

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

جامعة سعيدة الدكتور مولاي الطاهر

Université de Saida-Dr MOULAY Tahar



كلية العلوم

Faculté des Sciences

قسم البيولوجيا

Département de Biologie

Mémoire pour l'obtention du diplôme de Master

Es Sciences biologiques

Spécialité : Microbiologie Appliquée

Thème

N° d'Ordre

Criblage des microorganismes fermentaires à potentiel amyolytiques isolée a partir les produits fermentaire

Présenté par :

- Boudouaia Fatima Zohra
- Chagag Zahra

Soutenu le :

Devant le jury composé de :

Président	Mr. Kebir Nasreddine	MCA Université de Saida
Examineur	Mr. Benreguieg Mokhtar	MCA Université de Saida
Rapporteur	Mme Chahrour Wassila	MCB Université de Saida
Co-Rapporteur	Mr. Bellil Yahia	MCA Université de Saida

Année universitaire 2021/2022

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

جامعة سعيدة الدكتور مولاي الطاهر

Université de Saida-Dr MOULAY Tahar



N° d'Ordre

كلية العلوم

Faculté des Sciences

قسم البيولوجيا

Département de Biologie

Mémoire pour l'obtention du diplôme de Master

En Sciences biologiques

Spécialité : Microbiologie Appliquée

Thème

Criblage des microorganismes fermentaires à potentiel amylolytiques isolée a partir les produits fermentaire

Présenté par :

- Boudouaia Fatima Zohra
- Chagag Zahra

Soutenu le :

Devant le jury composé de :

Président	Mr. Kebir Nasreddine	MCA Université de Saida
Examineur	Mr. Benreguieg Mokhtar	MCA Université de Saida
Rapporteur	Mme Chahrour Wassila	MCB Université de Saida
Co-Rapporteur	Mr. Bellil Yahia	MCA Université de Saida

Année universitaire 2021/2022

Dédicaces



Remerciements

Avant tous, nous remercions **ALLAH** tout puissant de nous avoir accordé la force, le courage, la patience et la chance d'étudier et de suivre le chemin de la science.

Nos remerciements les plus sincères s'adressent en premier lieu à notre encadreur Me. **Chahrour Wassila** et co-encadreur **Mr Bellil Yahia** pour ses conseils judicieux et son appui tout au long de cette étude et surtout pour ses nombreuses critiques constructives. Votre sérieux, votre compétence et votre sens du devoir nous ont énormément marqués.

Nos remerciements s'adressent également à tous les membres de jury qui ont bien voulu accepter de juger ce modeste travail, **Mr kibir Nasreddine** qui nous a fait l'honneur de présider ce jury, et **Mr Benreguieg Mokhtar** qui nous a honorés de bien vouloir examiner ce travail.

Nos vifs remerciements vont à **M. Ahmed**, ingénieur de laboratoire au niveau d'université de **Saida-Dr Moulay Taher**, pour son aide précieuse.

Nous n'oublions pas de remercier l'ensemble des enseignants qui ont contribué à nos formations, et tous nos collègues de promotion 2022, Master II Microbiologie Appliquée.

Finalement, nous remercions nos amies, nos familles qui nous ont soutenus avec patience et qui nous ont donné leur confiance, merci pour leur encouragement et leur compréhension. Nous leur exprimons notre éternelle gratitude.

A tous ceux qui nous ont aidés à accomplir cette tâche, soit directement ou indirectement, nous disons: Merci.

Liste des abréviations

% : pourcentage

BL : les bactéries lactiques

C°: degree

G: gram

KDa: kilodalton

Min: minute

ml: millilitre

pH: potentiel hydrogène

SMF : submergée fermentation

SSF : solide substrat fermentation

Tr : tourne

U:unité

V: volume

Liste des tableaux

Tableau 1 : Quelques micro-organismes producteurs d' α -amylase.	13
Tableau 2 : Les bactéries lactiques amylolytique.....	24
Tableau 3 : Aspect macroscopique des souches isolées sur des milieux MRS, PDA, OGA.	34
Tableau 4 : les résultats obtenus d'isolement, purification et de coloration de Gram.....	36
Tableau 5 : Observation microscopique et macroscopique des champignons.....	38
Tableau 6: résultats de production d'alpha amylase.....	40

Liste des figures

Figure 1 : Structure tridimensionnelle de l'alpha amylase	6
Figure 2 : comparaison entre la Fermentation submergée et la Fermentation en substrat solide	10
Figure 3 : Schéma d'un arbre phylogénétique, sans racines, des BL ; les distances évolutives sont approximative	19
Figure 4 : La conversion de l'amidon en acide lactique par la voie directe et indirecte de la fermentation	23
Figure 5 : les échantillons de blé fermenté	27
Figure 6 : les échantillons des légumes fermentés.....	28
Figure 7 : La préparation de solution mère et dilution décimale La Pré identification des souches.	29
Figure 8 : application de solution amidonnée sur les morceaux de tissu.....	32
Figure 9 : pourcentage des bactéries lactique apport aux Gram, forme et catalase.	39
Figure 10 : la mise en évidence de l'activité amylasique (résultat positive /résultat négative).	39
Figure 11 : Activité amylolytique chez les 03souches.....	42
Figure 12 : Activité amylolytique chez les moisissures.....	43
Figure 13 : Test de désencollage pour les souches (cB ₂ 1, cB ₃ 1, cB ₁ 4)	44

Résumé

La fermentation naturelle est un moyen économique, efficace pour améliorer la qualité nutritionnelle et sanitaire des aliments. Les microorganismes constituent la principale source d'enzymes industrielles. Ce travail est mené pour sélectionner des souches capables de synthétiser l'alpha amylase. Quatre échantillons de blé, carotte, betterave et olive fermenté ont été choisis pour l'isolement; d'où on a pu isolée 54 isolats, des tests de caractérisation phénotypique préliminaire été utilisée. La mise en évidence de l'activité amyolytique sur milieu MRS _{amidon} et AAM permet de cribler 11 souches susceptible d'être bactéries lactiques et quatre souches de genre *Penicillium sp* possèdent le pouvoir amyolytique d'où on observe une activité remarquable chez *Penicillium*. Les souches de *Lactobacillus* cB₂ 1, cB₃ 1, cB₁ 4 subissent un test de désencollage dans laquelle on observe quelques zones d'hydrolyse.

Ces résultats donnent un aperçu sur les différents types des microorganismes producteurs d'alpha amylase qui peuvent jouer un rôle primordial dans industrie.

Mots clés : Bactéries lactiques amyolytique, alpha amylase, *Lactobacillus*, aliments fermentés, *Penicillium sp*.

Abstract

Natural fermentation is an economical, effective way to improve the nutritional and health quality of food. Microorganisms are the main source of industrial enzymes. This work is carried out to select strains capable of synthesizing alpha amylase. Four fermented wheat, carrot, beet and olive samples were chosen for isolation; from which 54 isolates were isolated, preliminary phenotypic characterization tests were used. The demonstration of amylolytic activity on MRS starch and AAM medium makes it possible to screen 11 strains likely to be lactic acid bacteria and four strains of the genus *Penicillium sp* have the amylolytic power from which a remarkable activity is observed in *penicillium*. *Lactobacillus* strains cB2 1, cB3 1, cB1 4 undergo a desizing test in which some areas of hydrolysis are observed.

These results provide insight into the different types of alpha amylase-producing microorganisms that may play a key role in industry.

Keywords: Amylolytic lactic acid bacteria, alpha amylase, *Lactobacillus*, fermented foods, *Penicillium sp*.

ملخص

التخمير الطبيعي هو وسيلة اقتصادية وفعالة لتحسين الجودة الغذائية والصحية للأغذية والكائنات الدقيقة هي المصدر الرئيسي للإنزيمات الصناعية ، ويتم هذا العمل لانتقاء سلالات قادرة على إنتاج ألفا أميليز. تم اختيار أربع عينات من القمح والجزر والشمندر والزيتون للعزل. تم عزل 54 عزلة ، واستخدمت اختبارات على amyolytic الخصائص المظهرية الأولية. إن إظهار نشاط يجعل من الممكن فحص 11 سلالة من المحتمل AAM ووسط MRS أن تكون بكتيريا حمض اللاكتيك وأربع سلالات من جنس التي من خلالها يتم ملاحظة amyolytic لها قوة *Penicillium sp* نشاط ملحوظ في البنسيليوم

تخضع سلالات *Lactobacillus cB2 1* و *cB3 1* و *cB1 4* لاختبار إزالة التحلل حيث يتم ملاحظة بعض مناطق التحلل توفر هذه النتائج نظرة ثاقبة لأنواع المختلفة من الكائنات الحية الدقيقة المنتجة لـ *alpha amylase* والتي قد تلعب دورًا رئيسيًا في الصناعة.

الكلمات المفتاحية: بكتيريا حمض اللاكتيك الأميلوليت ، ألفا أميليز ، اللاكتوباسيلوس ، الأطعمة المخمرة ، البنسليوم *sp*

Table des matières

II.1. Introduction	2
II.1.1. Définition :.....	5
II.1.2. Nomenclature :.....	5
II.1.3. Classification :.....	5
II.1.4. Structure :.....	6
II.1.5. Mécanisme d'action :.....	7
II.1.6. Caractéristique générale :	7
II.1.6.1. Spécificité de substrat :.....	7
II.1.6.2. Effet de la température sur l'activité de α -amylase :.....	7
II.1.6.3. Effet de pH sur l'activité de α -amylase	8
II.1.6.4. Effet des ions métalliques	8
II.1.6.5. Répartition des amylases dans le monde vivant.....	8
II.1.6.6. Méthodes de biosynthèse de l' α -amylase.....	8
II.1.6.7. Fermentation en substrat solide.....	9
II.2. Introduction	11
II.2.1. L'avantage de production des enzymes par les microorganismes	11
II.2.1.1. Intérêt industriel des moisissures.....	11
II.2.1.2. Intérêt industriel des levures.....	11
II.2.2. Application industrielles et biotechnologiques des amylases:	14
II.2.2.1. Panification et industrie boulangère:.....	14
II.2.2.2. En sucrerie:	14
II.2.2.3. En textile:.....	15
II.2.2.4. Détergents :	15
II.2.2.5. Domaine médicale et pharmaceutique:	15
II.2.3. Importance de la fermentation des céréales.....	16
II.2.4. La bio préservation.....	16
II.2.5. Microbiote des aliments fermentent à base de céréales.....	17
II.2.6. Flore lactique et céréales fermentées.....	17
II.2.6.1. Bactéries lactiques impliquées dans la fermentation des céréales	19
II.2.6.2. Flore fongique impliquée dans la fermentation des céréales	21

II.2.7. L'utilisation des bactéries lactiques amylolytiques en biotechnologie.....	22
II.2.8. Les enzymes amylolytiques produits par les bactéries lactiques.....	25
III.1. Echantillonnage.....	27
III.1.1. Préparation des échantillons.....	27
III.1.1.1. Blé fermenté.....	27
III.1.1.2. Légumes fermentés.....	27
III.1.2. Isolement et purification des microorganismes :.....	28
III.1.3. Etude phénotypique.....	29
III.1.3.1. Critères morphologiques.....	29
III.1.4. Pré identification des bactéries lactiques.....	30
III.1.4.1. Recherche de catalase.....	30
III.1.4.2. Test de type fermentaire :.....	30
III.1.4.3. Test de température 45°C.....	30
III.1.5. Conservation des souches :.....	30
III.1.5.1. Conservation à courte durée.....	30
III.1.5.2. Conservation à long durée.....	31
III.1.6. Mise en évidence des activités enzymatiques.....	31
III.1.6.1. La recherche de l'activité amylolytique.....	31
III.1.6.2. Test d'application de l' α -amylase comme un agent de désencollage.....	31
IV.1. Isolement et purification des microorganismes.....	34
IV.1.1. Isolement et purification des microorganismes.....	34
IV.1.2. Isolement et purification des moisissures.....	36
IV.1.3. Mise en évidence des activités enzymatiques.....	40
IV.1.4. Pré identification des souches.....	41
IV.1.5. Test d'application de l' α -amylase comme un agent de désencollage.....	44
VII.1. Annexe.....	63

PARTIE I. INTRODUCTION

Introduction

Les enzymes de la famille des hydrolases telles que l'amylase sont l'une des enzymes les plus importantes en biotechnologie (Gupta *et al.*, 2003). Elles représentent environ 25 à 33% du marché mondial des enzymes (Saxena *et al.*, 2007).

En biotechnologie, l'amylase est une enzyme cruciale, principalement obtenue à partir de microbes et a de nombreuses applications industrielles (Gopinath *et al.*, 2017).

Alpha amylase est largement utilisée dans de nombreuses industries, y compris la liquéfaction de l'amidon, brassage, alimentation, papier, textile et pharmaceutique (Arican, 2008).

L'industrie textile est l'un des plus grands contributeurs à la pollution de l'environnement due au désencollage des tissus, aux produits chimiques de blanchiment et aux teintures. Dans de telles industries, les enzymes sont utilisées pour permettre le développement de technologies respectueuses de l'environnement dans le traitement des fibres (Choi *et al.*, 2015).

Les bactéries lactiques (BL) ont la capacité de croissance sur différentes matrices alimentaires et produisent des activités enzymatiques très diverses qui sont notamment capables de modifier positivement les propriétés organoleptiques des aliments fermentés.

Dans notre étude de la production d'amylase, des bactéries lactiques et des champignons ont été sélectionnés comme milieux de fermentation en raison de leur production à grande échelle et de leur manipulation facile pour obtenir des enzymes aux propriétés souhaitées (Lonsane *et al.*, 1990).

Les atouts nutritionnels et thérapeutiques combinés des végétaux et les microorganismes bénéfiques nous ont conduits à l'idée d'isoler et sélectionner des microorganismes amylolytiques.

En ce sens, nous avons procédé à une recherche sur les microorganismes fermentaires à potentiel amylolytiques impliquée dans la fermentation des produits fermentés.

Ce travail comporte quatre parties :

La première partie : consiste à introduire le sujet par des rappels bibliographiques ; ensuite une partie où on a entamé la partie expérimentale par l'isolement et l'identification des microorganismes (bactérie et moisissure) ; l'étude de l'activité amylolytique fongique, bactérienne et l'essai d'application d' α -amylase dans l'industrie textile ; puis la dernière partie dans laquelle notre travail termine par conclusion et référence bibliographique.

