

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE MENTOURI-CONSTANTINE

Institut de la Nutrition, de l'Alimentation et des Technologies

Agro-alimentaires (INATAA)

Département de Biotechnologie Alimentaire

N° d'ordre :

N° de série :

MEMOIRE

Présenté pour l'obtention du Diplôme de Magistère en Sciences Alimentaires

Option : biotechnologie alimentaire

Thème

**Production d'alpha amylase par des moisissures cultivées sur
milieu à base de rebuts de dattes**

Présenté par :

Zoubiri Lamia

Devant le jury composé de :

Président :	Pr. Namoune H.	Professeur INATAA, UMC
Rapporteur :	Dr. Amourache L.	MCA. INATAA, UMC
Examineur :	Pr. Bengedouar N.	Professeur ISNV, UMC
Examinatrice :	Dr. Bekhouche F.	MCA. INATAA, UMC
Membre invité :	Dr. Açourène S.	Chargé de recherches, INRAA

Année universitaire : 2011-2012

Remerciements

Je tiens à remercier en premier lieu **ALLAH**, le tout Puissant de m'avoir donné courage, santé et patience pour achever ce travail (**ELHAMDOU LILLAH**).

Ce travail a été réalisé au Laboratoire de Technologies Agro-Alimentaires de la station de Recherches Agronomiques **INRAA-Tougourt-Algérie** sous :

La direction scientifique de Madame **AMOURACHE Leïla** à qui j'adresse mes vifs remerciements pour son encadrement, sa confiance, ses efforts et sa patience lors de la correction du manuscrit.

La co-direction de Monsieur **AÇOURENE Said**, chargé de recherche à la station **INRAA** et Chef de laboratoire de technologies agro-alimentaires de l'**INRAA** et Mademoiselle **DJAFRI Kouther**, attachée de recherche à la même station. Je souhaite leur adresser mes vifs remerciements pour m'avoir accueillie dans leur équipe, pour leurs discussions toujours enrichissantes et pour leur générosité.

Mes remerciements sont adressés aux membres de Jury qui ont bien voulu accepter de juger ce modeste travail :

Monsieur le professeur **NAMOUNE H.** qui nous a fait l'honneur de présider ce Jury ;

Monsieur le professeur **BENGUADOUAR N.** pour l'intérêt qu'il manifeste à ce travail et pour l'honneur qu'il nous a fait en participant à ce Jury.

Madame **BEKHOUCHE F.** qui nous a honorés de bien vouloir examiner ce travail.

Je tiens également à exprimer ma gratitude à l'égard de Mesdames **AIT KAKI Amel** et **LAKHDARI Wassima** pour leurs aide et conseils encourageants.

Ma reconnaissance et mon grand respect s'adressent à ma source de bonheur «**mes parents et mon mari**» qui m'ont soutenue avec patience et prouvé leur confiance en moi. Je leur exprime mon éternelle gratitude.

Je remercie tout particulièrement les familles **KHMISSETE, CHAWKI, ARIF, KHENFAR, SALTANI** et **SAKHR** de Touggourt, pour leur chaleureux accueil familial.

Mes remerciements s'adressent également à tous les gens qui travaillent à la station **INRAA** et au Centre de Vulgarisation Agricole de Sidi Mehdi-Tougourt, pour leur générosité et grande gentillesse.

J'exprime mes vifs remerciements aux Messieurs **ZEGUEY A.** et **AMIB Rachid**, cadres à l'Office National des Statistiques (**ONS-OUARGLA**) pour leur aide.

Enfin, mes remerciements sont aussi adressés aux Messieurs : **BOUASSLA A., BENSALÈM A., BOUGUERRA A., GOMRI M-A.** et les demoiselles **AYAD R.** et **BENLACHHEB R.**

Sommaire

	Pages
Résumés	
Liste des abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Introduction	1
Synthèse BIBLIOGRAPHIQUE	
Chapitre 1 : L'α-amylase	3
1.1 Données sur l' α -amylase	3
1.2 Nomenclature	3
1.3 Différentes origines	3
1.4 Structure et mécanisme d'action	5
1.5 Caractéristiques générales	6
1.6 Production d' α -amylase	7
1.7 Applications industrielles	7
Chapitre 2 : Les moisissures	9
2.1 Définition	9
2.2 Classification	9
2.3 Mode de reproduction	9
2.4 Conditions de croissance et développement	10
2.5 Intérêt industriel	12
Chapitre 3 : La Datte	14
3.1 Définition	14
3.2 Classification es dattes	14
3.3 Importance des dattes en Algérie	15
3.4 Principales variétés en Algérie	15
3.5 Composition biochimique de la datte	15
3.6 Transformation de la datte	16
3.7 Rebutis de dattes et leur mise en valeur	16
PARTIE EXPERIMENTALE	
Chapitre 4 : Matériel et méthodes	18
4.1 Matériel végétal	18
4.2 Microorganismes	18
4.3. Méthode d'isolement, d'ensemencement et d'identification des moisissures	18
4.4 Méthodes analytiques	20
4.5 Production d' α -amylase par fermentation submergée	21
4.5.1 Etude de la cinétique de croissance et de production d' α -amylase	22
4.5.2 Optimisation des productions (biomasse et α -amylase)	24
4.6 Analyse statistique	28
Chapitre 5 : Résultats	30
5.1 Isolement et identification des souches	30
5.2 Caractères macroscopiques et microscopiques des genres identifiés	31

5.3 Réponses des souches isolées au test amylolytique.....	33
5.4 Caractéristiques biochimiques du moût de dattes.....	34
5.5 Production d'α-amylase par fermentation submergée.....	34
5.5.1 Cinétique de croissance des cinq souches et variation du pH du milieu.....	35
5.5.2. Cinétique de production d'α-amylase.....	37
5.5.3 Optimisation des productions (biomasse et α-amylase).....	37
Chapitre 5 : Discussion.....	54
6.1 Isolement et identification des souches.....	54
6.2 Réponse des souches au test amylolytique.....	54
6.3 Caractéristiques biochimiques du moût de datte.....	55
6.4 Production de biomasse et d'α-amylase par fermentation submergée.....	56
6.4.1 Cinétique de production de biomasse par les cinq souches.....	56
6.4.2 Cinétique de production d'α-amylase par les cinq souches.....	57
6.5 Optimisation des productions (biomasse et α-amylase).....	59
6.5.1 Effet des facteurs testés sur la croissance des souches.....	59
6.5.2 Effet des facteurs testés sur la production d'α-amylase.....	61
6.6 pH de milieu à la fin de fermentation.....	64
Conclusion générale et perspectives.....	65
Références bibliographiques.....	67
Annexes	

Liste des abréviations

DNSA : Acide 3,5 dinitrosalicylique

DO : Densité optique

EDTA : Ethylène Diamine Tétra Acétate

E.L : Extrait de levure

INRAA : Institut National de la Recherche Agronomique Algérie

ITGC : Institut Technique des Grandes Cultures

KMnO₄ : Permanganate de potassium

MA: Malt Agar

Na₂CO₃: Carbonate de sodium

PDA: Potato Dextrose Agar

Q.S.P.: qualité sûreté prestataires

U/ml : Unité par millilitre

Liste des figures

Figure 1: Courbe étalon du glucose	23
Figure 2: Cinétique de croissance des cinq souches étudiées.....	36
Figure 3: Variation du pH de milieu pour les cinq souches étudiées.....	36
Figure 04: Cinétique de production d'α-amylase par les cinq souches étudiées.....	37
Figure 05 : Variation de l'activité amylasique de la souche <i>Rhizopus</i> sp. ₁ en fonction des huit essais	46
Figure 06 : Variation de l'activité amylasique de la souche <i>Rhizopus</i> sp. ₂ en fonction des huit essais.....	47
Figure 07 : Variation de l'activité amylasique de la souche <i>Penicillium</i> sp. ₁ en fonction des huit essais	49
Figure 08 : Variation de l'activité amylasique de la souche <i>Alternaria</i> sp en fonction des huit essais.....	50
Figure 09: Variation de l'activité amylasique de la souche <i>Helminthosporium</i> sp en fonction des huit essais	52

Liste des tableaux

Tableau 1: Différents noms d' α -amylase	3
Tableau 2: Différentes α -amylases microbiennes et leur action.....	4
Tableau 3: Différentes applications des α -amylases	8
Tableau 4: Principales caractéristiques de trois types de dattes.....	14
Tableau 5: Composition de la pulpe de Deglet-Nour.....	16
Tableau 6: Tableau récapitulatif des principales valorisations des rebuts des dattes.....	17
Tableau 7: Générateur des matrices pour N= 8, 12, 16, 20, 24 essais.....	25
Tableau 8: Matrcie de Plackett et Burman de huit expériences (7 facteurs) pour la production d' α -amylase par les souches <i>Rhizopus sp (1 et 2)</i>	25
Tableau 9: Facteurs testés pour les souches <i>Rhizopus sp (1 et 2)</i> et leurs concentrations correspondantes.....	26
Tableau 10: Matrcie de Plackett et Burman de huit expériences (7 facteurs) pour la production d' α -amylase par les souches : <i>Penicillium sp₁</i> , <i>Alternaria sp.</i> , et <i>Helminthosporium sp</i>	27
Tableau 11: Facteurs testés pour les souches <i>Penicillium sp₁</i> , <i>Alternaria sp.</i> et <i>Helminthosporium sp.</i> et leurs concentrations correspondantes.....	27
Tableau 12: Isolats fongiques obtenus à partir des deux échantillons d'orge.....	30
Tableau 13 : Caractères macroscopiques et microscopiques des souches isolées.....	32
Tableau 14: tableau récapitulatif représentant les souches potentiellement amylolytiques.....	32
Tableau 15 : Caractéristiques biochimiques de moût de datte utilisé.....	34
Tableau 16 : pH final et quantité de biomasse produite dans les 8 expériences pour la souche <i>Rhizopus sp₁</i>	38
Tableau 17 : Effet des facteurs testés sur la production de biomasse par la souche <i>Rhizopus sp₁</i>	39
Tableau 18 : pH final et quantité de biomasse produite dans les 8 expériences pour la souche <i>Rhizopus sp₂</i>	40
Tableau 19 : Effet des facteurs testés sur la production de biomasse par la souche <i>Rhizopus sp₂</i>	40
Tableau 20 : pH final et quantité de biomasse produite dans les huit expériences pour la souche <i>Penicillium sp₁</i>	41
Tableau 21: Effet des facteurs testés sur la production de biomasse de la souche <i>Penicillium sp₁</i>	42
Tableau 22 : pH final et quantité de biomasse produite dans les huit expériences pour la souche <i>Alternaria sp</i>	43

