Santínb J., Vujcic Z., 2011.** Production and properties of the highly efficient raw starch digesting  $\alpha$ -amylase from a *Bacillus licheniformis* ATCC 9945a. *Biochem. Eng. J.*, 53(2): 203–209.
- Bradford M.M., 1976.,** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72: 248–254.
- Burgess R.R., Deutscher M.P., 2009.** Guide to Protein Purification. Academic Press, San Diego, CA., USA., 854 p.
- Cahagnier B., Dragacci S., Frayssinet C., Frémy J.M., Hennebert G.L., Lesage-Meessen L., Multon J.L., Richard-Molard D., Roquebert M.F., 1998.** Moisissures des Aliments Peu Hydratés. Lavoisier Tec & Doc., Paris, France, 225 p.
- Calamai M., Canale C., Relini A., Stefani M., Chiti F., Dobson C.M., 2005.** Reversal of protein aggregation provides evidence for multiple aggregated states. *J. Mol. Biol.*, 346(2): 603–616.
- Çalci E., Demir T., Çelem E.B., Önal S., 2009.** Purification of tomato (*Lycopersicon esculentum*)  $\alpha$ -galactosidase by three-phase partitioning and its characterization. *Sep. Purif. Technol.*, 70, 123–127.
- Campbell C.K., Johnson E.M., Philpot C.M., Warnock D.W., 1996.** Identification of pathogenic fungi. Public Health Laboratory Service, London, UK., 298 p.
- Cantabrana I., Perise R., Hernández I., 2015.** Uses of *Rhizopus oryzae* in the kitchen. *Int. J. Gastro. Food Sci.*, 2: 103–111.
- Carlile M.J., Watkinson S.C., Gooday G.W., 2001.** The Fungi. 2<sup>nd</sup> Ed., Academic Press, London, UK., 588 p.
- Carlotti A., 2014.** Identification des moisissures. *La Vague*, 42: 10–12
- Castegnaro M., Pfohl-Leszkowicz A., 2002.** Les Mycotoxines : Contaminants Omniprésents dans l’Alimentation Animales et Humaines. In: Moll M., Moll N. (eds) : La Sécurité Alimentaire du Consommateur. Lavoisier Tec & Doc., Paris, France, pp. 127–179.
- Castro A.M., Castilho L.R., Freire D.M.G., 2011.** An overview on advances of amylases production and their use in the production of bioethanol by conventional and non conventional processes. *Biomass Conv. Bioref.*, 1: 245–255.
- Cavicchioli R., Siddiqui K.S., Andrews D., Sowers K.R., 2002.** Low-temperature extremophiles and their applications. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 13(3): 253–261.
- Chaiwut P., Pintathong P., Rawdkuen S., 2010.** Extraction and three-phase partitioning behavior of proteases from papaya peels. *Process Biochem.*, 45: 1172–1175.

- Chang T.T., Yang X.Y., Ko W.H., 1992.** Sensitive method for detecting production of extracellular enzyme by fungi on solid media. *Mycologia*, 84: 923–926.
- Chi Z., Chi Z., Liu G., Wang F., Ju L., Zhang T., 2009.** *Saccharomycopsis fibuligera* and its applications in biotechnology. *Biotechnol. Adv.*, 27: 423–431
- Chung Y.C., Kobayashi T., Kanai H., Akiba T., Kudo T., 1995.** Purification and properties of extracellular amylase from the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus profundus* DTS 432. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61: 1502–1506.
- Cooney G.D., Emerson R., 1964.** Thermophilic Fungi. W.H. Freeman and Company. San Francisco, USA., 188 p.
- Coquelle N., Fioravanti E., Weik M., Vellieux F., Madern D., 2007.** Activity, stability and structural studies of lactate dehydrogenases adapted to extreme thermal environments. *J. Mol. Biol.*, 374(2): 547–562.
- Cordova J., Nemmaoui M., Ismaili-Alaoui M., Morin A., Roussos S., Raimbault M., Benjlali B., 1998.** Lipase production by solid state fermentation of olive cake and sugar cane bagasse. *J. Mol. Catalysis. B: Enzym.*, 5: 75–78.
- Cuvellier G.F., 1999.** Réacteurs enzymatiques à enzymes libres. In Scriban R. (ed.): *Biotechnologie*. Ed. Lavoisier. pp. 401–425.
- Cuvellier G.F., Bouix M., Leveau J.Y., 2009.** Production des enzymes. In Scriban R. (ed.): *Biotechnologies*. 5<sup>e</sup> Ed., Lavoisier, Cachan, France, pp. 343–409.
- Dahiya P., Rathi B., 2015.** Characterization and application of alkaline  $\alpha$ -amylase from *Bacillus licheniformis* MTCC1483 as a detergent additive. *Int. Food Res. J.*, 22(3): 1293–1297.
- Das S., Singh S., Sharma V., Soni M.L., 2011.** Biotechnological applications of industrially important amylase enzyme. *Int. J. Pharm. Biol. Sci.*, 2(1): 486–496.
- De Almeida Siqueira E.M., Mizuta K., Giglio J.R., 1997.** *Pycnoporus sanguineus*: a novel source of  $\alpha$ -amylase. *Mycol. Res.*, 101(2): 188–190. doi:10.1017/s0953756296002547
- De Moraes L.M.P., Astolfi-Filho S., Ulhao C.J., 1999.** Purification and some properties of an  $\alpha$ -amylase glucoamylase fusion protein from *Saccharomyces cerevisiae*. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 15: 561–564.
- De Mot R., Verachlert H., 1987.** Purification and characterization of extracellular  $\alpha$ -amylase and glucoamylase from the yeast *Candida Antarctica* CBS6678. *Eur. J. Biochem.*, 164: 643–654.
- De Oliveira A.P.A., Silvestre M.A., Garcia N.F.L., Alves-Prado H.F., Rodrigues A., da Paz M.F., Fonseca G.G., Leite R.S.R., 2016.** Production and catalytic properties of amylases from *Lichtheimia ramosa* and *Thermoascus aurantiacus* by solid-state fermentation. *Sci. World J.*, 2016: 10 p. doi: 10.1155/2016/7323875
- Deb P., Talukdar S.A., Mohsina K., Sarker P.K., Abu Sayem S.M., 2013.** Production and partial characterization of extracellular amylase enzyme from *Bacillus amyloliquefaciens* P-001. *Springer Plus*, 2: 154–163.
- Dennison C., 2011.** Three-phase partitioning. In: Tschesche H. (ed.): *Methods in Protein Biochemistry*, Walter de Gruyter, Berlin, Germany, pp: 1–5.
- Dennison C., Lovrien R., 1997.** Three phase partitioning: concentration and purification of proteins. *Protein Expr. Purif.*, 11: 149–161.
- Dietrich J., Guezennec J., 2016.** Extrémophiles. *Encyclopædia Universalis*, <http://www.universalis.fr/encyclopedie/extremophiles> (consulté le 27 novembre 2016).
- Dix N.J., Webster J., 1995.** Fungal Ecology. Chapman & Hall, London, UK., 549 p.
- Djekrif D.S., Gillmann L., Bennamoun L., Ait Kaki A., Labbani K., Nouadri T., Meraihi Z., 2016.** Amylolytic Yeasts: Producers of  $\alpha$ -amylase and Pullulanase. *Int. J. Life Sci. Scienti. Res.*, 2(4): 339–354.

- Djekrif D.S., Gillmann L., Cochet N., Bennamoun L., Ait-kaki A., Labbani K., Nouadri T., Meraihi Z., 2014.** Optimization of thermophilic pullulanase and  $\alpha$ -amylase production by amy-lolytic yeast. *Int. J. Microbiol. Res.*, 6 (2): 559–569.
- Djekrif-Dakhmouche S., Gheribi-Aoulmi Z., Meraihi Z., Bennamoun L., 2006.** Application of a statistical design to the optimization of culture medium for  $\alpha$ -amylase production by *Aspergillus niger* ATCC 16404 grown on orange waste powder. *J. Food Eng.*, 73: 190–197.
- Djelal H., Larher F., Martin G., Amrane A., 2012.** Continuous culture for the bioproduction of glycerol and ethanol by *Hansenula anomala* growing under salt stress conditions. *Annals Microbiol.*, 62: 49–54.
- Domisch K.H., Gams W., Anderson T.H., 1980.** *Compendium of Soil Fungi*. Vol. 1. Academic press, London, UK., 860 p.
- Doss A., Anand S.P., 2013.** Purification and optimization of fungal amylase from litter samples of Western Ghats, Coimbatore, Tamilnadu (India). *J. Sci. Res. Rev.*, 2(1): 1–4
- Doyle M.P., Beuchat L.R., Montville T.J., 1998.** *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*. ASM press, Washington, D.C., USA., 872 p.
- Dubois M., Gills K.A., Hamilton J.K., Rebers P.A., Smith F., 1956.** Colorimetric method for determination of sugar and related substances. *Anal. Chem.*, 28: 350–356.
- Dufresne P., 2014.** Identification des champignons d'importance médicale. Stage de laboratoire. Institut National de Santé Publique, Quebec (Canada), 55 p.
- Duman Y.A., Kaya E., 2013a.** Purification, recovery, and characterization of chick pea (*Cicer arietinum*) beta-galactosidase in single step by three phase partitioning as a rapid and easy technique. *Protein Expr. Purif.*, 91: 155–160.
- Duman Y.A., Kaya E., 2013b.** Three-Phase partitioning as a rapid and easy method for the purification and recovery of catalase from sweet potato tubers (*Solanum tuberosum*). *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 170: 1119–1126.
- Duman Y.A., Kaya E., 2014.** Purification and recovery of invertase from potato tubers (*Solanum tuberosum*) by three phase partitioning and determination of kinetic properties of purified enzyme. *Turk. J. Biochem.*, 39(4): 443–448. doi: 10.5505/tjb.2014.78949
- Durand G., Monsan P., 1982.** *Les Enzymes. Production et Utilisation Industrielles*. Ed. Bordas, Paris, France, pp. 23–24.
- Egas M.C., da Cota M.S., Cowman D.A., Pires E.M., 1998.** Extracellular  $\alpha$ -amylase from *Thermus filiformis* ORK A2: Purification and biochemical characterization. *Extremophiles*, 2(1): 23–32.
- Elleuche S., Antranikian G., 2013.** Starch-Hydrolyzing Enzymes from Thermophiles. In: Satyanarayana T., Littlechild J., Kawarabayasi Y. (eds): *Thermophilic Microbes Environmental and Industrial Biotechnology*. Springer Verlag, Berlin, Germany, pp. 509–533.
- Ellis D.H., 1980.** Thermophilic fungi isolated from a heated aquatic habitat. *Mycologia*, 72(5): 1030–1033.
- Ellis D.H., 1998.** The Zygomycetes. In: Ajello L., Hay R.J. (eds): *Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections. Medical Mycology* (vol. 4). 9<sup>th</sup> Ed., Edward Arnold, London, UK., pp. 247–277.
- Englard S., Seifter S., 1990.** Precipitation techniques. *Meth. Enzymol.*, 182: 287–300.
- Evstatieva Y., Nikolova D., Ilieva S., Getov L., Savov V., 2010.** Identification and characterization of  $\alpha$ -amylase and endoxylanase, produced by *Aspergillus* mutant strains. *Biotechnol. Biotechnol. Equip.*, 24(sup1): 613–617
- Feller G., Lonhienne T., Deroanne C., Libioule C., Van Beeumen J., Gerday C., 1992.** Purification, characterization and nucleotide sequence of the thermolabile  $\alpha$ -amylase