PARTIE II. RAPPEL BIBLIOGRAPHIQUE

II.1. Généralité

II.2. Introduction

L'alpha-amylase est considérée comme l'une des enzymes industrielles les plus importantes (Gupta *et al.*, 2008). C'est une macromolécule appartenant à la classe des protéines globulaires, de type endoglycanase, et des hydrolases qui agissent sur la liaison α (1 \rightarrow 4) de l'amidon (Nouadri, 2011). Largement présent chez les animaux, les plantes et les microorganismes (Janecek, 1994). Les alpha-amylases d'origines différentes partagent peu de la même séquence d'acides aminés, mais leur structure tridimensionnelle et la composition de leurs sites actifs sont similaires. Leurs sites actifs sont composés de plusieurs sous-sites, chacun pouvant contenir des résidus de glucose dont le nombre dépend de l'origine de l'enzyme (Nouadri, 2011).

II.2.1. Définition :

Parmi les enzymes, l'alpha amylase est une macromolécule appartenant à la classe des protéines globulaires (Nouadri, 2011). C'est une enzyme amylolytique importante participant à l'hydrolyse de l'amidon la plus courante glucide dans la nature (Zhang *et al.*, 2017).

II.2.2. Nomenclature :

- ✓ Nom systématique : α -(1,4) D-glucane glucohydrolase.
- ✓ Nom codifié : EC 3.2.1.1.
- ✓ Nom recommandé : alpha-amylase.
- ✓ Synonymes : Glucogenase, Endoamylase, Maxilase, Taka amylase A, Takatherm, Termolase, Amylotherm, Clarase, Amylospin, Spitase CP1, G995, Kleistase L1, THC250, Maxamy, Ptyalin (Nouadri, 2011).

II.2.3. Classification :

D'après l'Union Internationale de Biochimie et de Biologie Moléculaire (UIBMB) et (Dakhmouche-Djekrif, 2016 ; Zhang *et al.*,2017) les amylases sont classées en trois groupes selon leur mécanisme d'action :

Les endoamylases : Elles hydrolysent les liaisons α -1,4 dans l'amidon et libèrent des oligosaccharides et des dextrines, on a principalement l' α -amylase (EC 3.2.1.1) dans cette classe.

Les exoamylases : Elles renferment la β -amylase (EC 3.2.1.3), l' α -glucosidase (EC 3.2.1.20) et la glucomylase (EC 3.2.1.3). Et en résumé leur mécanisme d'action par la libération des sucres simples à poids moléculaires faibles comme le glucose... etc.

Les enzymes débranchantes : α -1,6 de l'amylopectine. Parmi ces enzymes on a la pullulanase (EC 3.2.1.41), et l'isoamylase (EC 3.2.1.68).

II.2.4. Structure :

Les α -amylases sont également considérées comme des glycoprotéines renfermant 478 acides aminés répartis en 2 domaines globulaires appelés A (1-380 résidus) et B (381-478 résidus) (Nouadri, 2011). Ces domaines sont associés par une chaîne polypeptidique constituée principalement de résidus hydrophobes (**Figure01**) La partie glucidique est formée essentiellement de mannose, les résidus constituant le site de fixation du substrat ainsi que ceux constituant le site catalytique sont localisés dans le domaine A qui montre que l' α -amylase est formée de 8 feuillets β plissés et de 8 hélices α (Maktouf, 2013).

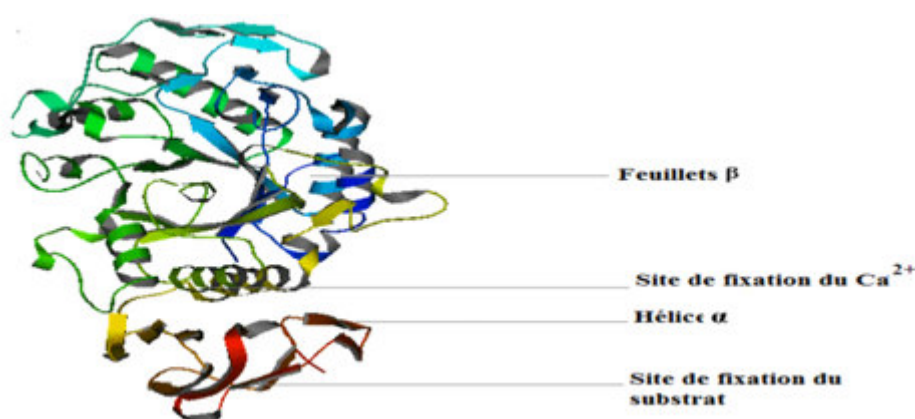


Figure 1: Structure tridimensionnelle de l'alpha amylase (Kherraz et Lorbi, 2015)

II.2.5. Mécanisme d'action :

Les α -amylases sont des métallo-enzymes à calcium. Ces ions sont nécessaires à l'activité enzymatique et au maintien de la stabilité de la structure en acides aminés des enzymes qui varie d'une souche à une autre (Toumi, 2018). Le mécanisme d'action de l' α -amylase nécessite la participation de trois fonctions du site actif impliquant un attaquant nucléophile, un stabilisateur de la charge positive de l'atome attaqué et un donneur de proton au groupe déplacé; ceci signifie que la rupture de la liaison osidique fait intervenir une série d'échanges d'électrons et de protons entre certains résidus de l'enzyme et du substrat. Ce mécanisme est une caractéristique de l'enzyme selon des conditions expérimentales telles que la température, le pH, la taille et la structure du substrat (Park *et al.*, 1997 ;Toumi, 2018).

II.2.6. Caractéristique générale

II.2.6.1. Spécificité de substrat

Le substrat naturel de l' α -amylase est l'amidon (Pandey *et al.*, 2000). La production d' α -amylase par des souches fongiques spécifiques (*Aspergillus sp.*, *Rhizopus sp.*, Et *Penicillium sp.*) est régulée par l'amidon et correspond à l'induction d'enzymes par son substrat naturel (Nouadri, 2011).

II.2.6.2. Effet de la température sur l'activité de α -amylase

La température optimale dépend du type et de l'origine de l'enzyme. En général, la température optimale pour l' α -amylase est de 40 à 70 ° C. En fait, l'amylase bactérienne est plus stable thermiquement que l'amylase fongique. La température optimale pour l' α -amylase bactérienne varie entre 50 et 95°C, tandis que la température optimale pour l' α -amylase fongique varie entre 40 et 60°C. La température maximale de l' α -amylase de levure est de 40-60°C et peut atteindre 70°C pour des espèces telles que *Lypomyces starchyi* (Benaouida, 2008).

II.2.6.3. Effet de pH sur l'activité de α -amylase

L'alpha-amylase est généralement stable dans la plage de pH de 4 à 8, 4 à 5 étant optimal pour l' α -amylase fongique et 6 à 8,5 étant plus optimal pour l'amylase bactérienne. Dans la levure, l'enzyme nécessite un pH de 4 à 6, selon l'espèce (Merabti, 2006).

II.2.6.4. Effet des ions métalliques

L'amylase est probablement une métalloprotéine complètement dépendante de l'activateur Allostérique Ca^{2+} (Egas *et al.*, 1998). Le calcium n'est pas directement impliqué dans la formation du complexe enzyme-substrat, mais pour la dénaturation thermique (Savcheko *et al.*, 2002; Peixoto Nogueira *et al.*, 2008) et l'activité et la stabilité maximales contre les acides. Maintient une conformation optimale. Dénaturation associée à la protéolyse (Nigam *et al.*, 1995; Mctigue *et al.*, 1995).

II.2.6.5. Répartition des amylases dans le monde vivant

L'amylase est universelle dans les règnes végétal, animal et microbien. Au cours de la dernière décennie, des recherches considérables ont été menées sur l' α -amylase extracellulaire produite par de nombreux micro-organismes. Le principal avantage de l'utilisation de micro-organismes dans la production d'amylase est leur grande capacité de production. (Lonsane *et al.*, 1990) L'amylase est produite par de nombreux micro-organismes tels que les champignons, les levures, les bactéries et les actinomycètes. (Pandey *et al.*, 2000).

II.2.6.6. Méthodes de biosynthèse de l' α -amylase

Il existe deux méthodes de biosynthèse de l' α -amylase.

1.7.1. Fermentation submergée

En fermentation immergée (SmF), les produits sont directement obtenus dans des milieux liquides comme les bouillons. La consommation de substrat est rapide, d'où un approvisionnement continu en substrat est nécessaire (Barragán *et al.* 2016).

Les bactéries génétiquement modifiées sont facilement cultivées dans SmF. Les processus de stérilisation et de la purification sont faciles à réaliser dans un environnement contrôlé, l'utilisation des bioréacteurs sont nécessaire pour un rendement élevé de produit.

Les fermenteurs sont réglementés en mode batch, fedbatch ou continu dans les industries en fonction des besoins et du type de microbe utilisé (Paulová *et al.* 2013).

II.2.6.7. Fermentation en substrat solide

Dans cette technique, les milieux contiennent une très faible quantité d'eau et ont des applications limitées (Paulová *et al.* 2013). SSF est bon pour la fermentation des champignons car ce milieu a une ressemblance avec leur habitat naturel donc ils peuvent facilement se développer dans ce moyen (Belmessikh *et al.* 2013).

La fermentation à l'état solide est administrée à ces microbes nécessite des substrats solides par exemple: la pâte à papier, les polysaccharides, ...etc. Les substrats riches en nutriments sont recyclés et consommés à un rythme très lent, ce qui élimine le besoin de constamment reconstituer le substrat (Dasari *et al.* 2019).

Une comparaison entre Smf et SSF sont illustrés dans la Figure suivante

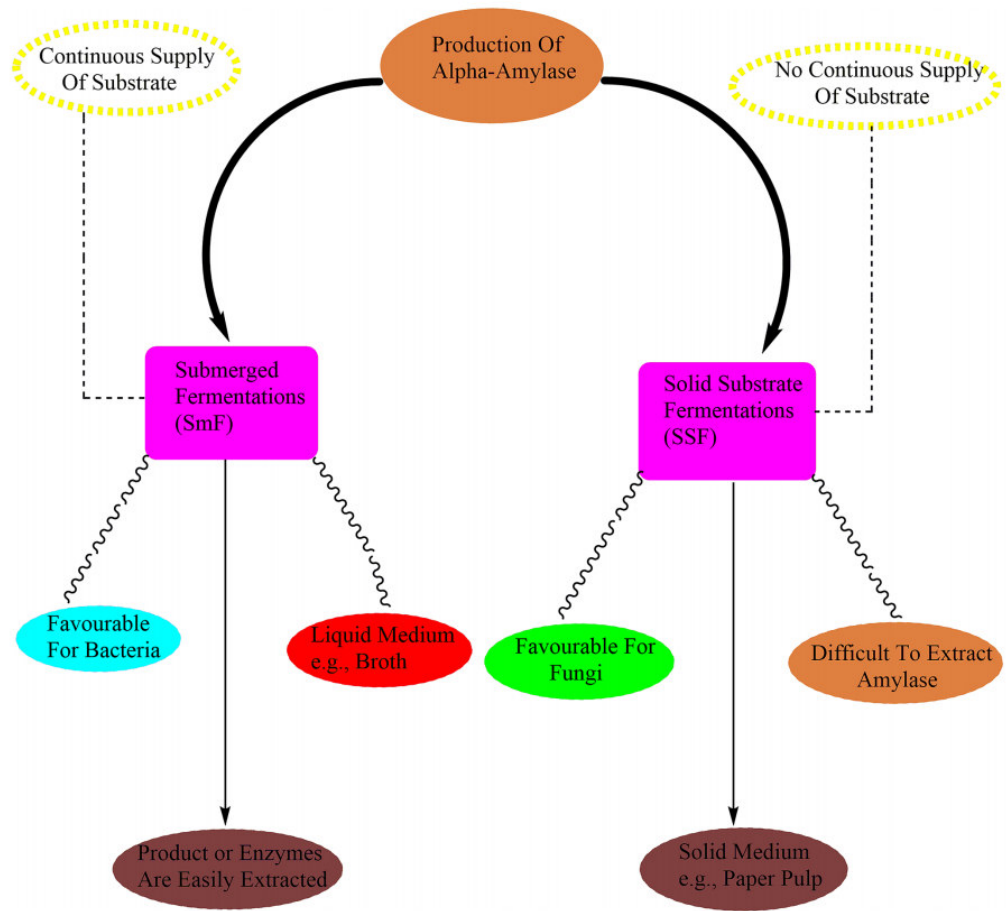


Figure2 : comparaison entre la Fermentation submergée et la Fermentation en substrat solide

II.3. Intérêt d' α -amylase

II.3.1. Introduction

En outre, l'utilisation de préparations enzymatiques a considérablement augmenté dans de nombreux domaines de bio industrie. Les enzymes dégradant l'amidon, en particulier l' α -amylase, sont les enzymes commerciales les plus importantes en raison de leurs utilisations polyvalentes (par exemple, industrie alimentaire et des aliments pour animaux, détergents, industrie du tannage, industrie de transformation des aliments, pharmacies)(Botton *et al.*, 1999).

II.3.2. L'avantage de production des enzymes par les microorganismes

Les microorganismes constituent la principale source d'enzymes industrielles : 50% proviennent des champignons et des levures, 35% des bactéries, alors que 15% sont d'origine végétales ou animale (Barnabé *et al.*, 2003).

II.3.2.1. Intérêt industriel des moisissures

Les moisissures jouent un rôle primordial dans divers domaines d'applications ; elles sont utilisées dans les industries alimentaires, chimiques, la biolixiviation et la biotransformation, etc.

Cependant l'industrie n'exploite commercialement qu'un petit nombre de métabolites de quelques espèces seulement (Boiron, 1996). Leur intérêt économique repose sur leur activité biologique dans la production d'une grande diversité de molécules produites au cours des métabolismes primaires et secondaires, exploitées en particulier par l'industrie pharmaceutique et en médecine (Larpend-Gourgaud et Sanglier, 1992).

II.3.2.2. Intérêt industriel des levures

Les levures présentent des éléments favorables par rapport aux bactéries quant à leur utilisation en biotechnologie. Elles offrent donc une meilleure résistance aux conditions de stress, en particulier la possibilité à des pH acides. Leur utilisation dans l'alimentation a fait de sorte que les levures

soient globalement plus connues par leur efficacité en fermentation industrielle que d'autres micro-organismes.

