

République Algérienne Démocratique et Populaire  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et De la Recherche Scientifique

**Université ABBES LAGHROUR Khenchela**

Faculté des Sciences de la nature et de la vie  
Département de Biologie moléculaire et Cellulaire



جامعة عباس لغرور خنشلة  
كلية العلوم الطبيعية و الحياة  
قسم البيولوجيا الجزيئية و الخلوية

**N° Série :**.....

**Mémoire de fin d'étude**  
*Pour l'obtention du diplôme de*  
**MASTER ACADEMIQUE**  
Domaine : **Science de la nature et de la vie**  
Filière : **Biologie**  
Spécialité : **Microbiologie Appliquée**

**Thème**

## **Caractérisation de moisissures amylolytiques issues des sols forestiers**

Présenté par :

**DAOUDI Rayane**

**CHORFI Amira**

Jury de Soutenance :

Président: **THABET. R.**

(MAA) Univ.Abbés Laghrour-Khenchela.

Encadrante: **MERABTI. R.**

(MCA) Univ.Abbés Laghrour-Khenchela.

Examinatrice: **LEULMI. N.**

(MCB) Univ.Abbés Laghrour-Khenchela.

**Année anniversaire  
2019/2020**



# Remerciements

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

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

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

***Mr. THABET.R.** En tant que président*

***Mme LEULMI NASSIMA.** En tant que 'examinatrice du jury*

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

# Dédicaces

*Je dédie ce modeste travail :*

*A mes très chers parents qui m'ont toujours entouré d'amour et de tendresse et qui n'arrêtent pas de me soutenir, de m'encourager et de me procurer tout ce dont j'ai besoin, pour leur témoigner de mon immense amour et la reconnaissance pour tous les efforts et sacrifices qu'ils ont entrepris et qui n'arrêtent d'entreprendre à mon égard.*

*A Mes formidables frères **Imadé** et **Ahmedé** et mes chères petites sœurs **Imane** et **Khadidja** à qui je souhaite tout le bonheur du monde et la réussite dans la vie.*

*A mes adorables oncles, tantes, cousins et cousines ainsi qu'à toute la famille **DAOUDI** et la famille **MAMEN**.*

*A mon très cher grand parent à qui je souhaite une longue vie en bonne santé.*

*A la mémoire de mes défuntes grands-mères, que DIEU les accueille dans son vaste paradis, elles resteront toujours présentes dans mon esprit et serrent à tout jamais les pièces manquantes du puzzle de ma vie.*

*A mes très chers amis.*

*A toutes les personnes que j'aime et que je respecte.  
Sans oublier tout les professeurs que ce soit du primaire, du moyen, du secondaire ou de l'enseignement supérieur.*

*A tous ceux qui j'aime*

*Daoudi Rayane*

# Dédicaces

*Je dédie ce mémoire à :*

***A** mon paradis sur terre, ma femme unique, ma vie et la source de mon bonheur « **ma mère** », qui ma guidé vers le bon chemin, et qui a fait le possible pour me voir réalisé mes rêves*

***Au** meilleur **papa** du monde, mon héro, qui peut être fier et trouver ici le résultat de longues années de sacrifices et de privations pour m'aider à avancer dans la vie. Puisse Dieu faire en sorte que ce travail porte son fruit ; Merci pour les valeurs nobles, l'éducation et le soutien permanent venu de toi.*

***Aux** personnes qui m'ont énormément aidée et encouragée : Mes très chers frères «**Abdelhak, Mohamed, Hacem et Hocien**», que Dieu les garde et les protège.*

***A** mon binôme **Rayane** on a passé des moments ensemble que Dieu garde Notre amitié pour toujours.*

***A** tout ma famille et ce qui sont proche de mon cœur et dont je n'ai pas cité le nom.*

***A** tous ceux qui j'aime  
**Chorfi Amira***

## Table des matières

Liste des abréviations  
Liste des figures  
Liste des tableaux  
Résumé  
Abstract  
المخلص

<b>INTRODUCTION GENERALE</b> .....	1
<b>REVUE BIBLIOGRAPHIQUE</b> .....	3
<b>I- LES MOISSURES</b> .....	4
1. Définition des moisissures .....	5
2. Habitat.....	5
3. Caractéristiques morphologiques des moisissures (champignons filamenteux) .....	6
4. Development .....	7
5. Classification des champignons .....	7
6. Principaux genres fongiques .....	8
7. Identification des champignons.....	11
7.1. Analyse macroscopique .....	11
7.2. Analyse microscopique .....	11
7.3. Analyse moléculaire .....	11
8. Intérêt industriel des moisissures .....	12
8.1. Intérêt alimentaire .....	12
8.2. Intérêt pharmaceutique.....	13
8.3. Autres domaines .....	13
<b>II-LES AMYLASES FONGIQUES</b> .....	15
1. Généralités sur les enzymes .....	16
2. Classification des enzymes .....	16
3. Hydrolases microbiennes .....	18
4. Enzymes amylolytiques microbiennes .....	18
4.1. Définition .....	18
4.2. Mode d'action.....	18
4.3. Microorganismes amylolytiques.....	20
4.3.1. Amylases bactériennes .....	21

4.3.2. Amylases fongiques .....	21
5. Utilisation industrielle des enzymes amylolytiques .....	22
5.1. Industrie de transformation de l'amidon et des aliments.....	22
5.2. Biscuiterie et Panification .....	22
5.3. Conversion de l'amidon en éthanol.....	22
5.4. Détergents.....	22
5.5. Papeterie et textile.....	22
5.6. Industrie Pharmaceutique.....	23
<b>REVUE EXPERIMENTALE .....</b>	<b>24</b>
<b>I MATERIELS ET METHODES .....</b>	<b>25</b>
1. Isolement et sélection de souches fongiques productrices des enzymes amylolytiques .	26
1.1. Echantillonnage .....	26
1.2. Isolement des moisissures amylolytiques .....	26
a. Milieux de culture.....	26
b. Réalisation des dilutions .....	26
c. Isolement .....	26
d. Purification.....	27
e. Sélection d'une souche à activité amylolytique .....	27
f. Conservation des souches .....	27
1.3. Identification des isolats amylolytiques.....	27
1.3.1 Analyse macroscopique .....	27
1.3.2 Analyse microscopique .....	28
2. Production et dosage de l'activité amylolytique .....	29
2.1. La fermentation .....	29
2.2. Extraction de l'enzyme (extrait brut).....	29
2.3. Dosage de l'activité amylolytique.....	29
<b>II-RESULTATS ET DISCUSSION .....</b>	<b>31</b>
1. Isolement et sélection des souches fongiques productrices des enzymes amylolytiques .....	32
2. Identification des isolats fongiques amylolytiques .....	35
3. Production d'amylase .....	42
<b>CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>44</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....</b>	<b>46</b>
<b>ANNEXES.....</b>	<b>56</b>

## Liste des abréviations

<b>ADN</b>	:	Acide désoxyribonucléique.
<b>ADNr</b>	:	Acide désoxyribonucléique ribosomique.
<b>ARN</b>	:	Acide ribonucléique.
<b>A<sub>w</sub></b>	:	Activité de l'eau.
<b>C</b>	:	Celsius.
<b>DNS</b>	:	Acide 3.5 dinitrosalicylique.
<b>ITS</b>	:	Internal Transcribed Spacer (La région d'espacement transcrit interne ribosomal).
<b>MA</b>	:	Malt Agar.
<b>PCR</b>	:	Réaction de polymérisation en chaîne.
<b>PDA</b>	:	<i>Potato Dextrose Agar</i> .
<b>pH</b>	:	potentiel d'Hydrogène.

## Liste des figures

<b><u>Figure 1</u></b> : Les deux types de mycélium, cloisonné ou non. Dans le premier cas, des pores traversent les cloisons et permettent la circulation du cytoplasme.....	6
<b><u>Figure 2</u></b> : Arbre phylogénétique d' <i>Aspergillus</i> .....	9
<b><u>Figure 3</u></b> : Mode d'action des amylases.....	20
<b><u>Figure 4</u></b> : Application d'amylase.....	23
<b><u>Figure 5</u></b> : Activité enzymatique de moisissures à activité amylasique sur milieu solide: (A) Boite témoin, (B) Zone d'activité d'hydrolyse, (C) Résultat négatif d'activité amylolytique.....	32
<b><u>Figure 6</u></b> : Aspect macroscopique d' <i>Aspergillus fumigatus</i> .....	36
<b><u>Figure 7</u></b> : Observation microscopique d' <i>Aspergillus fumigatus</i> au grossissement $\times 40$ .....	36
<b><u>Figure 8</u></b> : Aspect macroscopique d' <i>Aspergillus niger</i> .....	37
<b><u>Figure 9</u></b> : Observation microscopique d' <i>Aspergillus fumigatus</i> au grossissement $\times 40$ .....	37
<b><u>Figure 10</u></b> : Aspect macroscopique d' <i>Alternaria</i> .....	38
<b><u>Figure 11</u></b> : Observation microscopique d' <i>Alternaria</i> au grossissement $\times 40$ .....	38
<b><u>Figure 12</u></b> : Aspect macroscopique de <i>Fusarium</i> .....	39
<b><u>Figure 13</u></b> : Observation microscopique de <i>Fusarium</i> au grossissement $\times 40$ .....	39
<b><u>Figure 14</u></b> : Aspect macroscopique de <i>Cladosporium</i> .....	40
<b><u>Figure 15</u></b> : Observation microscopique de <i>Cladosporium</i> au grossissement $\times 40$ .....	40
<b><u>Figure 16</u></b> : Aspect macroscopique de <i>Penicillium</i> sp.....	41
<b><u>Figure 17</u></b> : Observation microscopique de <i>Penicillium</i> sp. au grossissement $\times 40$ .....	41
<b><u>Figure 18</u></b> : Famille des champignons producteurs d'enzyme amylase.....	42

## Liste des tableaux

<b><u>Tableau 1</u></b> : Principaux genres fongiques.....	9
<b><u>Tableau 2</u></b> : Classification des enzymes.....	17
<b><u>Tableau 3</u></b> : Les espèces fongiques isolées à partir de sol forestier et leurs activités amylolytiques sur milieu solide.....	33
<b><u>Tableau 4</u></b> : Les espèces fongiques isolées à partir de sol forestier et leurs activités amylolytiques (cm) sur milieu solide.....	34
<b><u>Tableau 5</u></b> : Les espèces fongiques isolées à partir de sol et leurs activités amylolytiques sur milieu solide.....	35
<b><u>Tableau 6</u></b> : Description morphologique et microscopique des souches fongiques amylolytiques isolées à partir de sol.....	36

**Résumé**

Les champignons filamenteux sont typiquement des microorganismes saprophytes qui sécrètent un large éventail d'enzymes impliquées dans la décomposition et le recyclage de biopolymères complexes à partir de tissus végétaux et animaux. La majorité de ces enzymes sont hydrolytiques et jouent un rôle important dans la nutrition fongique, libérant du carbone et de l'azote enfermés dans des macromolécules insolubles obtenues à partir des activités métaboliques d'autres organismes. Depuis, les champignons sont connus pour produire et sécréter différents types d'enzymes en grandes quantités, ce qui a entraîné un intérêt croissant pour l'étude et l'utilisation filamenteux dans les processus industriels. Les amylases sont parmi les enzymes les plus importantes utilisées dans la biotechnologie moderne, en particulier dans le processus impliquant l'hydrolyse de l'amidon. Les amylases fongiques présentent des applications majeures dans les industries alimentaires, textiles et pharmaceutiques et des biocarburants. Elles sont principalement produites par les espèces du genre *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Mucor*, *Humicola* et *Thermomonospora*.

**Mots clé**

Moisissures – Sol – Forêt – Enzymes – Amylases - Fermentation.

**Abstract**

Filamentous fungi are typically saprophytic microorganisms that secrete a wide range of enzymes involved in the breakdown and recycling of complex biopolymers from plant and animal tissues. The majority of these enzymes are hydrolytic and play an important role in fungal nutrition, releasing carbon and nitrogen locked in insoluble macromolecules obtained from the metabolic activities of other organisms. Since then, fungi have been known to produce and secrete different types of enzymes in large quantities, which has led to a growing interest in the study and use of filaments in industrial processes. Amylases are among the most important enzymes used in modern biotechnology, especially in the process involving the hydrolysis of starch. Fungal amylases have major applications in the food, textile and pharmaceutical and biofuel industries. They are mainly produced by species of the genus *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Mucor*, *Humicola* and *Thermomonospora*

**Key words**

Molds - Soil - Forest - Enzymes - Amylases - Fermentation.

الملخص

الفطريات الخيطية عبارة عن كائنات دقيقة الترميمية تفرز مجموعة واسعة من الإنزيمات المشاركة في تكسير وإعادة تدوير البوليمرات الحيوية المعقدة من الأنسجة النباتية والحيوانية. غالبية هذه الإنزيمات متحللة بالماء وتلعب دورًا مهمًا في التغذية الفطرية، حيث تطلق الكربون والنيتروجين المحبوسين في جزيئات كبيرة غير قابلة للذوبان يتم الحصول عليها من الأنشطة الأيضية للكائنات الأخرى. منذ ذلك الحين، عُرف عن الفطريات أنها تنتج وتفرز أنواعًا مختلفة من الإنزيمات بكميات كبيرة، مما أدى إلى زيادة الاهتمام بدراساتها واستخدامها في العمليات الصناعية. الأميلاز من بين أهم الإنزيمات المستخدمة في التكنولوجيا الحيوية الحديثة، لا سيما في عملية التحلل المائي للنشاء. الأميلاز الفطري له تطبيقات رئيسية في الصناعات الغذائية والمنسوجات والأدوية والوقود الحيوية، حيث يتم إنتاجها بشكل أساسي بواسطة أنواع من جنس الرشاشيات، بينيسيليوم والرازبة والعفنة و اوميكولا و تيرمومونوسورا.

كلمات مفتاحية

عفن - تربة - غابة - إنزيمات - أميلاز - تخمر.