- from the antarctic psychrotroph *Alternomonas haloplanctis* A23. J. Biol. Chem., 267(8): 5217–5221.
- Felsenstein J., 1985.** Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. Evolution, 39: 783–791.
- Fontana J.D., Gebara M., Blumel M., Schneider H., MacKenzie C.R., Johnson K.G., 1988.**  $\alpha$ -4-O-methyl-d-glucuronidase component of xylanolytic complexes. Methods Enzymol., 160: 560–571.
- Francis F., Sabu A., Nampoothiri K.M., Ramachandran S., Ghosh S., Szakacs G., Pandey A., 2003.** Use of response surface methodology for optimizing process parameters for the production of  $\alpha$ -amylase by *Aspergillus oryzae*. Biochem. Eng. J., 15: 107–115.
- Freitas A., Escaramboni B., Carvalho A., Lima V., Oliva-Neto P., 2014.** Production and application of amylases of *Rhizopus oryzae* and *Rhizopus microspores* var. *oligosporus* from industrial waste in acquisition of glucose. Chem. Pap., 68(4): 442–450.
- Frossard R., Oertli J.J., 1982.** Growth and germination of fungal spores in guttation fluids of barley grown with different nitrogen sources. Trans. Br. Mycol. Soc., 78: 239–245.
- Fugimoto Z., Takase K., Doui N., Momma M., Matsumoto T., Mizuno H., 1998.** Crystal structure of catalytic site mutant  $\alpha$ -amylase from *Bacillus subtilis* complexed with maltopentose. J. Mol. Biol., 277(2): 393–409.
- Gagaoua M., Boucherba N., Bouanane-Darenfed A., Ziane F., Nait-Rabah S., Hafid K., Boudechicha H.R., 2014.** Three-phase partitioning as an efficient method for the purification and recovery of ficin from Mediterranean fig (*Ficus carica* L.) latex. Sep. Purif. Technol., 132: 461–467.
- Gagaoua M., Hafid K., 2016.** Three phase partitioning system, an emerging nonchromatographic tool for proteolytic enzyme recovery and purification. Biosens. J., 5: 1–4.
- Gagaoua M., Hoggas N., Hafid K., 2015.** Three phase partitioning of zingibain, a milk-clotting enzyme from *Zingiber officinale* Roscoe rhizomes. Int. J. Biol. Macromol., 73: 245–52.
- Gandhi S., Salleh A.B., Abd Rahman R.N.Z.R., Leow T.C., Oslan S.N., 2015.** Expression and Characterization of *Geobacillus stearothermophilus* SR74 Recombinant  $\alpha$ -Amylase in *Pichia pastoris*. BioMed Research International, 2015: 529059 (9 p).
- Gangadharan D., Sivaramakrishnan S., Nampoothiri K.M., Sukumaran R.K., Pandey A., 2008.** Response surface methodology for the optimization of alpha amylase production by *Bacillus amyloliquefaciens*. Bioresour. Technol., 99: 4597–4602.
- Gao H., Gu W.Y., 2007.** Optimization of polysaccharide and ergosterol production from *Agaricus brasiliensis* by fermentation process. Biochem. Eng. J., 33(3): 202–210.
- Gao L., Yang H., Wang X., Huang Z., Ishii M., Igarashi Y., Cui Z., 2008.** Rice straw fermentation using lactic acid bacteria. Bioresour. Technol., 99(8): 2742–2748.
- Gavrilescu M., Chisti Y., 2005.** Biotechnology - A sustainable alternative for chemical industry. Biotechnol. Adv., 23: 471–499.
- Ghorai S., Banik S.P., Verma D., Chowdhury S., Mukherjee S., Khowala S., 2009.** Fungal biotechnology in food and feed processing. Food Res. Int., 42: 577–587.
- Ghosh B., Ray R.R., 2010.** Production of Isoamylase from *Rhizopus oryzae* in submerged fermentation. Int. J. Genetic Engg. Biotechnol., 1: 1–10.
- Ghosh B., Ray R.R., 2011.** Current commercial perspective of *Rhizopus oryzae*: A review. J. Appl. Sci., 11(14): 2470–2486.
- Ghosh B., Ray R.R., 2013.** Isolation of a hyperamylolytic mutant strain of *Rhizopus oryzae* PR7 by classical mutagenesis. Int. J. Pharm. Sci. Res., 4(3): 36–41.

- Godon B., Loisel W., 1997.** Guide Pratique d'Analyses dans les Industries des Céréales. 2<sup>e</sup> Ed, Lavoisier Tec & Doc., Paris, France, pp. 819.
- Goesaert H., Brijs K., Veraverbeke W.S., Courtin C.M., Gebruers K., Delcour J.A., 2005.** Wheat flour constituents: how they impact bread quality, and how to impact their functionality. *Trends Food Sci. Technol.*, 16: 12–30.
- Goesaert H., Gebruers K., Courtin C.M., Brijs K., Delcour J.A., 2006.** Enzymes in Breadmaking. In: Hui Y.H. (ed.): *Bakery Products. Science and Technology*. Blackwell Publishing, Ames, Iowa, USA., pp. 337–364.
- Goesaert H., Slade L., Levine H., Delcour J.A., 2009.** Amylases and bread firming -an integrated view. *J Cereal Sci.*, 50: 345–352.
- Gomi K., Akeno T., Minetoki T., Ozeki K., Kumagai C., Okazaki N., Iimura Y., 2000.** Molecular cloning and characterization of a transcriptional activator gene, amyR, involved in the amylolytic gene expression in *Aspergillus oryzae*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 64(4): 816–827.
- Gu F.Y., Gao J., Xiao J.Z., Chen Q., Ruan H., He G.Q., 2012.** Efficient methods of purification of  $\alpha$ -galactosidase from *Aspergillus niger*: Aqueous two-phase system versus three-phase partitioning. *Rom. Biotechnol. Lett.*, 17(6): 7853–7862.
- Guiraud J.P., 2012.** *Microbiologie Alimentaire*. Ed. Dunod, Paris, France, pp. 7–8, 321–333.
- Gupta R., Gigras P., Mohapatra H., Goswami V.K., Chauhan B., 2003. Microbial  $\alpha$ -amylases: A biotechnological perspective. *Process Biochem.*, 38: 1599–1616.
- Haider S.R., Reid H.J., Sharp B.L., 2012.** Tricine-SDS-PAGE. *Methods Mol. Biol.*, 869: 81–91.
- Hamer R., 1995.** Enzymes in the Baking Industry. In: Tucker G.A., Woods L.F.J. (eds): *Enzymes in Food Processing*. Chapman & Hall, Galsgow, UK., pp. 190–222.
- Hamilton L.M., Kelly C.T., Fogarty W.M., 1999.** Purification and properties of the raw starch degrading-amylase of *Bacillus sp.* IMD434. *Biotechnol. Lett.*, 21: 111–115.
- Hankin L., Anagnostakis S.L., 1975.** The use of solid media for detection of enzyme production by Fungi. *Mycologia*, 67: 597–607.
- Hassouni H., Ismaili-Alaoui M., Lamrani K., Perraud-Gaime I., Augur C., Roussos S., 2006.** Spore germination of filamentous fungi in solid state fermentation under different culture conditions. *Micol. Apl. Int.*, 19(1): 1–9.
- Hawksworth D.L., 2001.** The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. *Mycol. Res.*, 105(12): 1422–1432. doi: 10.1017/S0953756201004725
- Hemalatha M.S, Prasada Rao U.J.S., Leelavathi K., Salimath P.V., 2010.** Influence of amylases and xylanase on chemical, sensory, amylograph properties and microstructure of chapatti. *Food Sci. Technol. Int.*, 43: 1394–1402.
- Hendriksen H., Pedersen S., Bisgard-Frantzen H., 1999.** A process for textile warp sizing using enzymatically modified starches. Patent Application WO, 99/35325.
- Henrissat B., Davies G., 1997.** Structural and sequence-based classification of glycoside hydrolases. *Curr. Opin Str. Biol.*, 7: 637–644.
- Hernández M.S., Rodríguez M.R., Guerra N.P., Rosés R.P., 2006.** Amylase production by *Aspergillus niger* in submerged cultivation on two wastes from food industries. *J. Food Eng.*, 73: 93–100. doi: 10.1016/j.jfoodeng.2005.01.009
- Hibbett D.S., Binder M., Bischoff J.F., Blackwell M., Cannon P.F., Eriksson O.E., Huhndorf S., James T., Kirk P.M., Lücking R., Thorsten Lumbsch H., Lutzoni F., et al., 2007.** A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycol. Res.*, 111: 509–547.
- Hickey A., Singer G.A.C., 2004.** Genomic and proteomic adaptations to growth at high temperature. *Genome Biol.*, 5: 117.

- Hofemeister B., Konig S., Hoang V., Engel J., Mayer G., Hansen G., Hofemeister J., 1994.** The gene amyE (TV1) codes for a nongluconic  $\alpha$ -amylase from *Thermoactinomyces vulgaris* 94-2A in *Bacillus subtilis*. Appl. Environ. Microbiol., 60(9): 3381–3389.
- Hoffmann K., Pawłowska J., Walther G., Wrzosek M., de Hoog G.S., Benny G.L., Kirk P.M., Voigt K., 2013.** The family structure of the Mucorales: a synoptic revision based on comprehensive multigene-genealogies. Persoonia, 30: 57–76.
- Hoffmann K., Voigt K., Kirk P.M., 2011.** Mortierellomycotina subphyl. nov., based on multigene genealogies. Mycotaxon, 115: 353–363.
- Hwang K.Y., Song H.K., Chang C., Lee J., Lee S.Y., Kim K.K., Choe S., Sweet R.M., Such S.W., 1997.** Crystal structure of thermostable  $\alpha$ -amylase from *Bacillus licheniformis* refined at 1,7 Å resolution. Mol. Cells., 7(2): 251–258.
- Iefuji P., Chino M., Kato M., Iimura Y., 1996.** Raw-starch-digesting and thermostable  $\alpha$ -amylase from the yeast *Cryptococcus sp.* S-2: purification, characterization, cloning and sequencing. Biochem. J., 318: 989–996.
- Iraqi Houssaïni L., 2002.** Sélection et identification des champignons filamenteux thermophiles pour la production des phytases par FMS sur grignons d'olive. Mémoire de fin d'étude. Section IAA, IAV Hassan II, Rabat. 140 p.
- James T.Y., Kauff F., Schoch C.L., Matheny P.B., Hofstetter V., Cox C.J., Celio G., Gueidan C., Fraker E., Miadlikowska J., Lumbsch H.T., Rauhut A., Reeb V., et al., 2006.** Reconstructing the early evolution of fungi using a six-gene phylogeny. Nature, 443: 818–822.
- Janecek S., Svensson B., Mac Gregor E.A., 2011.** Structural and evolutionary aspects of two families of non-catalytic domains present in starch and glycogen binding proteins from microbes, plants and animals. Enzyme Microb. Technol., 49: 429–440
- János A., Szamos J., 2001.** Comparison of two methods in purification of meat-DNA for PCR. Acta Aliment., 30(1): 113–118.
- Jaspreet-Singha J., Kaurb L., Mc Carthy O.J., 2007.** Factors influencing the physico chemical, morphological, thermal and rheological properties of some chemically modified starches for food applications – A review. Food Hydrocoll., 21: 1–22.
- Jay J.M., 1996.** Modern Food Microbiology. 4<sup>th</sup> Ed. Chapman & Hall. New York, USA., pp. 335–370.
- Jennings D.H., Lysek G., 1996.** Fungal Biology: Understanding the Fungal Lifestyle. 2<sup>nd</sup> Ed. Bios Scientific Pub Ltd., Guildford, UK., 166 p.
- Jones M.D., Forn I., Gadelha C., Egan M.J., Bass D., Massana R., Richards T.A., 2011<sub>a</sub>.** Discovery of novel intermediate forms redefines the fungal tree of life. Nature, 474(7350): 200–203.
- Jones M.D., Richards T.A., Hawksworth D.L., Bass D., 2011<sub>b</sub>.** Validation and justification of the phylum name Cryptomycota phyl. nov. IMA Fungus, 2: 173–175.
- Joshi B.H., 2011.** A novel thermostable alkaline  $\alpha$ -amylase from *Bacillus circulans* PN5: Biochemical characterization and production. Asian J. Biotech., 3(1): 58–67.
- Jouany J.P., Yiannikouris A., 2002.** Les mycotoxines dans les aliments des ruminants, leur devenir et leurs effets chez l'animal. INRA Prod. Anim., 15(1): 3–16.
- Julliard R., Bœuf G., Barbault R., Morcellet J., Prévot-Julliard A.C., Pascal C., Couvet D., Machon N., Blandin P., 2013.** Les Enjeux de la Biodiversité. Doc. Sciences n°16, CRDP de l'académie de Versailles, France. 65 p.
- Kacem-Chaouche N., Dehimat L., Meraihi Z., Destain J., Kahlat K., Thonart Ph., 2013.** Decommissioned dates: chemical composition and fermentation substrate for the production of extracellular catalase by an *Aspergillus phoenicis* mutant. Agric. Biol. J. North America, 4(1): 41–47.