Les levures ont de grandes activités métaboliques et sont donc très utilisées dans le domaine agricole et alimentaire. Elles ne sont pas attaquées par des virus (phages), elles sont facilement récupérables grâce à leur grosseur (Lagzouliet *al.*, 2007). Leur stabilité génétique permet aussi une très bonne fidélité du procédé et la connaissance de leur physiologie cellulaire facilite leur utilisation (Labrecque, 2003).

Enfin, les bonnes connaissances de la biologie moléculaire des levures et la mise au point de techniques de génie génétique, permettant de programmer les levures de façon qu'elles expriment des protéines humaines et animales recombinantes ; constituent une grande réussite des biotechnologies surtout d'intérêt médical (par la production d'enzymes, d'hormones peptidiques, de facteurs de croissance, d'hémoglobines, de ferritines, l'érythropoïétine, etc.) (Lammi, 2011).

Tableau1 : Quelques micro-organismes producteurs d' α -amylase.

Micro-organisme	Espèces	Références
Levures	<i>Pichia pastoris.</i>	(Wang et al., 2019)
	<i>Saccharomyces cerevisiae.</i>	(Martínez et al., 2016)
	<i>Aureobasidium pullulans.</i>	(Ademakinwa et al., 2019)
	<i>Cryptococcusflavus.</i>	(Barros et al., 2009)
Bactéries	<i>Bacillus subtilis.</i>	(Zheng et al., 2021)
	<i>Pseudoalteromonasp.</i>	(Sanchez et al., 2019)
	<i>Pseudomonas.</i>	(Kizhakedathil& C, 2021)
	<i>Bacillus licheniformis.</i>	(Fincan et al., 2021)
	<i>Bacillus megaterium.</i>	(Shofiyah et al., 2020)
Moisissures	<i>Trichodermaharizianum.</i>	(Kalia et al., 2021)
	<i>Phohiotamicrospora.</i>	(Janíčková et Janeček, 2020)
	<i>Serendipitaindica.</i>	(Janíčková et Janeček, 2020)
	<i>Aspergillus niger.</i>	(Avwioroko et al., 2018)
	<i>Aspergillus oryzae.</i>	(Melnichuk et al., 2020)

II.3.3. Application industrielles et biotechnologiques des amylases

Les amylases sont parmi les enzymes les plus importantes en biotechnologie (Gupta *et al.*, 2003). Elles représentent environ 25 à 33% du marché mondial des enzymes (Saxena *et al.*, 2007). En effet, les amylases possèdent une gamme étendue d'applications tels que les industries de Panification et industrie boulangère, sucrerie, textile, Détergents et en domaine médicale et pharmaceutique (Gupta *et al.*, 2003). En raison de l'importance industrielle de cette enzyme, un intérêt est porté à l'isolement de nouvelles amylases appropriées à applications industrielles nouvelles (Burhan *et al.*, 2003).

II.3.3.1. Panification et industrie boulangère

Les alphas amylases dégradent l'amidon en sucres simples lorsqu'elles sont ajoutées à la pâte de pain. L'addition d'alpha amylases à la pâte diminue la viscosité de la pâte et augmente le taux de fermentation. Cela donne une texture améliorée, un goût et un volume du pain amplifiés et une meilleure couleur de la croûte. Une quantité appropriée d'amylase conduit à une pâte et à un produit final de haute qualité. L' α amylase dégrade l'amidon de la farine de blé en petites dextrans, permettant ainsi à la levure de fonctionner en continu pendant la fermentation de la pâte et les premiers stades du processus de cuisson. Lorsque la pâte est placée dans le four, la température augmente continuellement, augmentant la vitesse de la réaction enzymatique et produisant plus de sucre. (Abada, 2019; Singh et Kumar, 2019).

II.3.3.2. En sucrerie

L' α -amylase est utilisée pour faciliter les opérations d'extraction et de raffinage du saccharose à partir de la betterave ou de la canne à sucre pour éliminer des traces d'amidon gênant la purification. De plus, des α -amylases fongiques sont très utilisées pour la préparation des sirops sucrés à base d'amidon de maïs et de sirops de chocolats (Van der maarel *et al.*, 2002).

II.3.3.3. En textile

La résistance de textile est améliorée en déformant la pâte d'amidon en tissage textile. Il empêche également la perte de corde par frottement, coupure et génération d'électricité statique sur la corde en donnant de la douceur à la surface de la corde en raison de la chaîne posée. Après avoir tissé le tissu, l'amidon est enlevé et le tissu passe au décapage et à la teinture. L'amidon sur le tissu est généralement éliminé par l'application d' α -amylase (Afzaljavan et Mobini-Dehkordi, 2013).

II.3.3.4. Détergents

Les amylases sont le deuxième type d'enzymes utilisé dans la formation des détergents enzymatiques, et environ de 90% de tous les détergents liquides contiennent ces enzymes. Les α -amylases sont utilisées dans les détergents pour dégrader les résidus de féculent tels que les pommes de terre, les sauces, le chocolat...etc. En fait l'élimination de l'amidon des surfaces des tissus est également importante pour procurer un avantage de blancheur (Roy *et al.*, 2012).

II.3.3.5. Domaine médicale et pharmaceutique:

A. Domaine médical

L'augmentation du taux des α -amylases dans le sang peut témoigner d'une pancréatite aiguë et se rencontre également dans certains cancers digestifs et dans les oreillons (Lo *et al.*, 2001), elles sont donc employées en diagnostic médical pour détecter certaines maladies.

B. Domaine pharmaceutique

Les α -amylases fongiques sont utilisées comme:

- ✓ Aide digestif pour éviter les dyspepsies et les fermentations intestinales par exemple: Danilase.
- ✓ Agent anti-inflammatoire en soutenant le traitement antibiotique (Nouadri, 2011).

II.4. Les aliments fermentés

II.4.1. Importance de la fermentation des céréales

La fermentation des aliments, dans une grande partie de l'histoire humaine, a été le moyen le plus commun de conservation des produits périssables. Elle contribue à plusieurs avantages comme l'ajout de nouveaux goûts, de saveurs, d'arômes et de textures. Elle permet également l'amélioration de la valeur nutritionnelle des aliments, l'augmentation de leur digestibilité, la production de vitamines, l'élimination de substances toxiques et la diminution de l'énergie et du temps de cuisson (Kamal-Eldin, 2012b).

II.4.2. La bio préservation

La fermentation joue un rôle clé dans la bio préservation des aliments, grâce à une variété de composés et de métabolites produits par le microbiote fermentaire, principalement par les BL ; acide organiques, CO₂, H₂O₂, diacétyle, acide phenyllacétique, dipéptides cycliques, bactériocines, reutérine et acides gras. Ils agissent parfois de manière synergique dans les écosystèmes alimentaires complexes contre la détérioration des aliments et les micro-organismes pathogènes (Corsetti *et al.*, 2015).

Des espèces de BL, isolées à partir de céréales fermentées, appartenant aux genres *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Pediococcus* et *Leuconostoc* ont été décrites comme productrices de substances antibactériennes (Zacharof and Lovitt, 2012) et antifongiques (Crowley *et al.*, 2013; Bianchini, 2015). Les BL sont connues aussi pour leur aptitude à fixer les mycotoxines et à inhiber la croissance des moisissures toxigènes, en raison de leur acidification et de la production de composés de faible poids moléculaire au cours de la fermentation. Les acides organiques diffusent à travers la membrane des champignons et libèrent ainsi les ions hydrogène qui provoquent une chute du pH.

En outre, les acides organiques augmentent la perméabilité de la membrane plasmique et neutralisent le gradient électrochimique des protons, tuant ainsi le microorganisme. La production des acides organiques, seule,

n'explique pas l'activité antifongique. Plusieurs composés antifongiques ont été entièrement ou partiellement caractérisés mais l'effet synergique reste mal connu. Les études supposent une sorte d'interaction positive, même si cela n'a pas été prouvé pour de nombreux métabolites (Daliéet *al.*,2010; Oliveira *et al.*, 2014).

II.4.3. Microbiote des aliments fermentent à base de céréales

Les aliments fermentés, à base de céréales, abritent divers microorganismes (BL, levures et champignons filamenteux) présents sur les matrices de fermentation. La composition et la diversité du microbiote des céréales fermentées dépendent principalement de l'environnement (végétaux, animaux et ustensiles de fabrication, entres autres) et de l'adaptation des microorganismes aux conditions de fermentation (substrats, températures, pH, activité de l'eau) (Jespersen, 2003; Guyot, 2010; Tamang, 2010a).

II.4.4. Flore lactique et céréales fermentées

Les BL sont un groupe de bactéries unies par une multitude de caractéristiques morphologiques, métaboliques et physiologiques. En général, elles sont décrites comme des bactéries à Gram positif, non mobiles, en forme de coques ou de bâtonnets, non sporulantes, dépourvues de cytochromes et de catalase, anaérobies micro-aérophiles, strictement fermentatives, aux exigences nutritionnelles complexes (acides aminés, peptides, vitamines, sels, acides gras, glucides fermentescibles) et qui produisent de l'acide lactique comme le principal produit final au cours de la fermentation des carbohydrates. Le terme de BL est intimement associé aux habitats riches en nutriments (lait, viande, végétaux) et aux aliments fermentés, mais d'autres sont aussi associées aux différentes surfaces des muqueuses des mammifères (Axelsson, 2005).

La classification des BL repose en grande partie sur la morphologie, l'arrangement, la croissance à des températures différentes, la configuration de l'acide

lactique produit, la capacité de croître à des concentrations de sel élevées, et la tolérance acide ou alcaline. Les marqueurs chimiotaxonomiques, tels que les acides gras et les constituants de la paroi cellulaire (SDS-PAGE de toutes les protéines de la cellule), sont également utilisés dans la classification (Axelsson, 2005; Vandamme et al., 2014).

Le mode de fermentation du glucose, en anaérobiose dans des conditions standards non limitatives en concentration de glucose et en facteurs de croissance (acides aminés, vitamines, et des précurseurs d'acides nucléiques), est une caractéristique importante utilisée dans la différenciation des genres des BL. Dans ces conditions les BL peuvent être divisées en deux grands groupes : les homofermentaires et les hétérofermentaires.

Historiquement les genres *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* et *Streptococcus* forment le corps du groupe des 20 genres. En technologie alimentaire les genres *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* et *Weissella* sont considérés comme les plus importants. Les BL peuvent être divisées en bâtonnets (*Lactobacillus spp.* Et *Carnobacterium spp.*) et en coques (tous les autres genres). Une exception pour le genre *Weissella* qui, par définition, peut inclure à la fois des coques et des bâtonnets (Axelsson, 2005). La classification des BL, décrite ci-dessus, est largement basée sur les caractères phénotypiques et biochimiques. En pratique, dans l'identification de routine des isolats, ces caractéristiques ne peuvent pas suffire pour attribuer définitivement une souche à une espèce particulière. Aujourd'hui, avec la disponibilité de la technologie rapide et automatique de séquençage de l'ADN, le séquençage direct du gène de l'ARNr 16S est la méthode la plus puissante pour la classification des BL (Giraffa and Carminati, 2008)

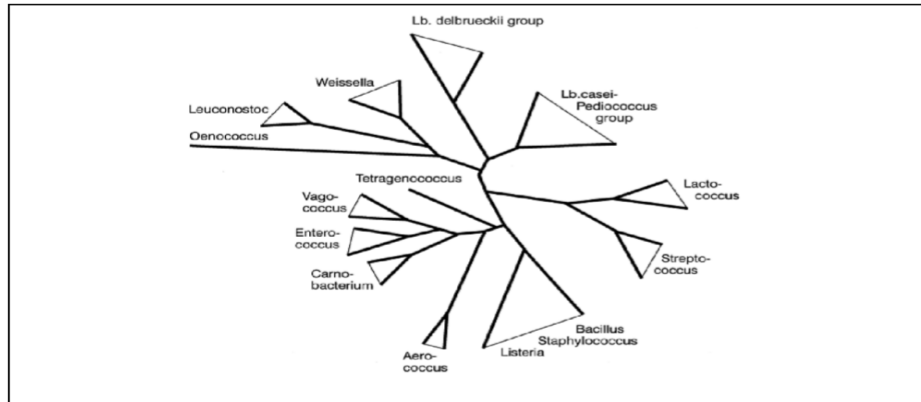


Figure 10 : Schéma d'un arbre phylogénétique, sans racines, des BL ; les distances évolutives sont approximative (Axelsson, 2005).

Figure 3 : Schéma d'un arbre phylogénétique, sans racines, des BL ; les distances évolutives sont approximatives (Axelsson,2005)

II.4.4.1. Bactéries lactiques impliquées dans la fermentation des céréales

Les BL, spécifiquement adaptées, jouent un rôle important dans la fermentation des céréales. Leur dominance dans les écosystèmes alimentaires diffère selon les pratiques traditionnelles de préparation. La variation des technologies de production et des paramètres tels que la nature des céréales, la température, et la durée de propagation, agissent sur leur diversité et sur l'implication d'une fermentation alcoolique, ou non, menée par les levures. (Hammeset *al.*, 2005).

Les pâtes aux levains qui sont des écosystèmes biologiques très complexes, principalement influencés par la composition et les interactions entre les processus de panification et les ingrédients, représentent des niches alimentaires très particulières dont la majorité des espèces isolées régulièrement appartiennent, à quelques exceptions près, aux genres de *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, et *Weissella*(Guyot, 2010).

Le plus grand nombre d'espèces identifiées (> 60 espèces) sont des *lactobacilles*, du fait de leur métabolisme des glucides hautement adapté (par

exemple, la capacité de fermentation du maltose de *L. fermentum*, *L. reuteri* et *L. sanfranciscensis*), et leur réponse au stress (par exemple, la réponse au stress acide associée à la production de protéines de stress) (De Vuyst *et al.*, 2014). Les lactobacilles typiques des levains sont représentés par *L. sanfranciscensis*, *L. pontis*, *L. panis*, *L. paralimentarius*, *L. frumenti*, *L. spicheri*, *L. rossiae*, *L. zymae*, *L. acidifarinae*, *L. hammesii*, *L. nantensis*, et *L. mindensis*. Alors que les weissellas (*W. cibaria*, *W. confusa*), les pediococques (*P. acidilactici*, *P. pentosaceus*), et les leuconostoques (*Leu. mesenteroides*, *Leu. citreum*) sont moins prédominants dans les levains.