# ***INTRODUCTION GENERALE***

Aujourd'hui, les forêts du monde occupent 31% de la superficie totale de la planète, et représentent un peu plus de 4 milliards d'hectares, ce qui correspond à une moyenne de 0,6 hectare par habitant (OECD, 2003). Le sol n'est pas seulement le support dans lequel les plantes s'enracinent, mais représente un écosystème qui contient tous les grands groupes microbiens : bactéries, champignons microscopiques (moisissures), algues, archées, protozoaires (Buscot et Varma 2006). Les bactéries et les moisissures constituent les microorganismes les plus représentés dans les sols (Quénéa 2004).

Les champignons microscopiques constituent une partie importante dans l'écosystème du sol, jouant un rôle central dans les interactions biotiques et abiotiques de cet environnement (Rosas et Maciá, 2020). Ils participent à la formation des sols, à la modification des habitats pour d'autres organismes et à l'amélioration de croissance des plantes en augmentant l'absorption des nutriments et les protègent contre les agents pathogènes (Garrett 2013).

Certaines espèces possèdent des enzymes et permettent de transformer la matière organique morte en biomasse fongique, en dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>) et en petites molécules, comme les acides organiques. Ces champignons utilisent généralement des substrats complexes, tels que la cellulose et la lignine, dans le bois, et sont essentiels à la décomposition des structures cycliques de carbone de certains polluants (Frac et al. 2018). De plus ils ont une grande importance dans la biotechnologie, la santé et l'industrie grâce à leurs propriétés métaboliques, ainsi que leur capacité à produire une grande variété d'enzymes (Compaoré et al. 2017).

Outre leur rôle naturel commun en tant que catalyseurs nécessaires à la croissance fongique par la dégradation de la biomasse et des déchets (Gupta et al 2015), actuellement plus de la moitié des enzymes industrielles sont d'origine fongique et sont utilisées avec succès dans divers procédés et produits industriels (Naveen et al 2019). Certains des domaines bien connus sont la papèterie, les textiles, les détergents, les industries alimentaires, les aliments pour animaux, et les produits thérapeutiques (Polizeli et Rai 2016).

Dans le présent, travail nous allons s'intéresser aux moisissures amylolytiques caractérisant les sols forestiers. En effet, le mémoire est présenté en deux revues. Une première revue bibliographique, dans laquelle nous allons décrire les champignons microscopiques, particulièrement ceux du sol, les amylases fongiques et leurs applications. Une deuxième revue qui porte sur la description des techniques et méthodes expérimentales

utilisées dans la caractérisation partielle des moisissures et de leurs enzymes, ainsi qu'une petite synthèse des résultats des travaux cités dans la littérature en relation avec la thématique abordée.

***REVUE BIBLIOGRAPHIQUE***

## *Chapitre I*

---

### *Les Moisissures*

## **I- LES MOISSURES**

### **1. Définition des moisissures**

Le terme moisissures désigne tous les champignons microscopiques eucaryotes, filamenteux (mucorales, ascomycètes et deutéromycètes)(Reboux et al. 2010), pluricellulaires du règne des mycètes appelés les «vrais» champignons ou Eumycètes(Dragacci, Zakhia-Rozis, et Galtier 2011). Ce sont des thallophytes hétérotrophes (dépourvus de chlorophylle) et immobiles(Davet 1996; Najada et Ousmane 2013).

Certaines vivent en symbiose avec les végétaux (Sinha 2007), et d'autres sont des parasites des végétaux (Deacon 2013); en provoquant certaines maladies notamment des récoltes (pourriture grise de la vigne, ergot du seigle, rouille du blé, etc.)(Champion 1997), ou des animaux causant des mycoses chez l'homme (champignons infectieux), d'autres encore sont des saprophytes en se développant sur des déchets organiques ou de produits alimentaires (Meyer, Deiana, et Bernard 2014).

Les moisissures sont dotées de propriétés lytiques importantes (cellulolytiques, pectinolytiques, amylolytiques, protéolytiques et lipolytiques), qui en font des alliés utiles en industries laitières (affinage des fromages), production des molécules à activité pharmaceutique (antibiotiques) et production d'enzymes industrielles(Meyer, Deiana, et Bernard 2014).

Enfin, on retrouve aussi des moisissures pathogènes qui sont pour la plupart toxigènes, c'est-à-dire qu'elles produisent une toxine qui diffuse dans les matrices alimentaires, et une fois ingérées provoques des troubles et pathologies plus ou moins graves(Dragacci, Zakhia-Rozis, et Galtier 2011).

### **2. Habitat**

Les champignons sont des microorganismes ubiquitaires ; poussent presque dans tous les habitats ; l'air, l'eau, le sol, dans ou les animaux comme parasites, comme saprophytes (poussent sur le sol, les organismes morts, les humas), aussi symbiotiques que les lichens et les mycorhizes, et parfois hyperparasite sur les autres champignons(Tembhurne et al. 2016), où l'humidité et les matières organiques sont disponibles (Reddy 2001).

Le sol est un milieu très complexe, un écosystème avec de multiples composants abiotiques et biotiques(Foster et Bills 2011). Il n'est pas un milieu inerte mais un site de grande activité microbienne, et que les champignons du sol sont plus nombreux que les

champignons qui poussent ailleurs. Les champignons du sol sont classés en deux catégories: les habitants du sol et les habitants des racines, selon leur capacité compétitive (Dube 2013).

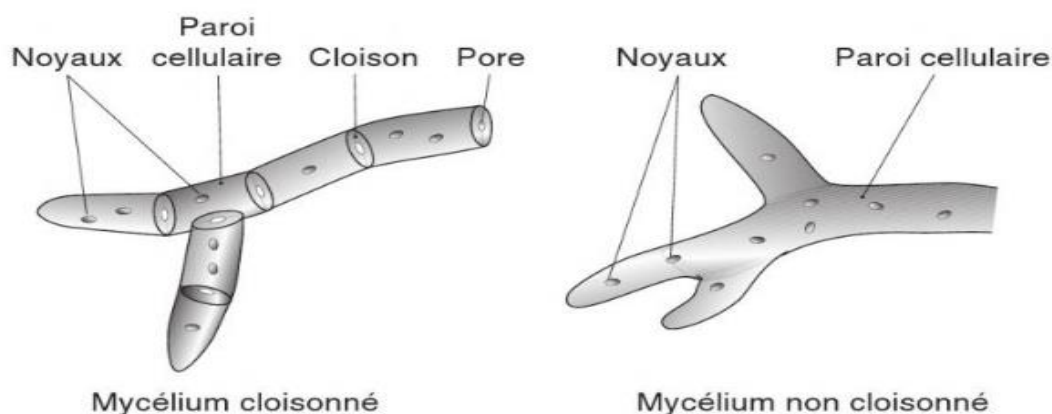
Parmi ces champignons à savoir, *Aspergillus*, *Mucor*, *Penicillium*, et *Trichoderma*. En particulier, *Mucor* et *Penicillium* se rencontrent couramment dans les sols des régions à climat tempéré ou frais, *Aspergillus* dans les sols tropicaux et *Trichoderma* se rencontre fréquemment dans les sols humides ou acides (Watanabe 2002).

Les champignons du sol intéressent les écologistes et les chercheurs appliqués en raison de leur importance dans la décomposition, le stockage du carbone et de l'azote, les cycles biogéochimiques, la stabilisation des sols et le parasitisme des plantes (Foster et Bills 2011).

### 3. Caractéristiques morphologiques des moisissures (champignons filamenteux)

Les moisissures sont des micro-organismes pluricellulaires filamenteux dont la paroi est riche en chitine (Chabasse, Guiguen, et Contet-Audonnet 1999). La structure élémentaire est appelée hyphe (filament mycélien) et l'ensemble des hyphes forment le mycélium ou thalle pluricellulaire (Dragacci, Zakhia-Rozis, et Galtier 2011).

Le mycélium peut être multicellulaire (ou septé) ou cénocytique (non septé) (voir Fig.1.) (Dube 2013), et peuvent contenir plusieurs noyaux (Bendre 2010). La présence de pores traversant ces cloisons, permet le passage intercellulaire du cytoplasme et d'organites subcellulaires, et même de noyaux qui peuvent ainsi migrer au sein du mycélium sur des distances relativement importantes (Sinha 2007).



**Figure 1** : Les deux types de mycélium, cloisonné ou non. Dans le premier cas, des pores traversent les cloisons et permettent la circulation du cytoplasme (Gobat, Aragno, et Matthey 2010).

#### 4. Development

La croissance des moisissures dépend de la nature des substrats disponibles (cellulose, lignine) et des conditions physiques (température, activité de l'eau ; aw, pH, oxygène)(Reboux et al. 2010).Le développement des moisissures comprend deux phases : une phase végétative (somatique) et une phase reproductrice(Sinha 2007).

La phase végétative chez les champignons est la croissance apicale de l'hyphe. Cette phase correspond la phase de nutrition, les hyphes absorbant à travers leur paroi les éléments nutritifs qui dégradant par émission d'enzymes et d'acides(Hudson 1992; Sinha 2007).

Dans la phase reproductrice les moisissures ont plusieurs modes de reproduction pouvant être asexuée (conidiogénèse donnant des conidies), ousexuelle (sporogénèse produisant des spores bien adaptées à la dispersion dans l'air). Les tailles de spores varient généralement de 2 à 10 µm (Douwes, Eduard, et Thorne 2017; Watkinson, Boddy, et Money 2015).

#### 5. Classification des champignons

La classification des champignons est basée sur des caractères morphologiques (l'aspect du thalle) et le mode de reproduction (Christian 2013).

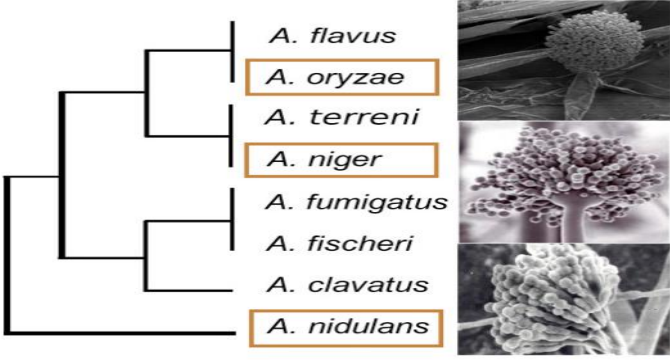
On distingue quatre divisions: *Mastigomycotina* (cette division comprend les *Oomycètes* et les *Chytridiomycètes*), *Zygomycotina*, *Ascomycotina*(elle rassemble la plupart des espèces pathogènes chez l'homme: levures ascospores, champignons filamenteux), *Basidiomycotina* (Lorsque la reproduction sexuée n'est pas connue la division est appelée *Fungi imperfecti* ou *Deuteromycotina*) (voir fig.2.)(Chabasse, Guiguen, et Contet-Audonneau 1999).

La classification utilisée actuellement ; discrimine huit divisions selon Hibbett (2011) :*Chytridiomycota* (2 classes), *Neoaillimastigomycota* (1 classe), *Blastocladiomycota*(1 classe), *Zygomycota* (4 subphyla), *Ascomycota* (3 subphyla: 15 classes), *Glomeromycota* (1 classe), *Microsporidia* (genres non reconnus), *Basidiomycota*(Dube 2013).

#### 6. Principaux genres fongiques

Les principaux genres fongiques présentés dans le tableau ci-dessous.

**Tableau 1** : Principaux genres fongiques.

Genres fongiques	Classification	Caractéristiques
<i>Aspergillus</i>	<p>Règne : <i>Fungi</i></p> <p>Division : <i>Ascomycota</i></p> <p>Classe : <i>Eurotiomycetes</i></p> <p>Sous-classe : <i>Eurotiomycetidae</i></p> <p>Ordre : <i>Eurotiales</i></p> <p>Famille : <i>Trichocomaceae</i></p> <p>Genre : <i>Aspergillus</i></p> <p>(Lauwers, Mino-Kenudson, et Kradin 2010).</p>	<p>- Le genre <i>Aspergillus</i> caractérisé par la présence des hyphes cloisonnés ramifiés à angle aigu avec des parois lisses et parallèles, dont la taille varie de 2 à 4 µm de diamètre (Lauwers, Mino-Kenudson, et Kradin 2010).</p> <p>- Se retrouvent partout dans les débris organiques tels que le foin, la végétation, le sol et la poussière en décomposition (Huang et al. 2020), les plantes en pot, le poivre et les épices (Meredith et Ulrich 2013; Mitchell, Verweij, et Hoepelman 2010).</p> <p>- Le genre <i>Aspergillus</i> contient plus de 250 espèces (voir fig.3.) (Mitchell, Verweij, et Hoepelman 2010).</p> <p>- <i>Aspergillus</i> joué un rôle important dans la transformation des aliments et dans des applications industrielles du textile, du papier, et aussi dans l'industrie pharmaceutique par la production d'enzymes et d'acide organique (Abbas 2005; Gómez, Fernández, et Vega 2016).</p>
		
		<p><b>Figure 2</b> : Arbre phylogénétique d' <i>Aspergillus</i> (Gómez, Fernández, et Vega 2016).</p>
<i>Penicillium</i>	<p>Règne : <i>Fungi</i></p> <p>Division : <i>Ascomycota</i></p> <p>Sous-division : <i>Pezizomycotina</i></p> <p>Classe : <i>Eurotiomycetes</i></p> <p>Ordre : <i>Eurotiales</i></p> <p>Famille :</p>	<p>- Est un genre principalement saprophyte, il se produit sur les légumes, les fruits, les viandes, les sols en décomposition et dans les sols forestiers sur les restes de plantes tombées et pourries (R. Gupta 2004).</p> <p>- Un grand genre qui est important sur les plans économique, écologique et médical (Asthana et Kumar 2018)</p> <p>- <i>Penicillium</i> est un genre fongique diversifié avec plus de 300 espèces connues aujourd'hui et est largement présent dans le monde entier dans divers substrats, comme</p>

	<p><i>Trichocomaceae</i></p> <p>Genre : <i>Penicillium</i></p> <p>(Reynolds 2012).</p>	<p>le sol et la nourriture, et dans divers processus de pathogénicité (Kumar et al. 2018).</p> <p>-<i>Penicillium.spp</i> , donnent également une large gamme de métabolites bioactifs ayant des propriétés antibactériennes, antifongiques, immunosuppressives , hypocholestérolémiantes et toxiques, qui peuvent être appliquées dans divers secteurs tels que la santé humaine, l'industrie et la biotechnologie(Rabha et Jha 2018).</p>
<p><b><i>Fusarium</i></b></p>	<p>Règne : <i>Fungi</i></p> <p>Division : <i>Ascomycota</i></p> <p>Classe : <i>Sordariomycetes</i></p> <p>Sous-classe : <i>Hypocreomycetidae</i></p> <p>Ordre : <i>Hypocreales</i></p> <p>Genre : <i>Fusarium</i></p> <p>(Liu 2014).</p>	<p>- <i>Le Fusarium</i> est un genre ubiquitaire trouvés dans le sol et dans divers autres substrats tels que la matière organique en décomposition ou dans des associations pathogènes ou non pathogènes avec des animaux, des plantes et d'autres organismes(Santos et al. 2020).</p> <p>-Ce genre regroupe des espèces telluriques saprophytes et des pathogènes de plantes (Hocquette et al. 2005), se trouve fréquemment dans les céréales (maïs, blé, orge, avoine) (Vesonder et Goliński 1989).</p> <p>- De nombreuses espèces de <i>Fusarium</i> produisent un certain nombre de métabolites secondaires, qui provoquent des réponses physiologiques et pharmacologiques chez les plantes et les animaux (Vesonder et Goliński 1989), et impliqués aussi en pathologie humaine, causant des mycotoxicoses et des infections qui peuvent être locales ou disséminées (Hocquette et al. 2005).</p>

## 7. Identification des champignons

Actuellement, l'identification des champignons filamenteux est basée sur l'analyse des caractéristiques morphologiques, nécessitant une évaluation et pouvant manquer de précision, ou sur les méthodes moléculaires, qui sont coûteuses et fastidieuses(Lecellier 2013).