- Kammoun R., Naili B., Bejar S., 2008.** Application of a statistical design to the optimization of parameters and culture medium for alpha-amylase production by *Aspergillus oryzae* CBS 819.72 grown on gruel (wheat grinding by-product). *Bioresour. Technol.*, 99: 5602–5609.
- Kane B.E., Mullins J.T., 1973.** Thermophilic fungi in a municipal waste compost system. *Mycologia*, 65: 1087–1100.
- Karmakar M., Ray R.R., 2011.** Current trends in research and application of microbial cellulases. *Res. J. Microbiol.*, 6(1): 41–53.
- Kathiresan K., Manivannan S., 2006.**  $\alpha$ -Amylase production by *Penicillium fellutanum* isolated from mangrove rhizosphere soil. *Afr. J. Biotechnol.*, 5: 829–832.
- Keller N.P., Hohn T.M., 1997.** Metabolic pathway gene clusters in filamentous fungi. *Fungal Genet. Biol.*, 21(1): 17–29.
- Ketnawa S., Benjakul S., Martínez-Alvarez O., Rawdkuen S., 2014.** Three-phase partitioning and proteins hydrolysis patterns of alkaline proteases derived from fish viscera. *Sep. Purif. Technol.*, 132, 174–181.
- Khedher I.B.A., Bressollier P., Urdaci M.C., Limam F., Marzouki M.N., 2008.** Production and biochemical characterization of *Sclerotinia sclerotiorum*  $\alpha$ -amylase ScAmy1: assay in starch liquefaction treatments. *J. Food Biochem.*, 32: 597–614.
- Khoo S.L., Amirul A.A., Kamaruzaman M., Nazalan N., Azizan M.N., 1994.** Purification and characterization of  $\alpha$ -amylase from *Aspergillus flavus*. *Folia Microbiol.*, 39(5): 392–398.
- Kim J.H., Maeda T., Morita N., 2006.** Effect of fungal  $\alpha$ -amylase on the dough properties and bread quality of wheat flour substituted with polished flours. *Food Res. Int.*, 39: 117–126.
- Kirk O., Vedel Borchert T., Fuglsang C.C., 2002.** Industrial enzyme applications. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 13: 345–351.
- Kohji O., Takashi K., Jiro S., Toshikazu T., Zui F., Hiroshi M., Shugetaka O., 1999.** Characteristics of two forms of the  $\alpha$ -amylases and industrial implication. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65(10): 4652–4658.
- Kulkarni V.M., Rathod V.K., 2014.** Extraction of mangiferin from *Mangifera indica* leaves using three phase partitioning coupled with ultrasound. *Ind. Crops Prod.*, 52: 292–297.
- Kumar V.V., Sathyaselvabala V., Kirupha S.D., Murugesan A., Vidyadevi T., Sivanesan S., 2011.** Application of response surface methodology to optimize three phase partitioning for purification of laccase from *Pleurotus ostreatus*. *Sep. Sci. Technol.*, 46: 1922–1930.
- Kunamneni A., Permaul K., Singh S., 2005.** Amylase production in solid state fermentation by thermophilic fungus *Thermomyces langinosus*. *J. Biosci. Bioeng.*, 100: 168–171.
- Laemmli UK., 1970.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680–685.
- Lamrani K., 2009.** Étude de la biodiversité des moisissures nuisibles et utiles isolées à partir des Maâsra du Maroc. Thèse de Doctorat en Biologie, spécialité : Microbiologie. Faculté des Sciences, Université Mohamed V, Rabat, Maroc.
- Lamrani K., Ismaili-Alaoui M., Cheheb M., Kammass N., Iraqui-Houssaini L., Hassouni H., Roussos S., 2006.** Distribution écologique des champignons filamenteux thermophiles isolés à partir des principales Maâsra du Maroc. In: Ismaili-Alaoui M., Roussos S., Perraud-Gaime I. (eds): *Biotechnologie et qualité des produits de l'olivier dans le bassin Méditerranéen*. Actes Editions, pp. 293–306.
- Larone D.H., 2011.** *Medically Important Fungi: A Guide to Identification*. 5<sup>th</sup> Ed., American Society for Microbiology Press, Washington, DC., USA., 584 pp.

- Larpent-Gourgaud M., Sanglier J.J., 1992.** Biotechnologies, Principe et Méthodes. Ed. Doin, Paris, France, pp. 574–581.
- Lawson C.L., van Montfort R., Strokopytov B., Rozeboom H.J., Kalk K.H., de Vries G.E., Penninga D., Dijkhuizen L., Dijkstra B.W., 1994.** Nucleotide sequence and X-ray structure of cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus circulans* strain 251 in a maltose-dependent crystal form. *J. Mol. Biol.*, 236(2): 590–600.
- Lecoq R., 1965.** Manuel d'analyses alimentaires et d'expertises usuelles. Ed. Doin, Paris, France, pp. 1604–1613.
- Lefier D., 2006.** Identification et Caractérisation des Microorganismes. In: Bertrand D., Dufour E. (eds): La Spectroscopie Infrarouge et ses Applications Analytiques. Collection Sciences et Techniques Agroalimentaires, Lavoisier, Paris, France, pp. 561–581.
- Leuchtenberger A., Friese F., Rutloff H., 1989.** Synthesis of variable enzymes spectrum by immobilised mycelium of *Aspergillus niger*. *Zentralbl. Mikrobiol.*, 144: 139–149.
- Lineweaver H., Burk D., 1934.** The determination of enzyme dissociation constants. *J. Am. Chem. Soc.*, 56(3): 658–666.
- Lucio de Souza E., Erika M.E.H., Castilho V.M., Delima A., Bellini M.Z., Cruz D., Cruz Z.R., 1996.** Production and characterization of  $\alpha$ -amylase from *Rhizopus sp.* *Arq. Biol. Technol.*, 39(4): 831–839.
- Macgregor E.A., Jespersen H.M., Svensson B., 1996.** A circularly permuted alpha-amylase - type alpha/beta-barrel structure in glucan-synthesizing glucosyltransferases. *FEBS Lett.*, 378: 263–266.
- Machius M., Wiegand G., Huber R., 1995.** Crystal structure of calcium-depleted *Bacillus licheniformis* amylase 2.2 A resolution. *J. Mol. Biol.*, 246: 545–559.
- Madingan M.T., Martingo J.M., Stahl D.A., Clark D.P., 2012.** Brock Biology of Microorganisms. Chapter 4. Nutrition, Culture and Metabolism of Microorganisms. 13<sup>th</sup> Ed., Prentice-Hall International Inc. New Jersey, USA., pp. 85–116.
- Magan N., Lacey J., 1988.** Ecological determination of mould growth in stored grain. *Int. J. Food Microbiol.*, 7(3): 245–256.
- Maheshwari R., Bharadwaj G., Bhat M.K., 2000.** Thermophilic fungi: their physiology and enzymes. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 64 : 461–488.
- Maity S., Mallik S., Basuthakur R., Gupta S., 2015.** Optimization of solid state fermentation conditions and characterization of thermostable alpha amylase from *Bacillus subtilis* (ATCC 6633). *J. Bioprocess Biotech.*, 5(4): 1000218 (7 p).
- Malhotra R., Noorwez S.M., Satyanarayana T., 2000.** Production and partial characterization of thermostable and calcium-independent  $\alpha$ -amylase of an extreme thermophile *Bacillus thermooleovorans* NP54. *Lett. Appl. Microbiol.*, 31(5): 378–384.
- Marc J.E., van der Maarel C., Joost B.V., Uitdehaag C.M., Leemhuis H., Dijkhuizen L., 2002.** Properties and applications of starch-converting enzymes of the  $\alpha$ -amylase family. *J. Biotechnol.*, 94(2): 137–155.
- Mathews C.K., van Holde K.E., Ahern K.G., 2000.** Enzymes: Biological Catalysts. In: Mathews C.K., van Holde K.E., Ahern K.G. (eds): Biochemistry. 3<sup>th</sup> Ed., Pearson, CA., USA., pp. 360–409.
- Mazzola P.G., Lopes A.M., Hasmann F.A., Jozala A.F., Penna T.C.V., Magalhaes P.O., Rangel-Yagui C.O., Pessoa A., 2008.** Liquid–liquid extraction of biomolecules: an overview and update of the main techniques. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 83: 143–157.
- Mercier C., 1985.** Les enzymes amylolytiques. In: Mauranche A., Costes C. (eds.): Hydrolases et Dépolymérasés : Enzymes d'Intérêt Industriel. Ed. Gauthier Villars, Paris, France, pp. 109–142.



- Meussen B.J., de Graaff L.H., Sanders J.P.M., Weusthuis R.A., 2012.** Metabolic engineering of *Rhizopus oryzae* for the production of platform chemicals. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 94(4): 875–886.
- Meyer A., Deiana J., Bernard A., 2004.** Cours de Microbiologie Générale. Ed. Doin, Paris, France, 388 p.
- Michelin M, Silva T.M., Benassi V.M., Peixoto-Nogueira S.C., Moraes L.A.B., Leão J.M., Jorge J.A., Terenzi H.F., Polizeli M.T.M., 2010.** Purification and characterization of a thermostable  $\alpha$ -amylase produced by the fungus *Paecilomyces variotii*. *Carbohydr. Res.*, 345: 2348–2353.
- Mishra R.S., Maheshwarî R., 1996.** Amylases of the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus*: their purification, properties, action on starch and response to heat. *J Biosci.*, 21(5): 653–672.
- Mohapatra B.R., Banerjee U.C., Bapuji M., 1998.** Characterization of a fungal amylase from *Mucor* sp. associated with the marine sponge *Spirastrella* sp. *J. Biotechnol.*, 60(1–2): 113–117.
- Molinie A., Faucet V., Castegnaro M., Pfohl-Leszkowicz A., 2005.** Analysis of some breakfast cereals collected on the French market for their content in OTA, Citrinin and Fumonisin B1. Development of a new method for simultaneous extraction of OTA and Citrinin. *Food Chem.*, 92: 391–400.
- Møller K., Sharif M.Z., Olsson L., 2004.** Production of fungal amylase by *Saccharomyces kluyveri* in glucose-limited cultivations. *J. Biotechnol.* 111(3): 311–318.
- Mondal K., Jain S., Teotia S., Gupta M.N., 2006.** Emerging options in protein bioseparation. *Biotechnol. Annu. Rev.*, 12: 1–29.
- Mondal K., Sharma A., Gupta M.N., 2004.** Three phase partitioning of starch and its structural consequences. *Carbohydr. Polym.*, 56: 355–359.
- Moreau C., 1991.** Les moisissures. In: Bourgeois C.M., Leveau J.Y. (Eds): *Technique d'Analyse et de Contrôle dans les Industries Agro-Alimentaires*. Lavoisier Tec & Doc., pp. 234–235.
- Morgan K.R., Hutt L., Gerrard J.A., Every D., Ross M., Gilpin M., 1997.** Staling in starch breads: the effect of anti-staling bread alpha-amylases. *Starch*, 49: 54–59.
- Mouchacca J., 1997.** Thermophilic fungi: biodiversity and taxonomic status. *Cryptogam. Mycol.*, 18: 19–69.
- Mouchacca J., 1999.** Thermophilic fungi: Present taxonomic concepts. In: Johri B.N., Satyanarayana T., Olsen. J. (eds): *Thermophilic Moulds in Biotechnology*. Kluwer Academic Publishers, London, UK., pp. 43–83.
- Mouchacca J., 2001.** Thermotolerant fungi erroneously reported in applied research work as possessing thermophilic attributes. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 16: 869–880.
- Mueller G.M., Schmit J.P., 2007.** Fungal biodiversity: what do we know? What can we predict? *Biodivers. Conserv.*, 16: 1–5.
- Mustafa S.R., Husaini A., Hipolito C.N., Hussain H., Suhaili N., Roslan H.A., 2016.** Application of response surface methodology for optimizing process parameters in the production of amylase by *Aspergillus flavus* NSH9 under solid state fermentation. *Braz. Arch. Biol. Technol.*, 59: e16150632 (10 p).
- Nancib A., Nancib N., Boudrant J., 2005.** Effets des sources de carbones seuls et milieux mixtes sur la production d'acide lactique à partir de *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus*. Maîtrise des Procédés en vue d'améliorer la qualité et la sécurité des aliments, Utilisation des OGM, Analyse des risques en agroalimentaire, Ouagadougou (Burkina Faso). 8-11 novembre 2005.