Les lactocoques, les entérocoques et les streptocoques sont très minoritaires (Chavan and Chavan, 2011; De Vuyst *et al.*, 2014).

Les BL hétérofermentaires et homofermentaires généralement associées aux boissons et aliments fermentés à base de céréales autres que les pâtes aux levains traditionnels, appartiennent aux genres *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Weissella*, *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Enterococcus* et *Streptococcus*. Quelles que soient les méthodes d'investigation utilisées, il semble qu'il y ait un consensus général pour dire que les BL appartenant aux genres cités ci-dessus sont souvent isolées, et que *L. plantarum* et/ou *L. fermentum* sont souvent les espèces dominantes (Blandino *et al.*, 2003; Guyot, 2010).

Les espèces du genre *Lactobacillus* ont été régulièrement isolées des aliments fermentés à base de céréales tels que bushera en Ouganda (Muyanja *et al.*, 2003), togwa en Tanzanie (Mugula *et al.*, 2003), Pozol au Mexique (Ampeet *et al.*, 1999), Mawé au Togo et au Bénin (Nout, 2009), hussuwa au Soudan (Yousif *et al.*, 2010), potopoto et degué dans la République du Congo (Abriouet *et al.*, 2006), et koko au Ghana (Lei and Jakobsen, 2004).

Les lactobacilles forment le groupe dominant en association avec des coques ou coccobacilles appartenant principalement aux genres *Weissella*, *Pediococcus* et *Lactococcus*. Cependant, il ya quelques aliments à base de

céréales fermentées dans lesquels les coques sont dominants ou représentent une part importante du microbiote (Guyot, 2010).

II.4.4.2. Flore fongique impliquée dans la fermentation des céréales

Les levures font partie du microbiote de quelques aliments fermentés à base de céréales tels que Mawé, idli, putto, Pozol et les pâtes au levain (Kofi and Nout, 2010). Le pain au levain San Francisco, en est un exemple, où la levure *Sacharomyces cerevisiae* joue un rôle important dans la fermentation.

La présence et la croissance d'autres espèces de levures ont été rapportées comprenant *Kazachstania exigua* [synonyme (syn.) *Saccharomyces exiguus* ; anamorphe *Candida* (Torulopsis) *holmii*], *Candida humilis* (syn. *Candida milleri*), *Pichiakudriavzevii* (syn. *Issatchenkia orientalis* ; anamorphe *Candida krusei*), *Torulaspordelbrueckii* (anamorphe *Candida colliculosa*), et *Wickerhamomyces anomalus* (syn. *Pichia anomala* et *Hansenula anomala* ; anamorphe *Candida pelliculosa*).

Ces levures évoluent en présence des BL indigènes précédemment décrites comme *L. sanfranciscensis* (unique dans ces écosystèmes), *L. plantarum*, et diverses autres espèces de *Lactobacillus*, de *Leuconostoc*, et de *Pediococcus* (De Vuyst et al., 2014).

Les levures sont aussi intimement impliquées dans la production de toutes les boissons alcoolisées. Cette association dépend de la capacité de certaines espèces de levure à fermenter rapidement les sucres en éthanol et également leur capacité à tolérer une concentration d'éthanol de 15 à 20 % (v/v).

Les principales levures qui fermentent l'amidon des céréales saccharifiées, en alcool, sont *Saccharomyces oopsisfibuligera*, *Sacharomycesopsisburtonii*, *Saccharomyces cerevisiae* et *Candida lactosa*. D'autres levures des genres *Hansenula*, *Pichia* et *Torulopsis* sont également détectées dans certains starters amylolytiques et boissons fermentées (Fleet, 1997; Tamang and Fleet, 2009). Par ailleurs, les levures sont fréquemment associées aux BL, en particulier lorsque le procédé conduit à des boissons

alcoolisées acides. *P. pentosaceus* et des espèces de *Lactobacillus* ont été rapportées comme dominantes dans des boissons alcoolisées en association avec des levures des espèces de *Saccharomyces* (Jespersen, 2003).

Les champignons filamenteux dans les aliments fermentés à base de céréales sont relativement limités et ne semblent pas avoir un rôle important dans le processus de fermentation. Ils sont surtout présents dans les aliments et les boissons fermentés asiatiques traditionnels préparés par des starters amylolytiques mixtes. Les espèces rapportées appartiennent aux genres *Aspergillus*, *Mucor* et *Rhizopus* (Tamang, 2010c).

II.4.5. L'utilisation des bactéries lactiques amylolytiques en biotechnologie

Environ 3,5 milliards de tonnes des résidus agricoles sont produites par ans dans le monde qui représente une source d'énergie renouvelables potentiellement intéressante basées sur le coût et la disponibilité. Malgré que ces débris soient riches en carbohydrates leur utilisation est limitée (Pandey et al., 2001)

Dans l'échelle commerciale l'utilisation d'une source de carbones moins cher, tels que l'amidon qui est un substrat brut le plus abondant et disponible dans la nature à côté de la cellulose et d'autre part le glucose est un alternatif coûteux.

Généralement la production biotechnologique de l'acide lactique à partir de matière amy lacée, nécessite un prétraitement pour la gélatinisation et la liquéfaction, qui est effectuée à des températures élevées de 90-130°C pendant 15min, puis par saccharification enzymatique dans le résultat est le glucose qui va être convertir en l'acide lactique par la fermentation (Anuradha et al., 1999). L'utilisation de l'amidon brut ou polysaccharide renouvelables en combinaison avec les BL amylolytique en deux étapes saccharification et fermentation, peuvent aider à diminuer le coût de l'ensemble de procédé de fermentation, comme illustre.

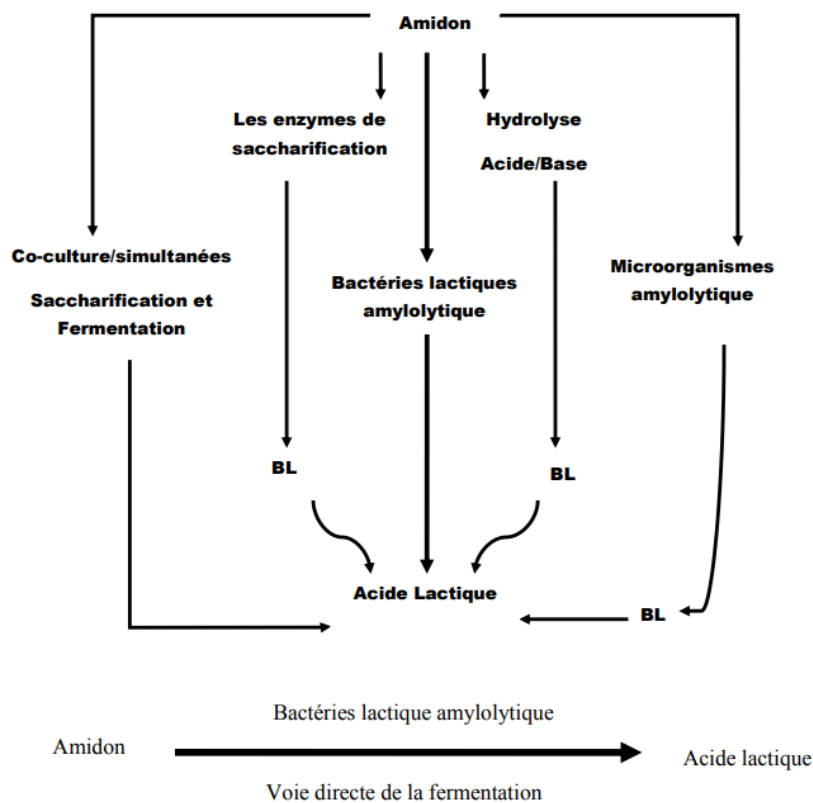


Figure 4 : La conversion de l'amidon en acide lactique par la voie direct et indirecte de la fermentation (Reddy *et al.*, 2009)

De Nombreux bactéries inclus *Lactobacillus* et *Lactococcus* ont été employée avec succès pour la production de l'acide lactique à partir de matières premières qui contient de l'amidon (Chengeet *al.*, 1991; Naveenaet *al.*, 2005).

Tableau 2 : Les bactéries lactique amylolytique (Reddy et al., 2009)

Espèces bactérienne	Code	Espèce bactérienne	Code
<i>L. manihotivorans</i>	OND32T	<i>L. acidophilus</i>	
	LMG18010T	<i>L. fermentum</i>	L9
<i>L. manihotivorans</i>	LMG18011	<i>L. plantarum</i>	A6
		<i>L. plantarum</i>	LMG18053
		<i>L. plantarum</i>	NCIM2084
	OgiEI		
	MW2		
<i>L. fermentum</i>	K9	<i>S. bovis</i>	148
<i>L. fermentum</i>		<i>Lactobacillus</i>	TH 165
<i>L. fermentum</i>	ATCC33622	sp	St3-28
	B-4542	<i>Leuconostoc</i>	
<i>L. amylovorus</i>		<i>L. cellobiosus</i>	LEM
<i>L. amylovorus</i>		<i>Lactobacillus</i>	220.207.202
<i>L. amylovorus</i>		strains	
	JCIM 1125	<i>Leuconostoc</i>	
		strains	
	B 4437	<i>S. macedonicus</i>	
<i>L. amylophilus</i>	GV 6	<i>L. amylolyticus</i>	
<i>L. amylophilus</i>			
<i>L. amylophilus</i>			

L'utilisation efficace des BL amylolytique permettra d'éliminer la saccharification, ce qui conduit à la réduction des coûts et substrat et le rendement élevée (Vickroy, 1985; Yumoto et Ikeda, 1995; Litchfield, 1996). En ce sens, une seule fermentation acide lactique par une étape amylolytique

bactérie *L.amylolytique* GV6 à haute efficacité de la production (Vishnuset *al.*, 1998 ; Naveenaet *al.*, 2005 ; Altafet *al.*, 2007).

II.4.6. Les enzymes amylolytiques produits par les bactéries lactiques

Les sucres raffinés ou gélatinisés sont généralement utilisés pour la production de l'acide lactique par la fermentation microbienne qui est une caractéristique de l'activité amylolytique de ces microorganismes. La présence à la fois l'amylase et de la pullulanase caractéristiques la fermentation de *L. amylophilus* GV6 qui est efficace pour la conversion directe de substrats amylolytiques en l'acide lactique. Cette activité amylolytique a été évaluée par l'estimation de la production de la quantité des enzymes extracellulaires amylolytiques (amylase et pullulanase) (Naveena, 2004 ; Vishnu *et al.*, 2006). Ces enzymes amylolytiques de *L. amylophilus* GV6 ayant à la fois une activité d'amylase et de pullulanase qui est une protéine de 90kDa caractérisée par (Vishnu *et al.*, 2006). L'activité d'amylase et l'activité spécifique de pullulanase étaient de 0.439 U/g/min et 0.18 U/g/min respectivement dans le son de blé (Naveena, 2004).

A partir de la photographies au MEB (**Figure04**) montrant que *L. amylophilus* GV6 hydrolyse de l'amidon des fibres dans le son de blé à sucres en L(+) acide lactique (Vishnu *et al.*, 2000 ; Naveenaet *al.*,2005). La souche GV6 montrée à la fois une activité s l'amylase et pullulanase de 0.59 et 0.34 U/mi/min en fermentation submergée D'où le maximum d'activité amylolytique a été observée avec la suivie l'amylopectine par l'amidon soluble (Vishnu *et al.*, 2006).

L'activité d'alpha-amylase de *Streptococcus bovis* est plus élevée en présence de l'amidon brut (1.41 U/ mi) que celle de glucose (0.06 U/ml) (Junya Narita *et al.*, 2004).

La souche de *L. fermentum* OGI E1 peu croître et produire des amylases à partir : amidon, le maltose, le glucose, le saccharose, le fructose, mais à partir du composé de céréales et légumes qui sont riches en sucres. Peu de BL amylolytiques sont étudiées pour leurs enzymes amylolytiques.

PARTIE III. MATÉRIELS ET MÉTHODES

III.1. Echantillonnage

III.1.1. Préparation des échantillons

III.1.1.1. Blé fermenté

La préparation des échantillons a été faite selon la méthode de (Merabti, 2015). Ou la préparation de blé fermenté été sur des bocaux en verre de 250g ; chaque bocal est rempli par 150g de Blé +100ml d'eau minérale contenant 3.75ml de vinaigre de 5°, en scellant les bocaux pour créer l'anaérobiose et en incubant à l'abri de la lumière. La température de laboratoires.



Figure 5 : Un échantillon de blé fermenté

III.1.1.2. Légumes fermentés

Carotte, betterave, olives ont été choisi pour la Lacto Fermentation, on a pesée 200g de chaque produit après les rincées deux fois pour se débarrasser des restes de sol, puis on a découpé en petits morceaux ; en suite une préparation d'une saumure avec 4% de sel dans de l'eau est effectuée. Pour assurer l'anaérobiose des pots à fermeture hermétique (couvercle avec joint en caoutchouc) été choisi pour mettre les légumes dedans ; alors on verse la saumure à condition qu'ils sont submergés pour créer un environnement sans O₂.

Les pots ont été déposés au laboratoire à une température entre 15-20 ° C. La fermentation à durer 6 semaines.



Figure 6 : les échantillons des légumes fermentés

III.1.2. Isolement et purification des microorganismes :

Les isolements des microorganismes ont été faits à partir des olives, betteraves, carottes et blé fermenté sur plusieurs milieux de cultures.

Une solution mère a été préparée par l'ajout de 10g de chaque échantillon choisi dans 100 ml d'eau physiologique(Annexe01) stérile (Ulacio *et al.*, 1997) puis le mélange a été haché par un hachoir plongeant pendant 5min (**Figure07**), ensuite une série de dilutions décimales ont été réalisées jusqu'à 10^{-5} (**Figure07**), chaque dilution subit une homogénéisation par agitation (Boulal *et al.*, 2017).

Pour la flore fongique l'ensemencement en surface été réalisée sur les milieux **PDA** et **OGA** (Annexe01); les boites ont été incubé à 30 °C pendant 5jours

Isolement de la flore totale été réalisée par l'ensemencement en profondeur sur le milieu GN ; les boites été incubé à 30°C pendant 48h.

Le milieu **MRS** (Annexe01) a été utilisé pour isolement de la flore lactiques, l'ensemencement été en profondeur, les boites ont été incubé à 30° C pendant48h.