L'identification des genres fongiques a été réalisée selon le manuel de Botton et al.(1990). En se basant sur les caractères macroscopiques des colonies (aspect, couleur, forme, contour, etc.) et sur les caractères microscopiques du mycélium et des conidies ou spores (cloisonnement du mycélium, forme des spores et conidies, forme des organes de fructification).

### 7.1. Analyse macroscopique

Pour l'observation macroscopique des moisissures, il est nécessaire de caractérisé :

- L'aspect des colonies : qui représente un critère clef d'identification. Les champignons filamenteux forment des colonies duveteuses, laineuses, cotonneuses, veloutées, poudreuses ou granuleuses.
- La couleur des colonies : c'est un élément très important d'identification. Les couleurs les plus fréquentes sont le blanc, crème, jaune, orange, brun allant jusqu'au noir. les pigments peuvent être localisés au niveau du mycélium (*Aspergillus*, *Penicillium*) ou diffuser dans le milieu de culture (*Fusarium*)(Richardson et Warnock 2012).

### 7.2. Analyse microscopique

L'utilisation d'un microscope optique a permis en photo du mycélium. Les isolats fongiques ont été identifiés selon le manuel de Botton et al.(1990).L'étude microscopique du mycélium est basée sur :

- L'absence ou présence de cloisons
- Couleur des filaments mycéliens
- Mode de ramification des cloisons
- La reproduction et les différenciation des thallospores(Schwarze, Engels, et Mattheck 2000; Elder, Baker, et Ribes 2004).

### 7.3. Analyse moléculaire

L'approche d'identification moléculaire, basée sur l'extraction de l'ADN environnemental total permet d'identifier les champignons directement (Alsohaili et Bani-

Hasan 2018), en utilisant la réaction en chaîne par polymérase (PCR), et une paire d'amorces qui permettent une amplification spécifique du groupe de gènes de l'ADN ribosomal fongique (ADNr). Avec l'électrophorèse sur gel à gradient de température, l'électrophorèse sur gel à gradient dénaturant ou le polymorphisme de conformation monocaténaire (Landeweert et al. 2003).

La sous-commission internationale sur les codes-barres fongiques a proposé la région d'espacement transcrit interne ribosomal (ITS) et le gène d'ADNr de grande sous-unité (L'ADNr18S) comme les principaux marqueurs moléculaire fongique pour l'identification des espèces. De nombreux autres marqueurs ont été conçus et largement utilisés à des fins spécifiques telles que: la sous-unité des gènes d'ARN polymérase RPB1 et RPB2, la B-tubuline (Na 2014).

## 8. Intérêt industriel des moisissures

Les champignons ont joué un rôle important dans les processus biotechnologiques anciens et modernes. Les procédés et les produits qui utilisent des champignons comprennent la cuisson, le brassage et la production d'antibiotiques, d'alcools, d'enzymes, d'acides organiques et de nombreux produits pharmaceutiques (Bennett 1998).

### 8.1. Intérêt alimentaire

Les moisissures sont utilisées dans la production d'un certain nombre d'aliments (Redhead 1990). L'une des principales fonctions des moisissures dans la fermentation des aliments est la synthèse des enzymes qui, en général, permet la conservation des aliments, améliore leur qualité nutritionnelle et augmente leurs qualités organoleptiques (Brémaud 2006) ; telle que *Penicillium camembertii*, une moisissure blanche utilisée à la surface de fromages à pâte molle comme le Camembert (Stanley 2003), *Penicillium roqueforti*, de couleur bleu-gris-vert : comme son nom l'indique, ce champignon sert à la fabrication de Roquefort (Gueguen, Desfleurs, et Lemarinier 1978).

Les enzymes dérivées à partir des champignons restent toujours les outils clés de la biotechnologie principalement dans les différentes applications alimentaires (Redhead 1990). *Aspergillus niger* la moisissure la plus abondante trouvée dans l'environnement, a également été à l'origine de plusieurs composés bioactifs et enzymes industrielles d'intérêt alimentaire (Nadumane, Venkatachalam, et Gajaraj 2016) ; telles que la production d'acide citrique et d'enzymes extracellulaires ; les amylases, les pectinases et les protéases (Nierman et Nelson 2002).

## 8.2. Intérêt pharmaceutique

Les moisissures sont utilisées dans l'industrie pharmaceutique, notamment pour la production d'antibiotiques (Boutrif 2007). La pénicilline est produite par *Penicillium chrysogenum* cultivé sur du lactose (source de carbone) et de l'extrait de levure (source d'azote) dans des fermenteurs industriels. La synthèse de la pénicilline augmente à mesure que le champignon épuise le lactose et la production est stimulée par l'aération et l'agitation (Asthana et Kumar 2018).

Les vitamines sont des constituants ou des précurseurs de coenzymes et ont une valeur documentée et acceptée pour la santé humaine et animale. Il existe une grande variation dans la capacité des champignons à synthétiser les vitamines. Parmi les vitamines produits par les champignons ; Ergostérol (provitamine D2), Cyanocobalamin B12, Vitamine B2 (riboflavine) (Madan et Thind 1998).

La riboflavine synthétisée par la combinaison des deux champignons ascomycètes étroitement liés, *Ashbya gossypii* et *Eremothecium ashbyi*, sont considérés comme les meilleurs producteurs de riboflavine (Kavanagh 2005).

## 8.3. Autres domaines

L'ergotamine un mélange d'alcaloïdes produit par *Claviceps purpurea* qu'est le premiers produit d'origine fongique utilisée en médecine, dont possède un grande efficacité pour le traitement des épidémies d'un trouble gangréneux connu sous le nom de « feu sacré », et peu de temps après ; il à été proposé de l'utilisation comme agent thérapeutique pour la migraine (Information 1961; Dowd et al. 2010).

Les protéases d'*Aspergillus oryzae* constituent l'un des groupes les plus importants d'enzymes industrielles qui ont des applications étendues dans les industries pharmaceutique, alimentaire, et aussi dans les détergents (El-Enshasy 2007; Shafique Quratulain, Nadeem Muhammad, Et Mamoona Naz 2016).

La production de cellulase par *Aspergillus flavus*, *Penicillium*, *Trichoderma* ; utilisée comme outil dans presque tous les secteurs industriels, y compris l'agriculture, la transformation des textiles, la fabrication du cuir, la transformation du papier et de la pâte (Stevenson 2016; Srivastava et al. 2019; El-Enshasy 2007).

Certains champignons tels que *Aspergillus niger*, *Penicillium purpurogenum* ou *Fusarium solani* sont capables de produire des lipides en quantités importantes et constituent une source potentielle d'utilisation chimique(Michel 1993; Lundgren 2009).

Les amylases microbiennes sont utilisées pour produire l'éthanol, du glucose et peuvent être appliquées d'autres industries(Pasin et al. 2017).

## ***Chapitre II***

---

### ***Les amylases fongiques***

## II-LES AMYLASES FONGIQUES

### 1. Généralités sur les enzymes

Une enzyme est une macromolécule, habituellement une protéine produit par un organisme vivant, et qui fonctionne comme un catalyseur biologique des réactions biochimiques, en accélérant la vitesse de la réaction (Moussard 2006). Les réactifs des réactions catalysées par des enzymes sont appelés substrats. Chaque enzyme a un caractère assez spécifique, agissant sur un ou des substrats particuliers pour produire un ou des produits particuliers(Champe, Harvey, et Ferrier 2005).

Les enzymes varient en taille moléculaire d'environ 13 000 à plusieurs millions de daltons, bien que la plupart des enzymes présentent une taille moléculaire comprise entre 30 000 et 50 000 dalton (Nagodawithana et Reed 2013).

Les enzymes peuvent être produites par des animaux, des plantes et des microorganismes(Brahmachari 2016), Les sources microbiennes ont un grand potentiel pour les applications industrielles(Budak, et Ceren 2018) , car ils peuvent être produits de manière économique dans des fermentations courtes et des milieux peu coûteux(Barredo 2005).

### 2. Classification des enzymes

En 1961, l'union internationale de biochimie (IUB) a classé et nommé les enzymes en fonction de la nature des réactions chimiques qu'elles catalysent(Fursule 2008).

Les enzymes peuvent être classées en six types; consignés dans le tableau 2.

**Tableau 2:** Classification des enzymes(Fursule 2008).

Classe d'enzymes	Type de réaction catalysée	Exemple
<b>1.Oxidoreductases</b>	Réactions d'oxydoréduction (transfert d'électrons)	Alcool déshydrogénase, exemple le cytochrome oxydase.
<b>2. Transférases</b>	Transfert de groupes fonctionnels	Hexokinase, transaminase, transméthylase, phosphorylase
<b>3. Hydrolases</b>	Réactions d'hydrolyse (Transfert de groupes fonctionnels à l'eau)	Lipase, choline estérase, pepsin, urease, phosphatases.
<b>4. Lyases</b>	Élimination de groupes pour former des doubles liaisons, ajout de groupes à doubles liaisons	Aldolase, histidase.
<b>5. Isomérases</b>	Isomérisation	Retinol isomerase, glucose phosphate isomerase
<b>6. Ligases</b>	Formation de liaisons couplée à l'hydrolyse de l'ATP	Glutamine synthétase, succinatéthiokinase

### 3. Hydrolases microbiennes

Les hydrolases sont des enzymes qui catalysent les réactions d'hydrolyse, c'est-à-dire le clivage d'une liaison chimique (C-O,C-N,C-C) par l'action de l'eau (Pandey et al. 2006). Il existe 12 sous-groupes d'hydrolases selon le type de liaison sensible. Ces enzymes sont pertinentes pour le catabolisme en fournissant des nutriments assimilables à la cellule (Illanes 2008).

Les enzymes produites par voie microbienne comme l'amylase, protéase et lipases sont privilégiées pour leur isolement plus facile en grandes quantités, leur production à faible coût en peu de temps et leur stabilité dans diverses conditions extrêmes, et leurs composés sont également plus contrôlables et moins nocifs (Gopinath et al. 2017).

Les hydrolases microbiennes occupent une position de premier plan dans le développement et l'amélioration d'une variété processus industriel et biotechnologique qu'il s'agisse d'aliments, de textiles, de médicaments, de produits laitiers ou de tout autre. grâce aux progrès de la biotechnologie moderne et de l'ingénierie des protéines (Mauro et al. 2013).

### 4. Enzymes amylolytiques microbiennes

Parmi les enzymes les plus utilisés dans les procédés industriels autres qu'alimentaires les amylases et en particulière les amylases microbiennes sont les principaux industriels demandés (Polizeli et Rai 2016).

Actuellement, grandes quantités d'amylases microbiennes sont commercialement disponible et avoir une hydrolyse complète d'amidon à appliquer dans l'industrie de transformation (Polizeli et Rai 2016).

#### 4.1. Définition

Les amylases sont une classe d'enzymes qui catalysent l'amidon en sucres tels que le glucose et le maltose (Brahmachari 2016). Les amylases sont divisées en sous-classes, selon le type de liaison qu'elles sont capables de cliver (Pandey et al. 2006).

#### 4.2. Mode d'action

- Alpha amylase (EC 3.2.1.1 $\alpha$  -1,4 - glucanglucanohydrolase)

Alpha amylase est une enzyme de type endohydrolases, c'est à dire catalysent les liaisons internes  $\alpha$ -1,4-O-glycosidiques dans les polysaccharides avec la rétention de la configuration  $\alpha$ -anomère dans les produits (Yamamoto 1994). Les caractéristiques de l' $\alpha$ -amylase sont étroitement liées aux structures des domaines constitutifs et des régions

conservées, en particulier les régions fonctionnelles telles que Ca<sup>2+</sup>-des sites de liaison, des modules de liaison aux glucides non catalytiques et des sites de liaison à la surface (Tomasik . 2003)

- $\beta$ -amylases (EC 3.2.1.2)

Les  $\beta$ -amylases (EC 3.2.1.2) sont des enzymes exohydrolases qui agissent à partir de l'extrémité non réductrice d'une chaîne polysaccharidique (Suriya et al. 2016), en hydrolysant les liaisons  $\alpha$ -1, 4-glucane pour donner des unités de maltose successives. Puisque les  $\beta$ -amylases sont incapables de cliver les liaisons ramifiées présentes dans les polysaccharides ramifiés, tels que le glycogène ou l'amylopectine, l'hydrolyse est incomplète et les unités de dextrine restent (Brahmachari 2016).

- Glucoamylase (EC 3.2.1.3 a - 1,4 - D - glucangucohydrolase)

La glucoamylase est une enzyme exotype qui élimine de façon continue le glucose de l'extrémité non réductrice de l'amidon (Gurung et al. 2013a). Dans l'industrie, l'enzyme est utilisée en combinaison avec une enzyme de ramification pour produire du glucose à partir d'amidon liquéfié par l' $\alpha$ -amylase (Schaechter 2009).