Tableau 23: Effet des variables étudiées sur la production de biomasse de la souche <i>Alternaria</i> sp.....	43
Tableau 24 : pH final et quantité de biomasse produite dans les 8 expériences pour la souche <i>Helminthosporium</i> sp.....	44
Tableau 25: Effet des variables étudiées sur la production de biomasse de la souche <i>Helminthosporium</i> sp.....	45
Tableau 26: Effet des variables étudiées sur la production d' α -amylase par la souche <i>Rhizopus</i> sp. ₁	46
Tableau 27: Effet des variables étudiées sur la production d' α -amylase par la souche <i>Rhizopus</i> sp. ₂	48
Tableau 28: Effet des variables étudiées sur la production d' α -amylase par la souche <i>Penicillium</i> sp. ₁	49
Tableau 29: Effet des variables étudiées sur la production d' α -amylase par la souche <i>Alternaria</i> sp.....	51
Tableau 30: Effet des variables étudiées sur la production d' α -amylase par la souche <i>Helminthosporium</i> sp.....	52

Introduction

Les enzymes appartenant à la famille des hydrolases telles que, les α -amylases sont parmi les plus importantes enzymes à l'échelle industrielle, ce qui les rendent l'un des outils-clés des biotechnologies (Little, 2004).

En effet, le marché mondial des enzymes est représenté par 80% des hydrolases, particulièrement les amylases et les protéases (Morvan, 2010).

En Algérie, les α -amylases utilisées dans diverses industries (panification, biscuiterie, amidonnerie...etc) sont importées en totalité, ce qui nécessite la création des ateliers locaux pour la production de ces enzymes.

Toutefois, la production d' α -amylase par des procédés biotechnologiques (fermentations), nécessite non seulement l'identification et la sélection des microorganismes amylolytiques, mais également le choix d'un substrat de fermentation à faible coût d'une part, et convenable en point de vue composition en éléments nutritifs nécessaires au développement des microorganismes et la production d' α -amylase, d'autre part.

Dans notre étude portant sur la production d' α -amylase; nous avons choisi les moisissures comme agents de fermentation, vu leur place importante sur le marché des enzymes amylolytiques et leur remarquable capacité à coloniser et à exploiter une grande variété de substrats (Leveau et Bouix, 1993 ; Boiron 1996), et les rebuts de dattes de la variété Deglet-Nour produites en Algérie, comme substrat de fermentation, car ils ont l'avantage d'être à la fois de faible valeur marchande, abondants et théoriquement inépuisables, puisqu'ils sont générés à des quantités importantes estimées moyennement à 67.500 tonne/an (Chehma et Longo, 2001).

Ces rebuts de dattes, par leur richesse en sucres fermentescibles, sels minéraux et vitamines, ont fait l'objet de plusieurs études intéressant la biotechnologie alimentaire, par la production de la levure boulangère, d'acides organiques, d'enzymes amylolytiques, cellulolytiques et de bioalcool (Siboukeur *et al.*, 2001; Ould El Hadj *et al.*, 2006; Bensmira, 2006 ; Boulal *et al.*, 2010 et Açourène et Ammouche, 2011).

Le présent travail a pour principaux objectifs, l'isolement et la sélection de nouvelles moisissures productrices d' α -amylase d'une part, et l'optimisation du milieu de culture, constitué du moût extrait des rebuts de la variété Deglet-Nour, d'autre part.

La concrétisation de ce travail est comme suit:

- Première partie, concerne la synthèse des connaissances sur l' α -amylase, les moisissures et enfin les dattes et leurs rebuts ;

- Deuxième partie, concerne l'isolement et la sélection des souches amylolytiques à partir des grains d'orge ;
- Troisième partie, concerne l'analyse physicochimique du moût de dattes qui servira de milieu de culture pour la production d' α -amylase ;
- Quatrième partie, concerne la production d' α -amylase, en étudiant la cinétique de croissance et de production d'enzyme en premier lieu, et l'optimisation de milieu de culture par l'emploi de la planification expérimentale basée sur les plans statistiques de Plackett-Burman (Plackett et Burman, 1946) qui permettent la sélection des facteurs ayant un effet significatif sur la croissance des souches sélectionnées et la production d' α -amylase.

Revue bibliographique

1.1 Données sur l' α -amylase

L' α amylase est considérée l'une des enzymes industrielles la plus importante et la plus ancienne (Gupta *et al.*, 2008). C'est une macromolécule appartenant à la classe des protéines globulaires, de type endoglycanases, de la classe des hydrolases, qui agit sur les liaisons α (1-4) de l'amidon. Son action fournit dès le début un mélange de glucose, de maltose et de dextrines. En fin de réaction elle fournit du glucose et des résidus correspondant aux liaisons α (1-6) situées aux points de ramification des chaînes (Raimbault, 1981; Alais *et al.*, 2008).

Elle est largement présente chez les animaux, les végétaux et les microorganismes. Bien que les α -amylases de différentes origines aient très peu de séquences d'acides aminés identiques, leur structure tridimensionnelle et l'organisation de leur site actif sont similaires (Mercier, 1985). Leur chaîne polypeptidique est organisée en trois domaines formé chacun d'un tonneau de huit segments bêta, entourés par huit hélices alpha. Leurs sites actifs sont constitués d'un ensemble de sous-sites (Scriban, 1999).

1.2 Nomenclature

Le tableau 1 récapitule les différentes nomenclatures d' α -amylase.

Tableau 1: Différentes nomenclatures d' α -amylase (Mercier, 1985).

Nom systématique	α (1 - 4) D-glucane glucanohydrolase
Non codifié	E.C .3.2.1.1
Nom recommandé	Alpha-amylase.
Synonymes	glycogenase, endoamylase, maxilase, taka-amylase A, takatherm, thermolase, amylotherm, clarase, amylopsin, spitase CP1, G995, kleistase L1, THC 250, maxamy, ptyalin

1.3 Différentes origines

L' α -amylase est une enzyme produite par des plantes, des animaux et des micro-organismes. Cependant, les sources microbiennes sont les plus préférées pour la production à grande échelle (Haq *et al.*, 2002):

- **Origine animale** : L' α -amylase d'origine animale est généralement extraite de la salive humaine et du pancréas des mammifères, tels que les porcs et les veaux (Bertheau *et al.*, 1985; Chatterton *et al.*, 1996).

- **Origine végétale** : L' α -amylase joue chez les plantes un rôle important dans le métabolisme glucidique, où elle participe à l'hydrolyse de l'amidon en produisant des sucres réducteurs (glucose et maltose) directement assimilables (Badot et Merlin, 1984). Cette enzyme végétale est généralement obtenue par extraction à partir des céréales, notamment le blé, l'orge, le son ou le riz (Srinivasa Rao *et al.*, 2004). Elle est souvent formée au cours de la germination des graines, qui requiert une activité enzymatique très importante pour la mobilisation des réserves et le développement de l'embryon (Brawn et Kelly, 1993 ; Charles *et al.*, 2003).

- **Origine microbienne** : Deux types sont distingués : les α -amylases bactériennes et les α -amylases fongiques.

✓ Les α -amylases fongiques

La production industrielle d'enzymes à partir des microorganismes fongiques appartenant surtout aux genres *Aspergillus* et *Penicillium*, existe depuis longtemps, du fait que la première production d' α -amylase a été réussie par Takamine en 1894. L' α -amylase fongique est d'une thermostabilité assez faible, son optimum d'action se situe entre 50°C et 55°C (Fogarty et Kelly, 1994 ; Duo-Chuan *et al.*, 1997).

Actuellement d'autres genres de moisissures dont *Rhizopus* et *Alternaria* ont été utilisés pour la production d' α -amylase relativement thermostable (Lateef *et al.*, 2004 ; Ait Kaki *et al.*, 2012). Les levures participent également à la production d' α -amylase (Leveau et Bouix, 1993).

✓ Les α -amylases bactériennes

Ce type d'enzymes est obtenu principalement par fermentation de Bacillacées (Milner *et al.*, 1997). Il s'agit de *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus licheniformis* (Bousseboua, 2002) et *Bacillus subtilis* (Mc Tighe *et al.*, 1995).

Le tableau 2 récapitule les différentes α -amylases microbiennes et leur action.

Tableau 2: Différentes α -amylases microbiennes et leur action (Liese *et al.*, 2000).

Enzyme	Source	Action
α -amylase	<i>Bacillus-amyloliquefaciens</i> <i>Bacillus licheniformis</i> <i>Aspegillus</i> <i>Saccharomyces</i>	Hydrolyse des liaisons α -(1,4) au hasard à l'intérieur de la chaîne, en donnant de l' α -dextrine, de maltose et de glucose.
α -amylase saccharifiante	<i>Bacillus subtilis</i>	Comme la précédente, sauf qu'elle produit jusqu'à 50% du glucose.

1.4 Structure et mécanisme d'action

Structurellement, les α -amylases sont considérées comme des glycoprotéines renfermant 478 acides aminés répartis en deux domaines globulaires appelés A (1-380 résidus) et B (381-478 résidus). Ces domaines sont associés par une chaîne polypeptidique constituée principalement de résidus hydrophobes. 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 huit feuillets β plissés et de huit hélices α (Chiba, 1988 ; Burhan, 2003).

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. Les groupes impliqués dans la réaction du site actif sont deux acides carboxyliques et un noyau imidazole (Parkc *et al.*, 1997).

Ce mécanisme est une caractéristique de l'enzyme et selon les conditions expérimentales (température, pH, taille et structure du substrat), l'enzyme peut utiliser l'un ou l'autre mécanisme et même une combinaison entre plusieurs mécanismes (Mazur et Nakatani, 1993 ; Nielson *et al.*, 2001):

- **Attaque aléatoire:** l' α -amylase hydrolyse aléatoirement les liaisons glucosidiques, libérant deux fragments, qui seront séparément attaqués.