La purification des souches a été réalisée par plusieurs repiquages sur milieux solides approprié de chaque isolat à partir des colonies bien isolées dans le milieu, puis la vérification a été réalisée par l'étude macroscopique et microscopique.

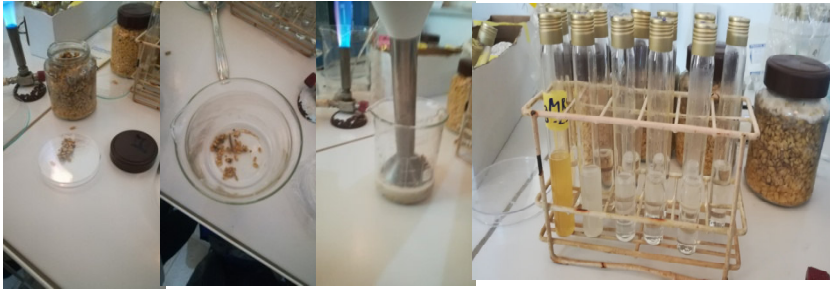


Figure 7 : La préparation de solution mère et dilution décimale La Pré identification des souches.

III.1.3. Etude phénotypique

III.1.3.1. Critères morphologiques

a) Caractérisation macroscopique

L'examen macroscopique permet de décrire l'aspect des colonies bactériennes (La forme, la taille, pigmentation, opacité...) mais aussi de vérifier la purification des colonies ; des isolats considérer comme pure si les colonies de même boîte possèdent le même aspect (Badis *et al.*, 2004).

La description macroscopique permet d'identifier les champignons grâce à l'étude des caractères cultureux : La vitesse de croissance, la texture, la couleur du thalle, la couleur du revers de la culture et l'odeur (Harrigan et Mccance, 1976 ; Rinaldi *et al.*, 1999).

L'étude morphologique du mycélium (absence ou présence de cloisons, couleur, ...) et des spores (forme, couleur, texture des parois, ...) (Harrigan et Mccance, 1976 ; Oteng-Gyang, 1984 ; Guiraud, 1998).

b) Caractérisation microscopique

La coloration de Gram (Annexe01) a été utilisée pour classer les bactéries selon leur Gram, morphologie et leur mode association, mais aussi cette coloration permet de vérifier la purification.

L'observation microscopique des champignons a est réalisée par la coloration de bleu de méthylène : Un petit morceau de scotch est appliqué à la face collante sur la colonie à l'aide d'une pince puis déposé sur une lame, puis on ajoute quelque goutte

de colorant du bleu de méthylène, l'observation se fait à l'aide d'un microscope optique (Chabasse *et al.*, 2002).

III.1.4. Pré identification des bactéries lactiques

Quelques tests été utilisée pour la pré-identification du genre ; Trois isolats possédant une activité amylolytique, susceptible d'être bactéries lactiques puisqu' ils sont bacille, Gram+ et catalase négative

III.1.4.1. Recherche de catalase

Le test consiste à déposer sur une lame une goutte d'eau oxygénée dans laquelle sera dissocié un petit prélèvement de la colonie. La souche examinée est dite catalase positive si un dégagement gazeux est observé et le contraire indique l'absence de l'enzyme catalase (Marchal *et al.*, 1991).

III.1.4.2. Teste de type fermentaire :

Ce test permet la distinction entre les bactéries lactiques homofermentaire ethétérofermentaire, grâce à la production de gaz (CO₂).

L'ensemencement des souches à tester s'effectue dans un milieu liquide MRS sans glucose et sans l'extraie de viande avec une cloche du Durham, mis à incubé à 30°C ; les tubes sont observé dans un délai de 48h en fonction de l'aspect du milieu (trouble) et la production de gaz (Garvie, 1984 ; Schilinger et Lücke, 1989).

III.1.4.3. Teste de température 45°C

Ce test est important car il de distinguer les bactéries lactiques mésophiles des bactéries lactique thermophiles après inoculation du MRS par les cultures jeunes, les tubes incubés pendant 24 à 48h à la température 45°C. (Guiraud, 1989)

III.1.5. Conservation des souches :

III.1.5.1. Conservation à courte durée

La conservation des isolats purifiés est réalisée par ensemencement sur gélose inclinée. Après incubation à 30°C pendant 18 h. Les tubes sont conservés à + 4°C.

III.1.5.2. Conservation à long durée

A partir des cultures jeunes (18 h) sur milieu liquide, les cellules sont récupérées par centrifugation à 4000 tr / min pendant 10 min. Une fois le surnageant éliminé, on ajoute le milieu de culture de conservation (70% lait écrémé (annexe01) et 30% de glycérol) sur le culot et le vortexé. Les cultures sont conservées en micro tubes « Eppendorf » à -20 °C.

III.1.6. Mise en évidence des activités enzymatiques

III.1.6.1. La recherche de l'activité amylolytique

25 isolats ont étéensemencés par touche sur le milieu **MRS**_{amidon} et 04 isolats de champignons ont étéensemencés sur milieu **AAM** (Amylase Activity Medium annexe 01) ensuite incubé à 30°C pendant 2-3 jours pour les bactéries et 05 à 07jours pour les champignons.

La mise en évidence de l'activité de l'amylase est effectuée par l'inondation de la surface de la gélosé avec une solution de lugol. Une lecture positive de la production de l'amylase se manifeste par l'apparition d'un halo clair autour de la colonieensemencée. Les diamètres des zones d'hydrolyses de l'amidon formés sont mesurés pour la sélection des souches productrices de l'amylase (Fossi *et al.*, 2009 ; Tatsinkou *et al.*, 2005).

III.1.6.2. Teste d'application de l'α-amylase comme un agent de désencollage

Que 03 souches du genre lactobacillus ont été utilisée pour ce test d'application ;

Chaque flacon a étéensemencé par 1 ml de culture jeune de 18h ; le tous été incubée pendant 3jours à 30°C. Quatre morceaux de tissu de coton blanc de taille égale (5 cm × 5 cm) ont été amidonnés en utilisant une solution d'amidon à 5 % et séchés, ensuit 03 morceaux ont été imbibés par la culture bactérienne de chaque souche, puis laissée pendant 30min à température de laboratoire, la révélation de l'activité amylosique été grâce à l'utilisation de lugol. Dans le cas de témoin le milieu de culture est remplacé par l'eau distillée.



Figure 8 : application de solution amidonnée sur les morceaux de tissu.

PARTIE IV. RESULTATS ET DISCUSSION

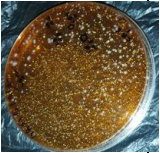
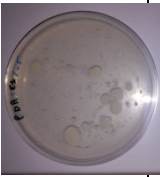
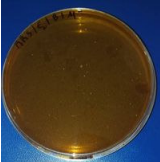
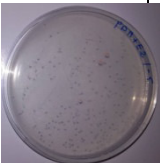
IV.1. Isolement et purification des microorganismes

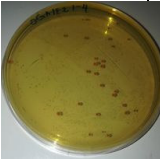

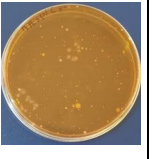
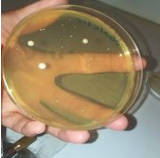
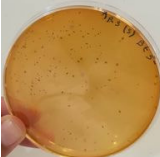
IV.1.1. Isolement et purification des microorganismes

Après 72h d'incubation à Température 30°C, Les boites de pétri des dilutions décimales, nous a permis de distinguée les différents types de colonies ; grâce aux critère macroscopique on a pu visualisée que la majorité des colonies ont été blanchâtre, mate, petites, opaque (C'est un caractère dominant des colonies aux niveaux des boites de MRS); colonie rose , orange, marron claire, de taille différente entre 1mm jusqu'à 3mm, et d'autre colonies de taille moyenne transparente possède un aspect brillant visqueux.

Le **tableau03** montre le caractère macroscopique des colonies des boites d'isolement et purification.

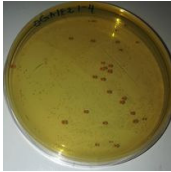
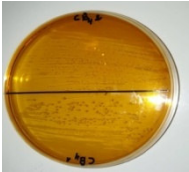
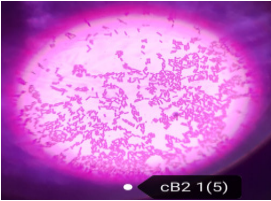
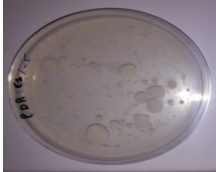



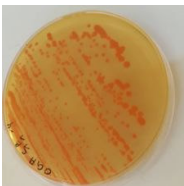

Tableau 3 : Aspect macroscopique des souches isolées sur des milieux MRS, PDA, OGA.

Échantillons	Milieu culture	CARACTÉRISTIQUES MACROSCOPIQUES	
E 1 (Blé)	MRS	Ronde Grande Blanchâtre	
	PDA	Petit colonies rond Blanchâtre Grosse colonies Blanchâtre irrégulier	
E 2 Blé	MRS	Très petite Blanchâtre	
	PDA	Petite Blanchâtre Grosse rose	

	OGA	Petite Blanchâtre Grosse rose	
E 3 Blé	MRS	Petite Colonie transparentes	
C carotte	MRS	Blanchâtre Crémeuse	
	OGA	Grosse rose Petite Blanchâtre	
BT betterave	MRS	Rond Blanchâtre Crémeuse	

Les boîtes possédant un caractère homogène des colonies (même taille, même aspect, même couleur ...) ont été considérées comme pure dans cela, la vérification a été faite par la coloration de Gram qui représente la première clé de classification et puis un test de catalase.

Tableau 4 : les résultats obtenus d'isolement, purification et de coloration de Gram

Isolement	Purification	Coloration de Gram
		
		
		

IV.1.2. Isolement et purification des moisissures

Après l'isolement et la purification de ces moisissures sur milieu PDA, des études macroscopiques et microscopiques ont été effectuées pour identifier les souches mycéliennes isolées.

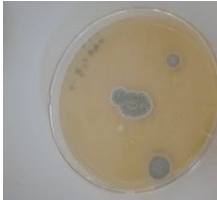
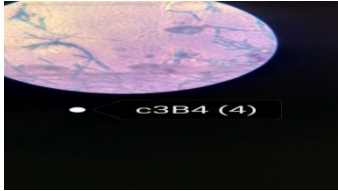
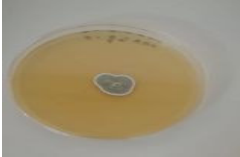
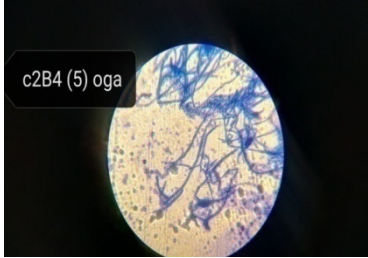
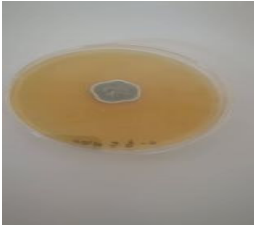
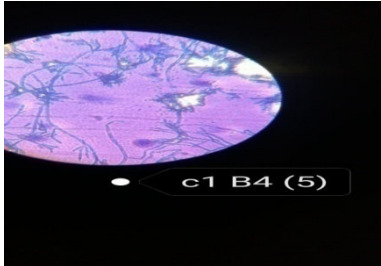

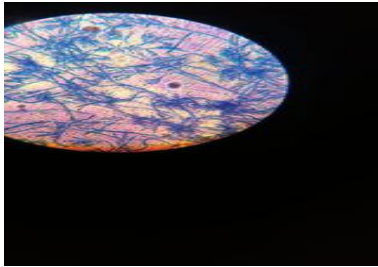
Les moisissures purifiées sont identifiées par un examen macroscopique qui est effectué après une incubation de 07 jours sur le milieu de culture PDA à 37°C, (**Figure 09**), et l'examen microscopique sur lame avec la technique du ruban au bleu de méthylène, donne les résultats suivants :

Les quatre souches possèdent les caractéristiques suivantes :

Revers : jaune, mycélium : blanc, spores : vert, aspect : filamenteuse (**Tableau 05**)

Grace à l'observation microscopique (**Tableau05**), l'hyphe été septé, phialides en forme de verticilles, présence de métules.

Tableau 5: Observation microscopique et macroscopique des champignons

Souches	Observation Macroscopique	Observation microscopique
C3B4 -4		
C2B4 -5		
C1B4 -5		
C1B4 -4		

Grace à l'isolement on a pu isoler ; une levure, quatre souches fongique, et 32 isolats de bactéries ; la répartition des microorganismes été comme suite :

- La population bactérienne est dominante avec un pourcentage de 82.05%, les champignons avec 10.25% puis les levures avec 2.52%

la dominance des bactéries dans le blé et légume fermenté par appart aux autre microorganismes est due aux type respiratoire des bactéries qui peut être anaérobie stricte, aérobie anaérobie facultatif et micro aérophile, aux contraire la flore fongique est une flore aérobie ; On constate que cette flore n'été pas éliminé aux cours de fermentation (ni par le CO₂ ni par les acides organiques), la présence de cette flore fongique doit être expliqué par la contamination des bocaux (type de bocaux qui n'assure pas l'anaérobiose) ou bien c'est une flore provienne aux cours de manipulation.

Parmi les 54 isolats on a pu purifier que 32 isolats, 26 isolats ont été bacille isolé, en diplobacille et en chaînette courte. Cette forme représente 81.25% par apport la forme Cocci qui représente 18.75%, ces Cocci en été soit isolé ou bien en diplococci, il ya que 03 isolat possède le mode d'association de type chaînette.

A partir d'histogramme suivant on observe que les isolats de forme bacille et (Catalase -) été majoritaire avec un pourcentage qui dépasse 70% par apport les Cocci catalase négative 23.80% .

Ces isolats susceptibles d'être des bactéries lactiques, et qui ont un rôle effecteur majeure dans la fermentation des aliments ; la dominance des souches susceptibles d'être de genres lactobacillus est claire plus de 70%, ces souches peuvent d'être homo ou bien hétéro fermentaire, on suppose qu'un pourcentage important de l'acide lactique provient de ces souches. BL, pourraient même exercer un antagonisme par la production de substances antifongiques, largement démontrée dans de nombreux travaux de recherche (Mandal *et al.*,2013; Crowley *et al.*, 2013).