- $\alpha$ -D-glycosidase (EC 3.2.1.20  $\alpha$ -D-glycoside glucohydrolase):

En général, sont des exoenzymes d'origine microbienne. Ils hydrolysent les liaisons  $\alpha$ -1,4 et  $\alpha$ -1,6 des polysaccharides tels que l'amidon, le glycogène et les oligosaccharides d'une chaîne courte, qui sont formés par l'action d'autres amylases, libérant des unités de D-glucose des non-réducteurs fin (Tomasik et Horton 2012) .

- Exo- (1,4) -  $\alpha$ -D-glucanases (EC 3.2.1.60 1,4- $\alpha$ -D-glucanmaltotetrahydrolase /3.2.1.98 1,4- $\alpha$ -D-glucanmaltohexahydrolase):

Sont des exoenzymes qui hydrolysent les liaisons glycosidiques  $\alpha$ -1, 4, en éliminant les unités successives de glucose de l'extrémité non réductrice de la chaîne, libérant des molécules de  $\beta$ -D-glucose (Lee 2006).

- Pullulanases (EC 3.2.1.41  $\alpha$ -dextrine-6-glucanohydrolase):

Sont des enzymes qui hydrolysent les liaisons  $\alpha$ -1,6 du pullulane et d'autres oligosaccharides. Le produit d'hydrolyse correspond au maltotétraose, au maltotriose et au maltose (Doelle, Rokem, et Berovic 2009).

- Isopullulanases (EC 3.2.1.57 pullulane-4-glucanohydrolase) :

Sont des enzymes qui hydrolysent également les liaisons  $\alpha$ -1,4 du pullulane, mais elles n'ont aucune activité sur l'amidon. L'isopanose est le produit d'action finale de ces enzymes.

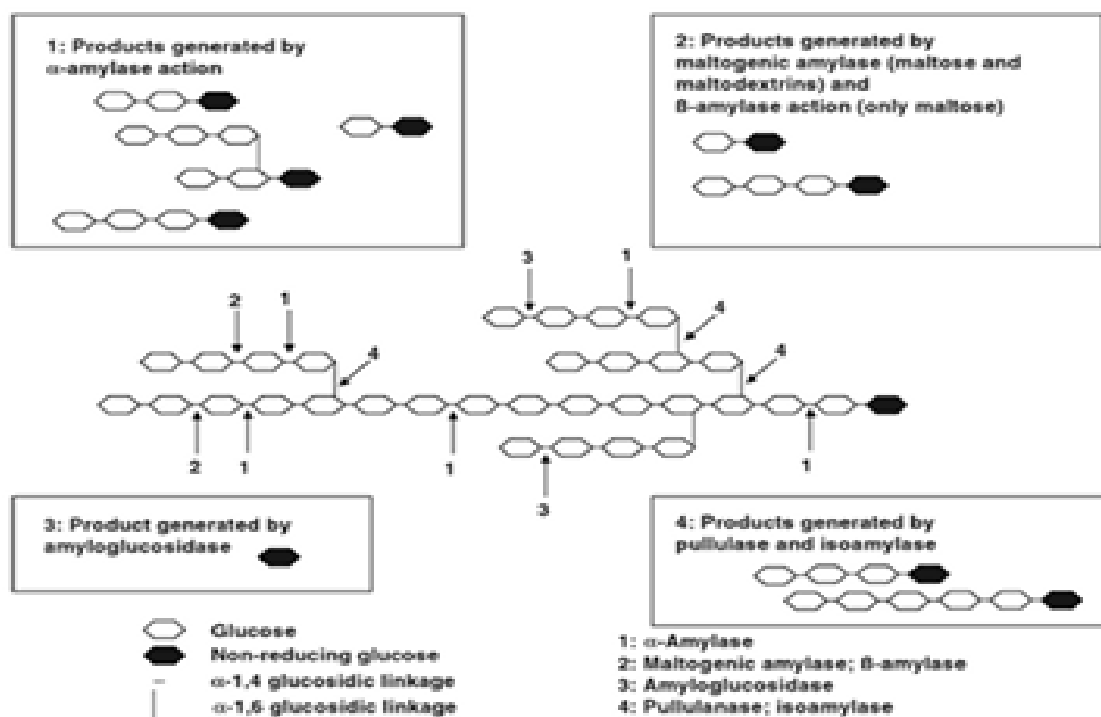
- Isoamylases (EC 3.2.1.68 glycogène-6-glucanohydrolase):

Sont des amylases qui hydrolysent les liaisons  $\alpha$ -1,6 de l'amylopectine, du glycogène et des oligosaccharides (Dumitriu 2004)(Sakano 2008).

- Cyclomaltodextrine D-glucotransférase (CGTase) (EC 2.4.1.19 1,4- $\alpha$ -D- (1,4-D-Glucan) transférase):

sont des exoenzymes qui hydrolysent l'amidon par des réactions complexes formant des oligosaccharides cycliques non réducteurs, appelés cyclodextrines(Polizeli et Rai 2016).

Le mode d'action des enzymes amylolytiques est montré dans la figure 4



**Figure 3 :** Mode d'action des amylases (Whitehurst et Oort 2009).

#### 4.3. Microorganismes amylolytiques

Les amylase sont des enzymes ubiquitaires, peuvent être obtenus à partir de plusieurs sources, telles que les plantes, les animaux et les microorganismes (Panesar 2010).

À l'heure actuelle, les amylases microbiennes sont les principaux industriels demandées (Hasan et al. 2017); sont principalement produites par la fermentation de nombreux types de microbes, tels que les procaryotes et les eucaryotes qui contiennent des gènes pour l'expression de l'amylase et ont la capacité de produire de l'amylase (Yuan 2018), en raison de leur grand nombre de caractéristiques (Polizeli et Rai 2016). La rentabilité, moins de temps et d'espace requis pour la production et la facilité de modification et d'optimisation des processus (Yuan 2018).

#### 4.3.1. Amylases bactériennes

Un grand nombre des bactéries sont connues pour la production des enzymes pour des applications commerciales. Un large éventail d'espèces bactériennes a été isolé pour la sécrétion d'amylase. La plupart sont des espèces de *Bacillus* (*B. subtilis*, *B. stearothermophilus*, *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis*, *B. coagulans*, *B. polymyxa*, *B. mesentericus*, *B. vulgaris*, *B. megaterium*, *B. cereus*, *B. halodurans*, et *Bacillus* sp. *Ferdowsicous*), *Rhodothermus marinus*, *Corynebacterium gigantea*, *Chromohalobacter* sp., *Caldimonas taiwanensis*, *Geobacillus thermoleovorans*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus manihotivorans*, et *Pseudomonas* (Gopinath et al. 2017).

#### 4.3.2. Amylases fongiques

De même, les champignons filamenteux sont largement utilisés pour la production d'amylases depuis des siècles (Panesar 2010).

Les enzymes fongiques ont l'avantage d'être sécrétées par voie extracellulaire. De plus, la capacité des champignons à pénétrer les substrats durs facilite le processus d'hydrolyse. (Gopinath et al. 2017).

Les enzymes fongiques sont limitées aux isolats terrestres, principalement à *Aspergillus* et *Penicillium* (Gurung et al. 2013). Les espèces productrices d'amylase efficaces comprennent celles du genre *Aspergillus* (*A. oryzae*, *A. niger*, *A. awamori*, *A. fumigatus*, *A. kawachii* et *A. flavus*), ainsi que les espèces *Penicillium* (*P. brunneum*, *P. fellutanum*, *P. expansum*, *P. chrysogenum*, *P. roqueforti*, *P. janthinellum*, *P. camemberti* et *P. olsonii*), *Streptomyces rimosus*, *Thermomyces lanuginosus*, *Pycnoporus sanguineus*, *Cryptococcus flavus*, *Thermomonospora curvata* et *Mucor* sp. (Gopinath et al. 2017).

## **5. Utilisation industrielle des enzymes amylolytiques**

Les applications industrielles des enzymes microbiennes se sont considérablement développées ces dernières années(Fig.5.)(Brahmachari 2016).

### **5.1. Industrie de transformation de l'amidon et des aliments**

Deux étapes principales peuvent être identifiées dans la transformation industrielle de l'amidon: l'étape de liquéfaction et de saccharification. Ces deux tapes permet de transfère l'amidon on sirop de maltose s'effectue bien sûr par l'action des enzymes amylolytique tels que l' $\alpha$ -amylase  $\beta$ -amylase et des glucoamylases peuvent également être utilisées dans le processus de saccharification (Kulp 2000).

### **5.2. Biscuiterie et Panification**

La première enzyme à être utilisée dans l'industrie de la boulangerie a été l' $\alpha$ -amylase. L'utilisation d'enzymes amylolytiques dans ce secteur industriel a pour but d'améliorer la qualité du produit final, de manière à augmenter le volume du pain (Branger, Richer, et Roustel 2009),et en formant une croûte croustillante à sa surface, en plus de modifier leur coloration et le pain devient mou et perd sa saveur (Feillet 2000).

### **5.3. Conversion de l'amidon en éthanol**

Les amylases ont joué un rôle important dans la conversion de l'amidon en éthanol en utilisant simultanément les processus de saccharification et de fermentation d'amylases dans la production d'éthanol à en partie résolu les problèmes auxquels certains pays sont confrontés concernant le manque de réserves de carburant(Polizeli et Rai 2016).

### **5.4. Détergents**

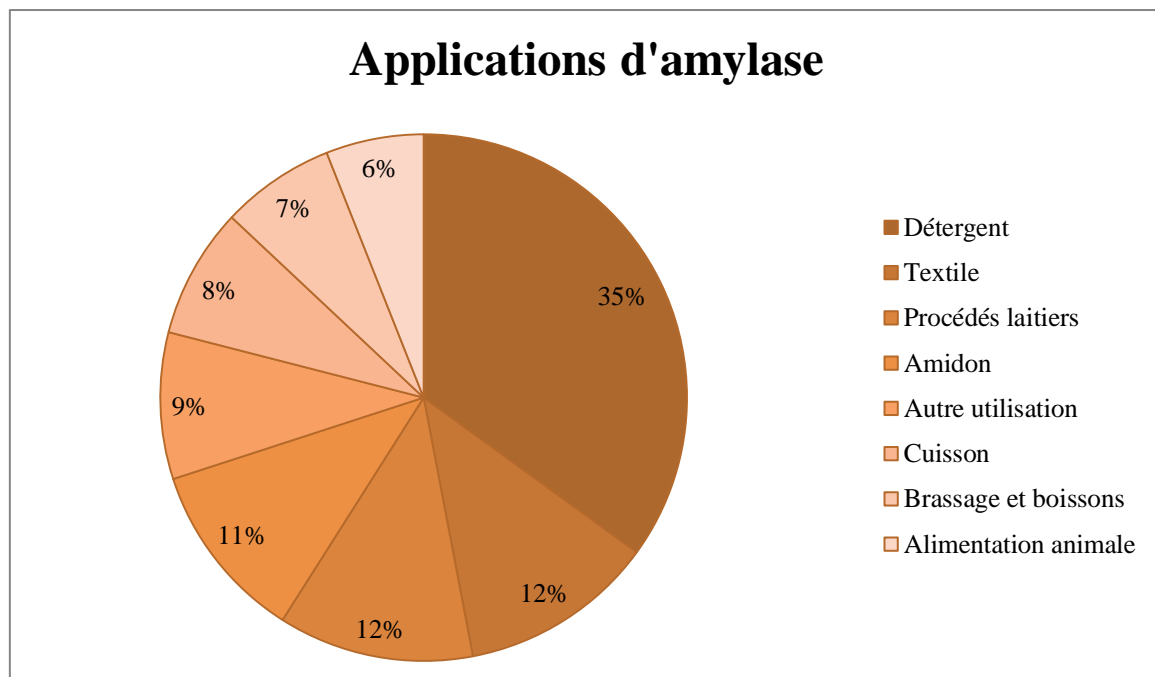
Les enzymes amylolytiques constituent l'un des ingrédients existants les plus modernes dans les détergents(Engineers 2013). Les amylases présentes dans les détergents agissent sur les taches contenant de l'amidon.et hydrolysent l'amidon en le transformant en oligosaccharides à chaîne courte qui sont solubles dans l'eau (Brahmachari 2016).

### **5.5. Papeterie et textile**

Les amylases utilisées dans l'industrie papetière dans le but de réduire la viscosité de la solution d'amidon utilisée sur le papier lors de son traitement (Bajpai 2018). Et même sur les tissus (le désencollage textile) afin de protège les fils pendant le processus de tissage (Choudhury 2006).

### 5.6. Industrie Pharmaceutique

Dans l'industrie Pharmaceutique, l'amylase utile dans Traitement du diabète et de l'obésité. L'une des stratégies de gestion du diabète et l'obésité implique, est l'utilisation des inhibiteurs de l'amylase pour contrôler les glucides, car ils corrigent les sous protections qui empêchent les amidons alimentaires d'être absorbés par le corps (Nieder, Benbi, et Reichl 2018).



**Figure 4** : Application d'amylase (Arora 2003).

# ***REVUE EXPERIMENTALE***

## ***Matériels et Méthodes***

---

---

## I-MATERIEL ET METHODES

### 1. Isolement et sélection de souches fongiques productrices des enzymes amylolytiques

#### 1.1. Echantillonnage

L'échantillonnage est réalisé par le creusement de puits de 10 à 15 cm de profondeur (Al-Enazi et al. 2018), suivi par le prélèvement de sol (environ 100g). Les échantillons sont collectés dans des sacs stériles et conservés à 4 ° C jusqu'à l'utilisation (Kushiro et al. 2017).

#### 1.2. Isolement des moisissures amylolytiques

Les étapes d'isolement et d'identification sont celles recommandées par Davet et Rouxel (1997) :

##### a. Milieux de culture

Les milieux de culture généralement utilisés pour l'isolement des champignons sont: le milieu Cazpek, Malt Agar (MA), Potato Dextrose Agar (PDA) (Annexe 1). Les milieux de culture sont stérilisés à l'autoclave à 120°C pendant 20 min, ensuite coulés dans des boites de pétri.