- **Attaque préférée:** l' α -amylase montre une préférence pour certaines liaisons dans le substrat.

- **Attaque répétitive ou multiple:** elle implique le déplacement de l'enzyme tout au long de la chaîne du substrat, pour hydrolyser les liaisons glucosidiques sans se dissocier du substrat (Berry et Paterson, 1990 ; Scriban, 1999).

Fogarty et Kelly (1980), signalent que les α -amylases sont des métallo-enzymes à calcium, vu la nécessité des ions calcium à l'activité enzymatique et au maintien de la stabilité de la structure en acides aminés de ces enzymes.

1.5 Caractéristiques générales

1.5.1 Spécificité de substrat

Le substrat naturel de l' α -amylase est l'amidon (Pandey *et al.*, 2000 ; Alais *et al.*, 2008).

Dans la molécule d'amidon, les unités de glucose sont reliées par des liaisons osidiques α (1-4) en formant ainsi des chaînes hélicoïdales d'amylose, sur lesquelles de courtes chaînes de même constitution se branchent par des liaisons osidiques α (1-6) (Mercier, 1985).

La production d' α -amylase par certaines souches fongiques (*Aspergillus* sp., *Rhizopus* sp. et *Penicilium* sp.) est contrôlée par l'amidon; il s'agit d'une induction de l'enzyme par son substrat naturel (Leveau et Bouix, 1993; Nouadri 2011).

1.5.2 Température optimale

En général, les α -amylases ont une température optimale comprise entre 25 °C et 70 °C, avec une grande stabilité thermique pour les α -amylases bactériennes (Larpen-gourgaud et Sanglier, 1992).

Vertiani *et al.* (1998), signalent que la température optimale des α -amylases bactériennes varie de 50 °C à 90 °C, avec possibilité de résistance à des températures dépassant 100 °C, pour celles isolées des souches hyperthermophiles.

Cependant la température optimale des α -amylases fongiques varie de 40 °C à 60 °C avec un optimum plus élevé (65 °C) pour l' α amylase de la souche *Rhizopus oryzae* (Lucio *et al.*, 1996).

1.5.3 pH optimal

Les α -amylases sont généralement stables dans une gamme de pH de 4 à 9, avec un optimum variant de 4 à 5 pour les α -amylases fongiques, et un optimum supérieur à la neutralité, soit 6 à 8.5 pour les α -amylases bactériennes (Larpen-gourgaud et Sanglier, 1992).

Selon Lucio *et al.*, (1996) , l' α -amylase de la souche *Rhizopus oryzae* a un pH optimal se situant entre 4 et 6,5.

1.5.4 Ions métalliques

Les α -amylases sont des métalloprotéines absolument dépendantes du Ca^{2+} , qui est vraisemblablement un activateur allostérique (Egas *et al.*, 1998). Le calcium ne participe pas directement à la formation du complexe enzyme-substrat, mais il maintient l'enzyme dans une conformation optimale pour un maximum d'activité et de stabilité vis à vis de la dénaturation

thermique (Savcheko *et al.*, 2002 ; Peixoto-Nogueira *et al.*, 2008) et de la dénaturation par protéolyse (Nigam *et al.*, 1995 ; Mc tigue *et al.*, 1995).

L'activité enzymatique de l' α -amylase n'est pas modifiée par les ions K^+ , Na^+ , NH_4^+ , mais elle est fortement inhibée par l'éthylène diamine tétra acétate (EDTA) et les métaux lourds (Igarashi *et al.*, 1998; Talamond *et al.*, 2002).

1.6 Production d' α -amylase

Plusieurs auteurs travaillent au criblage des microorganismes pour la production d'enzymes, l'isolement et la production des α -amylases extracellulaires (Jensen *et al.*, 1987 ; Haasumet *et al.*, 1991), ainsi que la purification et la caractérisation de ces dernières (Nguyen *et al.* 2000). Des α -amylases microbiennes sont maintenant industriellement produites, par des espèces de *Bacillus*, *Aspergillus* et *Rhizopus*, par fermentation submergée ou semi solide (Niehaus *et al.*, 1999; Bel'en *et al.*, 2006).

Actuellement, la production d' α -amylase met en jeu des procédés biotechnologiques à moindre coût, utilisant comme substrat de fermentation des déchets organiques, tels que la pulpe de betterave (Baldwin *et al.*, 1986), les déchets d'oranges (Diomi *et al.*, 2008 ; Mahmoud *et al.*, 1998 ; Hart *et al.*, 1991), les produits céréaliers (Pascal et Thomas, 1990), les rebuts des dattes (Açourène et Ammouche, 2011) et le lactosérum (Ait Kaki *et al.*, 2012).

Le milieu de fermentation contient en général l'amidon, considérée comme meilleur inducteur de l' α -amylase bactérienne (*Lanuginosus thermomyces*) et fongique (*Aspergillus* et *Penicillium*) (Leveau et Bouix, 1993).

1.7 Applications industrielles

Les α -amylases sont parmi les hydrolases les plus importantes pour toutes les industries à base d'amidon, et leur commercialisation est la plus ancienne, avec première utilisation en 1984, comme aide pharmaceutique pour le traitement de désordres digestifs. Aujourd'hui, les α -amylases trouvent l'application dans tous les processus industriels, avec une dominance des α -amylases microbiennes qui ont complètement remplacé, non seulement l'hydrolyse chimique dans les industries de transformation d'amidon, mais également dans les industries chimiques pharmaceutiques et autres (Bennett, 1998).

Actuellement, les α -amylases ont la part principale du marché mondial d'enzymes, dont plusieurs différentes préparations d' α -amylase sont disponibles avec de divers fabricants d'enzymes pour utilisation spécifique dans diverses industries (Aehle et Misset, 1999).

Le tableau 3, rapporte en bref les divers domaines d'application des α -amylases.

Tableau 3: Différentes applications des α -amylases

Industries	Applications
Glucoserie	Solubilisation de l'amidon, accompagnée d'une chute importante de la viscosité (liquéfaction) (Alais <i>et al.</i> , 2008).
Sucrierie	Réduction de la viscosité des sirops de cannes à sucre, en hydrolysant les contaminants amylacés pour assurer la réussite de processus de cristallisation (Van der maarel <i>et al.</i> , 2002).
Biscuiterie et panification	Amélioration des propriétés rhéologiques et fermentaires de la pâte, ainsi que le volume de la mie et la coloration de la croûte (Pandey <i>et al.</i> , 2000).
Industrie textile	Désencollage textile, qui permet d'éliminer la colle d'amidon qui enduit les fibres et les protège au cours du tissage (Hendriksen <i>et al.</i> , 1999).
Papeterie	Liquéfaction de l'amidon, pour préparer des sauces de couchage permettant d'éliminer les irrégularités superficielles de la feuille (Tolan, 1996).
Détergent	Dégradation des taches à base d'amidon, les oligosaccharides et les dextrans libérés de l'action hydrolytique sont solubles, ce qui facilite le découpage physique de la tache (Kottwitz <i>et al.</i> , 1994).
Industrie pharmaceutique	Traitement de diabète et de l'obésité (Nielson <i>et al.</i> , 2001).

2.1 Définition

Les moisissures sont des champignons microscopiques, qui ont des actions bénéfiques, mais aussi néfastes pour l'homme. Ce sont des eucaryotes, hétérotrophes, donc obligés de puiser dans le milieu de développement les substances nutritives nécessaires à leur métabolisme (Dao, 2005).

Certaines moisissures vivent en symbiose avec des végétaux, d'autres sont des parasites de végétaux ou d'animaux, d'autres sont des saprophytes, se développant aux dépens de substrats inertes ou en voie de décomposition (Bourgeois *et al.*, 1989 ; Leveau et Bouix, 1993).

Les moisissures possèdent un appareil végétatif constitué par un thalle filamenteux : le mycélium, dont les filaments s'appellent des hyphes. Le mycélium peut différencier des organes forts variés selon les groupes, spécialisés dans la multiplication et la dissémination, auxquels est accordée la dénomination globale de spores (Bourgeois *et al.*, 1989).

2.2 Classification

Différents groupes de moisissures ont été définis suivant leur mode de reproduction sexuée et les caractéristiques de leur spore. Les Eumycètes forment un groupe très vaste, incluant les classes principales des moisissures (Bourgeois *et al.*, 1989), à savoir les Zygomycètes, les Ascomycètes, les Basidiomycètes et les Deutéromycètes.

Les Zygomycètes possèdent des spores contenues à l'extérieur d'une cellule renflée, les Ascomycètes ont des spores regroupées dans des sortes de sacs, les Basidiomycètes qui ont des spores portées par des basides, et les Deutéromycètes. Ces derniers sont un groupe hétérogène dont on ne connaît pas actuellement, pour la plupart, la forme de reproduction sexuée (Kiffer et Morelet, 1997 ; Cahagnier *et al.*, 1998).

Les moisissures se rencontrent dans tous les groupes, en particulier dans les Hyphomycètes, mais sont assez peu nombreuses chez les Basidiomycètes (Frazier, 1967; Punt *et al.*, 2002).

2.3 Mode de reproduction

L'appareil végétatif des moisissures est un thalle composé de filaments (hyphes) ramifiés, dont l'ensemble constitue le mycélium. Ils se reproduisent grâce à des spores, qui sont issues soit d'une reproduction sexuée (champignon téléomorphe) ou d'une multiplication asexuée (champignon anamorphe). Certains champignons, chez lesquels, les deux formes coexistent sont appelés holomorphes (Guiraud, 1998 ; Dao, 2005).

2.4 Conditions de croissance et développement

Pour assurer leur croissance et développement, les moisissures comme tout autre microorganisme, utilisent les sources de carbones et d'énergie qu'elles trouvent dans leur environnement et qu'elles dégradent, à l'aide d'enzymes exocellulaires appropriées. Les produits résultants, absorbés sélectivement et soumis à leur tour à l'action d'enzymes endocellulaires, sont transformés en molécules plus petites fournissant l'énergie et les précurseurs indispensables pour la biosynthèse des métabolites primaires, qui peuvent être à l'origine d'autres métabolites dits secondaires (Leveau et Bouix, 1993).