- Nancib N., Ghoul M., Larous L., Nancib A., Adimi L., Remmal M., Boudrant J., 1999.** Use of date product in the production of the thermophilic dairy starter, strain *Streptococcus thermophilus*. *Bioresour. Technol.*, 67: 291–295.
- Nancib N., Nancib A., Boudrant J., 1997.** Use a waste product in the fermentative formation of baker's yeast biomass by *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioresour. Technol.*, 60: 67–71.
- Narang S., Satyanarayana T., 2001.** Thermostable  $\alpha$ -amylase production by an extreme thermophile *Bacillus thermooleovorans*. *Lett. Appl. Microbiol.* 32(1): 31–35.
- Ndangui C.B., Petit J., Gaiani C., Nzikou J.M., Scher J., 2014.** Impact of thermal and chemical pretreatments on physicochemical, rheological, and functional properties of sweet potato (*Ipomea batatas* Lam) flour. *Food Bioprocess Technol.*, 7: 3618–3628.
- Negi S., Banerjee R., 2009.** Optimization of extraction and purification of glucoamylase produced by *Aspergillus awamori* in solid-state fermentation. *Biotechnol. Bioprocess Eng.*, 14: 60–66.
- Nguyen Q.D., Rezessy-Szabó J.M., Claeysens M., Stals I., Hoschke A., 2002.** Purification and characterisation of amylolytic enzymes from thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus* strain ATCC 34626. *Enzyme Microb. Tech.*, 31: 345–352.
- Nicklin J., Graeme-Cook K., Paget T., Killington R., 2000.** *L'essentiel en Microbiologie*. Ed. Berti, Paris, France, pp. 211–217.
- Nonaka T., Fujihashi M., Kita A., Hagihara H., Ozaki K., Ltso S., Miki K., 2003.** Crystal structure of calcium free  $\alpha$  amylase from *Bacillus sp.* Strain KSM-K38 (amyK38 ) and its sodium ion binding sites. *J. Biol. Chem.*, 278(27): 24828–24824.
- Nwagu T.N., Okolo B.N., 2011.** Extracellular amylase production of a thermotolerant *Fusarium sp.* isolated from Eastern Nigerian soil. *Braz. Arch. Biol. Technol.*, 54: 649–658.
- Octave S., Thomas D., 2009.** Biorefinery: Toward an industrial metabolism. *Biochimie*, 91(6): 659–664.
- Oger P., Franzetti B., 2012.** Des microbes qui repoussent les limites de la vie. *Biofutur*, 336: 36–39.
- Ogundero V.W., 1981.** Isolation of thermophilic and thermotolerant fungi from stored groundnuts in Nigeria and determination of their lipolytic activity. *Int. Biodeterior.*, 17: 51–56.
- Öner E.T., 2006.** Optimization of ethanol production from starch by an amylolytic nuclear petite *Saccharomyces cerevisiae* strain. *Yeast*, 23: 849–856.
- Özer B., Akardere E., Çelem E.B., Önal S., 2010.** Three-phase partitioning as a rapid and efficient method for purification of invertase from tomato. *Biochem. Eng. J.*, 50: 110–115.
- Pandey A., Nigam P., Soccol C., Soccol V., Singh D., Mohan R., 2000.** Advances in microbial amylases. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 31(2): 135–152.
- Paz A., Mester D., Baca I., Nevo E., Korol A., 2004.** Adaptive role of increased frequency of polypurine tracts in mRNA sequences of thermophilic prokaryotes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 101(9): 2951–2956
- Pedersen H., Nielsen J., 2000.** The influence of nitrogen sources on the  $\alpha$ -amylase productivity of *Aspergillus oryzae* in continuous cultures. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 53(3): 278–281.
- Pei-Ling L., Xiao-Song H., Qun S., 2010.** Effect of high hydrostatic pressure on starches: A review. *Starch*, 62: 615–628.
- Pelmont J., 2000.** *Enzymes Catalyseurs du monde vivant*. Collection Grenoble Sciences, p. 290–295.

- Pereira J.C., Travaini R., Marques N., Daniela S.B., Martins A.B., 2015.** Saccharification of ozonated sugarcane bagasse using enzymes from *Myceliophthora thermophila* JCP 1-4 for sugars release and ethanol production. *Bioresour. Technol.*, 204: 122–129.
- Pereira R.T.G., Frank J.M., Pfenning L.H., 2003.** Método para análise de comunidade de fungos associados a frutos e grãos do cafeeiro. *Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil*, Porto Seguro, BA, Brazil, pp. 177–178.
- Perrone G., Susca A., Cozzi G., Ehrlich K., Varga J., Frisvad J.C., Meijer M., Noonim P., Mahakarnchanakul W., Samson R.A., 2007.** Biodiversity of *Aspergillus* species in some important agricultural products. *Stud. Mycol.*, 59: 53–66.
- Pfohl-Leskowicz A., 2001.** Définition et Origines des Mycotoxines. In: CSHPF (Conseil Supérieur d'Hygiène Publique de France) (ed.): *Les Mycotoxines dans l'Alimentation: Evaluation et Gestion du Risque*. Lavoisier Tec & Doc., Paris, France. pp. 3–14.
- Pike R., Dennison C., 1989.** Protein fractionation by three phase partitioning (TPP) in aqueous/t-butanol mixtures. *Biotechnol. Bioeng.*, 33: 221–228.
- Pitt J.I., 1980.** The genus *Penicillium* and its teleomorphic states: *Eupenicillium* and *Talaromyces*. Academic Press, London, UK., 148 p.
- Pitt J.I., 1998.** Natural occurrence of mycotoxins in foods and feeds. *Revue de Médecine Vétérinaire*, 149(6): 479–492.
- Pitt J.I., Hoking A.D., 1997.** *Fungi and Food Spoilage*. Blackie Academic & Professional, London, UK., 593 p.
- Plackett R.L., Burman J.P., 1946.** The design of optimum multifactorial experiments. *Biometrika* 33(4): 305–325.
- Pongjaruvat W., Methacanon P., Seetapan N., Fuongfuchat A., Gamonpilas C., 2014.** Influence of pregelatinised tapioca starch and transglutaminase on dough rheology and quality of gluten-free jasmine rice breads. *Food Hydrocoll.*, 36: 143–150.
- Prajapati V.S., Trivedi U.B., Patel K.C., 2015.** A statistical approach for the production of thermostable and alklophilic alpha-amylase from *Bacillus amyloliquefaciens* KCP2 under solid-state fermentation. *3 Biotech*, 5(2): 211–220.
- Prescott L.M., Harley J.P., Klein D., Willey J.M., Sherwood L.M., Woolverton C.J., 2010.** *Microbiologie*. 3<sup>e</sup> Ed., De Boeck, Paris, France, pp. 101–125.
- R Development Core Team, 2016.** R-Software, version 3.3. A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna (Austria).
- Rachana C., Lyju Jose V., 2014.** Three phase partitioning-a novel protein purification method. *Int. J. ChemTech Res.*, 6: 3467–3472.
- Rajagopalan G., Krishnan C., 2008.** Alpha amylase production from catabolite derepressed *Bacillus subtilis* KCC103 utilizing sugarcane bagasse hydrolysate. *Bioresour. Technol.*, 99: 3044–3050.
- Rajavaram R.K., Bathini S., Girisham S., Reddy S.M., 2010.** Incidence of thermophilic fungi from different substrates in Andhra Pradesh (India). *Int. J. Pharm. Biol. Sci.*, 1(3): 1–6.
- Ramachandran S., Patel A.K., Nampootheri K.M., Chandran S., Szakacs G., Soccol C.R., Pandey A., 2004.** Alpha amylase from a fungal culture grown on oil cakes and its properties. *Braz. Arch. Biol. Technol.*, 47: 309–317.
- Raper K.B., Fennel D.I., 1977.** *The Genus Aspergillus*. Krieger Malabar, FL., USA., 686 p.
- Ratanakhanokchai K., Kaneko J., Kamio Y., Izaki K., 1992.** Purification and properties of a maltotetraose and maltotriose producing amylase from *Chloroflexus aurantiacus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58(8): 2490–2494.
- Ravi-Kumar K., Venkatesh K.S., Umesh-Kumar S., 2004.** Evidence that cleavage of the precursor enzyme by autocatalysis caused secretion of multiple amylases by *Aspergillus niger*. *FEBS Lett.*, 557: 239–242.

- Riaz A., Qadar S., Anwar A., Iqbal S., Bano S., 2008.** Production and characterization of thermostable  $\alpha$ -amylase from a newly isolated strain of *Bacillus subtilis* KIBGE-HAR. Internet J. Microbiol., 6(1): 1-8.
- Rifkin J., 2012.** La Troisième Révolution Industrielle : Comment le pouvoir latéral va transformer l'énergie, l'économie et le monde. Les Liens qui Libèrent, Paris, France, 414 p.
- Rivière J., 1975.** Les Applications Industrielles de Microbiologie. Masson et Cie, Paris, France, pp.180–184.
- Robledo A., Aguilar C.N., Belmares-Cerdaa R.E., Flores-Gallegosa A.C., Contreras-Esquivela J.C., Montañezb J.C., Mussattoc S.I., 2016.** Production of thermostable xylanase by thermophilic fungal strains isolated from maize silage. CyTA. J. Food, 14(2): 302–308.
- Roohi K.M., 2014.** Bio-statistical approach for optimization of cold-active  $\alpha$ -amylase production by novel psychrotolerant *M. foliorum* GA2 in solid state fermentation. Biocatal. Agric. Biotechnol., 3: 175–181.
- Roovers M., Wouters J., Bujnicki J M., Tricot C., Stalon V., Grosjean H., Droogmans L., 2004.** A primordial RNA modification enzyme: the case of tRNA (m 1 A) methyl transferase. Nucleic Acids Res., 32: 465–476.
- Roquebert M.F., 1984.** Introduction à la Mycologie Morphologique des Principales Espèces de Moisissures. In: Multon J.L., Cahagnier B. (eds): Les Mycotoxines : Connaissances Actuelles et Risques pour la Santé Publique dans la Chaîne Alimentaire. Paris, France, pp. 3–18.
- Roussos S., 1985.** Croissance de *Trichoderma harzianum* par fermentation en milieu solide : Physiologie, sporulation et production de cellulase. Thèse d'Etat, Université de Provence, Marseille. 193 p.
- Roy I., Gupta M.N., 2002.** Three-phase affinity partitioning of proteins. Anal. Biochem., 300: 11-14.
- Sagu S.T., Nso E.J., Homann T., Kapseu C., Rawel H.M., 2015.** Extraction and purification of beta-amylase from stems of *Abrus precatorius* by three phasepartitioning. Food Chem., 183: 144-153.
- Sahnoun M., Bejar S., Sayari A., Triki M.A., Kriaa M., Kammoun R., 2012.** Production, purification and characterization of two  $\alpha$ -amylase isoforms from a newly isolated *Aspergillus oryzae* strain S2. Process Biochem., 47: 18–25.
- Sahnoun M., Jemli S., Trabelsi S., Ayadi L., Bejar S., 2016.** *Aspergillus oryzae* S2  $\alpha$ -amylase domain C involvement in activity and specificity: in vivo proteolysis, molecular and docking studies. Plos One, 11(4): e0153868 (15 p).
- Sahnoun M., Naili B., Elgharbi F., Kammoun R., Gabsi K., Bejar S., 2013.** Effect of *Aspergillus oryzae* CBS 819.72  $\alpha$ -amylase on rheological dough properties and bread quality. Biologia, 68(5): 808–815.
- Saito K., Kawamura Y., Oda Y., 2003.** Role of the pectinolytic enzyme in the lactic acid fermentation of potato pulp by *Rhizopus oryzae*. J. Ind. Microbiol. Biotechnol., 30(7): 440–444.
- Saitou N., Nei M., 1987.** The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol. Biol. Evol., 4(4): 406–425.
- Salar R.K., Aneja K.R., 2007.** Thermophilic Fungi: Taxonomy and Biogeography. J. Agric. Technol., 3: 77–107.
- Samanta S., Das A., Halder S.K., Jana A., Kar S., Mohapatra P.K.D., Pati B.R., Mondal K.C., 2014.** Thermodynamic and kinetic characteristics of an  $\alpha$ -amylase from *Bacillus licheniformis* SKB4. Acta Biol. Szeged., 58(2):147–156.