##### b. Réalisation des dilutions

Les dilutions sont effectuées selon la technique habituelle; une prise d'essai de 10g de l'échantillon est aseptiquement pesée et mélangée avec 90 ml d'eau physiologique stérile (solution mère). Cette suspension mère est agitée pendant 10 minutes à l'aide d'un agitateur Vortex (Silva et al. 2012), puis une série de dilutions décimales (de  $10^{-1}$  jusqu'à  $10^{-6}$ ) est réalisée.

##### c. Isolement

0,1 ml de chaque dilution est étalée à la surface des milieux gélosés Cazpek, Malt Agar et PDA additionnés d'amidon (à 1%) comme seule source de carbone, pour favoriser la croissance des moisissures à activité amylolytique.

La lecture des résultats se fait à partir du septième jour d'incubation (28°C).

##### d. Purification

La purification est réalisée par le repiquage successif (trois au minimum) des isolats sur les milieux jusqu'à l'obtention des souches pures.

### e. Sélection d'une souche à activité amylolytique

La recherche des souches amylolytiques est réalisée sur les isolats précédemment purifiés. La sélection est effectuée sur milieu PDA additionné d'amidon à 1%. Les boîtes sont incubées à 37°C pendant 2-3 jours. Après la période d'incubation, une solution de lugol est versée sur la surface de la boîte. L'iode se complexe avec l'amidon et donne un précipité bleu sombre (Sujeeta et al. 2017).

L'hydrolyse complète de l'amidon se traduit par l'apparition d'une zone claire autour des colonies. Le diamètre des zones de lyse, est pris en considération pour la sélection de la souche amylolytique la plus performante (Ratnasri et al. 2014).

### f. Conservation des souches

Les moisissures isolées sont conservées sur gélose inclinée de Malt agar (MA) pendant 3 jours pour permettre une croissance maximale. Les cultures sont alors stockées à 4 °C (Djekrif-Dakhmouche, Gillmann, et Saunier 2008).

## 1.3. Identification des isolats amylolytiques

L'identification a pour but de classer les souches fongiques par genres et espèces selon les critères d'identification, et repose essentiellement sur l'analyse des caractères morphologiques macroscopiques et microscopiques (Campbell et Johnson 2013; Botton et Larpent 1990). Ces méthodes d'identification peuvent être complétées par une analyse moléculaire (Gherbawy et Voigt 2010).

### 1.3.1 Analyse macroscopique

Les caractères sont étudiés à l'œil nu ou sous une loupe. L'analyse consiste à déterminer les caractères suivants :

- **L'aspect des colonies** : duveteux, laineux, cotonneux, velouté, poudreux, granuleux ou glabre (l'absence ou pauvreté du mycélium aérien) ;
- **Le relief des colonies**: plat, plissé ou cérébriforme ;
- **La taille des colonies**: petite, étendue ou envahissante ;
- **La couleur des colonies**: blanche, crème ou colorée (verte, brune, orangée, violette, grises...) ;

La présence d'un pigment diffusant dans la gélose ainsi que certains paramètres telle la vitesse de la pousse des colonies (rapide :  $\geq 3$  cm, modérée : entre 1 et 3 cm, lente :  $\leq 1$  cm)

ou la température de développement peuvent être de bons indicateurs pour l'identification d'une moisissure.

### 1.3.2 Analyse microscopique

Pour faire une étude microscopique, il faut d'abord réaliser des frottis des moisissures soit par un prélèvement d'un petit fragment mycélien à l'aide d'une anse de platine stérile. L'échantillon est prélevé sur la bordure de la colonie car les structures fertiles sont jeunes et le nombre de spores n'est pas excessif. De plus, les structures qui peuvent enfermer les spores sont prises (près du centre de la colonie, le nombre des spores à maturité est plus grand). Le fragment est déposé sur une lame en lui ajoutant le bleu de méthylène, ensuite recouvert d'une lamelle (Kutateladze et al. 2016), ou bien par la technique du rurbain adhésif (scotch).

Un petit morceau de papier adhésif transparent est accroché sur la pointe d'une pince. Sa face adhésive est déposée sur la surface de la colonie fongique en culture en boîte de Pétri. Ce contact permet de prélever du mycélium et des spores. La face adhésive du papier est ensuite appliquée sur une lame. Pour augmenter le contraste, une goutte de colorant du rouge Congo est déposée sur la lame juste avant d'y accoler le papier adhésif (Sallenave, 1999).

L'observation est effectuée au microscope optique aux différents grossissements ( $\times 10$ ,  $\times 40$ ) ainsi qu'à l'immersion ( $\times 100$ ). L'étude microscopique du mycélium est basée sur les organes de fructifications, types de spores, aspect et la taille du thalle, disposition des spores (Makhlouf 2019) :

- **Organes de fructification** : périthèces, cléistothèces (sexué), pycnides (asexué) ;
- **thalle**: septes (cloisonné), non septés, larges (5-15  $\mu\text{m}$ ), étroits (2-5  $\mu\text{m}$ ) ;
- **types de spores** endogènes (endospores), exogènes (conidies) ;
- **conidiophores** : absents, présents simples, ramifiés ;
- **cellules conidiogènes**: annélide, phialide. ;
- **conidies** : uni- ou pluricellulaires, solitaires, en amas ou en chaînes, forme (ronde, ovale, en massue...).

## 2. Production et dosage de l'activité amylolytique

### 2.1. La fermentation

Les souches révélées à activités amylolytiques importantes par le test qualitatif au lugol, sont sélectionnées pour la production d'enzymes par fermentation submergée (Banakar et al. 2012).

Les cultures sont cultivées dans Erlenmeyer de 250 ml contenant 100 ml du milieu suivant :  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , 0,6%;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,2%;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ , 0,2%;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,001% et 2% (p/v) d'amidon soluble. Le pH est ajusté à 7,0 puis les cultures sont incubées à 28°C pendant 7 jours (Banakar et al. 2012a; Zaferanloo et al. 2014).

### 2.2. Extraction de l'enzyme (extrait brut)

Après 7 jours d'incubation, le mycélium est éliminé par filtration sur papier filtre Whatman (Zaferanloo et al. 2014), ensuite une centrifugation à 4 ° C est effectuée à 10000 tr / min pendant 10 min. Le surnageant obtenu par centrifugation est considéré comme extrait brut des amylases produites (Korekar et Chavan 2015).

### 2.3. Dosage de l'activité amylosique

L'activité amylosique est mesurée selon la méthode de Bernfeld (1955), dont le principe est basé sur la mesure du pouvoir réducteur des sucres lors de l'hydrolyse de l'amidon. C'est à dire consiste à déterminer les concentrations en sucres réducteurs par une réaction colorimétrique, due à la présence de l'acide 3,5- dinitrosalicylique (DNS) (Alva et al. 2007), qui forme un complexe avec les sucres réducteurs et donne une coloration rouge; si il y a une forte couleur rouge donc il y a une grande production des sucres libérés (glucose) (Sahoré et Abouattier 2016).

Cette activité est mesurée dans un mélange réactionnel contenant 0.5 ml d'extrait enzymatique dilué dans du tampon phosphate citrate 0.1 M, pH 5 et 0.5 ml d'une solution de l'amidon soluble à 1 % (W/V) préparé dans le tampon phosphate citrate 0.1M, pH 5 (Priya, A., et Murugan 2016). Ce mélange réactionnel est incubé à 37°C pendant 30 minutes. La réaction est arrêtée par addition de 1 ml de DNS (Ali et al. 2017).

La lecture de l'absorbance de chaque solution est effectuée à l'aide d'un spectrophotomètre 530 nm contre un blanc (le blanc est préparé de la même façon, sans l'addition de substrat) (Sahoré et Abouattier 2016).

La quantité des sucres réducteurs est déterminée sur une droite d'étalonnage préparée avec des solutions de glucose de différentes concentrations(Sahoré et Abouattier 2016).

## ***Résultats et Discussion***

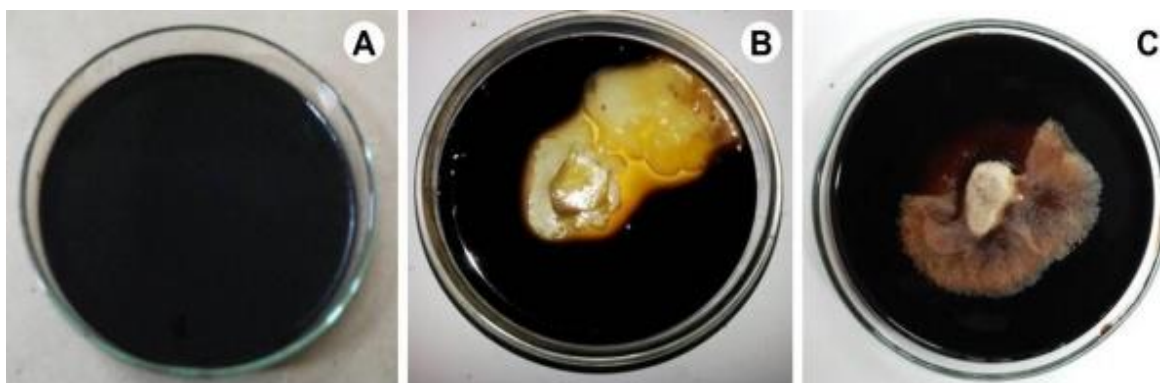
---

## II-RESULTATS ET DISCUSSION

### 1. Isolement et sélection des souches fongiques productrices des enzymes amylolytiques

Les champignons est le groupe dominant présent dans le sol à côté des bactéries (Chandini et Rajeshwari 2017), notamment les sols riches en matières organiques. Ils peuvent constituer une part importante de la biomasse souterraine, où ils ont des rôles majeurs et variés dans le fonctionnement des sols (Jeffery et al 2013).

Le lugol permet de détectées les isolats les plus performants d'amylase. Les colonies amylolytiques présentent des zones claires de la solution iodée. En effet, la combinaison entre l'amidon et l'iode, donne un complexe bleu foncé plus ou moins intense selon sa concentration (Saba et al 2017). La dégradation de l'amidon par l'amylase est montrée par un halo clair sur le milieu (Fig.6.).



**Figure 5 :** Activité enzymatique de moisissures à activité amylasique sur milieu solide: (A)Boite témoin,(B) Zone d'activité d'hydrolyse, (C)Résultat négatif d'activité amylolytique(Verma et Verma 2018).

Sivakumar Banakar et ses collaborateurs (2012) isolent 15 espèces fongiques amylolytiques à partir des échantillons de sol forestier indien (Bhadra) par la méthode de dilution en série. L'isolement des moisissures amylolytiques a été effectué sur milieu gélosé à l'amidon. La performance des isolats sélectionnés, producteurs des amylases, est effectuée par mesure des diamètres des zones d'hydrolyse formées autour des colonies ensemencées sur un milieu de culture solide. Les résultats sont exprimés dans le tableau 3.

D'autre part, Poonam Verma et ses collaborateurs (2018) ont décrit 21 espèces fongiques amylolytiques isolées à partir de 138 échantillons prélevés de sol de Dalli-Rajhara (Inde). Les résultats sont exprimés dans le tableau 4. D'autre part, Adeniranet Abiose, (2009) ; isolent au total 12 espèces fongiques à partir d'échantillons de sol agriculteur nigérian sur milieu solide constitué d'amidon soluble. Seulement 8 isolats sont considérés comme des souches productrices d'amylase (Tab.5.).

**Tableau 3:** Les espèces fongiques isolées à partir de sol forestier et leurs activités amylolytiques sur milieu solide (Banakar et al. 2012).

N°	Espèces fongiques	Activité amylolytique
1	<i>Penicillium chrysogenum</i>	+++
2	<i>Cladosporium herbarum</i>	++
3	<i>Aspergillus terreus</i>	+++
4	<i>Aspergillus candidus</i>	+++
5	<i>Eupenicillium</i> sp.	+
6	<i>Penicillium javanicum</i>	++
7	<i>Penicillium</i> sp.	+++
8	<i>Penicillium digitatum</i>	+
9	<i>Aspergillus flavus</i>	+++
10	<i>Mucor hiemenis</i>	++
11	<i>Mucor</i> sp.	+
12	<i>Cunninghamella echinulata</i>	+
13	<i>Aspergillus niger</i>	++
14	<i>Verticillium</i> sp.	+
15	<i>Aspergillus fumigatus</i>	+++

+ (activité faible) indiqué un diamètre <4, ++ (activité modérée) indiqué un diamètre 4–7 cm et +++ (activité élevée) indiquent un diamètre > 7 cm.

**Tableau 4:** Les espèces fongiques isolées à partir de sol forestier et leurs activités amylolytiques (cm) sur milieu solide (Verma et Verma 2018).

N°	Espèces fongiques	Activité amylolytique (cm)
1	<i>Alternaria alternata</i>	6.23
2	<i>Alternaria awamori</i>	3.56
3	<i>Alternaria fumigatus</i>	3.33
4	<i>Alternaria janus</i>	2.86
5	<i>Alternaria nidularis</i> var. <i>echinulatus</i>	6.16
6	<i>Alternaria parasiticus</i>	3.26
7	<i>Aspergillus</i> sp. 3	5.73
8	<i>Aspergillus</i> sp. 4	5.33
9	<i>Aspergillus terreus</i>	3.93
10	<i>Aspergillus versicolor</i>	4.36
11	<i>Fusarium chlamydosporum</i>	5.66
12	<i>Memmoniella echinata</i>	3.26
13	<i>Penicillium citreonigrum</i>	3.14
14	<i>Penicillium funiculosum</i>	5.26
15	<i>Penicillium roseopurpureum</i>	3.93
16	<i>Penicillium rugulosum</i>	4.84
17	<i>Penicillium</i> sp. 1	4.93
18	<i>Periconia hispidula</i>	4.13
19	<i>Phoma</i> sp.	4.96
20	<i>Scytalidium lignicola</i>	2.96
21	<i>Trichoderma polysporum</i>	3.33


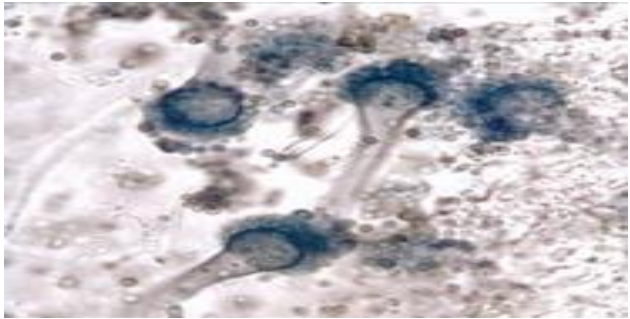
**Tableau 5:** Les espèces fongiques isolées à partir de sol et leurs activités amylolytiques sur milieu solide (Adeniran et Abiose 2009).