Les conditions optimales de croissance peuvent varier d'une espèce à l'autre, chacune d'entre elles ayant un degré différent d'adaptation à son environnement (Halewyn *et al.*, 2002).

Selon Boiron (1996), le développement optimal (croissance et reproduction) des moisissures nécessite la connaissance et le contrôle des facteurs nutritionnels et physicochimiques du milieu de culture.

2.4.1 Facteurs nutritionnels

Les éléments nutritifs de base qu'exigent les moisissures pour se développer sont le carbone, l'azote et les minéraux (Davet, 1997).

✓ Source de carbone

Pratiquement, tous les composés organiques peuvent être utilisés comme source de carbone et d'énergie par les moisissures. La plupart d'entre elles peuvent métaboliser le glucose et le saccharose, avec quelques polysaccharides comme l'amidon et la cellulose (Boiron, 1996 ; Nicklin *et al.*, 2000). Certaines d'entre elles, produisent des lipases extracellulaires capables d'hydrolyser les lipides en glycérol et acides gras, qui peuvent être assimilés par beaucoup d'espèces fongiques, alors que seulement certaines espèces utilisent les acides organiques et l'éthanol (Boiron, 1996).

✓ Source d'azote

La plupart des moisissures assimilent l'azote sous forme de NH_4^+ , dont la présence réprime l'utilisation d'autres sources azotées (nitrate, acides aminés et protéines). L'ammoniaque est transformé en acide glutamique, en glutamine ou en d'autres acides aminés par transamination (Boiron, 1996), alors que seules certaines espèces utilisent le nitrate, d'autres ne peuvent croître qu'en présence d'azote organique et aucune moisissure ne peut fixer l'azote atmosphérique (Punt *et al.*, 2002).

✓ Sels minéraux

Certains minéraux, tels que le phosphore (assimilé sous forme H_2PO_4^-), soufre (assimilé sous forme sulfate ou composés réduits), potassium...etc., sont exigés à concentration relativement élevée (environ 10^{-3} M).

Cependant, certains minéraux, tels que le fer, cuivre, manganèse, zinc et molybdène sont exigés à concentration faible (10^{-6} M ou moins) (Boiron, 1996).

✓ Facteurs de croissance et vitamines

Boiron (1996), signale que les stérols, les acides gras et certaines vitamines de groupe B sont nécessaires pour le développement d'un certains nombre d'espèces fongiques.

2.4.2 Facteurs physico-chimiques

Les facteurs physicochimiques ont une influence importante sur le développement des moisissures. Parmi ces facteurs les plus importants :

✓ Température

La température joue un rôle prépondérant dans la croissance mycélienne, elle intervient également dans la sporulation et la germination des spores (Bourgeois *et al.*, 1989). La plupart des moisissures sont mésophiles se développant bien à des températures de 25 à 35°C (Botton *et al.*, 1990 ; Julien, 2002). Quelques espèces sont thermotolérantes ou thermophiles et peuvent croître à hautes températures (au dessus de 50°C), avec une croissance optimale aux environ de 20 à 25°C, *Aspergillus fumigatus* est un bon exemple (Botton *et al.*, 1990; Nicklin *et al.*, 2000).

D'autres sont des psychrophiles ou psychrotolérantes, se développant à basses températures (entre -5 et 10°C), telles que *Helicostylum pulchrum*, *Chrysosporium pannorum* et *Cladosporium herbarum*. Ces espèces peuvent même survivre à -60°C et elles sont rencontrées dans des entrepôts frigorifiques (Davet, 1997 ; Botton *et al.*, 1990).

✓ Activité de l'eau (A_w)

Théoriquement, les limites pour la croissance microbienne s'étendent de 0.65 à 1, avec une limite inférieure absolue de 0.55. En pratique, si l' a_w dans le matériau peut être maintenue sous les 0.75, la croissance microbienne sera limitée, tandis qu'il n'y aura pratiquement aucune croissance microbienne sous une a_w de 0.65, même sur les matériaux les plus facilement attaquables. Les spores de moisissures pourront toutefois, rester viables sous ces valeurs et ce, sur de longues périodes de temps (Halwyn *et al.*, 2002).

✓ pH

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

Toutefois, les variations du pH, peuvent influencer la croissance fongique, soit indirectement en agissant sur la disponibilité de certains nutriments, soit directement par action sur la membrane cellulaire, sachant que la plupart des moisissures peuvent ajuster le pH du milieu à leur convenance (Boiron, 1996).

✓ Oxygène

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

✓ Lumière

La lumière peut influencer favorablement ou défavorablement la croissance et la sporulation de certaines moisissures, mais la plupart d'entre elles se développent aussi bien à lumière qu'à l'obscurité (Leveau et Bouix, 1993).

Toutefois, Boiron (1996) signale que la lumière influence la croissance de certaines moisissures, soit par destruction photochimique de constituants du milieu, soit en agissant directement sur le métabolisme fongique (induction de la biosynthèse des pigments caroténoïdes de *Fusarium aquaeductuum*).

2.5 Intérêt industriel

Les moisissures manifestent une très grande utilité dans de larges secteurs de la vie économique (Leveau et Bouix, 1993).

2.5.1 Domaine d'alimentation

Les champignons filamenteux sont des producteurs importants d'acides organiques, tels que l'acide gluconique, l'acide malique, l'acide acétique et l'acide citrique (Leveau et Bouix, 1993 ; Boiron, 1996). Ce dernier est notamment produit par *Aspergillus niger*, où 60% de sa production est destinée au secteur alimentaire (Botton *et al.*, 1990).

Le rôle de certaines espèces du genre *Penicillium* en fromagerie (*P. Camemberti*, *P. roqueforti*) a été confirmé par des études sur des laits caillés à flore contrôlée (Lenoir *et al.*, 1979).

La production de biomasse peut être une source importante pour l'alimentation animale et même humaine, en servant de complémentation des produits céréaliers. Quelques espèces fongiques ont un grand usage, c'est le cas d'*Aspergillus niger* et de *Fusarium graminearum* (Botton *et al.*, 1990 ; Larpent- Gourgaud et Sanglier, 1992 ; Delgado-Jarana *et al.*, 2002).

Les enzymes fongiques restent toujours les outils clés de la biotechnologie et reflètent de plus en plus l'importance et le rôle infini des moisissures dans les différentes applications alimentaires. *Aspergillus niger* est un bon exemple, il produit la cellulase, les amylases, l'invertase et la pectinase, employées principalement comme des catalyseurs biologiques en glucoserie, brasserie et pour la fabrication des boissons. Cette moisissure secrète aussi des protéases, des lipases et des estérases, utilisées dans différentes applications alimentaires (Kosikowski, 1988 ; Scriban, 1999).

2.5.2 Domaine de la santé

La diversité d'action des moisissures est remarquable dans le domaine de la santé. Elle se manifeste notamment dans la fabrication d'antibiotique (la pénicilline de *penicillium notatum*), de vitamines, d'hormones et de nombreuses substances pharmacologiquement actives (Leveau et Bouix, 1993 ; Ellaiah *et al.*, 2003).

2.5.3 Domaine phytosanitaires

Il s'agit des gibbérellines, hormones de croissance végétales produites par une moisissure pathogène *Gibberella fujikuroi* et des myco-pesticides englobant certaines espèces appartenant aux Zygomycètes et aux Deutéromycète (Leveau et Bouix, 1993).

2.5.4 Autres domaines

Certaines moisissures luttent contre la pollution. Un rôle anti-mucor du genre *penicillium*, conduisant ainsi à l'élimination de problème appelée couramment accident de « poil du chat » (Samson *et al.*, 1977).

Une culture mixte de moisissures et levures (*Mucor hiemalis*, *Aspergillus niger* et *Galactomyces geotrichum*), est utilisée dans la biodégradation d'effluents industriels en éliminant ainsi la pollution causée par la décomposition de la matière carbonée (Djelal et Perrot 2009).

3.1 Définition

La datte est le fruit de palmier dattier (*Phoenix dactylifera*) qui fait partie de la grande famille des palmacées. Le genre *Phoenix* comporte au moins douze espèces, dont *dactylifera* reste la plus connue et que le fruit « datte » fait l'objet d'un commerce international important (Espiard, 2002).

Richard (1972), décrivait la datte comme étant une baie constituée de deux parties : une partie comestible représentée par la chair ou pulpe dont la forme, la consistance et la couleur à maturité sont selon les variétés, et une partie non comestible représentée par la graine ou noyau ayant une consistance dure.

Le même auteur indiquait que la datte ayant un poids de 2 à 7,8g et une longueur de 1,5 à 8cm.

3.2 Classification des dattes

Selon leur consistance, les dattes peuvent être classées en:

- **Dattes molles:** Elles sont aqueuses et connues par leur forte teneur en sucres réducteurs.
- Dattes demi-molles:** Représentées par Deglet-Nour, dont les sucres sont en majorité réducteurs.
- **Dattes sèches:** Représentées par Degla Beida, Mech Degla...etc., dont la consistance est dure, la chair ayant un aspect farineux et le saccharose demeure leur sucre dominant (Meunier, 1973). Le même auteur signale que les trois types de dattes se singularisent par leur teneur en eau et leur proportion en sucres réducteurs et non réducteurs.

Le tableau 4, résume les principales caractéristiques de chaque type de ces dattes.

Tableau 4: Principales caractéristiques des trois types de dattes (Siboukeur, 1997).

Type de datte	Teneur en eau	Teneur en sucres réducteurs	Teneur en saccharose	Couleur de pulpe	Goût	Conservation
Sèche	-	-	Teneur élevée	Clair blanche	Acidulé	Très bonne
Demi molle	Teneur moyenne	Teneur moyenne	Teneur moyenne	Marron Clair	Parfumé	Bonne
Molle	Teneur élevée	Teneur élevée	-	Marron, noir	Très parfumé	Faible

3.3 Importance des dattes en Algérie

Sur le plan mondial, l'Algérie occupe le cinquième rang en terme de production. Elle est classée après l'Irak, l'Emirat, l'Egypte et l'Arabie Saoudite, soit 538000 tonnes, avec un nombre de palmier de 13,3 millions. Sur le plan qualité, l'Algérie occupe le premier rang pour la variété Deglet-Nour, avec une moyenne de production de 250000 tonnes/an (statistiques agricoles, 2008).