- Sanchez O.J., Cardona C.A., 2008.** Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. *Bioresour. Technol.*, 99: 5270–5295
- Sarikaya E., Gurgun V., 2000.** Increase of the  $\alpha$ -amylase yield by some *Bacillus* strains. *Turk J. Biol.*, 24: 299–308.
- Sarrouh B., Santos T.M., Miyoshi A., Dias R., Azevedo V., 2012.** Up-to-date insight on industrial enzymes applications and global market. *J. Bioprocess Biotechniq.*, S4:002 (10 p).
- Savcheko A., Vieille C., Kang S., Zeikus J.C., 2002.** Pyrococcus  $\alpha$ -amylase is stabilized by calcium and zinc. Department of biochemistry and molecular biology. University east Lausing. pp. 111–123.
- Saxena R., Singh R., 2011.** Amylase production by solid-state fermentation of agro-industrial wastes using *Bacillus sp.* *Braz. J. Microbiol.*, 42(4): 1334–1342.
- Schipper M.A.A., 1978.** On the genera *Rhizomucor* and *Parasitella*. *Stud. Mycol.*, 17: 53–68.
- Schübler A., Schwarzott D., Walker C., 2001.** A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution. *Mycol. Res.*, 105: 1413–1421.
- Sen A., Eryilmaz M., Bayraktar H., Önal S., 2011.** Purification of  $\alpha$ -galactosidase from pepino (*Solanum muricatum*) by three-phase partitioning. *Sep. Purif. Technol.*, 83, 130–136.
- Sethi B.K., Nanda P.K., Sahoo S., Sena S., 2016.** Characterization of purified  $\alpha$ -amylase produced by *Aspergillus terreus* NCFT 4269.10 using pearl millet substrate. *Cogent Food Agric.*, 2: 1158902 (11 p).
- Shabbiri, K., Adnan A., Noor B., Jamil S., 2012.** Optimized production, purification and characterization of alpha amylase by *Brevibacterium linens* DSM 20158, using bio-statistical approach. *Ann. Microbiol.*, 62: 523–532.
- Shah S., Sharma A., Gupta M.N., 2004.** Extraction of oil from *Jatropha curcas* L. seed kernels by enzyme assisted three phase partitioning. *Ind. Crops Prod.*, 20: 275–279.
- Sharma A., Gupta M.N., 2001.** Three phase partitioning as a large-scale separation method for purification of a wheat germ bifunctional protease / amylase inhibitor. *Process Biochem.*, 37, 193–196.
- Sharma A., Gupta M.N., 2004.** Oil extraction from almond, apricot and rice bran by three-phase partitioning after ultrasonication. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 106: 183–186.
- Sharma A., Mondal K., Gupta M.N., 2003.** Some studies on characterization of three phase partitioned chitosan. *Carbohydr. Polym.*, 52: 433–438.
- Sharma K., Bhutty S., Khurana S., Kohli U., 2014.** Isolation, identification and optimization of culture conditions of *Bacillus sp.* strain PM1 for alkalo-thermostable amylase production. *Br. Microbiol. Res. J.*, 4(4): 369–380.
- Sharma A., Gupta M.N., 2002.** Three phase partitioning of carbohydrate polymers: separation and purification of alginates. *Carbohydr. Polym.*, 48: 391–395.
- Shen H., Mo X., Chen X., Han D., Zhao C., 2012.** Purification and enzymatic identification of an acid stable and thermostable  $\alpha$ -amylase from *Rhizopus microsporus*. *J. Inst. Brew.*, 118(3): 309–314.
- Sherry J., 2016.** Alpha-Amylase Baking Enzyme Market Worth \$320.1 Million by 2024: Grand View Research, Inc. <http://www.marketwatch.com/story/alpha-amylase-baking-enzyme-market-worth-3201-million-by-2024-grand-view-research-inc-2016-05-26> (Publié le 26 May 2016 ; consulté le 7 juin 2016).
- Shurtleff W., Aoyagi A., 2001.** *The Book of Miso: Savory Soy Seasoning*. 2<sup>nd</sup> Ed., Ten Speed Press, Barkely, CA., USA., 280 p.
- Simair A.A., Qureshi A.S., Khushk I., Ali C.H., Lashari S., Bhutto M.A., Mangrio G.S., Lu C., 2017.** Production and partial characterization of  $\alpha$ -amylase enzyme from *Bacillus sp.* bcc 01-50 and potential applications. *BioMed. Res. Int.*, 2017: 9173040 (9 p).

- Sindhu R., Binod P., Pandey A., 2017.**  $\alpha$ -Amylases. In: Pandey A., Negi S., Soccol C.R. (eds): Current Developments in Biotechnology and Bioengineering: Production, Isolation and Purification of Industrial Products. Elsevier, Amsterdam, Netherlands, pp. 3–24.
- Sindhu R., Suprabha G.N., Shashidhar S., 2009.** Optimization of parameters for the production of  $\alpha$ -amylase from *Penicillium janthinellum* (NCIM 4960). *Afri. J. Microbiol. Res.*, 3: 498–503.
- Sindhu R., Suprabha G.N., Shashidhar S., 2011.** Purification and characterization of  $\alpha$ -amylase from *Penicillium janthinellum* (NCIM 4960) and its application in detergent industry. *Biotechnol. Bioinfo. Bioeng.*, 1(1): 25-32.
- Singh R.N., Bahuguna A., Chauhan P., Sharma V.K., Kaur S., Singh S.K., Khan A., 2016.** Production, purification and characterization of thermostable  $\alpha$ -amylase from soil isolate *Bacillus sp.* strain B-10 *J. BioSci. Biotechnol.* 2016, 5(1): 37–43.
- Singhania R.R., Patel A.K., Soccol C.R., Pandey A., 2009.** Recent advances in solid state fermentation. *Biochem. Eng. J.*, 44: 13–18.
- Smith R., 2002.** Fungal Identification Guide. Department of veterinary pathology, Texas University, USA., pp. 24–26.
- Smitha R.B., Sajith S., Priji P., Unni K.N.N., Roy T.A.N., Benjamin S., 2015.** Purification and characterization of amylase from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*. *Bt Research*, 6(3): 1–8.
- Solis-Pereira S., Ernesto F.T., Gustero V.G., Mariano-Gutierrez R., 1993.** Effect of different carbon on the synthesis of pectinase by *Aspergillus niger* in submerged and solid state fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 39: 36–41.
- Strobl S., Maskos K., Betz M., Wiegand G., Huber R., Gomis-Rüth F.X., Glockshuber R., 1998.** Crystal structure of yellow meal worm alpha-amylase at 1.64 Å resolution. *J. Mol. Biol.*, 278: 617–628
- Strokopytov B., Knegetel R.M.A., Penninga D., Roozeboom H.J., Kalk K.H., Dijkhuizen L., Dijkstra B.W., 1996.** Structure of cyclodextrin glycosyltransferase complexed with a maltononase inhibitor at 2.6 Å resolution. Implications for product specificity. *Biochem.*, 35(13): 4241–4249.
- Suganthi C., Mageswari A., Karthikeyan S., Gothandam K.M., 2015.** Insight on biochemical characteristics of thermotolerant amylase isolated from extremophile bacteria *Bacillus vallismortis* TD6 (HQ992818). *Microbiology*, 84(2): 210–218.
- Suman S., Ramesh K., 2010.** Production of a thermostable extracellular amylase from thermophilic *Bacillus* species. *J. Pharm. Sci. & Res.*, 2(2): 149–154
- Sumner J.L., Morgan E.D., Evans H.C., 1969.** The effect of growth temperature on the fatty acid composition of fungi in the Order Mucorales. *Can. J. Microbiol.*, 15: 515–520.
- Sumrin, A., W. Ahmad, B. Ijaz, M. Sarwar, S. Gull, H. Kausar, I. Shahid, S. Jahan, S. Asad, M. Hussain and S. Riazuddin. 2011.** Purification and medium optimization of  $\alpha$ -amylase from *Bacillus subtilis* 168. *Afr. J. Biotechnol.*, 10: 2119–2129.
- Sun H., Zhao P., Ge X., Xia Y., Hao Z., Liu J., Peng M., 2010.** Recent Advances in Microbial Raw Starch Degrading Enzymes. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 160(4): 988–1003.
- Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipinski A., Kumar S., 2013.** MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.*, 30(12): 2725–2729.
- Tan K.H., Lovrien R., 1972.** Enzymology in aqueous-organic cosolvent binary mixtures. *J. Biol. Chem.*, 247: 3278–3285.
- Thompson J.D., Higgins D.G., Gibson T.J., 1994.** CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.*, 22(22): 4673–4680.

- Trivedi S., Gehlot H.S., Rao S.R., 2006.** Protein Thermostability in Archaea and Eubacteria. *Genet. Mol. Res.*, 5(4): 816–827.
- Uitdehaag J., Mosi R., Kalk K., van der Veen B., Dijkhuizen L., Withers S., Dijkstra B., 1999.** X-ray structures along the reaction pathway of cyclodextrin glycosyltransferase elucidate catalysis in the  $\alpha$ -amylase family. *Nat. Struct. Biol.*, 6(5): 432–436.
- Uygun M.A., Tanyildizi M.S., 2016.** Optimization of alpha-amylase production by *Bacillus amyloliquefaciens* grown on orange peels. *Iran. J. Sci. Technol. Trans. A Sci.*, 40: 1–7.
- Vági P., Preininger E., Kovács G.M., Kristóf Z., Bóka K., Böddi B., 2013.** Structure of Plants and Fungi. Eötvös Loránd University, Hungary, 101 p.
- Valaparla V.K., 2010.** Purification and properties of a thermostable  $\alpha$ -amylase by *Acremonium sporosulcatum*. *Int. J. Biotechnol. Biochem.*, 6(1): 25–34
- Van Dam H.W., Hille J.D.R., 1992.** Yeast and enzymes in bread making. *Cereal Food World*, 37: 245–252.
- Varga J., Kocsubé S., Tóth B., Frisvad J.C., Perrone G., Susca A., Meijer M., Samson R.A., 2007.** *Aspergillus brasiliensis* sp. nov., a biseriata black *Aspergillus* species with world-wide distribution. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 57: 1925–1932.
- Velupillai S., Nithyanantharajah K., Vasantharuba S., Balakumar S., Arasaratnam V., 2010.** Optimization of bread preparation from wheat flour and malted rice flour. *Rice Sci.*, 17: 51–59.
- Vetal M.D., Rathod V.K., 2015.** Three phase partitioning a novel technique for purification of peroxidase from orange peels (*Citrus sinenses*). *Food Bioprod. Process.*, 94: 284–289.
- Vieille C., Zeikus G.J., 2001.** Hyperthermophilic enzymes: sources, uses, and molecular mechanisms for thermostability. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 65(1): 1–43.
- Vishwanathan P., Surlikar N.R., 2001.** Production of  $\alpha$ -amylase with *Aspergillus flavus* on Amaranthus grains by solid-state fermentation. *J. Basic Microbiol.*, 41: 57–64.
- Voet D., Voet J.G., 2005.** *Biochimie*. 2<sup>e</sup> Ed., De Boeck, Paris, France, pp: 127–207.
- Voet D., Voet J.G., Pratt C.W., 2013.** Principles of Biochemistry. International student version, 4<sup>th</sup> Ed., John Wiley & Sons Inc, New York, USA., 1208 p.
- Wanderley K.J., Torres F.A.G., Moraes L.M.P., Ulhoa C.J., 2004.** Biochemical characterization of  $\alpha$ -amylase from the yeast *Cryptococcus flavus*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 231: 165–169.
- Wang P., Wang P., Tian J., Yu X., Chang M., Chu X., Wu N., 2016.** A new strategy to express the extracellular  $\alpha$ -amylase from *Pyrococcus furiosus* in *Bacillus amyloliquefaciens*. *Sci. Rep.*, 6: 22229 (10 p).
- Ward W.W., 2009.** Three-phase partitioning for protein purification. *Innovations Pharm. Technol.*, 28: 28–34.
- Webster J., Weber R., 2007.** Introduction to Fungi. 3<sup>th</sup> Ed., Cambridge University Press, Cambridge, UK., 841 p.
- White T.J., Bruns T., Lee S., Taylor J., 1990.** Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenetics. In: Innis, M., Gelfand, D., Sninsky, J., White, T. (eds.) PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. Academic Press, Orlando, Florida, USA., pp. 315–322.
- Xian L., Wang F., Luo X., Feng Y.L., Feng J.X., 2015.** Purification and characterization of a highly efficient calcium-independent  $\alpha$ -amylase from *Talaromyces pinophilus* 1-95. *PLoS One*, 10(3): e0121531.
- Yang F., Gong Y., Liu G., Zhao S., Wang J., 2015.** Enhancing Cellulase Production in Thermophilic Fungus *Myceliophthora thermophila* ATCC42464 by RNA Interference of cre1 Gene Expression. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 25(7): 1101–1107.

- Yeoman C.J., Han Y., Dodd D., Schroeder C.M., Mackie R.I., Cann I.K., 2010.** Thermostable enzymes as biocatalysts in the biofuel industry. *Adv. Appl. Microbiol.*, 70: 1–55.
- Yoshioka Y., Hasegawa K., Matsuura Y., Katsube Y., Kubota M., 1997.** Crystal structures of a mutant maltotetraose-forming exo-amylase cocrystallized with maltopentaose. *J. Mol. Biol.*, 271(4): 619-628.
- Zareian S., Khajeh K., Ranjbar B., Dabirmanesh B., Ghollasi M., Mollania N., 2010.** Purification and characterization of a novel amylopullulanase that converts pullulan to glucose, maltose, and maltotriose and starch to glucose and maltose. *Enzyme Microbial. Technol.*, 46(2): 57–63.
- Zhao W., Zheng J., Wang Y.G., Zhou H.B., 2011.** A marked enhancement in production of amylase by *Bacillus amyloliquefaciens* in flask fermentation using statistical methods. *J. Cent. South Univ. T.*, 18(4): 1054–1062.