Autrement, La fermentation lactique est un procédé non thermique permettant de réduire les pertes nutritionnelles, mérite d'être exploité pour l'obtention d'aliments végétaux à haute valeur nutritionnelle par la préservation des minéraux, des vitamines et des composés phénoliques, préservant ainsi les propriétés antioxydantes de l'aliment (Dueñas M *et al.*, 2005).

Il a été démontré que la fermentation lactique d'une légumineuse (*Vignasinensis*) permettait d'augmenter la concentration de plusieurs composés phénoliques (acide gallique, acide vanillique, quercétine, acide férulique, acide hydroxybenzoïque) (Björkroth, K.J *et al.*, 2002). Mais aussi de mieux préserver la teneur en vitamine C, en glutathion, en composés phénoliques ainsi que l'activité antioxydante de smoothies et de jus de tomate, de jus de grenade (Osimani, A *et al.*, 2015), de jus de carotte, d'haricot et de courgette (Magnusson, J *et al.*, 2002) et de lait de soja (Cho, J *et al.*, 2006).

D'où on peut citer quelque exemple d'espèce lactique :

- *Lactobacillus plantarum* a été isolé à partir de Carottes, Concombres, Abergines, Betteraves rouges, Fenouils, Choux (Sánchez *et al.*, 2000 ; Tamminen *et al.*, 2004 ; Plenghvidhya *et al.*, 2007 ; Di Cagno *et al.*, 2008b, 2008a, 2010a, 2011a, 2011b ; Pulido *et al.*, 2012)
- *Lc. mesenteroides*, *Pc. cerevisiae*, *Lb. plantarum*, *Lb. fermentum*, *Lb. Buchneri* à partir d'Oignon rouge (Tamang JP *et al.*, 2016)

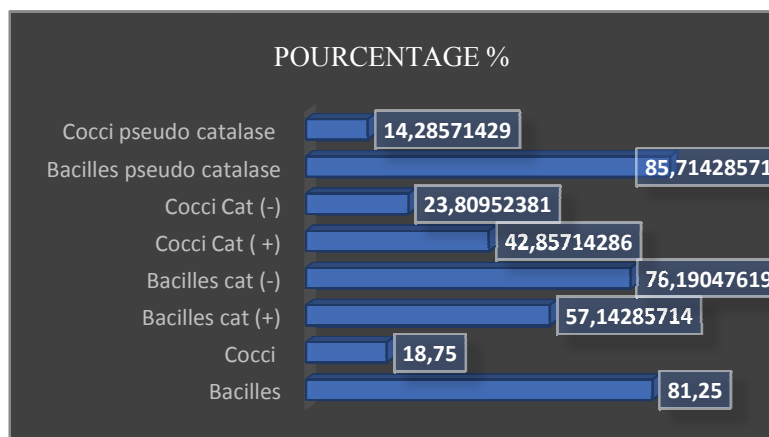


Figure9: Pourcentage des bactéries par apport aux Gram, forme et catalase.

IV.1.3. Mise en évidence des activités enzymatiques

29 isolats ont été testés pour leur pouvoir amylolytique, tableau suivant : illustre les isolats productifs et non productifs d'alpha amylase.

Tableau6: Résultats de production d'alpha amylase.

Isolats	Résultats	Isolats	Résultats
cB ₃ 1	+/-	oZ ₃	+/-
cB ₁ 3	+	cB ₄ 1	-
Cc	+	cB ₁ 6	+/-
cB ₃ 2	+/-	C ₂ B ₁	-
cB ₁ 2	+	C ₂ B ₂	-
cB ₃ 1	+	C ₂ B ₁	-
cB ₂ 1	+	C ₃ B ₁	-
cB ₄ 2	+/-	C ₂ C	-
cB ₁ 4	+	C ₁ B ₁	-
cB ₃ 2	+/-	C ₄ B ₁	-
cB ₂ 2	+/-	C ₃ B ₄	+
cB ₃ 3	+/-	C ₂ B ₄	+
Bt _{F2}	-	C ₁ B ₄ (-4)	+
Bt _{F1}	-	C ₁ B ₄ (-5)	+
oZ ₁	+/-		

Après 10 jours d'incubation, tous les souches fongique été productrice d'alpha amylase ; les zones d'hydrolyses été plus importante par rapport aux autres bactéries avec des diamètres de 4mm à 1cm (**Figure 12**) car les moisissures possèdent un matériel

Enzymatique important, ces résultats sont similaires aux travaux de (Ghrim et Mokadem, 2018).

16 isolats possédant une activité amylasique dans 11 isolats appartient aux bactéries lactiques (**Figure 11**)

Le test de l'activité amylasique nécessite une période de 03 jours dans laquelle on a observé une faible croissance des colonies par rapport aux milieux MRS.

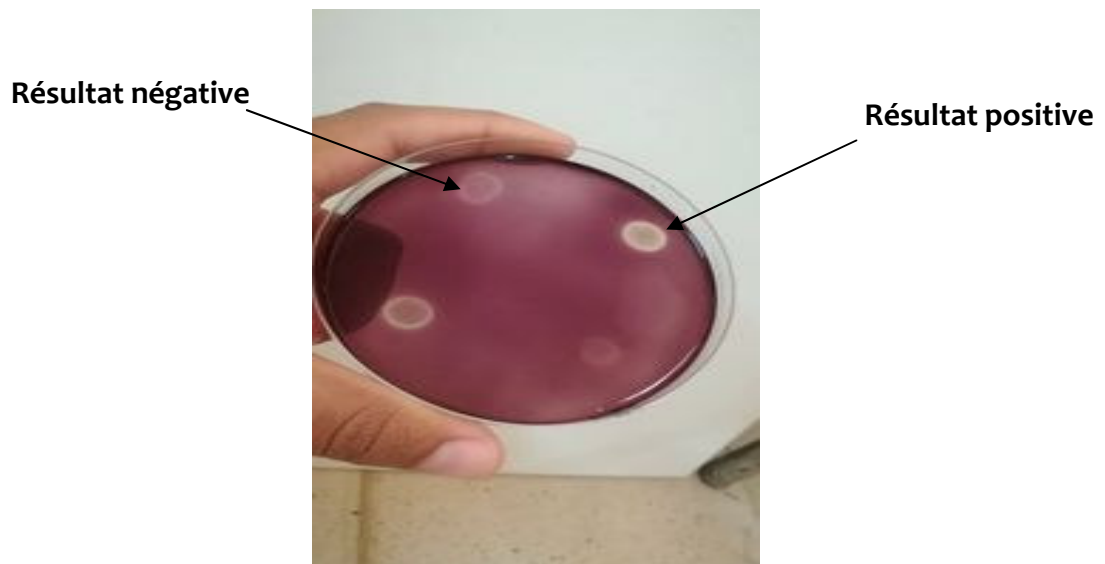


Figure 10 : la mise en évidence de l'activité amylasique (résultat positive /résultat négative)

IV.1.4. Pré identification des souches

Sur la base des résultats obtenus et aussi sur le catalogue les moisissures d'intérêt médical et description of médical Fungi en a obtenu un seul genre de moisissure : Penicillium qui est caractérisé par :

- Des colonies filamenteuses
- Présence des spores

- Couleur de colonies généralement vert
- Présence de métules
- Les hyphes sont septé
- Tête en forme de pinceau.

D'autre part on a testé le type fermentaire sur trois (03) isolats bacille catalase négative possédant une activité amylolytique; ces souches ont été de genres *Lactobacillus* homofermentaire. Ces isolats: cB₂ 1, cB₃ 1, cB₁ 4 subissent un test d'application.

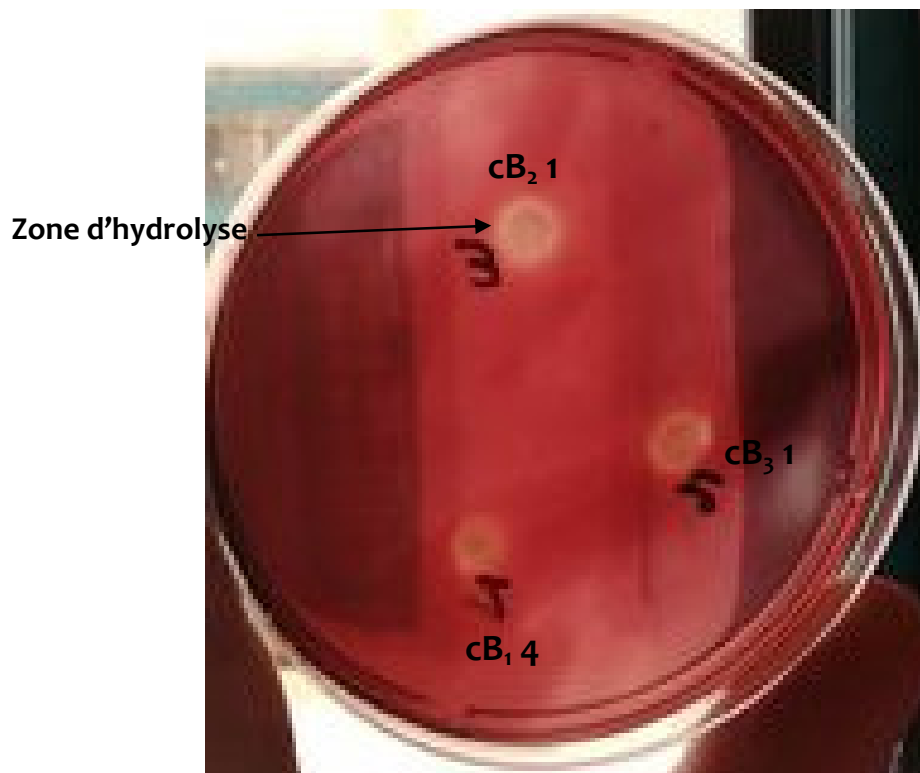


Figure 11 : Activité amylolytique chez les 03souches

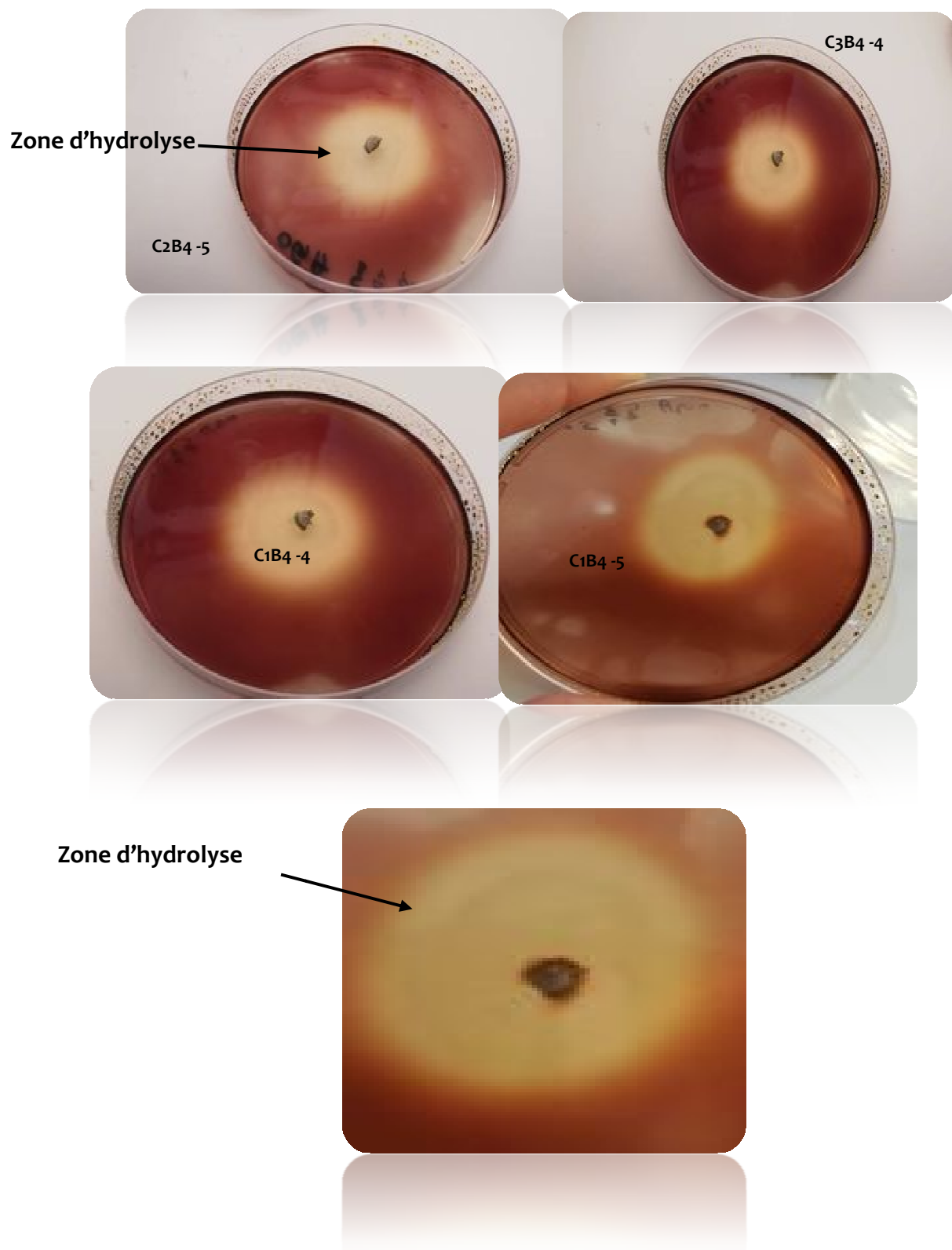


Figure 12 : Activité amylolytique chez les moisissures.

Penicillium C2B4-5, *Penicillium* C3B4-4, *Penicillium* C1B4-4, *Penicillium* C1B4-5.

IV.1.5. Test d'application de l' α -amylase comme un agent de désencollage

Les souches (cB_2 , cB_3 , cB_4) de genre *Lactobacillus* étaient étudiées pour pouvoir éliminer l'amidon de tissu, la réaction a été par l'utilisation de la culture bactérienne, l'observation de quelque zone d'élimination (de couleur marron); ces résultats ne sont pas similaires avec les travaux Ghomrani et Boukerrou qui ont obtenu une élimination remarquable d'amidon, cela peut être dû à la concentration de l'enzyme, puisque dans notre expérience on a utilisé la culture bactérienne donc souche et surnageant.