3.4 Principales variétés cultivées en Algérie

Les variétés de dattes algériennes sont très nombreuses, seulement quelques unes ont une importance commerciale. Elles se différencient par leur saveur, consistance, forme, couleur, poids et dimensions (Djerbi, 1994; Buelghedj, 2001).

Il existe plus de 800 variétés de dattes algériennes qui se différencient entre elles par leur qualité et leur appréciation par le consommateur (Dubost, 1991).

Toutefois, la variété Deglet-Nour reste l'unique variété commerciale par excellence des dattes demi-molles. Elle est la plus appréciée par le consommateur, du fait de son aspect, son onctuosité et sa saveur. À maturité elle est d'une couleur brune ambrée avec un épicarpe lisse légèrement plissé et brillant, le mésocarpe présente une texture fine légèrement fibreuse. Son poids atteint 12g, avec une longueur moyenne de 4 à 5 cm et un diamètre moyen de 1.8 cm (Mattalah, 1970; Boudrar *et al.*, 1997; Kendri, 1999).

3.5 Composition biochimique de la datte

La datte est constituée d'une pulpe et d'un noyau, la proportion du noyau par rapport à la datte entière constitue une caractéristique de qualité qui dépend, non seulement de la variété mais aussi des facteurs climatiques et des conditions de culture. Cette caractéristique est utilisée par les sélectionneurs pour évaluer la qualité d'une telle ou telle variété, sachant qu'une datte de qualité Deglet-Nour, comporte 10% de noyau et 90% de pulpe (Mama, 2009). Munier (1973), signale que le sucre et l'eau sont les constituants prédominants de la chair. C'est leurs proportions qui déterminent la consistance de la datte. En effet, la stabilité de la datte dépend du rapport sucre/eau, qui doit être d'environ 2 (Matallah, 1970).

Le tableau 5 donne la composition de la pulpe de la datte fraiche Deglet-Nour.

Tableau5: Composition de la pulpe de Deglet-Nour (Devshony *et al.*, 1992).

Constituants	% du poids à l'état frais
Eau	23
Protéines	1.5
Sucres totaux	65.00
Saccharose	33.44
Glucose	15.10
Fructose	14.70
Cellulose	7.20
Lipides	0.05
Cendres	1.9

En plus des sucres, la datte contient des protéines, des vitamines (vitamine B₆ et la vitamine C) et des éléments minéraux, à des quantités appréciables (Devshony *et al.*, 1992).

3.6 Transformation de la datte

Malgré la disponibilité de certains produits résultant de la transformation des dattes, tels que les pattes et farines de datte, confiture, crèmes et sirop de dattes, le domaine de transformation des dattes accuse un retard technologique, avec des systèmes de transformation archaïques et un tonnage dépassant 30% de la production, reste non utilisé et mérite d'être valorisé (récupéré et transformé) (Boukhiar, 2009).

3.7 Rebutis de dattes et leur mise en valeur

Les rebutis de dattes ou écarts de tri, représentent les fruits du palmier dattier non consommés par l'être humain et qui sont destinés habituellement à l'alimentation de bétails. Il existe principalement trois catégories représentant le tonnage le plus important des rebutis:

- **Dattes véreux** : dattes pourries ;
- **Hchef** : dattes déshydratées avant maturité à cause de conditions climatiques défavorables ;
- **Sich** : dattes non fécondées suite à la mauvaise qualité ou indisponibilité de pollen.

Les rebutis de dattes peuvent atteindre 25% de la production totale des dattes (Mama, 2009).

En 2008, le tonnage annuel de rebutis de la variété Deglet-Nour a été estimé à 62500 tonnes (DSA, 2008). Ces rebutis riches en sucres, peuvent être transformés par des procédés biotechnologiques pour obtenir de la levure boulangère, de l'alcool et du vinaigre (Açourène *et al.*, 2008).

Chehema *et al.* (2003), démontrent que l'utilisation digestive des régimes à base de rebuts de dattes chez le mouton et le dromadaire, a une influence plus au moins importante sur la digestibilité *in vivo* de la matière sèche, organique et azotée.

Les travaux d'Akbache et Bariout (2007) et de Belaidi et Barka (2009), montrent que le moût et la farine de datte constituent des milieux favorables au développement des champignons microscopiques ; aussi bien pour la production de la biomasse que pour la production des enzymes fongiques de grande importance industrielle, telles que les enzymes amylolytiques.

Le tableau 6 récapitule les principales valorisations par procédés biotechnologiques (fermentations) des rebuts de dattes algériennes.

Tableau 6: Principales valorisations des rebuts des dattes algériennes.

Produit de valorisation	Microorganismes utilisés	Références
Acide citrique	<i>Aspergillus niger</i>	(Açourène et Ammouche, 2011).
Vinaigre	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> et bactéries acétiques	(Boukhiar, 2009)
Levure boulangère	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	(Ould El Hadj <i>et al.</i> , 2006; Açourène et Tama, 2006)
Ethanol	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	(Kaidi et Touzi, 2001; Boulal <i>et al.</i> , 2010 ; Açourène et Ammouche, 2011)
α-amylase	<i>Rhizopus oryzae</i> , <i>Aspergillus niger</i> , <i>Candida guilliermondii</i>	Akbache et Bariout, 2007 ; Mama, 2009; Açourène et Ammouche , 2011)
Cellulase	<i>Trichoderma sp.</i>	(Bensmira, 2006)
Invertase	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	(Berguiya et Hafi., 2012)

Matériel et méthodes

La partie expérimentale a été réalisée durant quatre mois au niveau de la station expérimentale de Sidi Mehdi-Touggourt rattachée à l'Institut National de la Recherche agronomique d'Algérie (**I.N.R.A.A.**).

4.1 Matériel

Dans ce travail, deux matériels végétaux représentés par les rebuts de dattes et l'orge, ont été utilisés pour servir, respectivement à la préparation du milieu de culture et l'isolement des souches désirées.

4.1.1 Choix du matériel végétal

Les rebuts de dattes (dattes ratatinées et desséchées avant maturité appelé communément « H'chef ») produits par la variété Deglet-Nour, ont été choisis en raison de leur disponibilité en quantités importantes dans la région en générale, et particulièrement à la station de recherches agronomiques (INRAA-Touggourt) d'une part, et de leur faible valeur marchande, d'autre part. Les dattes ont été triées pour obtenir un lot homogène avant de les laver et peser pour extraire leur moût, qui sera utilisé comme milieu de culture de base pour la production d' α -amylase.

Quant à l'orge, les grains ont été triés en éliminant tout grain cassé ou altéré.

4.1.2 Origine du matériel végétal

Les rebuts de dattes ont été fournis par la station **I.N.R.A.A** de Touggourt. Ils sont constitués que par les déchets générés à la récolte des fruits de la palmeraie de la station.

Pour l'orge, en provenance de deux régions locales différentes: Touggourt (Sud algérien) et Sétif (Est algérien), fournis respectivement par la station **I.N.R.A.A** de Touggourt et l'institut technique de grandes cultures de Constantine (**I.T.G.C**).

4.2 Microorganismes

Toute moisissure isolée à partir d'orge et possédant un pouvoir amylolytique, représente le microorganisme utilisé pour la suite du travail.

4.3 Méthodes d'isolement, d'ensemencement et d'identification des moisissures

Les étapes d'isolement et d'identification réalisées sont celles recommandées par Botton *et al.* (1990); Champion (1997) ; Malloch (1997) ; Cahagnier (1998) et Guiraud (1998).

✓ **Triage et traitement des grains d'orge**

Le tri des grains d'orge a été fait en fonction de la couleur et l'aspect des grains.

Tout changement de couleur ou d'aspect général des grains supprime son utilisation.

✓ **Milieux de cultures**

Les milieux de cultures solides utilisés pour l'isolement des moisissures sont: Malt Agar (**MA**), Potato Dextrose Agar (**PDA**) préparés au laboratoire de la station INRAA et Sabouraud commercialisé.

✓ **Ensemencement et incubation**

L'ensemencement des grains a été effectué dans des conditions aseptiques, selon la méthode de Cahagnier (1998) qui indique l'incubation de 4 à 5 grains, déposés espacement dans les boîtes de Pétri remplies du milieu de culture **PDA**, **MA** et Sabouraud. Les boîtes fermées par un parafilm, sont incubées à 25 °C pendant 7 jours.

✓ **Observation et repiquage des mycéliums**

Des observations quotidiennes à la loupe sont effectuées dès l'apparition des mycéliums. Ces derniers sont repiqués sur différents milieux de cultures solides cités ci-dessus (Botton et *al.*, 1990; Champion, 1997 ; Guiraud, 1998).

✓ **Purification des souches**

La purification des souches contaminées est effectuée par prélèvement d'une hyphes terminale qui sera cultivée sur un milieu **PDA** neuf. La souche est ensemencée au centre de la boîte grâce à une anse de platine stérile, puis incubé à 28 °C jusqu'à un développement suffisant de la souche pour qu'elle soit prélevée pour faire l'objet de plusieurs repiquages permettant l'obtention d'une culture pure représentée par une seule espèce.

✓ **Identification des souches**

L'identification des moisissures dépend d'une part, de l'examen macroscopique effectué sur un milieu **PDA** (préparé au laboratoire) coulé en boîtes de Pétri dont l'aspect extérieur de la culture reste un indice très important pour prévoir le genre, et de l'examen microscopique effectué sur une préparation à l'état frais, après fixation au lactophénol, d'autre part (Guiraud et Galzy, 1980). Il est à signaler que malgré la réunion de ces deux tests dans la présente étude, seul le genre a été identifié, vu la complexité d'identifier l'espèce.

✓ Culture des isolats sur milieu liquide (Test amylolytique)

Chaque souche purifiée et identifiée a fait l'objet d'un test amylolytique permettant la mise en évidence de son activité amylolytique. Il s'agit d'une culture des isolats sur milieu liquide (moût de datte stérile enrichi par 5l'amidon, l'extrait de levure à 5g/l, KH_2PO_4 à 4g/l, pH ajusté à 5 et incubation à une température de 30 °C pendant 72 heures sous agitation de 180 tours/min.