Thèse de Doctorat en Sciences  
**L' $\alpha$ -Amylase d'une nouvelle souche de *Rhizopus oryzae* FSIS4 isolée de blé des zones arides :**  
**Production, Purification, Caractérisation, Etude des propriétés et Essai de panification**  
Amel AIT KAKI ép. EL-HADEF EL-OKKI

# Annexes

## Annexe 1

### Les coordonnées Lambert des points d'échantillonnage

Echantillon	Nb	Latitude	Longitude	Altitude	Commune	Wilaya
1	6	35°07'48" N	5°10'54" E	410 m	M'doukal	Batna
2	9	34°41'06" N	5°42'05" E	46 m	Oumache	Biskra
3	8	33°56'50" N	5°55'36" E	4 m	El-Meghaier	El-Oued
4	9	33°07'19" N	6°03'56" E	74 m	Tougourt	Ouargla
5	7	30°34'51" N	2°52'26" E	401 m	El-Goléa	Ghardaia
6	8	27°11'52" N	2°29'22" E	296 m	In Salah	Tamanrasset
7	6	26°43'24" N	0°12'47" E	219 m	Reggane	Adrar

## Annexe 2

### Milieux de culture (Guiraud, 2012)

#### Milieu agar blanc

- Agar ..... 15 à 20 g.
- Eau distillée ..... 1000 mL.

#### Milieu sabouraud

- Glucose ..... 20 g.
- Peptone chapoteaut ..... 10 g.
- Agar ..... 15 g.
- Eau distillée ..... 1000 mL.

#### Milieu PDA. (Potato Dextrose Agar )

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

200g de pommes de terre non pelées, lavées et coupées en petits dés; mis ensuite dans 1 litre d'eau distillée, puis portés à l'ébullition pendant 1 heure. Ils sont enfin écrasés et le volume est complété à 1 litre.

##### -Composition du milieu PDA

Extrait de pomme de terre : 1000ml  
20g Glucose  
15-20g Agar

Dissoudre l'Agar à chaud dans l'extrait puis ajouter le glucose  
Stériliser à 110°C pendant 30 min.

#### Milieu Czapek Yeast Agar (CYA)

- $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ..... 1 g
- Czapek concentré ..... 10 mL
- Extrait de levure ..... 5 g
- Saccharose ..... 30 g
- Agar ..... 15 g
- Eau distillée qsp ..... 1 L

Autoclavage à 120 °C pendant 15 min.

#### Milieu pour l'étude de la thermophilie (MT) :

Le milieu utilisé est le milieu rapporté par Hankin et Anagnostakis (1975), dont la composition est la suivante:

- Peptone ..... 10 g.
- NaCl ..... 5 g.
- $\text{CaCl}_2$  ..... 0,1 g.
- Tween 80 ..... 10 mL.
- Agar ..... 20 g.
- Eau distillée qsp ..... 1 L.

Autoclavage à 120 °C pendant 20 min.

### **Annexe 3**

#### **Préparation des réactifs**

##### **Préparation du lactophénol d'AMANN**

- Phénol pur cristallisé ..... 20 g.
- Acide lactique ..... 20 g.
- Glycérine.....40 g.
- Eau distillée.....20 ml.

A conserver en flacon coloré à l'abri de la lumière

##### **Préparation du réactif de Bradford**

Le réactif de Bradford utilisé est constitué de 320 mg de bleu de Coomassie,  
660 ml d'acide phosphorique pur  
puis compléter à 1 L de solution avec de l'eau distillée.

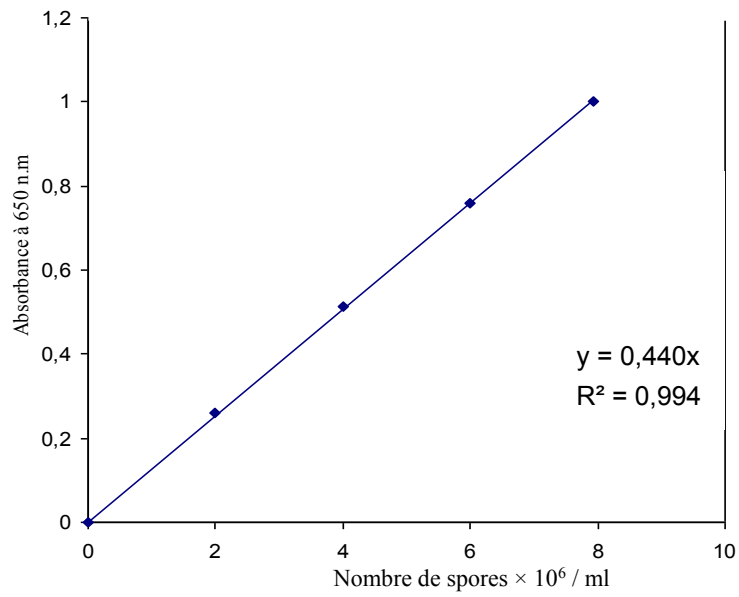
##### **Préparation du DNSA**

Dissoudre 1 g de DNSA (acide 3,5 dinitrosalicylique)  
dans 20 ml de NaOH (2N) et 50 ml d'eau distillée.  
Ajouter 30 g de tartrate double de sodium et de potassium,  
compléter à 100 ml avec de l'eau distillée filtrer  
et conserver à l'abri de la lumière.

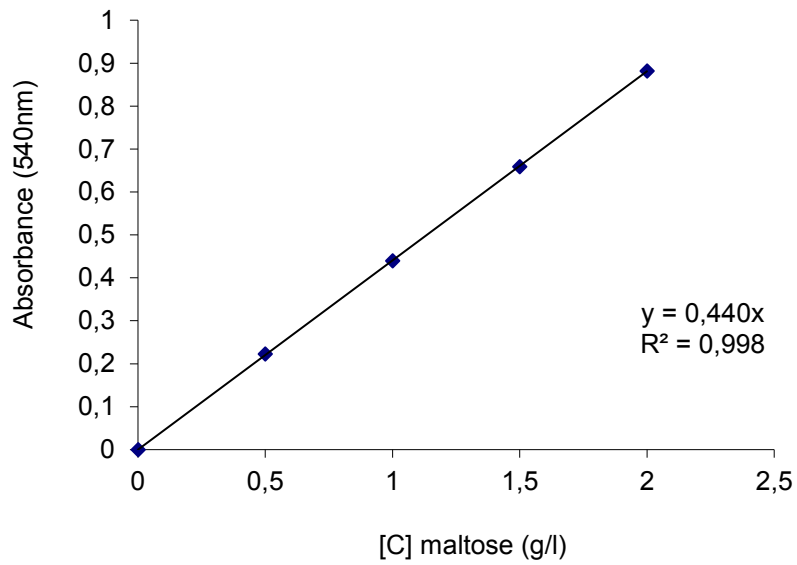
##### **Préparation de la solution du substrat**

Dissoudre 1 g d'amidon dans 100 ml de tampon phosphate 0,1 M à pH 5

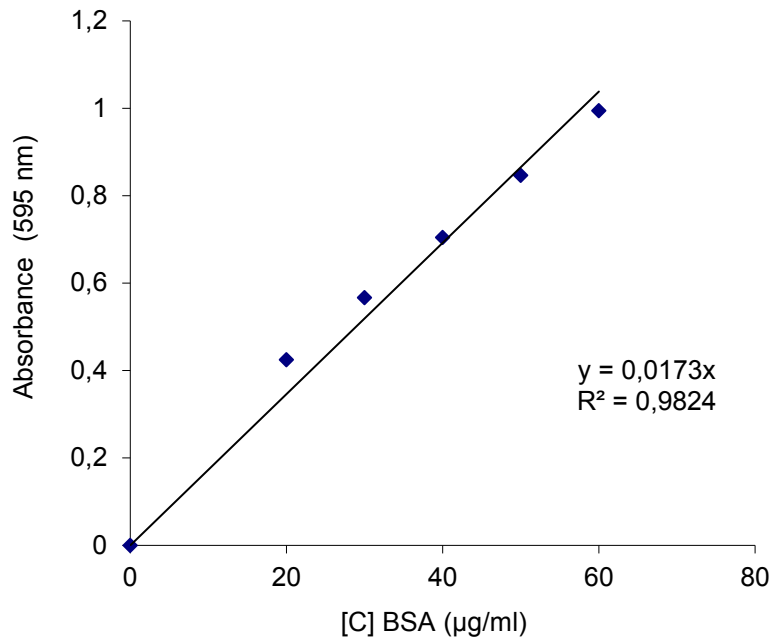
## Annexe 4



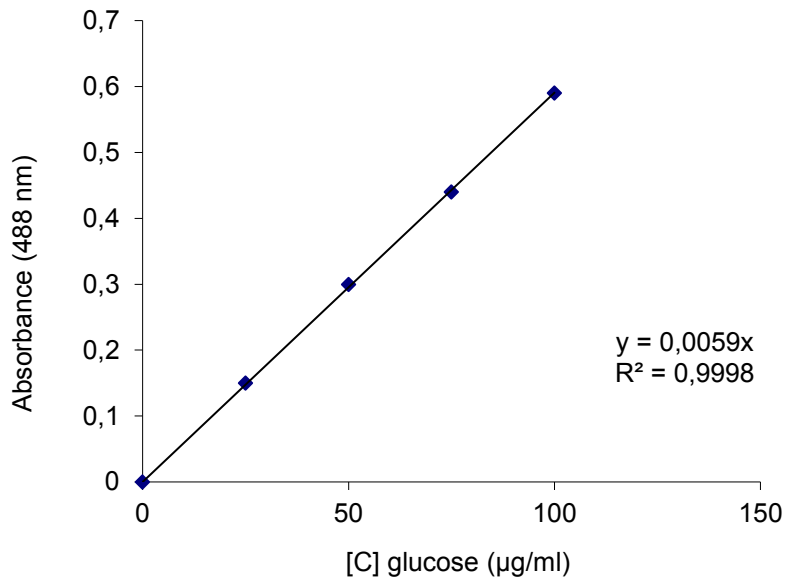
Courbe d'étalonnage des spores de *Rhizopus oryzae* FSIS4.



Courbe d'étalonnage du maltose.



Courbe d'étalonnage des protéines.



Courbe d'étalonnage des sucres totaux

## Annexe 5

### Résultats du blast

Séquence obtenue avec l'amorce ITS4

```
>TAGTTTGAAAgTTACTGGAfTATACTCTTGTACTTTACTTCCnGgnngaaCCAAAAAAAAGA
TCCTGAGACCAGCGTAATATTCCTGCCTAGCAAGCCAGACA gAAAATCACACACATTTTA
GGTGCTCAcTGnaaTAaAACaGcgAtGCgACCCATCacCacataaaCaAATGTtAtGtGTGgGTTT
```

#### BLAST

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<i>Rhizopusoryzae</i> strain 113 3 l1 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	335	335	100%	2e-88	98%	KP784371.1
<i>Rhizopus</i> sp. AQG33 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	335	335	100%	2e-88	98%	KP857667.1
<i>Rhizopusoryzae</i> strain RZgf-1 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	335	335	100%	2e-88	98%	KP771803.1
<i>Rhizopusoryzae</i> strain ABTSJ63 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	335	335	100%	2e-88	98%	KP790013.1
<i>Rhizopusoryzae</i> genomic DNA sequence contains 18S rRNA gene, ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS and 28S rRNA gene	335	335	100%	2e-88	98%	LN835272.1
<i>Rhizopusoryzae</i> isolate ROCM-01 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	335	335	100%	2e-88	98%	KJ636461.1
<i>Rhizopusoryzae</i> strain G-195 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	335	335	100%	2e-88	98%	KP172533.1
Fungal endophyte isolate SNP216 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	335	335	100%	2e-88	98%	KP335409.1
<i>Rhizopusoryzae</i> isolate HN-1-4 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	335	335	100%	2e-88	98%	KM527218.1
<i>Rhizopus</i> sp. BAB-4277 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	335	335	100%	2e-88	98%	KM401403.1
<i>Rhizopusoryzae</i> strain PWQ2218 isolate ISHAM-ITS_ID MITS2195 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	335	335	100%	2e-88	98%	KP132575.1
<i>Rhizopusoryzae</i> 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	335	335	100%	2e-88	98%	KM491890.1
<i>Rhizopusoryzae</i> 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	335	335	100%	2e-88	98%	KM225290.1
<i>Rhizopusoryzae</i> strain 2013-028 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	335	335	100%	2e-88	98%	KJ744381.1
<i>Rhizopusoryzae</i> strain 2012-008 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	335	335	100%	2e-88	98%	KJ744380.1
<i>Rhizopusoryzae</i> strain CBS 400.95 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 26S ribosomal RNA gene, partial sequence	335	335	100%	2e-88	98%	KJ551417.1
<i>Rhizopusoryzae</i> strain CBS 148.22 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 26S ribosomal RNA gene, partial sequence	335	335	100%	2e-88	98%	KJ551403.1