N°	Espèces fongiques	Activité amylolytique (cm)
1	<i>Helminthosporium oxysporium</i>	2.23
2	<i>Penicillium frequestans</i>	2.09
3	<i>Aspergillus fumigatus</i>	2.17
4	<i>Aspergillus flavus</i>	2.04
5	<i>Aspergillus fumigatus</i>	2.12
6	<i>Aspergillus niger</i>	2.14
7	<i>Aspergillus flavus</i>	2.21
8	<i>Aspergillus fumigatus</i>	2.05

## 2. Identification des isolats fongiques amylolytiques

L'identification des moisissures est généralement basée sur les critères morphologiques et culturels. La caractérisation et l'identification sommaires des isolats d'intérêt sont faits à l'échelle du genre, selon les clefs de détermination de **Botton et al.**(1990). Le tableau 6 résume les caractéristiques macroscopiques (morphologies) et microscopiques des souches amylolytiques isolées à partir de sol décrites par Guillaume (2006).

**Tableau 6** : Description morphologique et microscopique des souches fongiques amylolytiques isolées à partir de sol (Guillaume 2006).

Souche	Identification macroscopie (culture)	Identification microscopie
<i>Aspergillus fumigatus</i>	<p>Aspect : velouté avec ou sans touffes blanches de mycélium aérien</p> <p>Couleur : vert puis vert foncé a gris noirâtre.</p> <p>Revers : incolore à jaune puis rougeâtre (Fig.7.).</p>	<p>Tête : colonne compacte.</p> <p>Conidiophore : 300 microns lisse incolore.</p> <p>Phialides : 1 série parallèle fixée sur partie supérieure de la vésicule.</p> <p>Vésicule : Elargie en massue hémisphérique.</p> <p>Conidies : globuleuses 2 à 3 micromètre (Fig.8.)</p>
		
	<p><b>Figure 6</b> : Aspect macroscopique d'<i>Aspergillus fumigatus</i>.</p>	<p><b>Figure 7</b> : Observation microscopique d'<i>Aspergillus fumigatus</i> au grossissement <math>\times 40</math>.</p>

***Aspergillus niger***

Aspect : Granuleuse à broussailleuse

Couleur : Brun foncé noirâtre

Revers : Incolore, parfois diffusion d'un pigment jaune vif en début de culture (Fig.9.).

Tête : Sphérique incolore ou jaune près de la vésicule, lisse paroi épaisse

Conidiophore : Incolores ou jaunes à brunâtres près de la vésicule, lisses, paroi, épaisse

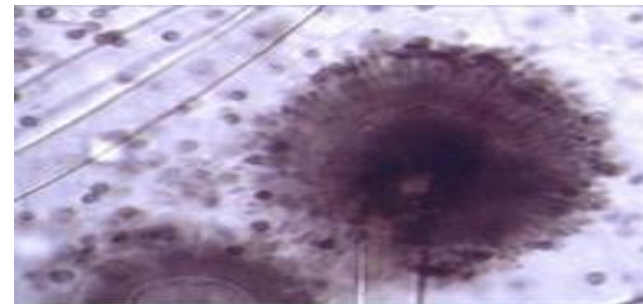
Phialides : 2 séries brunâtres

Vesicule : Globuleuse 20 à 50 micromètre

Conidies : Rondes, lisses d'abord puis rugueuses, brun sombre (Fig.10.).



**Figure 8** : Aspect macroscopique d'*Aspergillus niger*.



**Figure 9** : Observation microscopique d'*Aspergillus niger* au grossissement  $\times 40$ .

***Alternaria sp.*** Aspect : colonie duveteuse à cotonneuse

Couleur : recto blanc gris à noir

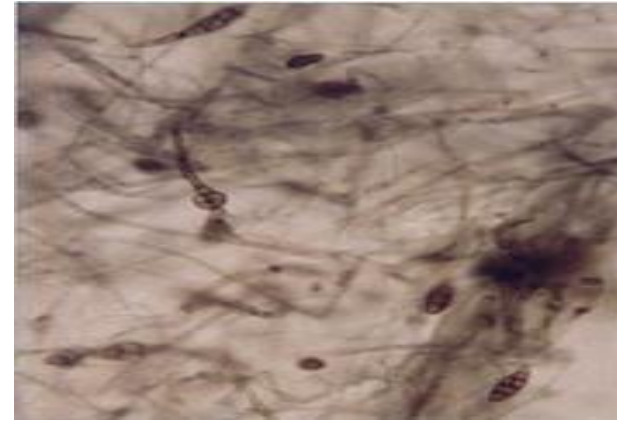
Revers : noir (Fig.11.).



**Figure 10 :** Aspect macroscopique d'*Alternaria* sp.

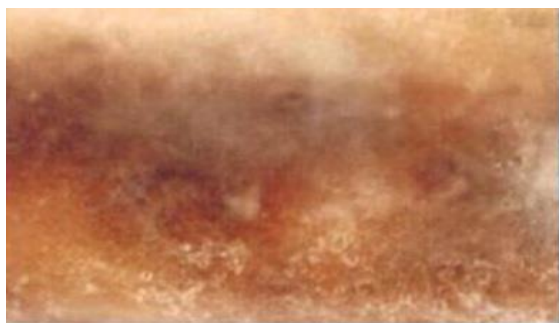
Conidiophore : court ou allongé

Conidies : terminales, produites isolément ou en chaîne simple ou ramifiée, foncées, de forme variable, cloisonnées transversalement et longitudinalement (spores murales) (Fig.12.).



**Figure 11:** Observation microscopique d'*Alternaria* sp.  
.grossissement  $\times 40$ .

***Fusarium sp.*** Aspect : colonie cotonneuse à laiteuse  
Couleur : blanche, puis se teinte en rose violet ou jaune  
Revers : incolore à jaune puis rouge foncé (Fig.13.).



**Figure 12** : Aspect macroscopique de *Fusarium sp.*

Conidiophore : isolés ou accolés en paquets (sporodochies), courts

Phialides : isolées ou groupées

Conidies : microconidies unicellulaires, ovales,, isolées ou en chaînette. Macroconidies pluricellulaires, incurvées en faucilles, aux extrémités pointues (Fig.14.).



**Figure 13** : Observation microscopique de *Fusarium sp.* au grossissement  $\times 40$ .

***Cladosporium*** sp. Aspect : colonie compacte, duveteuse

Couleur : recto noir

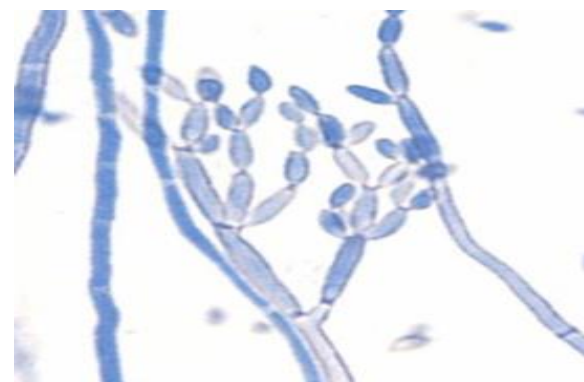
Revers : noir (Fig.15.).



**Figure 14** : Aspect macroscopique de *Cladosporium* sp.

Conidiophore : septés, bruns, à parois épaisses

Conidies : blastospores foncées, uni ou bicellulaires, ovales, isolées ou en chainettes acropétales ramifiées ou non (Fig.16.).



**Figure15** : Observation microscopique de *Cladosporium* sp. au grossissement  $\times 40$ .

***Penicillium* sp.** Aspect : surface poudreuse

Couleur : blanche au début, blanc, bleu vert le plus souvent

Revers : incolore à jaunâtre (Fig.17.).

Conidiophore : plus ou moins ramifiés, en « pinceaux »

Mycélium: septé

Phialides : à l'extrémité des ramifications

Conidies : rondes ou ovoïdes en longues chaînes hyalines ou colorées, lisses ou rugueuses (Fig.18.).



**Figure 16:** Aspect macroscopique de *Penicillium* sp.



**Figure17 :** Observation microscopique de *Penicillium* sp. au grossissement  $\times 40$ .

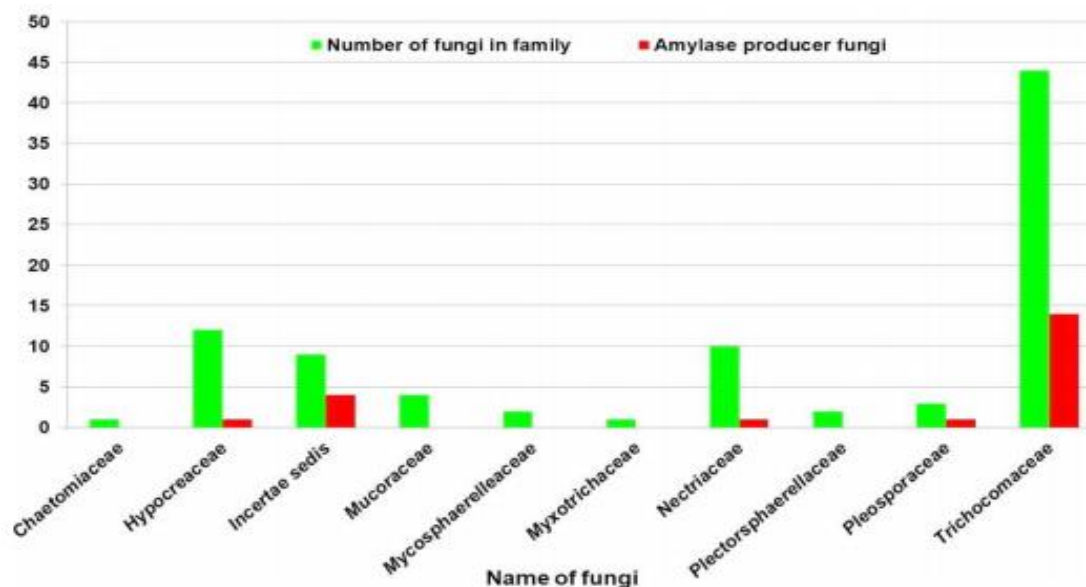
### 3. Production d'amylase

La fermentation submergée permet la croissance des souches sélectionnées dans un milieu riche en amidon pour la production d'amylase. Après 7 jours d'incubation, les filtrats de culture sont habituellement collectés par filtration pour être utilisés comme solution d'enzyme brute des amylases (Kopsahelis et Kachrimanidou 2019).

Les résultats obtenus à partir des travaux de Banakar et ses collaborateurs (2012) montrent que l'activité amylolytique maximale pour l'enzyme brute d'amylase a été observée chez les espèces suivantes : *Penicillium chrysogenum*, *Aspergillus candidus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus terreus* et *Aspergillus flavus*, *Penicillium chrysogenum*.

Outre le genre *Aspergillus* et *Penicillium*, des espèces d'autres genres tels que *Rhizopus*, *Mucor*, *Humicola* et *Thermomyces*, entre autres, apparaissent dans la littérature comme des productrices potentielles d'amylase (Polizeli et Rai 2016).

Verma et Verma (2018) ont réussi à isoler des moisissures appartenant à 29 genres. Ils ont trouvé un taux maximum d'enzyme produite par la famille des *Trichocomaceae*. Les résultats obtenus sont montrés dans la figure 19. Les souches du genre *Trichoderma* sont classées comme un groupe contenant les meilleurs producteurs d'amylase fongique (Mukherjee et al. 2013; Samson et Pitt 2000).



**Figure 18** : Famille des champignons producteurs des amylases (Verma et Verma 2018).

La première utilisation industrielle d'une enzyme fongique était une amylase d'*Aspergillus oryzae* en 1894 de la famille *Trichocomaceae*. Depuis lors, de nombreux rapports ont fait état de la production d'amylase à partir de champignons mésophiles et thermophiles, et la production d'amylase a été largement décrites chez les espèces des genres *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Mucor*, *Humicola* et *Thermomonospora* (Arora 2003; Pandey et al. 2006).

La méthode de Bernfeld (1955) est la méthode de référence utilisée dans le dosage des activités amyliques, par la mesure du pouvoir réducteur du glucose libéré lors de l'hydrolyse (lorsque le glucose est utilisé comme étalon sucre réducteur). L'activité enzymatique du filtrat est exprimée en unité par ml (U / ml), qui est définie comme la quantité d'enzyme qui libère 1  $\mu$ mole de sucre réducteur par ml et par minute dans les conditions du dosage.

Les filtrats de culture bruts ont été testés pour les activités d'amylase par Bankar et ses collaborateurs (2012), les espèces fongiques suivantes ont montré des taux d'activités différents dans les conditions de test. L'activité d'amylase après l'incubation est maximale par *Penicillium* sp. ( $0,87 \pm 0,05$  U / mL) suivi de *Penicillium chrysogenum* ( $0,69 \pm 0,05$  U / mL), *Aspergillus candidus* ( $0,67 \pm 0,03$  U / mL), *Aspergillus fumigatus* ( $0,066 \pm 0,06$  U / mL), *Aspergillus terreus* ( $0,43 \pm 0,03$  U / mL) et *Aspergillus flavus* ( $0,34 \pm 0,04$  U / mL).

***CONCLUSION GENERALE***  
***ET PERSPECTIVES***

Au cours des dernières décennies, les microorganismes en général et les champignons en particulier ont apporté une contribution significative dans certains domaines industriels car ils constituent des sources d'enzymes plus facilement exploitables que celles des végétaux et des animaux (Maria et Polizeli 2016).