L'activité amylyasique a été déterminée par la méthode de Bernfeld (1955) en se basant sur la mesure de pouvoir réducteur du glucose libéré lors de l'hydrolyse enzymatique. Cette méthode sera détaillée dans le protocole expérimental de la production d' α -amylase par les souches sélectionnées.

✓ Conservation des souches amylolytiques

La méthode utilisée pour la conservation des souches, consiste à repiquer ces dernières dans des boîtes de pétri contenant le milieu PDA, les maintenir pendant cinq à sept jours à 28°C, puis les stockées à 4°C pour favoriser leur viabilité et limiter les possibilités de variation (Botton *et al.*, 1990).

4.4 Méthodes analytiques

✓ Extraction et filtration du moût de dattes

Une fois les dattes dénoyautées, lavées et broyées, 2,5 litres d'eau distillée sont ajoutées à un kilogramme de dattes, et portées au bain marie à 85°C durant 45 minutes sous agitation continue. Le moût extrait et filtré à travers un tissu, subit une dilution à une teneur en sucres de 15 % et une stérilisation à 120°C pendant 20 minutes (Açourène et Tama, 2001).

✓ Caractéristiques biochimiques du moût de dattes

Le moût de dattes extrait a fait l'objet d'une série d'analyses physicochimiques et biochimiques afin de connaître en quels éléments est riches ou pauvre, pour qu'il sera enrichi et optimisé convenablement.

Les paramètres suivants ont été mesurés :

- pH

Le pH du moût extrait est déterminé par une lecture directe sur un pH mètre préalablement étalonné.

- Teneur en eau

La teneur en eau est déterminée sur un échantillon de 10 ml du moût de dattes par dessiccation à l'étuve à une température de 105 °C jusqu'à l'obtention d'un poids constant (Audigié *et al.*, 1984).

- Teneur en cendres

La teneur en cendres est déterminée par incinération d'un gramme de dattes ou 3ml du moût dans un four à moufle à une température de 600°C durant 3 heures.

- Teneur en sucres

Les sucres réducteurs, le saccharose et les sucres totaux ont été déterminés par la méthode de Bertrand, rapporté par Audigié *et al.* (1984). Le principe de cette méthode consiste à faire agir un excès de liqueur cuproalcaline dans des conditions bien fixées, puis on sépare l'oxyde cuivreux et on le traite par une liqueur sulfurique de sulfate ferrique. Dans ce cas, on ne dose que les sucres réducteurs. Pour doser les sucres totaux, on fait tout d'abord une hydrolyse acide afin de libérer les fonctions aldéhydiques ou cétoniques. De cette façon, on transforme le saccharose en sucres réducteurs. Enfin, le saccharose est déterminé de la façon suivante : (Sucres totaux - Sucres réducteurs) x (0.95).

- Teneur en protéines

L'azote total est déterminé par la méthode de Kjeldahl qui consiste en une minéralisation de l'échantillon par voie humide par l'acide sulfurique, puis distillation et titration avec l'acide sulfurique 0.05 N (Audigié *et al.*, 1984).

4.5 Production d' α -amylase par fermentation submergée

La fermentation submergée est une fermentation où le substrat est soluble, permettant une bonne homogénéisation des composants de milieu (Raimbault, 1998).

Dans cette partie, seules les souches répondant positivement au test amylolytique sont retenues pour la suite de travail qui comporte :

- L'étude de la cinétique de production de biomasse et d' α -amylase en suivant l'évolution de la biomasse et de l'activité amyolasique des souches étudiées pendant 120 heures d'incubation à 30 °C.
- L'optimisation des productions (biomasse et α -amylase) en utilisant une planification expérimentale (matrices de Plackett-Burman).

4.5.1 Etude de la cinétique de croissance des différentes souches et de production d' α -amylase

L'étude de la cinétique de production de biomasse et d' α -amylase a été réalisée pendant 120 heures pour les cinq souches dont *Rhizopus* sp_{1.}, *Rhizopus* sp_{2.}, *Penicillium* sp_{1.}, *Alternaria* sp. et *Helminthosporium* sp., répondant positivement au test amylolytique.

4.5.1.1 Milieu de culture

Le milieu de base est constitué du moût de datte à une teneur en sucres de 15%. Ce milieu a été enrichi par 5g/l d'amidon, 5g/l d'extrait de levure et 4g/l de KH₂PO₄.

4.5.1.2 Préculture

Une préculture dont le but est d'acclimater chaque souche potentiellement amylolytique au moût de datte, a été réalisée dans des erlenmeyers de 100 ml à raison de 20 ml de milieu de culture enrichi et stérile par erlens.

Après réactivation des souches, quelques spores identiques ou un fragment de mycélium sont prélevés à l'aide d'une anse de platine stérile pour ensemercer les 20 ml de milieu de culture. Après une légère homogénéisation des erlens, ces derniers sont incubés à 30°C pendant 24 heures.

4.5.1.3 Culture discontinue non alimentée

Les cultures sont réalisées dans des erlens de 500 ml à raison de 100 ml du moût de dattes enrichi par erlens.

L'ensemencement a été fait par la prise de 1 ml de la dilution 10⁻² de la préculture après 24 heures d'incubation. Les cultures (pour les cinq souches) sont incubées à 30 °C pendant 120 heures et sous agitation de 180 tours/min.

Des prélèvements effectués régulièrement chaque 24 heures, pour la détermination du pH, de la quantité de biomasse produite et de l'activité amyolasique pour les cinq souches.

✓ Mesure du pH

Le pH de l'extrait enzymatique a été mesuré à l'aide d'un pH- mètre.

✓ Détermination de la biomasse

Le poids sec de la biomasse produite est déterminé chaque 24 heures jusqu'à la fin des fermentations, par prélèvement de 20 ml du moût fermenté et sa filtration à l'aide d'un papier

Wattman n° 2, et rinçage avec l'eau distillée. La biomasse est séchée dans une étuve réglée à 105 °C jusqu'à poids constant (Pedersen et Nielsen, 2000).

✓ **Dosage de l'activité amylasique**

L'activité amylasique a été estimée selon la méthode de Bernfeld (1955), en utilisant le filtrat obtenu après filtration de moût de fermentation. Le principe de cette méthode est basé sur la mesure du pouvoir réducteur du glucose libéré lors de l'hydrolyse enzymatique de l'amidon. La réaction est colorimétrique et l'intensité de la coloration est proportionnelle à la quantité de glucose libérée (Bernfeld, 1955). L'activité enzymatique est exprimée par unité internationale (U/ml), correspondant à une μ mole du glucose libéré par minute et par millilitre du milieu à 40°C et à pH 5.

4.5.1.4 Protocole expérimental

1 ml de l'extrait enzymatique est ajouté à 1ml de la solution du substrat, après agitation le mélange est incubé à 40°C pendant 30 minutes avec un tube témoin représenté par le blanc. La réaction est arrêtée par l'addition de 1 ml d'acide 3,5 dinitrosalicylique (DNSA), suivie d'un chauffage à 100°C pendant 10 minutes. Après refroidissement dans un bain de glace, 10 ml d'eau distillée sont ajoutés. L'absorbance est déterminé à 540 nm contre le blanc. La concentration des sucres réducteurs correspondants est déterminée à partir d'une courbe étalon établie avec des concentrations du glucose variant de 10 à 100 mg/100 ml (figure 1).

La préparation des réactifs utilisés : DNSA, solution du substrat et tampon acétate est détaillée en annexe 3.

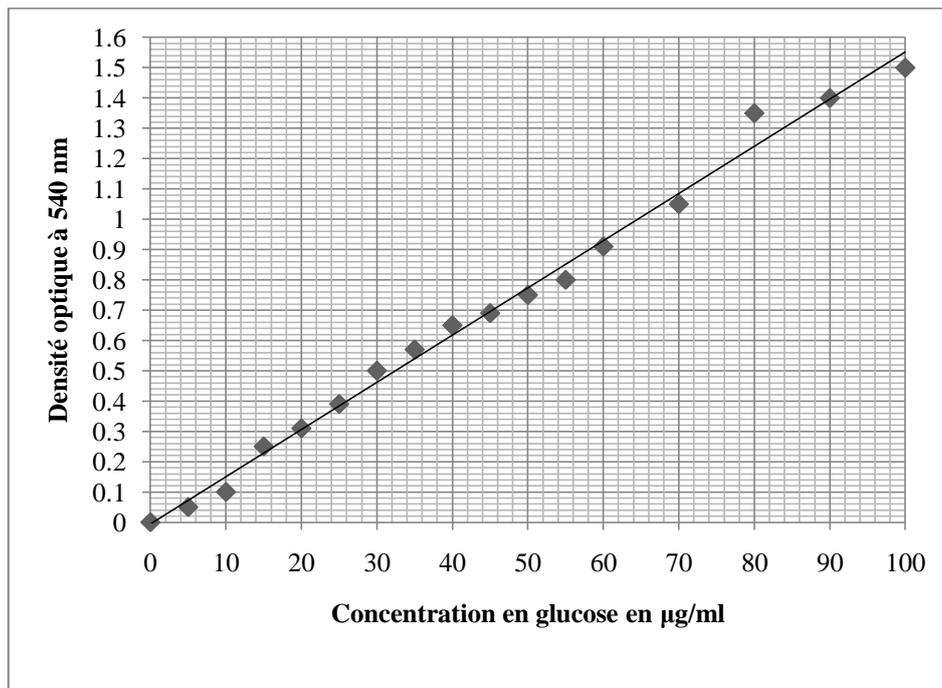


Figure 1: Courbe étalon du glucose

4.5.2 Optimisation des productions (biomasse et α -amylase)

Une bonne conduite de fermentation nécessite une bonne croissance de micro-organisme mis en jeu, et cela ne peut être atteint qu'après l'assurance d'un milieu de culture bien convenable en point de vue composition en éléments nutritifs, d'une part et conditions expérimentales maîtrisables, d'autre part. Ces conditions ne peuvent être réunies qu'à l'aide d'une méthodologie reposant sur la planification expérimentale.