Séquence obtenue avec l'amorce ITS5

TaaTTATGTTAAAGCGCCTTACCTTAGGGTTTCCTCTGGGGTAAGTGATTGCTTCTACACTG  
 TGAAAATTTGGCTGAGAGACTCAGACTGGTCATGGGTAGACCTATCTGGGGTTTGATCGA  
 TGCCACTCCTGGTTTCAGGAGTACCCTTCATAATAAACCTAGAAATTCAGTATTATAAAGt  
 TtaatAAAAACAACCTTTTAAcaatGgaTCTCTTGGtTctcgcacgATGAAGAacgtAnCaAAGTGCgAt  
 aACTAgtGtGAATTGcAtaTtCagtGaatnt

**99% d'identité avec *Rhizopus oryzae***

Rhizopusoryzae strain RZgf-1 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	520	520	98%	7e-144	99%	KP771803.1
Amylomycesrouxii strain ABTSJ82 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence	520	520	98%	7e-144	99%	KP790015.1
Rhizopusoryzae strain ABTSJ63 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	520	520	98%	7e-144	99%	KP790013.1
Rhizopusoryzae strain 19/5 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence	520	520	98%	7e-144	99%	KF986610.1
Rhizopusoryzae isolate ROFA-01 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	520	520	98%	7e-144	99%	KJ636462.1
Rhizopusoryzae strain G-195 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	520	520	98%	7e-144	99%	KP172533.1
Rhizopus sp. FL-2014 strain UASWS1292 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence	520	520	98%	7e-144	99%	KP713858.1
Rhizopusoryzae strain FSU5857 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence	520	520	98%	7e-144	99%	KJ408568.1
Rhizopusoryzae 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	520	520	98%	7e-144	99%	KM491890.1
Rhizopusoryzae 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	520	520	98%	7e-144	99%	KM225290.1
Rhizopus sp. LN0006 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence	520	520	98%	7e-144	99%	KM252961.1
Rhizopusoryzae strain CBS 148.22 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 26S ribosomal RNA gene, partial sequence	520	520	98%	7e-144	99%	KJ551403.1
Rhizopusoryzae strain CBS 147.22 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 26S ribosomal RNA gene, partial sequence	520	520	98%	7e-144	99%	KJ551402.1
Rhizopusoryzae strain CBS 102659 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 26S ribosomal RNA gene, partial sequence	520	520	98%	7e-144	99%	KJ551383.1
Rhizopus sp. XJ201408 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	520	520	98%	7e-144	99%	KM229698.1
Rhizopusoryzae isolate F751 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	520	520	98%	7e-144	99%	KM249085.1
Rhizopusoryzae isolate F750 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	520	520	98%	7e-144	99%	KM249084.1
Uncultured zygomycete clone C31_C04 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	520	520	98%	7e-144	99%	EU490048.1
Rhizopusoryzae genomic DNA containing ITS1, 5.8S rRNA gene and ITS2, isolate F14	520	520	98%	7e-144	99%	HG971776.1
Rhizopusoryzae genomic DNA containing ITS1, 5.8S rRNA gene and ITS2, isolate F12	520	520	98%	7e-144	99%	HG971774.1



# Annexe 6

NCBI Resources  How To  Sign in to NCBI

Nucleotide    [Advanced](#) [Help](#)

GenBank  Send to:

## Rhizopus oryzae strain FSIS4 internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence

GenBank: KU726976.1

[FASTA](#) [Graphics](#)

[Go to:](#)

LOCUS KU726976 283 bp DNA linear PLN 28-JUN-2016  
DEFINITION Rhizopus oryzae strain FSIS4 internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence.  
ACCESSION KU726976  
VERSION KU726976.1  
KEYWORDS .  
SOURCE Rhizopus oryzae (Rhizopus arrhizus)  
ORGANISM [Rhizopus oryzae](#)  
Eukaryota; Fungi; Mucoromycota; Mucoromycotina; Mucorales; Mucorineae; Rhizopodaceae; Rhizopus.  
REFERENCE 1 (bases 1 to 283)  
AUTHORS Ait Kaki,A., Bennamoun,L., Djekrif,S., Guaguaoua,M., Souagui,Y., El-Hadef El-Okki,M., Bouchara,J.P. and Meraihi,Z.  
TITLE Optimization of thermostable alpha-amylase production by novel Rhizopus oryzae isolated from Algerian arid area (Sahara) using decommissioned dates  
JOURNAL Unpublished  
REFERENCE 2 (bases 1 to 283)  
AUTHORS Ait Kaki,A., Bennamoun,L., Djekrif,S., Guaguaoua,M., Souagui,Y., El-Hadef El-Okki,M., Bouchara,J.P. and Meraihi,Z.  
TITLE Direct Submission  
JOURNAL Submitted (11-FEB-2016) Institute of Nutrition, Food and Agri-Food Technologies (INATAA), Mentouri University of Constantine, Ain El-Bey Road, Constantine 25000, Algeria  
COMMENT ##Assembly-Data-START##  
Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing  
##Assembly-Data-END##  
FEATURES  
source Location/Qualifiers  
1..283  
/organism="Rhizopus oryzae"  
/mol\_type="genomic DNA"  
/strain="FSIS4"  
/isolate="arid area of Sahara"  
/isolation\_source="seed"  
/host="Triticum durum L. (wheat)"  
/db\_xref="taxon:64495"  
/country="Algeria"  
/altitude="268 m"  
/identified\_by="Amel Ait Kaki"  
misc\_RNA  
<1..>283  
/note="contains internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA"

### ORIGIN

```
1 taattatggt aaagcgcctt accttagggt ttcctctggg gtaagtgt gcttctacac
61 tgtgaaaatt tggctgagag actcagactg gtcctgggta gacctatctg gggtttgatc
121 gatgccactc ctggtttcag gagtaccctt cataataaac ctagaattc agtattataa
181 agtttaataa aaaacaactt ttaacaatgg atctcttggg tctcgcctcg atgaagaagc
241 tancaaatg cgataactag tgtgaattgc atattcagtg aat
```

//

### Analyze this sequence

- 
- 
- 
- 

### Related information

- 
- 

### Recent activity

- 
- Rhizopus oryzae strain FSIS4 internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribos Nucleotide
- ait kaki (30) Nucleotide
- Saccharification of ozonated sugarcane bagasse using enzymes from PubMed
- A new strategy to express the extracellular  $\alpha$ -amylase from Pyrococcus furiosus i... PubMed
- 2304-8158 (104) PubMed
- See more...

You are here: NCBI > DNA & RNA > Nucleotide Database

[Support Center](#)

#### GETTING STARTED

- [NCBI Education](#)
- [NCBI Help Manual](#)
- [NCBI Handbook](#)
- [Training & Tutorials](#)
- [Submit Data](#)

#### RESOURCES

- [Chemicals & Bioassays](#)
- [Data & Software](#)
- [DNA & RNA](#)
- [Domains & Structures](#)
- [Genes & Expression](#)
- [Genetics & Medicine](#)
- [Genomes & Maps](#)
- [Homology](#)
- [Literature](#)
- [Proteins](#)
- [Sequence Analysis](#)
- [Taxonomy](#)
- [Variation](#)

#### POPULAR

- [PubMed](#)
- [Bookshelf](#)
- [PubMed Central](#)
- [PubMed Health](#)
- [BLAST](#)
- [Nucleotide](#)
- [Genome](#)
- [SNP](#)
- [Gene](#)
- [Protein](#)
- [PubChem](#)

#### FEATURED

- [Genetic Testing Registry](#)
- [PubMed Health](#)
- [GenBank](#)
- [Reference Sequences](#)
- [Gene Expression Omnibus](#)
- [Map Viewer](#)
- [Human Genome](#)
- [Mouse Genome](#)
- [Influenza Virus](#)
- [Primer-BLAST](#)
- [Sequence Read Archive](#)

#### NCBI INFORMATION

- [About NCBI](#)
- [Research at NCBI](#)
- [NCBI News](#)
- [NCBI FTP Site](#)
- [NCBI on Facebook](#)
- [NCBI on Twitter](#)
- [NCBI on YouTube](#)

National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine  
8600 Rockville Pike, Bethesda MD, 20894 USA

[Policies and Guidelines](#) | [Contact](#)



Thèse de Doctorat en Sciences

**L' $\alpha$ -Amylase d'une nouvelle souche de *Rhizopus oryzae* FSIS4 isolée de blé des zones arides :  
Production, Purification, Caractérisation, Etude des propriétés et Essai de panification**

Amel AIT KAKI ép. EL-HADEF EL-OKKI

# Résumés

## Abstract

The application field of enzymes is expanding increasingly. However, these enzymes show a relatively poor performance given the constraints related to industrial processes. In order to respond properly to the needs of the industry (temperature  $\geq 70$  °C), it becomes crucial to identify new enzymes possessing properties that enable them to catalyze reactions in desired conditions. In this context, research of enzymes from extremophiles microorganisms can provide a solution to these issues. As a result, the main challenges of commercially produced enzymes are the thermostability, production cost and performance. Therefore, the objective of this thesis focuses on thermophilic mold isolation and identification isolated from durum wheat grown in 7 arid regions in Algeria. Thus, 246 strains of thermophilic fungi were isolated from 53 samples. After purification, 8 types are identified namely: *Aspergillus*, *Alternaria*, *Rhizopus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Mucor*, *Geotricum* and *Moniliella*. A total of 37 isolates belonging to the genus *Rhizopus* are tested for the production of  $\alpha$ -amylase, but only 25 strains are selected to test the thermostability of the enzyme at 80 °C. The FSIS4 strain proved to be the most efficient one for both production and enzyme thermostability of  $\alpha$ -amylase.

Molecular identification by PCR sequencing products from regions ITS1 and ITS2 rDNA of the FSIS4 strain allowed to get two sequences. These show a similarity of 99% with many strains of *R. oryzae*. The ITS1 sequence is deposited in the Genebank of NCBI with the access number (Accession No: KU726976.1). To produce the  $\alpha$ -amylase from *R. oryzae* FSIS4, we decided to up grade the use of a low-cost agro-ressource, decommissioned dates.

The optimization of this medium, using design of experiments as a statistical approach, permitted to select 4 factors of significant effects on the production of the enzyme namely: starch, yeast extract, CaCl<sub>2</sub> and the MgSO<sub>4</sub>, the optima of these factors are determined by the response surface methodology are respectively 5.42 g/L; 2.30 g/L; 0.47 g/L; 0.39 g/L. The kinetics' study in a fermenter revealed an optimum growth at 24 h of fermentation and a maximum out put of 11034 UI after 28 hours of incubation.

For the enzyme purification process, we selected an easy, fast and cost-effective technique which is the three phase partitioning (TPP). The  $\alpha$ -amylase is selctively fractionated in one phase while the other proteins were located inanother one. This system permits to purify the  $\alpha$ -amylase and concentrate it in the intermediate phase. The TPP system yielded 168.83% with a purification fold of 14.94. The electrophoresis under denaturing conditions and the zymogram carried out on the intermediate phase allowed to check the purity of the protein and to calculate the molecular mass of the enzyme which is 54.8 kDa.

The characterization of the partially purified enzyme depicts a pH and an optimum temperature of 5 and 60°C respectively. The enzyme is stable at 80°C with a half-life of 165 min, whereas at 90°C it is rather 105 min. The  $\alpha$ -amylase of *R. oryzae* FSIS4 is therefore among the most thermoactive and thermostable fungal  $\alpha$ -amylases described. The Ca<sup>2+</sup>, NH<sub>4</sub><sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> ions increase the activity of the  $\alpha$ -amylase of *R. oryzae* FSIS4 whereas; Zn<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup>, Na<sup>+</sup> and Cd<sup>2+</sup>, urea and SDS moderately inhibit the enzyme. A stronger inhibitory effect is observed in the presence of Cu<sup>2+</sup>, Hg<sup>2+</sup> and EDTA whereas  $\beta$ -mercaptoethanol improves the  $\alpha$ -amylase activity by 30.33%. The  $\alpha$ -amylase of *R. oryzae* FSIS4 is stable in the presence of ethanol and methanol up to 30%, tween 20 and 80 do not affect amylase activity while X-triton increases enzymatic activity of 13%. The kinetics parameters of the enzyme calculated are a K<sub>m</sub> of 4.16 g/L whereas the V<sub>max</sub> is 6760 IU.