D'après la littérature, l'isolement et la purification des prélèvements sont réalisés sur milieu PDA additionnés d'amidon à 1%. Les souches les plus performantes sont sélectionnées grâce au test utilisant la solution de lugol (Saba et al 2017). L'identification morphologique des souches fongiques grâce à l'étude des caractères macroscopiques et microscopiques est très importante dans la caractérisation partielle des isolats.

Plusieurs auteurs ont montré que les espèces appartenant aux genres *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Mucor*, *Humicola* et *Thermomyces* sont les plus performantes (Banakar et al. 2012). En effet de nombreux travaux se sont intéressés aux moisissures impliqués dans la production d'amylase. Les moisissures dotées d'activité amylolytique appartiennent principalement aux genres ; *Penicillium* *Aspergillus* *Rhizopus*, *Mucor*, *Humicola* et *Thermomyces*, dont les espèces d'*Aspergillus* et de *Penicillium* sont les plus dominantes (*P. chrysogenum*, *A. candidus*, *A. fumigatus*, *A. terreus* et *A. flavus*) (Banakar et al. 2012).

Cette revue bibliographique et expérimentale, a permis de mettre en exergue l'importance des moisissures colonisant le sol comme source d'enzymes amylolytiques. Elle serait de grande utilité, pour une future étude expérimentale concernant les moisissures productrices d'amylases caractéristiques du sol de la wilaya de Khenchela, jusque-là très peu étudié.

***REFERENCES***  
***BIBLIOGRAPHIQUES***

## A

**Abbas, Hamed K.** 2005. Aflatoxin and Food Safety. CRC Press.

**Adeniran, Adekanmi, et SH Abiose.** 2009. Amylolytic potentiality of fungi isolated from some Nigerian agricultural wastes. African journal of biotechnology.

**Al-Enazi, Nouf M., Amani S. Awaad, Monerah R. Al-Othman, Nour K. Al-Anazi, et Saleh I. Alqasoumi.** 2018. Isolation, Identification and Anti-Candidal Activity of Filamentous Fungi from Saudi Arabia Soil. Saudi Pharmaceutical Journal 26 (2): 253-57.

**Ali, Esam H., Mohamed A. El-Nagdy, Saleh M. Al-Garni, Mohamed S. Ahmed, et Ahmed M. Rawaa.** 2017. Enhancement of Alpha Amylase Production by *Aspergillus Flavus* AUMC 11685 on Mandarin (*Citrus Reticulata*) Peel Using Submerged Fermentation. European Journal of Biological Research 7 (3): 154-64.

**Alsohaili, Sohail, et B.M. Bani-Hasan.** 2018. Morphological and Molecular Identification of Fungi Isolated from Different Environmental Sources in Northern Eastern Jordan Deseret. Jordan Journal of Biological Sciences: 329-37.

**Alva, S., J. Anupama, J. Savla, Y. Chiu, Vyshali Pingle, Shruti Murthy, B. Yogeetha, et al.** 2007. Production and characterization of fungal amylase enzyme isolated from *Aspergillus* sp. JGI 12 in solid state culture. African Journal of Biotechnology (ISSN: 1684-5315) Vol 6 Num 5.

**Arora, Dilip K.** 2003. Handbook of Fungal Biotechnology. CRC Press.

**Asthana, Monika, et Avnish Kumar.** 2018. Understanding the Diversity of *Penicillium* Using Next-Generation Sequencing. In New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering, édité par Vijai Kumar Gupta et Susana Rodriguez-Couto, 19-43. Amsterdam: Elsevier.

## B

**Bajpai, Pratima.** 2018. Biotechnology for Pulp and Paper Processing. Springer.

**Banakar, Shivakumar, Thippeswamy Basaiah, Thirumalesh Banjagere, et Naveenkumar K.J.** 2012. Isolation, Production and Partial Purification of Fungal Amylase from Forest Soils of Bhadra Wildlife Sanctuary, Western Ghats. Inventi Rapid: Pharm Biotech & Microbio 2012 (avril): 1-7.

- Barredo, José-Luis. 2005.** Microbial Enzymes and Biotransformations. Springer Science & Business Media.
- Bendre, Ashok M. 2010.** A Text Book of Practical Botany. Rastogi Publications.
- Bennett, J. W. 1998.** Mycotechnology: The Role of Fungi in Biotechnology1Based on a Lecture Held at the Symposium, `Progress in US Biotechnology, at the 8th European Congress on Biotechnology (ECB8) in Budapest, Hungary, August 1997.1. Journal of Biotechnology 66 (2): 101-7.
- Botton, B., et Jean-Paul Larpent. 1990.** Moisissures utiles et nuisibles: importance industrielle. Masson.
- Boutrif, Ezzedine. 2007.** Les bonnes pratiques d'hygiene dans la preparation et la vente des aliments de rue en Afrique: Outils pour la formation. Food & Agriculture Org.
- Brahmachari, Goutam. 2016.** Biotechnology of Microbial Enzymes: Production, Biocatalysis and Industrial Applications. Elsevier Science.
- Branger, Alain, Marie-Madeleine Richer, et Sébastien Roustel. 2009.** Alimentation, processus technologiques et contrôles: Applications pratiques et dirigées Educagri Editions.
- Brénaud, Christelle. 2006.** Alimentation, santé, qualité de l'environnement et du cadre de vie en milieu rur: Module MP3 Bac professionnel Services en milieu rural. Educagri Editions.
- Budak, ebem, Öztürkolu, et Akal Ceren H. 2018.** Microbial Cultures and Enzymes in Dairy Technology. IGI Global.
- Buscot, Francois, et Ajit Varma. 2006.** Microorganisms in Soils: Roles in Genesis and Functions. Springer Science & Business Media.

## C

- Campbell, Colin K., et Elizabeth M. Johnson. 2013.** Identification of Pathogenic Fungi. John Wiley & Sons.
- Carlotti, Arnaud. 2014.** Identification des moisissures. Technologie/Process, 3.
- Chabasse, Dominique, Claude Guiguen, et Nelly Contet-Audonneau. 1999.** Mycologie médicale. Elsevier Masson.
- Champe, Pamela C., Richard A. Harvey, et Denise R. Ferrier. 2005.** Biochemistry. Lippincott Williams & Wilkins.
- Champion, Rémi. 1997.** Identifier les champignons transmis par les semences. Editions Quae.

**Chandini K.C, Rajeshwari N. 2017.** Isolation and identification of soil fungi in Mattavara forest, Chikamagalur Karnataka. *Journal of pharmacognosy and phytochemistry* 6(5), 721-726.

**Choudhury, A. K. Roy. 2006.** *Textile Preparation and Dyeing.* Science Publishers.

**Christian, RIPERT. 2013.** *Mycologie médicale.* Lavoisier.

**Compaoré, Hamidou, Hagrétou Sawadogo-Lingani, Serge Samandoulougou, Filbert Guira, Aly Savadogo, et Alfred S. Traore. 2017.** Aptitude de Trois Souches de Moisissures à Produire Des Enzymes Extracellulaires En Milieu Solide Au Burkina Faso. *Journal of Applied Biosciences.*

## D

**Davet, Pierre. 1996.** *Vie microbienne du sol et production végétale.* Editions Quae.

**Davet, Pierre, et Francis Rouxel. 1997.** *Détection et isolement des champignons du sol.* Editions Quae.

**Deacon, J. W. 2013.** *Fungal Biology.* John Wiley & Sons.

**Djekrif-Dakhmouche, Scheherazad, Louisa Gillmann, et Monique Saunier. 2008.** Production d'une -amylase thermostable par culture mixte des microorganismes . Laboratoire SONAS-I.U.T. Université d'Angers, 4, boulevard Lavoisier 49000 Angers, France .Laboratoire de Génie enzymatique, Dpt Sc. Nature Vie, Université Mentouri, Constantine, Algérie

**Doelle, Horst W., J. Stefan Rokem, et Marin Berovic. 2009.** *Biotechnology - Volume IX: Fundamentals in Biotechnology.* EOLSS Publications.

**Douwes, Jeroen, Wijnand Eduard, et Peter S. Thorne. 2017.** *Bioaerosols .* In *International Encyclopedia of Public Health (Second Edition)*, édité par Stella R. Quah, 210-18. Oxford: Academic Press.

**Dowd, Frank J., John A. Yagiela, Bart Johnson, Angelo Mariotti, et Enid A. Neidle. 2010.** *Pharmacology and Therapeutics for Dentistry - E-Book.* Elsevier Health Sciences.

**Dragacci, Sylviane, Nadine Zakhia-Rozis, et Pierre Galtier. 2011.** *Danger dans l'assiette.* Editions Quae.

**Dube, H. C. 2013.** *An Introduction to Fungi, 4th Ed.* Scientific Publishers.

**Dumitriu, Severian. 2004.** *Polysaccharides: Structural Diversity and Functional Versatility, Second Edition.* CRC Press.

## E

**Elder, Kay, Doris J. Baker, et Julie A. Ribes. 2004.** Infections, Infertility, and Assisted Reproduction. Cambridge University Press.

**El-Enshasy, Hesham A. 2007.** Filamentous Fungal Cultures, Process Characteristics, Products, and Applications . In Bioprocessing for Value Added Products from Renewable Resources, édité par Shang-Tian Yang, 225-61. Amsterdam: Elsevier.

**Engineers, NIIR Board of Consultants. 2013.** The Complete Technology Book on Detergents , Second Edition. Scientific Publishers.

## **F**

**Feillet, Pierre. 2000.** Le grain de blé: Composition et utilisation. Editions Quae.

**Foster, Mercedes S., et Gerald F. Bills. 2011.** Biodiversity of Fungi: Inventory and Monitoring Methods. Elsevier.

**Fraç, Magdalena, Silja E. Hannula, Marta Belka, et Małgorzata Jędryczka. 2018.** Fungal Biodiversity and Their Role in Soil Health. *Frontiers in Microbiology* 9 (avril).

**Fursule, Dr R. A. 2008.** Biochemistry Basics and Applied. Pragati Books Pvt. Ltd.

## **G**

**Garrett, S. D. 2013.** Soil Fungi and Soil Fertility: An Introduction to Soil Mycology. Elsevier.

**Gherbawy, Youssuf, et Kerstin Voigt. 2010.** Molecular Identification of Fungi. Springer Science & Business Media.

**Gobat, Jean-Michel, Michel Aragno, et Willy Matthey. 2010.** Le sol vivant: bases de pédologie, biologie des sols. PPUR Presses polytechniques.

**Gómez, S., F. J. Fernández, et M. C. Vega. 2016** Heterologous Expression of Proteins in *Aspergillus*. In *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering*, édité par Vijai Kumar Gupta, 55-68. Amsterdam: Elsevier.

**Gopinath, Subash C. B., Periasamy Anbu, M. K. Md Arshad, Thangavel Lakshmipriya, Chun Hong Voon, Uda Hashim, et Suresh V. Chinni. 2017.** Biotechnological Processes in Microbial Amylase Production . Review Article. *BioMed Research International*. Hindawi. 9 février 2017.

**Guillaume, Viviane. 2006.** Fiches de mycologie. De Boeck Supérieur.

**Gupta, Rajni. 2004.** A Textbook of Fungi. APH Publishing.

**Gupta, Vijai Kumar, Robert L. Mach, et S. Sreenivasaprasad. 2015.** Fungal Biomolecules: Sources, Applications and Recent Developments. John Wiley & Sons.

**Gurung, Neelam, Sumanta Ray, Sutapa Bose, et Vivek Rai. 2013.** A Broader View: Microbial Enzymes and Their Relevance in Industries, Medicine, and Beyond. Review Article. BioMed Research International.

## **H**

**Hasan, Md. Mahbub, Lolo Wal Marzan, Asamul Hosna, Al Hakim, et Abul Kalam Azad. 2017.** Optimization of Some Fermentation Conditions for the Production of Extracellular Amylases by Using *Chryseobacterium* and *Bacillus* Isolates from Organic Kitchen Wastes. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology* 15 (1): 59-68.

**Hibbett, David S., Anders Ohman, Dylan Glotzer, Mitchell Nuhn, Paul Kirk, et R. Henrik Nilsson. 2011.** Progress in Molecular and Morphological Taxon Discovery in Fungi and Options for Formal Classification of Environmental Sequences. *Fungal Biology Reviews*, Keynote and Plenary Papers from IMC9, 25 (1): 38-47.  
<https://doi.org/10.1016/j.fbr.2011.01.001>.

**Hocquette, A., M. Grondin, S. Bertout, et M. Mallié. 2005.** Les champignons des genres *Acremonium*, *Beauveria*, *Chrysosporium*, *Fusarium*, *Onychocola*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Scedosporium* et *Scopulariopsis* responsables de hyalohyphomycoses . *Journal de Mycologie Médicale* 15 (3): 136-49.

**Hudson, Harry J. 1992.** *Fungal Biology*. CUP Archive.

## **I**

**Illanes, Andrés. 2008.** *Enzyme Biocatalysis: Principles and Applications*. Springer Science & Business Media.

**Information, Reed Business. 1961.** *New Scientist*. Reed Business Information.

## **J**

**Jeffery S, Gardi C, et Jones A. 2013.** *Atlas Européen de la biodiversité des sols*. Publications Office. p90-95.

## **K**

**Kavanagh, Kevin. 2005.** *Fungi: Biology and Applications*. John Wiley & Sons.

**Kopsahelis, Nikolaos, et Vasiliki Kachrimanidou. 2019.** *Advances in Food and By-Products Processing Towards a Sustainable Bioeconomy*. MDPI.

**Korekar, Dr Sanjay L., et Miss Shubhangi P. Chavan. 2015.** *Studies on fungal diseases of some medicinal and aromatic plants from osmanabad district*. Lulu.com.

**Kulp, Karel. 2000.** Handbook of Cereal Science and Technology, Second Edition, Revised and Expanded. CRC Press..

**Kushiro, Masayo, Hidemi Hatabayashi, Yazhi Zheng, et Kimiko Yabe. 2017.** Application of Newly-Developed Dichlorvos–Ammonia (DV–AM) Method to Direct Isolation of Aflatoxigenic Fungi from Field Soils. *Mycoscience* 58 (2): 85-94.

**Kutateladze, L. Y., N. G. Zakariashvili, M. D. Jobava, T. A. Burduli, et T. A. Sadunishvili. 2016.** Microscopic Fungi Spread in Different Types of Soils in Western Georgia . *Annals of Agrarian Science* 14 (3): 227-32.