4.5.2.1 Description de la méthode d'optimisation (matrice de Plackett-Burman)

Un plan expérimental établi d'après la matrice de Plackett et Burman à (N= 8) soit 8 expériences et 7 facteurs (5 réels et 2 erreurs) (Plackett et Burman, 1946 ; Radouane *et al.*, 2008), est utilisé pour sélectionner les facteurs favorisant la production d' α -amylase.

Les matrices de Plackett-Burman sont basées sur les blocs incomplets équilibrés (B.I.E), fournissant une méthode efficace pour sélectionner un grand nombre de variables et identifier les plus importantes. Ce sont des matrices carrées établies à partir d'un générateur de base (tableau 7), la dernière ligne du plan d'expérience étant toujours au niveau inférieur. Chaque ligne représente une expérience, et chaque colonne représente une variable (tableau 8). Ces plans permettent de mettre en évidence l'effet de k facteurs à deux niveaux (tableau 8), sur le phénomène étudié avec un nombre d'expériences N, tel que $N = k + 1$.

L'analyse statistique consiste à identifier les variables qui ont un effet significatif positif ou négatif sur la production d' α -amylase, et de biomasse (Bennamoun *et al.*, 2004; Djekrif-Dakhmouche *et al.*, 2006 ; Radhouane *et al.*, 2008).

Ce plan expérimental permet, non seulement un gain du temps par la réduction de nombre de tâtonnements possibles, mais aussi l'obtention d'un plus grand nombre d'informations valables concernant le degré de signification des facteurs testés sur la croissance des souches utilisées et la production d' α -amylase (Larpent-gourgaud et Sanglier , 1992).

Tableau 7: Générateur des matrices pour N=8, 12, 16, 20, 24 essais.

N=8	+	+	+	-	+	-	-															
N=12	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-											
N=16	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-								
N=20	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-				
N=24	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-

4.5.2.2 Optimisation des productions pour les souches *Rhizopus* sp. (1 et 2)

La matrice de Plackett-Burman utilisée pour l'optimisation du milieu de culture pour la production de biomasse et d' α -amylase par les souches *Rhizopus* sp. (1 et 2) est représentée dans le tableau 8. Le niveau supérieur de chaque facteur est représenté par le signe (+1), le niveau inférieur est représenté par (-1).

Tableau 8: Matrice de Plackett-Burman de huit expériences (7 facteurs) pour la production de biomasse et d' α -amylase par les souches *Rhizopus* sp (1 et 2).

N° d'essai	Facteurs testés						
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆	X ₇
1	+	+	+	-	+	-	-
2	-	+	+	+	-	+	-
3	-	-	+	+	+	-	+
4	+	-	-	+	+	+	-
5	-	+	-	-	+	+	+
6	+	-	+	-	-	+	+
7	+	+	-	+	-	-	+
8	-	-	-	-	-	-	-

X₁: pH, X₂: Amidon, X₃: Erreur, X₄: Urée, X₅: Erreur, X₆: Extrait de levure, X₇: KH₂PO₄.

4.5.2.3 Conditions de culture et facteurs testés pour les souches *Rhizopus* sp (1 et 2).

Une préculture dans des conditions identiques à celle utilisées pour l'étude de la cinétique de production de biomasse et d' α -amylase a été réalisée, dont le milieu de culture de chaque essai a été ensemencé par 1 ml de la dilution 10^{-2} de cette dernière.

Selon les résultats de l'étude de la cinétique, la durée et la température d'incubation pour ces souches, sont fixés respectivement, à 72 heures et 30°C.

Les facteurs testés et leurs concentrations sont montrés dans le tableau 9.

Tableau 9: Facteurs testés pour les souches *Rhizopus* sp. (1 et 2) et leurs concentrations correspondantes.

Facteurs testés	Niveau inférieur (-)	Niveau supérieur (+)
X ₁ : pH	5	5.5
X ₂ : Amidon	0 g/l	5g/l
X ₃ : Erreur	-	-
X ₄ : Urée	0 g/l	5g/l
X ₅ : Erreur	-	-
X ₆ : Extrait de levure	0 g/l	5g/l
X ₇ : KH ₂ PO ₄	4 g/l	6g/l

4.5.2.4 Analyse des produits de fermentation

A la fin de fermentation, des mesures de pH, biomasse et de l'activité amylasique ont été effectuées pour chaque expérience, suivant le même principe cité dans l'étude de la cinétique.

4.5.2.5 Optimisation des productions pour les souches *Alternaria* sp., *Penicillium* sp₁. et *Helminthosporium* sp.

La matrice de Plackett-Burman utilisée pour l'optimisation de la production de biomasse et d' α -amylase par les souches *Penicillium* sp₁., *Alternaria* sp. et *Helminthosporium* sp. est représentée dans le tableau 10.

Le niveau supérieur de chaque facteur est représenté par le signe (+1), le niveau inférieur est représenté par (-1).

Tableau 10: Matrcie de Plackett et Burman de huit expériences (7 facteurs) pour la production de biomasse et d' α -amylase par les souches : *Penicillium* sp₁, *Alternaria* sp., et *Helminthosporium* sp.

Facteurs testés							
N° d'essai	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆	X ₇
1	+	+	+	-	+	-	-
2	-	+	+	+	-	+	-
3	-	-	+	+	+	-	+
4	+	-	-	+	+	+	-
5	-	+	-	-	+	+	+
6	+	-	+	-	-	+	+
7	+	+	-	+	-	-	+
8	-	-	-	-	-	-	-

X₁: pH, X₂: Température, X₃: Erreur, X₄: Amidon, X₅: Erreur, X₆: Extrait de levure, X₇: KH₂PO₄.

4.5.2.6 Conditions de culture et facteurs testés pour les souches *Alternaria* sp., *Penicillium* sp₁. et *Helminthosporium* sp.

Comme pour les souches *Rhizopus* sp. (1 et 2), une préculture a été réalisée, dont le milieu de culture de chaque essai a étéensemencé par 1 ml de la dilution 10⁻² de cette dernière. La durée d'incubation pour ces souches est fixée à 96 heures.

Les facteurs testés et leurs concentrations sont montrés dans le tableau 11.

Tableau 11: Facteurs testés pour les souches *Penicillium* sp₁, *Alternaria* sp. et *Helminthosporium* sp. et leurs concentrations correspondantes.

Facteurs testés	Niveau inférieur (-)	Niveau supérieur (+)
X ₁ : pH	5	6
X ₂ : Température	30 °C	35 °C
X ₃ : Erreur	-	-
X ₄ : Amidon	0 g/l	5g/l
X ₅ : Erreur	-	-
X ₆ : Extrait de levure	0 g/l	5g/l
X ₇ : KH ₂ PO ₄	4 g/l	6g/l

4.5.2.7 Analyse des produits de fermentation.

Comme pour les souches *Rhizopus* sp. (1 et 2), les mesures de pH, de la biomasse et le dosage de l'activité enzymatique ont été réalisés à la fin de fermentation.

4.6 Analyse statistique

A la fin de chaque expérience, les coefficients de chaque facteur explicatif sur la production de l' α -amylase des cinq souches étudiées sont estimés par la méthode des moindres carrés et assortis de test t de Student à un seuil critique α .

Des sous modèles sont alors sélectionnés pour chacun des facteurs à expliquer. Le degré de signification est de $(1-\alpha) \geq 70\%$. Si le test t est significatif, l'effet est donc dû au changement du niveau du facteur et non pas au hasard ni à l'erreur expérimentale.

Les calculs ont été effectués par le logiciel Minitab (version 13.2, 2000).

La réponse théorique μ , pour chaque facteur analysé, est de la forme :

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_4 X_4 + \beta_5 X_5 + \beta_6 X_6 + \beta_7 X_7 + \varepsilon.$$

Où :

β_0 : constante ;

$\beta_1 \dots \beta_{11}$: coefficients de régression ;

$X_1 \dots X_7$: facteurs explicatifs ;

ε : erreur résiduelle.

L'effet de chaque facteur et de l'erreur sont calculés comme la différence entre la moyenne des valeurs de réponses observées au niveau supérieur (+) et la moyenne des valeurs de réponses observées au niveau inférieur (-).

$$E_A = \sum \left(\frac{\text{Réponses au niveau (+)}}{r} - \frac{\text{Réponses au niveau (-)}}{r} \right)$$

Où :

E : effet de chaque facteur ;

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

La variance est définie comme la moyenne des carrés des erreurs, qui est exprimée par :

$$S^2_E = \sum \frac{(\text{Erreurs})^2}{n}$$

Où :

S^2_E : Variance des effets

n : Nombre des erreurs

L'erreur standard (S_E) est définie comme la racine carrée de la variance et exprimée par :

$$S_{E=} = \sqrt{\frac{S_E^2}{E}}$$

La signification de chaque facteur est déterminée par la *Student* :

$$t = \frac{E}{SE}$$

Résultats

5.1 Isolement et identification des souches

Nous avons obtenu 21 isolats sur lesquels, nous avons identifié cinq genres en étudiant les caractères macroscopiques et microscopiques.

Le tableau 12 représente les 21 isolats obtenus à partir des deux échantillons d'orge.

Tableau 12. Isolats fongiques obtenus à partir des deux échantillons d'orge

Nombre d'isolats	Numéro d'isolat	Origine d'orge	Identification du genre
5	1	Sétif	<i>Rhizopus sp</i> ₁ .
	2		
	3		
	4		
	5		
5	1	Sud (Touggourt)	<i>Rhizopus sp</i> ₂ .
	2		
	3		
	4		
	5		
4	1	Sétif	<i>Penicillium sp</i> ₁ .
	2	Sud	<i>Penicillium sp</i> ₂ .
3			
4	4	Sétif	<i>Alternaria sp.</i>
	1		
	2		
	3		
2	4	Sétif	<i>Helminthosporium sp.</i>
	1		
1	2	Sétif	<i>Ustilago sp.</i>
	1		

Les chiffres (1) et (2) accompagnant le genre, indiquent l'origine d'orge à partir du quel cette souche a été isolée. Ils représentent respectivement l'orge de Sétif et du sud (Touggourt).