Le désencollage des tissus nécessite un rendement important de production d' α -amylase par ces souches : *Lactobacillus cB₂*, *Lactobacillus cB₃*, et *Lactobacillus cB₄*.

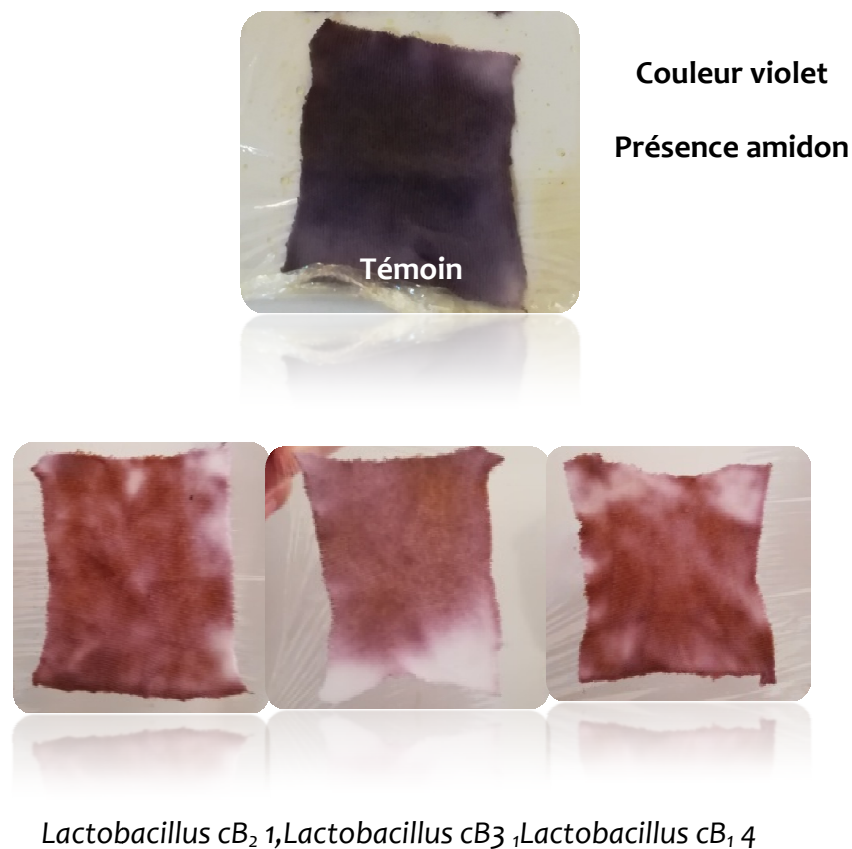


Figure 13: Résultats de désencollage par les cultures bactériennes des souches : *Lactobacillus cB₂*, *Lactobacillus cB₃*, et *Lactobacillus cB₄*.

PARTIE V. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Conclusion

L' α -amylase est l'une des hydrolases les plus importantes agissant sur l'amidon et son application est en constante expansion. Cette enzyme était produite par certaines bactéries, levures et certains types de moisissures.

Notre étude a montré la dominance des bactéries spécialement les bactéries lactiques par rapport aux microorganismes dont elles jouent un rôle essentiel dans la fermentation des légumes ou bien des produits amylacés; par la richesse de produit finale; les métabolites issus de différents types de fermentation tel que l'acide lactique, acétique... qui ont un affect la qualité nutritionnelle et sensoriel de produit finale.

Le screening des souches amylolytique permet de sélectionner quatre champignons de genre *Penicillium* sp avec une activité remarquable par rapport aux bactéries lactiques; parmi 16 isolat susceptible d'être bactéries lactiques 11 ont été amylolytique; que 03 souches de genre *Lactobacillus* ont été testé pour le pouvoir de désencollage des tissus; les résultats ont été plus ou moins positive.

Ces tests d'orientation nécessitent d'autre expérience complémentaire et approfondie dans laquelle on a besoin :

- D'identifier les souches amylolytique; Etudier les conditions optimales de croissance et de production; La sélection des souches les plus performantes et Test d'application d' α amylase.

PARTIE VI. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques

Abada, E. A. (2019). Application of microbial enzymes in the dairy industry. In *Enzymes in food biotechnology* (pp. 61-72). Academic Press.

Abriouel, H., Omar, N. B., López, R. L., Martínez-Cañamero, M., Keleke, S., &Gálvez, A. (2006). Culture-independent analysis of the microbial composition of the African traditional fermented foods potopoto and dégué by using three different DNA extraction methods. *International Journal of Food Microbiology*, 111(3), 228-233.

Ademakinwa, A. N., Agunbiade, M. O., Ayinla, Z. A., &Agboola, F. K. (2019). Optimization of aqueous two-phase partitioning of *Aureobasidium pullulans* α -amylase via response surface methodology and investigation of its thermodynamic and kinetic properties. *International journal of biological macromolecules*, 140, 833-841.

Afzaljavan, F., &Mobini-Dehkordi, M. (2013).Application of alpha-amylase in Antarctic bacteria *Pseudoalteromonas* sp. 2-3. Protein Expression and Purification, *Aspergillus oryzae* by solid-state fermentation. *Waste Management*, 106, 155-161.

Aidoo, K. E., &Nout, M. R. (2010). Functional yeasts and molds in fermented foods and beverages. *Fermented foods and beverages of the world*, 127-148.

Altaf, M. D., Naveena, B. J., & Reddy, G. (2007). Use of inexpensive nitrogen sources and starch for L (+) lactic acid production in anaerobic submerged fermentation. *Bioresource Technology*, 98(3), 498-503.

Ampe, F., ben Omar, N., Moizan, C., Wachter, C., & Guyot, J. P. (1999). Polyphasic study of the spatial distribution of microorganisms in Mexican pozol, a fermented maize dough, demonstrates the need for cultivation-independent methods to investigate traditional fermentations. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(12), 5464-5473.

Anuradha, C. V., & Balakrishnan, S. D. (1999). Taurine attenuates hypertension and improves insulin sensitivity in the fructose-fed rat, an animal model of insulin resistance. *Canadian journal of physiology and pharmacology*, 77(10), 749-754.

Arican, O., & Kurutas, E. B. (2008). Oxidative stress in the blood of patients with active localized vitiligo. *Acta Dermatovenerologica Alpina Panonica Et Adriatica*, 17(1), 12.

Avwioroko, O. J., Anigboro, A. A., Unachukwu, N. N., Tonukari, N. J. (2018). Isolation, *Bacillus licheniformis* So-B3 and its potential in hydrolyzing raw starch. *Life Sciences*,

Badis et al, (2004). Badis A, Guetarni D, Moussa BB, Henni DE, Kihal M. Identification and technological properties of lactic bacteria isolated from raw goat milk of four Algerian races. *Food Microbiology*, 2004; 21: 579-588

BARNABE, S., SASSEVILLE, J. L., VALERO, J., & TYAGI, R. (2003). Eaux usées et résidus industriels, matières tertiaires ou matières premières?. *VECTEUR environnement*, 36(2), 50-62.

Barragán, L. P., Figueroa, J. J. B., Durán, L. R., González, C. A., & Hennigs, C. (2016). Fermentative production méthode. In *Biotransformation of Agricultural Waste and By-Products* (pp. 189-217). Elsevier.

Bautista, D. M., Movahed, P., Hinman, A., Axelsson, H. E., Sterner, O., Högestätt, E. D., ... & Zygmunt, P. M. (2005). Pungent products from garlic activate the sensory ion channel TRPA1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(34), 12248-12252.

Belmessikh, A., Boukhalfa, H., Mechakra-Maza, A., Gheribi-Aoulmi, Z., & Amrane, A. (2013). Statistical optimization of culture medium for neutral protease production by *Aspergillus oryzae*. Comparative study between solid and submerged fermentations on tomato pomace. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 44(3), 377-385.

Benaouida, K. (2008). Etude de l'alpha amylase de levures isolées d'un écosystème extrême (sol environnement des sources thermales) et cultivées sur un milieu à base de lactosérum. *Université Mentouri, Constantine*.

Björkroth, K. J., Schillinger, U., Geisen, R., Weiss, N., Hoste, B., Holzapfel, W. H., ... & Vandamme, P. (2002). Taxonomic study of *Weissella aconifusa* and description of *Weissella acibaria* sp. nov., detected in food and clinical samples. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52(1), 141-148.

Boiron, P., & Périlleux, E. (1996). *Organisation et biologie des champignons*. Nathan.

Botton, B., Breton, A., Fèvre, M., Guy, P., Larpent, J. P., & Veau, P. (1990). Moisissures utiles et nuisibles. Importance industrielle.

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

Chabasse, D., Bouchara, J. P., De Gentile, L., Brun, S., Cimon, B., & Penn, P. (2002). Les moisissures d'intérêt médical. *Cahier de formation*, (25).

Chavatte, N., Baré, J., Lambrecht, E., Van Damme, I., Vaerewijck, M., Sabbe, K., & Houf, K. (2014). Co-occurrence of free-living protozoa and foodborne pathogens on dishcloths: implications for food safety. *International journal of food microbiology*, 191, 89-96.

Cho, J. G., & Dee, S. A. (2006). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Theriogenology*, 66(3), 655-662.

Choi, J. M., Han, S. S., & Kim, H. S. (2015). Industrial applications of enzyme biocatalysis: Current status and future aspects. *Biotechnology advances*, 33(7), 1443-1454.

Corsetti, V., Florenzano, F., Atlante, A., Bobba, A., Ciotti, M. T., Natale, F., ... & Amadoro, G. (2015). NH₂-truncated human tau induces deregulated

mitophagy in neurons by aberrant recruitment of Parkin and UCHL-1: implications in Alzheimer's disease. *Human molecular genetics*, 24(11), 3058-3081.

Crowley, S., Mahony, J., & van Sinderen, D. (2013). Current perspectives on antifungal lactic acid bacteria as natural bio-preservatives. *Trends in food science & technology*, 33(2), 93-109.

Dakhmouche-Djekrif, S. (2016). *Production et caractérisation de l'amylopullulanase de la levure Clavisporalutitaniae ABS7 isolée de blé cultivé et stocké en zones arides* (Doctoral dissertation, Compiègne).

Dasari, P. R., Ramteke, P. W., Kesri, S., & Kongala, P. R. (2019). Comparative study of cellulase production using submerged and solid-state fermentation. In *Approaches to Enhance Industrial Production of Fungal Cellulases* (pp. 37-52). Springer, Cham.

De Vuyst, L., Van Kerrebroeck, S., Harth, H., Huys, G., Daniel, H. M., & Weckx, S. (2014). Microbial ecology of sourdough fermentations: diverse or uniform?. *Food microbiology*, 37, 11-29.

Di Cagno, R., Coda, R., De Angelis, M., & Gobbetti, M. (2013). Exploitation of vegetables and fruits through lactic acid fermentation. *Food Microbiology*, 33(1), 1-10.

Dixit, V., Pandey, V., & Shyam, R. (2001). Differential antioxidative responses to cadmium in roots and leaves of pea (*Pisum sativum* L. cv. Azad). *Journal of Experimental Botany*, 52(358), 1101-1109.

Dueñas, M., Fernández, D., Hernández, T., Estrella, I., & Muñoz, R. (2005). Bioactive phenolic compounds of cowpeas (*Vigna sinensis* L). Modifications by fermentation with natural microflora and with *Lactobacillus plantarum* ATCC 14917. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85(2), 297-304.

Egas, M. C., da Costa, M. S., Cowan, D. A., & Pires, E. (1998). Extracellular α -amylase from *Thermus filiformis* Ork A2: purification and biochemical characterization. *Extremophiles*, 2(1), 23-32.

Fincan, S. A., Özdemir, S., Karakaya, A., Enez, B., Mustafov, S. D., Ulutaş, M. S., Şen, F. from a textile industry as a fungal growth supplement for enhanced α -amylase

Garvie, E. I. (1984). Taxonomy and identification of bacteria important in cheese and fermented dairy products. *Advances in the microbiology and biochemistry of cheese and fermented milk*, 35-66.

Giraffa, G., & Carminati, D. (2008). Molecular techniques in food fermentation: principles and applications. In *Molecular techniques in the microbial ecology of fermented foods* (pp. 1-30). Springer, New York, NY.

Gopinath, G., Kalemli-Özcan, Ş., Karabarbounis, L., & Villegas-Sanchez, C. (2017). Capital allocation and productivity in South Europe. *The Quarterly Journal of Economics*, 132(4), 1915-1967

Guiraud, J. P. (1998). *Microbiologie alimentaire*. Dunod.

Gupta, A., Gupta, V. K., Modi, D. R. et Yadava, L. P. (2008). Production and characterization of α -amylase from *Aspergillus niger*. *Biotechnologie*, 7 (3), 551-556. ISSN 1686-296X.

Gupta, R., Gigras, P., Mohapatra, H., Goswami, V. K., & Chauhan, B. (2003). Microbial α -amylases: a biotechnological perspective. *Process biochemistry*, 38(11), 1599-1616.

Guyot, S., & Richard, F. (2010). Les fronts écologiques-Une clef de lecture socio-territoriale des enjeux environnementaux?. *L'Espace Politique. Revue en ligne de géographie politique et de géopolitique*, (9).

Hammes, A., Andreassen, T. K., Spoelgen, R., Raila, J., Hubner, N., Schulz, H., ... & Willnow, T. E. (2005). Role of endocytosis in cellular uptake of sex steroids. *Cell*, 122(5), 751-762.

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

<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.130554>

<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2011.10.026>

<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.08.159>

<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.05.069>

<https://doi.org/10.1016/j.meteno.2016.06.003>

<https://doi.org/10.1016/j.wasman.2020.03.025>

<https://doi.org/10.1074/jbc.272.11.6876>

identification and in silico analysis of alpha-amylase gene of *Aspergillus niger* strain

Ihsanawati, Natalia, D. (2020). Isolation, expression, and characterization of raw

International Journal of Biological Macromolecules, 140, 833-841.

International Journal of Biological Macromolecules, 50(1), 219-229.

Janeček, Š. (1994). Sequence similarities and evolutionary relationships of microbial, plant and animal α -amylases. *European journal of biochemistry*, 224(2), 519-524.

Janíčková, Z., & Janeček, Š. (2020). Fungal α -amylases from three GH13 subfamilies: Their sequence-structural features and evolutionary relationships. *International Journal of Biological Macromolecules*, 159, 763-772.