## L

**Landeweert, Renske, Paula Leeftang, Thom. 2003.** Applied and environmental microbiology **Kuyper, Ellis Hoffland, Anna Rosling, Karel Wernars, et Eric Smit. 2003.** Molecular Identification of Ectomycorrhizal Mycelium in Soil Horizons. 69 (janvier): 327-33.

**Lauwers, Gregory, Mari Mino-Kenudson, et Richard L. Kradin. 2010.** Infections of the Gastrointestinal Tract. In *Diagnostic Pathology of Infectious Disease*, édité par Richard L. Kradin, 215-54. New York: W.B. Saunders.

**Lecellier, Aurélie. 2013.** Détection, caractérisation et identification des moisissures par spectroscopie vibrationnelle infrarouge et Raman.

**Lee, Yuan Kun. 2006.** *Microbial Biotechnology: Principles and Applications*. World Scientific.

**Liu, Dongyou. 2014.** *Manual of Security Sensitive Microbes and Toxins*. CRC Press.

**Lundgren, Jonathan G. 2009.** *Relationships of Natural Enemies and Non-Prey Foods*. Springer Science & Business Media.

## M

**Madan, Mira, et K. S. Thind. 1998.** *Physiology of Fungi*. APH Publishing.

**Makhlouf, Joya. 2019.** Caractérisation de la biodiversité des souches d'Aspergillus de la section Flavi isolées d'aliments commercialisés au Liban : approche moléculaire, métabolique et morphologique. These de doctorat, Toulouse, INPT.

**Mauro, Tropeano, Vazquez Susana, coria Silvia, Turjanski Adrián, Cicero Daniel, Bercovich Andrés, et Mac Cormack Walter. 2013.** Extracellular Hydrolytic Enzyme Production by Proteolytic Bacteria from the Antarctic. ResearchGate. 2013.

**Meredith, Travis A., et J. Niklas Ulrich. 2013.** Infectious Endophthalmitis . In *Retina* (Fifth Edition), édité par Stephen J. Ryan, Srinivas R. Sadda, David R. Hinton, Andrew P. Schachat, Srinivas R. Sadda, C. P. Wilkinson, Peter Wiedemann, et Andrew P. Schachat, 2019-39..

**Meyer, Alphonse, José Deiana, et Alain Bernard. 2014.** Cours de microbiologie générale: avec problèmes et exercices corrigés. Rueil-Malmaison: Éditions Doin.

**Michel, Sancholle. 1993.** les lipides des champignons. *Acta Botanica Gallica*, 779-86.

**Mitchell, Thomas G., Paul Verweij, et Andy I. M. Hoepelman. 2010.** Chapter 178 - Opportunistic and Systemic Fungi. In *Infectious Diseases* (Third Edition), édité par Jonathan Cohen, Steven M. Opal, et William G. Powderly, 1823-52.

**Moussard, Christian. 2006.** Biochimie structurale et métabolique. De Boeck Supérieur.

**Mukherjee, Prasun K., B. A. Horwitz, U. S. Singh, Mala Mukherjee, et Monika Schmoll. 2013.** *Trichoderma: Biology and Applications*. CABI.

## N

**Na, Kee Peng Ng, Tuck Soon Soo-Hoo & Shiang Ling. 2014.** *A Guide to the Study of Basic Medical Mycology*. Partridge Publishing Singapore.

**Nadumane, V. K., P. Venkatachalam, et B. Gajaraj. 2016.** *Aspergillus Applications in Cancer Research* . In *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering*, édité par Vijai Kumar Gupta, 243-55. Amsterdam: Elsevier.

**Nagodawithana, Tilak, et Gerald Reed. 2013.** *Enzymes in Food Processing*. Elsevier.

**Naveen, Kango, Kumar Uttam, et Choukade Ritumbhara. 2019.** *Fungal Enzymes: Sources and Biotechnological Applications* | SpringerLink . 2019.

**Najada, Ibrahim, et Mahamane Ousmane. 2013.** *Plantes ligneuses du Niger*. L'Harmattan.

**Nieder, Rolf, Dinesh K. Benbi, et Franz X. Reichl. 2018.** *Soil Components and Human Health*. Springer.

**Nierman, William C., et Karen E. Nelson. 2002.** *Genomics for Applied Microbiology*. In *Advances in Applied Microbiology*, édité par Allen I. Laskin, Joan W. Bennett, et Geoffrey M. Gadd, 51:201-48. *Advances in Applied Microbiology*. Academic Press.

## O

**OECD. 2003.** *Examens environnementaux de l'OCDE : Italie 2002*. OECD Publishing.

## P

- Panesar, Parmjit S. 2010.** *Enzymes in Food Processing: Fundamentals and Potential Applications*. I. K. International Pvt Ltd.
- Pandey, Ashok, Colin Webb, Carlos Ricardo Soccol, et Christian Larroche. 2006.** *Enzyme Technology*. Springer Science & Business Media.
- Pasin, Thiago Machado, Vivian Machado Benassi, Paulo Ricardo Heinen, André Ricardo de Lima Damasio, Mariana Cereia, João Atílio Jorge, et Maria de Lourdes Teixeira de Moraes Polizeli. 2017.** Purification and Functional Properties of a Novel Glucoamylase Activated by Manganese and Lead Produced by *Aspergillus Japonicus* . *International Journal of Biological Macromolecules* 102 (septembre): 779-88.
- Polizeli, Maria de Lourdes T. M., et Mahendra Rai. 2016.** *Fungal Enzymes*. CRC Press.
- Priya, F., Renu A., et M. Murugan. 2016.** Isolation and production of amylase from *Aspergillus Niger* using jackfruit seed as substrate. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research* 40 (janvier): 65-67.

## Q

- Quénéa, K. 2004.** Étude structurale et dynamique des fractions lipidiques et organiques réfractaires de sols d'une chronoséquence forêt/maïs (Cestas, sud-ouest de la France), octobre.

## R

- Rabha, Jintu, et Dhruva K. Jha. 2018.** Metabolic Diversity of *Penicillium* . In *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering*, édité par Vijai Kumar Gupta et Susana Rodriguez-Couto, 217-34.
- Rao, Dubasi Govardhana. 2010.** *Introduction to Biochemical Engineering*. Tata McGraw-Hill Education.
- Rosas, Miguel, Jose G. Maciá, et Meike Piepenbring. 2020.** Diversity of Fungi in Soils with Different Degrees of Degradation in Germany and Panama . *Mycobiology* 48 (1): 20-28.
- Ratnasri, P. V., B. K. M. Lakshmi, K. Ambikadevi, et K. P. J. Hemalatha. 2014.** Extracellular Amylase from the Isolate, *Aspergillus Tubingensis* .
- Reboux, G., A. -P. Bellanger, S. Roussel, F. Grenouillet, et L. Millon. 2010.** Moisissures et habitat : risques pour la santé et espèces impliquées. *Revue Française d'Allergologie* 50 (8): 611-20.

**Reddy, S. M. 2001.** Algae, Fungi, Bryophyta And Pteridophyta. University Botany I: New Age International.

**Redhead, J. 1990.** Utilisation des aliments tropicaux: graines oleagineuses tropicales. Food & Agriculture Org.

**Reynolds, D. R. 2012.** Ascomycete Systematics: The Luttrellian Concept. Springer Science & Business Media.

**Richardson, Malcolm D., et David W. Warnock. 2012.** Fungal Infection: Diagnosis and Management. John Wiley & Sons.

## S

**Saba, Sana, Mansoor Nawaz, et Ahmad Mansur-ud-Din. 2017.** Diversity of Soil Born Estarch Hydrolyzing Fungi of Livestock Farms. Journal of animal and plant sciences 27(2):407-414

**Sahoré, Alexis Drogba, et Joachim Levry Abouattier. 2016.** Quelques méthodes d'analyse biochimique de produits alimentaires. Editions Publibook.

**Sakano, Yoshiyuki. 2008.** Why Could Isopullulanase, An Odd Pullulan Hydrolyzing Enzyme, Be Discovered. In Carbohydrate-Active Enzymes, édité par Kwan-Hwa Park, 37-44. Woodhead Publishing..

**Santos, Ana Carla da Silva, Athaline Gonçalves Diniz, Patricia Vieira Tiago, et Neiva Tinti de Oliveira. 2020.** Entomopathogenic Fusarium Species: A Review of Their Potential for the Biological Control of Insects, Implications and Prospects. Fungal Biology Reviews 34 (1): 41-57.

**Schaechter, Moselio. 2009.** Encyclopedia of Microbiology. Academic Press.

**Schwarze, Francis W. M. R., Julia Engels, et Claus Mattheck. 2000.** Fungal Strategies of Wood Decay in Trees. Springer Science & Business Media.

**Shafique Quratulain, Nadeem Muhammad, et Mamoona Naz. 2016.** Production of alkaline protease from *Aspergillus oryzae* via static liquid surface culture technique and its potential application as a detergent additive . International Journal of Biology, Pharmacy and Allied Sciences (IJHPAS), 227-45.

**Silva, Neusely da, Marta Hirotomi Taniwaki, Valéria Christina Junqueira, Neliane Silveira, Maristela da Silva do Nascimento, et Renato Abeilar Romeiro Gomes. 2012.** Microbiological Examination Methods of Food and Water: A Laboratory Manual. CRC Press.

**Sinha, A. K. 2007.** Botany For Degree Students Fungi. S. Chand Publishing.

**Stevenson, Marguerite. 2016.** Cellulase: Production, Applications and Health Benefits. Nova Science Publishers, Incorporated.

**Sujeeta, Kamla Malik, Shikha Mehta, et Khushboo Sihag. 2017.** Isolation and Screening of Amylase Producing Fungi .

**Suriya, J., S. Bharathiraja, M. Krishnan, P. Manivasagan, et S. -K. Kim. 2016.** Marine Microbial Amylases: Properties and Applications . In *Advances in Food and Nutrition Research*, édité par Se-Kwon Kim et Fidel Toldrá, 79:161-77. *Marine Enzymes Biotechnology: Production and Industrial Applications, Part II - Marine Organisms Producing Enzymes*. Academic Press.

## T

**Tembhurne, Dr R. R., Dr N. S. Mali, Shri S. U. Shinde, Shri D. S. Bhise, et Mrs S. M. Satpute. 2016.** A TEXT-BOOK OF BOTANY. Lulu.com.

**Tomasik, Piotr. 2003.** Chemical and Functional Properties of Food Saccharides. CRC Press.

**Tomasik, Piotr, et Derek Horton. 2012.** Enzymatic Conversions of Starch. In *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, édité par Derek Horton, 68:59-436. Academic Press.

## V

**Verma, Poonam, et Ram Verma. 2018.** Qualitative estimation of amylase enzyme activity of fungal species isolated from iron ore mined overburden soil . *Tropical Plant Research* 5 (décembre): 396-404.

**Vesonder, Ronald F., et Piotr Goliński. 1989.** Metabolites of fusarium . In *Fusarium*, édité par J. Chelkowski, 2:1-39. *Topics in Secondary Metabolism*. Amsterdam: Elsevier.

## W

**Watanabe, Tsuneo. 2002.** Pictorial Atlas of Soil and Seed Fungi: Morphologies of Cultured Fungi and Key to Species, Second Edition. CRC Press.

**Watkinson, Sarah C., Lynne Boddy, et Nicholas Money. 2015.** The Fungi. Academic Press.

**Whitehurst, Robert J., et Maarten Van Oort. 2009.** Enzymes in Food Technology. John Wiley & Sons.

## Y

**Yamamoto, Takehiko. 1994.** Enzyme Chemistry and Molecular Biology of Amylases and Related Enzymes. CRC Press.

**Yuan, Zhenhong. 2018.** *Microbial Energy Conversion*. Walter de Gruyter GmbH & Co KG.

## Z

**Zaferanloo, Bitra, Shatabdi Bhattacharjee, Mahmood M Ghorbani, Peter J Mahon, et Enzo A Palombo. 2014.** Amylase production by *Preussia minima*, a fungus of endophytic origin: optimization of fermentation conditions and analysis of fungal secretome by LC-MS. *BMC Microbiology* 14 (mars): 55.

# *ANNEXES*

---

➤ **Milieu PDA (pomme de terre glucosée et gélosée)**

<b>Amidon soluble</b>	<b>5g</b>
<b>Extrait de levure</b>	<b>0,75g</b>
<b>Extrait de viande</b>	<b>0,75g</b>
<b>Peptone</b>	<b>2,5g</b>
<b>NaCl</b>	<b>2,5g</b>
<b>MgSO4</b>	<b>0,25g</b>
<b>KH2PO4</b>	<b>0,25g</b>
<b>KCl</b>	<b>0,25g</b>
<b>Eau distillée</b>	<b>500 ml</b>

Faire cuire 200 g de pommes de terre pelées, lavées et coupées en tranches fines dans 1 l d'eau pendant 1 h. Filtrer sur plusieurs d'étamine puis presser pour exprimer le liquide restant. Ajouter g de glucose et 15 à 20 g de gélose. Compléter à 1 l si nécessaire. Autoclaver 15 min à 121 °C. Ce milieu existe aussi tout préparé dans le commerce.

➤ **Milieu de Czapek**

<b>NaNO3</b>	<b>2g</b>
<b>K2HPO4</b>	<b>1g</b>
<b>MgSO4, 7H2O</b>	<b>0,5g</b>
<b>KCl</b>	<b>0,5g</b>
<b>FeSO4, 7H2O</b>	<b>0,01g</b>
<b>Saccharose</b>	<b>30g</b>
<b>Gélose</b>	<b>15g</b>
<b>Eau distillée</b>	<b>1000 ml</b>

Autoclaver à 121 °C pendant 15 min. Ce milieu existe aussi tout préparé dans le commerce. Le milieu de Czapek-Dox contient 3 g de NaNO3 au lieu de 2 g.

➤ **Milieu à l'extrait de malt (malt extract agar)**

<b>Extrait de malt</b>	<b>25g</b>
<b>Gélose</b>	<b>20g</b>
<b>Eau distillée</b>	<b>1000 ml</b>

Ce milieu existe tout préparé dans le commerce. Les préparations commerciales contiennent généralement du glycérol et 1 g/l de peptone.