The incorporation of the formulated thermostable  $\alpha$ -amylase of *R. oryzae* FSIS4 in bread induced an increase of both specific volume and the the ratio (height / width) of the bread, compared to that obtained with a commercial  $\alpha$ -amylase. These results suggest the possibility of using this enzyme to replace imported amylases and additives consisting of chemicals and emulsifiers conventionally used in bread making, in order to improve not only the textural, rheological and flavor properties of bread, but also to limit the staling speed of the bread.

**Keywords:** *Rhizopus oryzae* FSIS4, thermostable  $\alpha$ -amylase, decommissioned dates, optimization, experimental planning, purification, TPP, bread making.

## ملخص

مجال استعمال الانزيمات في توسع مسمتر. ومع ذلك، فإن التطبيقات الصناعية تتطلب إنزيمات مقاومة لدرجات الحرارة العالية (كـ 70 °م). ولذلك فمن الضروري البحث عن انزيمات جديدة و مستقرة حراريا. لتلبية هذا الطلب الصناعي، استهدفنا في عملنا هذا إنزيم ألفا أميلاز، المنتج من طرف فطريات معزولة في بيئات ايكولوجية صحراوية. 53 عينة من القمح الصلب المزروع في 7 مناطق جافة من الصحراء الجزائرية استعملت لعزل هذه الفطريات. وهكذا، 246 نوع من الفطريات المقاومة للحرارة تم عزلها، و بعد تنقيتها تم تحديد 8 انواع : *Rhizopus*، *Alternaria*، *Aspergillus*، *Moniliella* و *Geotricum*، *Mucor*، *Fusarium*، *Penicillium*، *Rhizopus* عزلت تنتمي إلى نوع FSIS4 لإنتاج ألفا أميلاز. وقد تم اختيار 25 منها فقط لإختبار صمود انزيمها في درجة حرارة 80 °م. وقد تبين أن العزلة FSIS4 هي الأكثر كفاءة في إنتاج ألفا أميلاز المقاوم للحرارة.

التحديد الجزيئي من خلال طريقة PCR للمقاطع ITS1 و ITS2 من الحمض النووي للعزلة FSIS4 أعطى تسلسلين يظهران تشابه بقيمة 99 ٪ مع العديد من سلالات *R. oryzae*. تم ايداع التسلسل ITS1 في بنك الجينات (Genbank) تحت رقم (KU726976.1). لإنتاج ألفا أميلاز من طرف العزلة FSIS4 *R. oryzae*، اخترنا منتج ثانوي منخفض الكلفة هو بقايا التمر.

تم تحسين الوسط الانتاجي من خلال استخدام التصميم التجريبي الذي مكن من تحديد أربعة عوامل لها تأثير كبير على إنتاج الإنزيم وهي : النشاء، خلاصة الخميرة،  $CaCl_2$  و  $MgSO_4$ . وقد تم تحديد التركيز الأمثل لهذه العوامل، عن طريق منهجية السطوح، و هي على التوالي : 5.42 غ/ل، 2.30 غ/ل، 0.47 غ/ل و 0.39 غ/ل. وقد أظهرت دراسة التخمر للنمو الأمثل في 24 ساعة، والطاقة الانتاجية القصوى بـ 11034 وحدة دولية بعد 28 ساعة.

و لتتقية الإنزيم، اخترنا تقنية سهلة وسريعة واقتصادية، نظام التوزيع على ثلاث طبقات (TPP). ويتيح هذا النظام لتتقية ألفا أميلاز و تركيزها في الطبقة المتوسطة مع مردود يقدر بـ 168.83 ٪ ودرجة تتقية تقدر بـ 14.94. كما جعلت تقنية الفصل الكهربائي و zymogram من الممكن التحقق من نقاء البروتين و حساب وزنه الجزيئي المقدر بـ 54.8 كيلودالتون. توصيف الانزيم المنقى جزئيا يظهر الرقم الهيدروجيني الأمثل 5 و درجة حرارة المثلى هي 60 درجة مئوية. بينا يظهر الإنزيم استقرارا عند 80 °م و 90 °م مع انصاف مدة الحياة 165 و 105 دقيقة على التوالي. وبالتالي فإن ألفا أميلاز المنتج من طرف FSIS4 *R. oryzae* قد تكون الأعلى مستوى من حيث الإستقرار في درجة الحرارة بالمقارنة مع كافة النزيمات الميكروبية. كما أن  $Ca^{2+}$ ،  $NH_4^{2+}$ ،  $Mg^{2+}$  يزيد من نشاط النزيم بينما  $Zn^{2+}$ ،  $Fe^{2+}$ ،  $Na^+$  و  $Cd^{2+}$  و اليوريا و SDS تثبط نشاطه. ولوحظ أيضا وجود تثبيط بشكل واضح في وجود النحاس والزنك وكذلك EDTA، في حين أن  $\beta$ -المركابتوثيرانول يحسن نشاط الانزيم بمقدار 30.33 ٪. هذا الإنزيم مستقر في وجود 30 ٪ الإيثانول والميثانول، في حين التوين 20 و 80 لا تؤثر على نشاطه، أما التريتون X يزيد من نشاط الانزيم بـ 13 ٪. و قد يتم حساب المعلمات الحركية للانزيم و هي ثابتة ميكاليس 4.16 غ / ل و السرعة القصوى 6760 وحدة دولية.

اختبار إدراج ألفا أميلاز FSIS4 *R. oryzae* في صناعة الخبز يسمح بزيادة الحجم ونسبة (الطول / العرض) للخبز أكبر من تلك التي يسببها النزيم المستعمل تجاري. وتشير هذه النتائج لمصلحة تطبيق هذا الإنزيم ليحل محل الانزيمات المستوردة والمواد المضافة التي تتكون من المواد الكيميائية والمستحلبات المستخدمة تقليديا في الخبز لتحسين الخصائص التكوينية و النكهة الانسيابية للخبز.

### الكلمات المفتاحية :

*Rhizopus oryzae* FSIS4، ألفا أميلاز مقاومة للحرارة، بقايا التمر، تحسين، التصميم التجريبي، التنقية، نظام التوزيع على ثلاث طبقات، صناعة الخبز.

Nom : **Ait Kaki ép. El-Hadef El-Okki**  
Prénom : **Amel**

Date de soutenance : 13 Mai 2017

**L'α-AMYLASE D'UNE NOUVELLE SOUCHE DE *RHIZOPUS ORYZAE* FSIS4 ISOLEE  
DE BLE DES ZONES ARIDES : PRODUCTION, PURIFICATION, CARACTERISATION,  
ETUDE DES PROPRIETES ET ESSAI DE PANIFICATION**

**Résumé :**

Le champ d'application des enzymes ne cesse de s'élargir ; néanmoins les applications industrielles nécessitent des enzymes thermostables résistant à des températures élevées ( $\geq 70^{\circ}\text{C}$ ). Il convient donc de chercher des nouvelles enzymes performantes en thermostabilité. Pour répondre à cette exigence industrielle, nous avons ciblés une enzyme ( $\alpha$ -amylase) issue de moisissures vivant dans des niches écologiques particulières de type SAHARA, Algérie. Un screening de moisissures thermophiles a porté sur 53 échantillons de blé dur, cultivé dans 7 régions arides du Sahara algérien, pour isoler et sélectionner des moisissures productrices d' $\alpha$ -amylase thermostable. Ainsi, 246 souches de moisissures thermophiles sont isolées. Après purification, 8 genres sont identifiés *Aspergillus*, *Alternaria*, *Rhizopus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Mucor*, *Geotricum* et *Moniliella*. 37 isolats appartenant au genre *Rhizopus* sont testés pour la production de l' $\alpha$ -amylase, seule 25 souches sont retenues pour tester la thermostabilité de leur enzyme à  $80^{\circ}\text{C}$ . La souche FSIS4 est avérée la plus performante en la production de l' $\alpha$ -amylase thermostable. L'identification moléculaire par le séquençage des produits PCR des régions ITS1 et ITS2 de l'ADN<sub>r</sub> de la souche FSIS4 donne 02 séquences qui montrent une similitude de 99 % avec de nombreuses souches de *R. oryzae*. La séquence ITS1 est déposée dans Genbank de NCBI (numéro d'accès KU726976.1). En vue de produire l' $\alpha$ -amylase de *R. oryzae* FSIS4, nous avons opté pour une agro-ressource de faible coût, les dattes déclassées. L'optimisation de ce milieu, par l'emploi de la planification expérimentale, a permis de sélectionner 4 facteurs à effets significatifs sur la production de l'enzyme à savoir : l'amidon, l'extrait de levure, le  $\text{CaCl}_2$  et le  $\text{MgSO}_4$ . Les optima de ces facteurs, déterminés par la méthodologie des surfaces de réponses sont 5,42 g/L ; 2,30 g/L ; 0,47 g/L ; 0,39 g/L, respectivement. L'étude cinétique en fermenteur a révélé un optimum de croissance à 24 h de fermentation, et une production maximale de 11034 UI au bout de 28 h d'incubation. Pour la purification de l'enzyme, nous avons opté pour une technique facile, rapide et économique, c'est le système de répartition en trois phases (TPP). Ce système permet de purifier l' $\alpha$ -amylase et la concentrer dans la phase intermédiaire et d'obtenir un rendement de 168,83% avec un degré de purification de 14,94. L'électrophorèse en conditions dénaturantes et le zymogramme réalisés sur la phase intermédiaire permettent de vérifier la pureté de la protéine et de calculer la masse moléculaire de l'enzyme qui est de 54,8 kDa. La caractérisation de l'enzyme partiellement purifiée révèle un pH de 5 et une température optimale de  $60^{\circ}\text{C}$ . L'enzyme est stable à  $80^{\circ}\text{C}$  avec une demi-vie de 165 min alors qu'à  $90^{\circ}\text{C}$ , elle est de 105 min. L' $\alpha$ -amylase de *R. oryzae* FSIS4 est donc parmi les  $\alpha$ -amylases fongiques les plus thermoactives et les plus thermostables décrites à ce jour. Les ions  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{NH}_4^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  augmentent l'activité de l' $\alpha$ -amylase de cette souche alors que  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Na}^{2+}$  et  $\text{Cd}^{2+}$ , l'urée et le SDS inhibent modérément l'enzyme. Un effet inhibiteur prononcé est observé en présence de  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$  et l'EDTA alors que le  $\beta$ -mercaptoéthanol améliore l'activité de l' $\alpha$ -amylase de 30,33 %. L' $\alpha$ -amylase de *R. oryzae* FSIS4 est stable en présence d'éthanol et de méthanol jusqu'à 30 %, les surfactants tween 20 et 80 n'affectent pas l'activité amyliasique alors que le triton-X augmente l'activité enzymatique de 13 %. Les paramètres cinétiques de l'enzyme calculés sont un  $K_m$  de 4,16 g/L et une  $V_{max}$  de 6760UI. Les essais d'incorporation de l' $\alpha$ -amylase thermostable de *R. oryzae* FSIS4 formulée dans la fabrication du pain induit une augmentation du volume spécifique et du rapport (hauteur / largeur) du pain supérieure à celle induite par l' $\alpha$ -amylase commerciale. Ces résultats suggèrent l'intérêt de l'application de cette enzyme pour remplacer les amylases importés et les additifs constitués de produits chimiques et d'émulsifiants classiquement utilisés en panification afin d'améliorer les propriétés texturales, rhéologiques et la saveur du pain d'une part et d'autre part, limiter la vitesse de rassissement du pain.

**Mots clés :** *Rhizopus oryzae* FSIS4,  $\alpha$ -amylase thermostable, dattes déclassées, optimisation, planification expérimentale, purification, TPP, panification

**Laboratoire de Génie Microbiologique et Applications, Université Frères Mentouri Constantine 1**

Présenté devant le jury :

Président	Mr. KACEM-CHAOUCHE N.	Professeur,	Univ. Frères Mentouri, Constantine 1
Directrice de Thèse	Mme MERAIHI Z.	Professeur,	Univ. Frères Mentouri, Constantine 1
Examinatrice	Mme BEKHOUCHE F.	Professeur,	Univ. Frères Mentouri, Constantine 1
Examinatrice	Mme BENDJEMANA K.	Professeur,	Univ. Laghrour Abbès, Khenchela
Examineur	Mr. GUECHI A.	Professeur,	Univ. Ferhat Abbas, Sétif 1
Examineur	Mr. YAHIAOUI B.	MCA.,	Univ. Ferhat Abbas, Sétif 1