Jespersen, L. (2003). Occurrence and taxonomic characteristics of strains of *Saccharomyces cerevisiae* predominant in African indigenous fermented foods and beverages. *FEMS yeast research*, 3(2), 191-200.

Kalia, S., Bhattacharya, A., Prajapati, S. K., & Malik, A. (2021). Utilization of starch effluent from a textile industry as a fungal growth supplement for enhanced α -amylase production for industrial application. *Chemosphere*, 279, 130554.KHE

Lammi, S. (2011). Recherche de substances à activités antimicrobiennes (antibactériennes et anticandidoses) produites par des souches levuriennes isolées des sols sahariens. RRAZ, Z., & LORBI, S. (2015). Contribution à l'étude de l'influence des paramètres physico-chimiques sur l'activité amylolytiques des levures.

Lei, V., & Jakobsen, M. (2004). Microbiological characterization and probiotic potential of koko and koko sour water, African spontaneously fermented millet porridge and drink. *Journal of applied microbiology*, 96(2), 384-397.

Lo, H. F., Lin, L. L., Chen, H. L., Hsu, W. H., & Chang, C. T. (2001). Enzymic properties of a SDS-resistant *Bacillus* sp. TS-23 α -amylase produced by recombinant *Escherichia coli*. *Process Biochemistry*, 36(8-9), 743-750.

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

Maktouf, S. (2013). Activités amylase et lichenase d'une nouvelle souche de *Bacillus*. Production sur milieu solide et caractérisation (Doctoral dissertation, Toulouse, INSA).

Maqsood, S., Benjakul, S., & Kamal-Eldin, A. (2012). Haemoglobin-mediated lipid oxidation in the fish muscle: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 28(1), 33-43.

Marchal, N., Bourdon, J. L., & Richard, C. (1982). Les milieux de culture pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries.

Martínez, J. L., Meza, E., Petranovic, D., & Nielsen, J. (2016). The impact of respiration and oxidative stress response on recombinant α -amylase production by *Saccharomyces cerevisiae*. *Metabolic Engineering Communications*, 3, 205-210.

Melnichuk, N., Braia, M. J., Anselmi, P. A., Meini, M. R., & Romanini, D. (2020). Valorization of two agroindustrial wastes to produce alpha-amylase enzyme from *Aspergillus oryzae* by solid-state fermentation. *Waste Management*, 106, 155-161.

Merabti, R. (2006). Isolement et caractérisation de souches levuriennes amylolytiques à partir de sol saharien algérien.

Mugula, J. K., Nnko, S. A. M., Narvhus, J. A., & Sørhaug, T. (2003). Microbiological and fermentation characteristics of togwa, a Tanzanian fermented food. *International journal of food microbiology*, 80(3), 187-199.

Muyanja, C. M. B. K., Narvhus, J. A., Treimo, J., & Langsrud, T. (2003). Isolation, characterisation and identification of lactic acid bacteria from bushera: a Ugandan traditional fermented beverage. *International journal of food microbiology*, 80(3), 201-210.

Narita, J., Nakahara, S., Fukuda, H., & Kondo, A. (2004). Efficient production of L-(+)-lactic acid from raw starch by *Streptococcus bovis* 148. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 97(6), 423-425.

Naveena, B. J., Altaf, M., Bhadriah, K., & Reddy, G. (2005). Selection of medium components by Plackett–Burman design for production of L (+) lactic acid by *Lactobacillus amylophilus* GV6 in SSF using wheat bran. *Bioresource technology*, 96(4), 485-490.

Naveena, B. J., Altaf, M., Bhadriah, K., & Reddy, G. (2005). Selection of medium components by Plackett–Burman design for production of L (+) lactic acid by *Lactobacillus amylophilus* GV6 in SSF using wheat bran. *Bioresource technology*, 96(4), 485-490.

Naveena, B. M., Mendiratta, S. K., & Anjaneyulu, A. S. R. (2004). Tenderization of buffalo meat using plant proteases from *Cucumistrigonos* Roxb (Kachri) and *Zingiberofficinale* roscoe (Ginger rhizome). *Meat Science*, 68(3), 363-369.

Nouadri, T. (2011). L'α-amylase de *Penicillium camemberti* PL21: Production, Purification, Caractérisation et Immobilisation. *Diplôme de Doctorat d'Etat. Biochimie et Biotechnologies. Université Mentouri Constantine.* p160.

Nout, R. A., Putter, H., Jurgenliemk-Schulz, I. M., Jobsen, J. J., Lutgens, L. C., van der Steen-Banasik, E. M., ... & Creutzberg, C. L. (2009). Quality of life after pelvic radiotherapy or vaginal brachytherapy for endometrial cancer: first results of the randomized PORTEC-2 trial. *Journal of Clinical Oncology*, 27(21), 3547-3556.

Oliveira, P. M., Zannini, E., & Arendt, E. K. (2014). Cereal fungal infection, mycotoxins, and lactic acid bacteria mediated bioprotection: From crop farming to cereal products. *Food microbiology*, 37, 78-95.

Osimani, A., Garofalo, C., Aquilanti, L., Milanović, V., & Clementi, F. (2015). Unpasteurised commercial boza as a source of microbial diversity. *International Journal of Food Microbiology*, 194, 62-70.

Oteng-Gyong, K. (1984). *Introduction à la microbiologie alimentaire dans les pays chauds* (No. 664.8 O8).

PANDEY, A., NIGAM P., SOCCOL, V.T., SINGH, D., MOHAN, R. (2000). Advances in microbial amylases. In: Alva S., Anupama, J., Savla J., Chiu ,Y.Y., Vyshali P., Shruti M., Yogeetha, B.S., Bhavya D., Purvi J., Ruchi, K., Kumudini ,B.S ., Varalakshmi K.N. Production and characterisation of fungal amylase enzyme isolated from *Aspergillus* sp. JGI12 in solid state culture. *African Journal of Biotechnology*. 6(5): 576-581.

Pandey, A., Nigam, P., Soccol, C. R., Soccol, V. T., Singh, D., & Mohan, R. (2000). Advances in microbial amylases. *Biotechnology and applied biochemistry*, 31(2), 135-152.

Pandey, A., Nigam, P., Soccol, C. R., Soccol, V. T., Singh, D., & Mohan, R. (2000). Advances in microbial amylases. *Biotechnology and applied biochemistry*, 31(2), 135-152.

Paulová, L., Patáková, P., & Brányik, T. (2013). Advanced fermentation processes. *Engineering Aspects of Food Biotechnology*, CRC Press, Boca Raton, 89-110.

Pulido-Martos, M., Augusto-Landa, J. M., & Lopez-Zafra, E. (2012). Sources of stress in nursing students: a systematic review of quantitative studies. *International Nursing Review*, 59(1), 15-25.

Reddy, K. R., Gangathulasi, J., Parakalla, N. S., Hettiarachchi, H., Bogner, J. E., & Lagier, T. (2009). Compressibility and shear strength of municipal solid waste under short-term leachate recirculation operations. *Waste Management & Research*, 27(6), 578-587.

Rinaldi, C., Sutton, A., Fothergill, S. R. (1998). The morphology of fungi. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 123-129.

Roy, J. K., Rai, S. K., & Mukherjee, A. K. (2012). Characterization and application of a detergent-stable alkaline α -amylase from *Bacillus subtilis* strain AS-S01a. *International journal of biological macromolecules*, 50(1), 219-229.

Salimon, J., Salih, N., & Yousif, E. (2010). Biolubricants: Raw materials, chemical modifications and environmental benefits. *European journal of lipid science and technology*, 112(5), 519-530.

Sanchez, A. C., Ravanal, M. C., Andrews, B. A., & Asenjo, J. A. (2019). Heterologous expression and biochemical characterization of a novel cold-active α -amylase from the Antarctic bacteria *Pseudoalteromonas* sp. 2-3. *Protein Expression and Purification*, 155, 78-85.

Sanchez, P., Chaminade, C., & Olea, M. (2000). Management of intangibles—An attempt to build a theory. *Journal of intellectual capital*.

Savchenko, A., Vieille, C., Kang, S., & Zeikus, J. G. (2002). *Pyrococcus furiosus* α -amylase is stabilized by calcium and zinc. *Biochemistry*, 41(19), 6193-6201.

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

Schillinger, U., & Lücke, F. K. (1987). Identification of lactobacilli from meat and meat products. *Food microbiology*, 4(3), 199-208.

Singh, P., & Kumar, S. (2019). Microbial enzyme in food biotechnology. In *Enzymes in food biotechnology* (pp. 19-28). Academic Press.

Singh, Y., Javier, J. R., Ehrman, S. H., Magnusson, M. H., & Deppert, K. (2002). Approaches to increasing yield in evaporation/condensation nanoparticle generation. *Journal of Aerosol Science*, 33(9), 1309-1325.

Tamang, J. P., & Fleet, G. H. (2009). Yeasts diversity in fermented foods and beverages. In *Yeast biotechnology: diversity and applications* (pp. 169-198). Springer, Dordrecht.

Tamang, J. P., & Kailasapathy, K. (Eds.). (2010). *Fermented foods and beverages of the world*. CRC press.

Tamang, J. P., Watanabe, K., & Holzapfel, W. H. (2016). Diversity of microorganisms in global fermented foods and beverages. *Frontiers in microbiology*, 7, 377.

Tamminen, S., Oulasvirta, A., Toiskallio, K., & Kankainen, A. (2004). Understanding mobile contexts. *Personal and ubiquitous computing*, 8(2), 135-143.

Toumi, salima. (2018). Isolement et caractérisation des souches levuriennes productrices

Valorization of two agroindustrial wastes to produce alpha-amylase enzyme from

Van Der Maarel, M. J., Van der Veen, B., Uitdehaag, J. C., Leemhuis, H., & Dijkhuizen, L. (2002). Properties and applications of starch-converting enzymes of the α -amylase family. *Journal of biotechnology*, 94(2), 137-155.

Vishnu, C., Naveena, B. J., Altaf, M. D., Venkateshwar, M., & Reddy, G. (2006). Amylopullulanase—a novel enzyme of *L. amylophilus* GV6 in direct fermentation of starch to L (+) lactic acid. *Enzyme and Microbial Technology*, 38(3-4), 545-550.

Wang, Y. C., Zhao, N., Ma, J. W., Liu, J., Yan, Q. J., & Jiang, Z. Q. (2019). High-level expression of a novel α -amylase from *Thermomycesdupontii* in *Pichia pastoris* and its application in maltose syrup production. *International journal of biological macromolecules*, 127, 683-692.

Zacharof, M. P., & Lovitt, R. W. (2012). Bacteriocins produced by lactic acid bacteria a review article. *Apcbee Procedia*, 2, 50-56.

Zhang, Q., Han, Y., & Xiao, H. (2017). Microbial α -amylase: a biomolecular overview. *Process Biochemistry*, 53, 88-101.

Zheng, T., Li, J., & Liu, C. (2021). Improvement of α -amylase to the metabolism adaptations of soil bacteria against PFOS exposure. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 208, 111770.

PARTIE VII. ANNEXES

VII.1. Annexes

Solutions

➤ Eau physiologique

Chlorure de sodium.....	9g
Eau distillée.....	1000ml

Milieux de culture

➤ Milieu de Man, Rogosa, Sharpe (MRS)

Peptone.....	10.0g
Extrait de viande de bœuf.....	8.0g
Extrait de levure.....	4.0g
Glucose.....	20g
Tween 80.....	1ml
Hydrogénophosphate de potassium.....	2.0g
Acétate de sodium 3 H ₂ O.....	5.0g
Citrate d'ammonium.....	2.0g
Sulfate de magnésium 7 H ₂ O.....	0.2g
Sulfate de manganèse 4 H ₂ O.....	0.05g
Agar.....	10.0
Eau distillée.....	1000ml
pH= 6,2 +/- 0,2	

➤ Milieu Poato Dextrose Agar (PDA)

Pomme de terre.....	200g
Glucose.....	20g
Agar.....	20g
Eau distillée.....	1000ml

Laver la pomme de terre et la couper en petit cubes

- Mettre dans 500 ml d'eau distillée et porter à l'ébullition pendant 1 heure.

- Ecraser et filtrer la pomme de terre afin d'obtenir l'extrait

- D'autre part, faire fondre l'agar dans un petit volume d'eau distillée

- Ajouter le filtrat à la solution d'agar
- Ajouter le glucose
- Ajuster le volume à 1000 ml
- Agiter le milieu jusqu'à homogénéisation
- Stériliser par autoclavage à 121 °C pendant 20 min

➤ **Gélose nutritive (GN)**

Extrait de viande.....	10g
Extrait de levure.....	2g
Peptone	5g
Chlorure de sodium.....	5g
Agar.....	15g

Eau distillée..... 1000ml

pH= 7,4

➤ **Bouillon nutritif (BN)**

Peptone	5g
Extrait de viande.....	3.00g
Eau distillée.....	1000ml

➤ **Lait écrémé :**

Lait écrémé en poudre	10g
Extrait de levure.....	0.5g
Eau distillée.....	11ml

➤ **Milieu Amylase, Activity, Medium (AAM)**

Amidon.....	10g
Eau distillée.....	1000ml
Agar.....	20g

pH= 5

➤ **Milieu MRS à 1% d'amidon**

MRS sans extrait de viande et sans glucose..... 1000ml
Amidon.....10g

➤ **COLORATION DE GRAM**

- Réaliser un frottis sur une lame en verre propre et préalablement dégraissée.
- Colorer le frottis avec du violet de gentiane durant 2 minutes.
- Rejeter le colorant et ajouter le Lugol 2× 45secondes.
- Rincer à l'eau.
- Décolorer à l'alcool 96° durant 10 secondes.
- Rincer abondamment à l'eau.
- Faire une contre-coloration avec de la fuchsine diluée à 1/10 durant 2 minutes.
- Rincer à l'eau et observer à l'immersion ×100.

➤ **Coloration avec le bleu de méthylène**

- Le mode opératoire consiste :
- On prépare une goutte de suspension de la souche avec l'eau distillée sur une lame
 - Réaliser un frottis et le fixer.
 - Recouvrir la lame de bleu de méthylène 1 à 2 minutes.
 - Rincer à l'eau distillée.
 - Sécher la lame entre 2 feuilles de papier Joseph.
 - Observation au microscopique aux différents grossissements