Le tableau 12, montre que l'orge de Sétif est plus contaminée par les moisissures car la majorité des genres ont été isolés à partir de cette dernière, comparativement à l'orge du Touggourt à partir de laquelle nous n'avons isolé et identifié que les genres *Rhizopus* et *Penicillium* avec une abondance du genre *Rhizopus* envahissant les boîtes de Pétri en premières heures d'incubation, gênant ainsi la croissance d'autres moisissures. Les genres identifiés sont *Rhizopus*, *Penicillium*, *Alternaria*, *Helminthosporium* et *Ustilago*.

L'identification des isolats est basée, non seulement sur les observations macroscopiques du mycélium fongique qui permet de déterminer l'aspect des colonies pendant le développement,

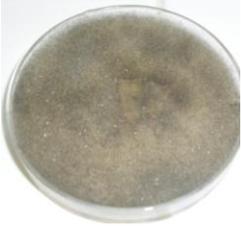
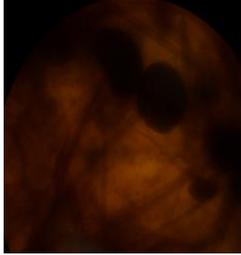
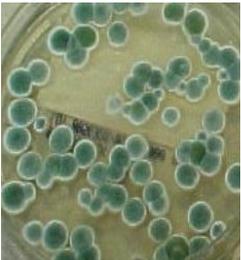
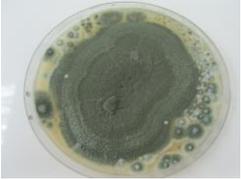
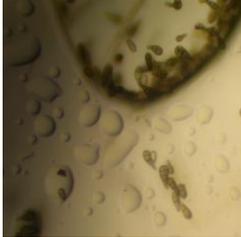
mais également sur l'observation microscopique qui détecte la présence du thalle et la présence ou l'absence de septum.

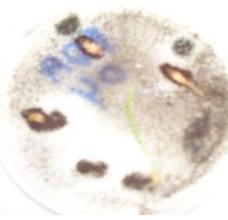
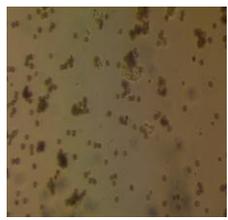
Les souches: *Rhizopus* sp_{1.}, *Penicillium* sp_{1.}, *Alternaria* sp., *Helminthosporium* sp. et *Ustilago* sp. sont isolées à partir d'orge de Sétif, alors que les souches *Rhizopus* sp_{2.}, *Penicillium* sp_{2.} sont isolées à partir d'orge de Touggourt.

5.2 Caractères macroscopiques et microscopiques des genres identifiés

Les caractères macroscopiques et microscopiques des genres identifiés sont représentés dans le tableau 13.

Tableau 13. Caractères macroscopiques et microscopiques des souches isolées

Aspect macroscopique sur milieu MA	Aspect microscopique (objectif x40)	Caractéristiques	Identification du genre
		Thalle à croissance rapide envahissant la boîte de petri, Mycélium non cloisonné, Rhizoid au pied de sporangiophore (Smith, 2002 ; Botton 1992).	<i>Rhizopus sp1.</i>
		Thalle à croissance rapide envahissant la boîte de petri, Mycélium non cloisonné, Rhizoid au pied de sporangiophore (Smith, 2002 ; Botton 1992).	<i>Rhizopus sp2.</i>
		Mycélium aérien foncé, Mycélium cloisonné, Conidiophore dévisé en articles (Champion, 1997).	<i>Penicillium sp1.</i>
		Mycélium aérien foncé, Mycélium cloisonné, Conidiophore dévisé en articles (Champion, 1997).	<i>Penicillium sp2.</i>
		Mycélium aérien duveteux, Mycélium cloisonné, Conidie cloisonnée transversalement, (Champion, 1997 ; Botton 1992).	<i>Alternaria sp.</i>

		<p>Mycélium aérien trop foncé, Mycélium cloisonné, Conidies cloisonnées Transversalement en plus de 2 loges et isolées (Champion, 1997 ; Botton, 1990)</p>	<p><i>Helminthosporium sp.</i></p>
		<p>Colonies sous forme de points noirs, Spores simples, légèrement sphériques ou anguleuses (Champion, 1997).</p>	<p><i>Ustilago sp.</i></p>

5.3 Réponses des souches isolées au test amylolytique

Les souches répondant positivement à ce test sont représentées dans le tableau 14.

Tableau 14: Souches potentiellement amylolytiques.

Souches	Origine d'orge	Numéro d'isolat	Activité Amylasique (U/ml)
<i>Rhizopus sp</i> ₁ .	Sétif	3	2498.36
<i>Rhizopus sp</i> ₂ .	Sud	5	2422.95
<i>Helminthosporium sp.</i>	Sétif	1	2366.96
<i>Alternaria sp.</i>	Sétif	3	2293.33
<i>Penicillium sp</i> ₁ .	Sétif	2	2237.36

Les souches mentionnées dans le tableau 14, sont celles sélectionnées, pour poursuivre le travail.

5.4 Caractéristiques biochimiques du moût de dattes

Les caractéristiques biochimiques du moût de datte utilisé comme milieu de base dans la présente étude sont données dans le tableau 15.

Le moût de datte apparait acide et riche en sucres (tableau15), il constitue donc un milieu favorable au développement des moisissures. Cependant il est pauvre en certains autres éléments indispensables à leur développement tels que la matière azotée, ce qui confirme qu'il est nécessaire de l'enrichir par une source d'azote indispensable, aussi bien pour le bon développement des moisissures que pour la production d' α -amylase.

La teneur en cendres nous renseigne sur la quantité d'éléments minéraux dans le moût de dattes.

Bien que le pourcentage des cendres de ce moût (1.95%) apparaisse faible, seule une source de phosphore sous forme de KH_2PO_4 a été additionnée, car selon la littérature, les dattes sont riches par certains minéraux tels que (Ca^{2+} et Mg^+), particulièrement abondants, dépassant nettement les autres fruits secs; mais restent pauvres en certains d'autres éléments tels que le phosphore qui est un élément indispensable pour la synthèse et le développement des acides nucléiques des microorganismes (Benchelah et Maka, 2008 ; Jaccard, 2008).

Tableau 15: Caractéristiques biochimiques du moût de datte utilisé

Paramètres	Résultats
pH	5.09 \pm 0.02
Teneur en eau	68.47 % \pm 0.07
Sucres totaux	17.92 % \pm 0.03
Saccharose	08.40 % \pm 0.03
Sucres réducteurs	9.08 % \pm 0.03
Protéines	01.09 % \pm 0.03
Cendres	01.95 \pm 0.02

5.5 Production d' α -amylase par fermentation submergée

Dans cette partie, la cinétique de production de biomasse et d' α -amylase par les cinq souches a été étudiée en premier lieu, suivie par l'optimisation des deux productions (biomasse et α -amylase).

5.5.1 Cinétique de croissance des cinq souches et variation du pH du milieu

La cinétique de croissance des cinq souches nous a permis de suivre l'évolution de la quantité de biomasse produite par chaque souche, durant le temps d'incubation d'une part, et les variations du pH du milieu, d'autre part.

Les résultats de la cinétique de croissance des cinq souches ainsi que les variations du pH pour ces souches sont représentés respectivement dans la figure 2 et 3.

Nous constatons que la croissance des cinq souches varie avec la durée d'incubation, où la biomasse apparaît dès les premières heures d'incubation pour atteindre son maximum à 72 heures d'incubation pour les souches *Rhizopus* sp. (1 et 2), *Alternaria* sp. et *Helminthosporium* sp., et à 96 heures pour la souche *Penicillium* sp₁.

L'intervalle de :

[24h à 72h] : peut correspondre à la phase exponentielle de croissance des souches *Rhizopus* sp. (1 et 2), *Alternaria* sp, *Helminthosporium* sp ;

[24h à 96h] : peut correspondre à la phase exponentielle de croissance de la souche *Penicillium* sp.

Une diminution de la biomasse au-delà de 72 heures d'incubation est enregistrée pour les souches *Rhizopus* sp. (1 et 2), *Alternaria* sp, *Helminthosporium* sp et au-delà de 96 heures pour la souche *Penicillium* sp₁.

Quant aux variations du pH (figure 3), ce dernier varie à son tour d'une souche à l'autre en fonction de la durée d'incubation, où il diminue progressivement dès les premières heures d'incubation pour toutes les souches et atteint des valeurs faibles à la fin de fermentation (120h).

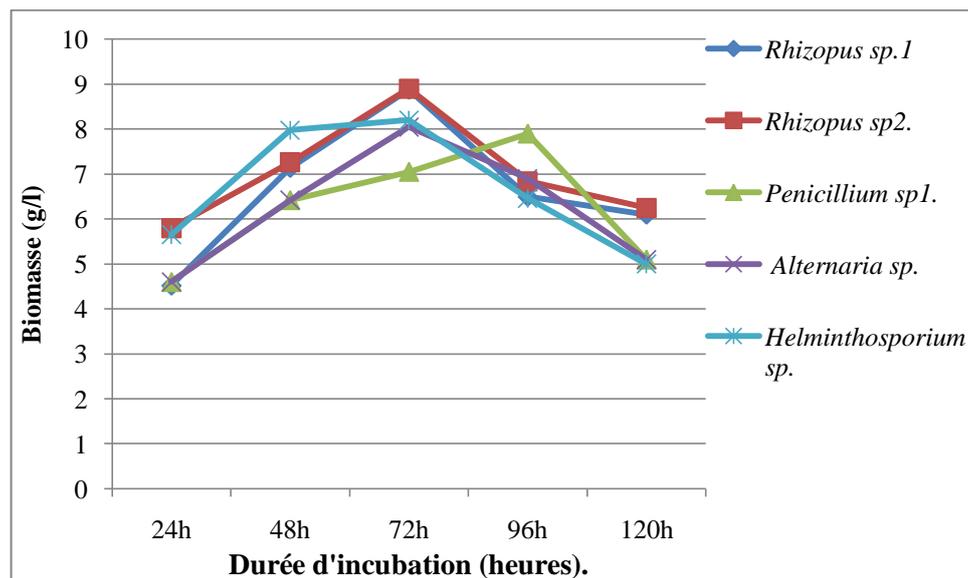


Figure 02: Cinétique de croissance des cinq souches étudiées.

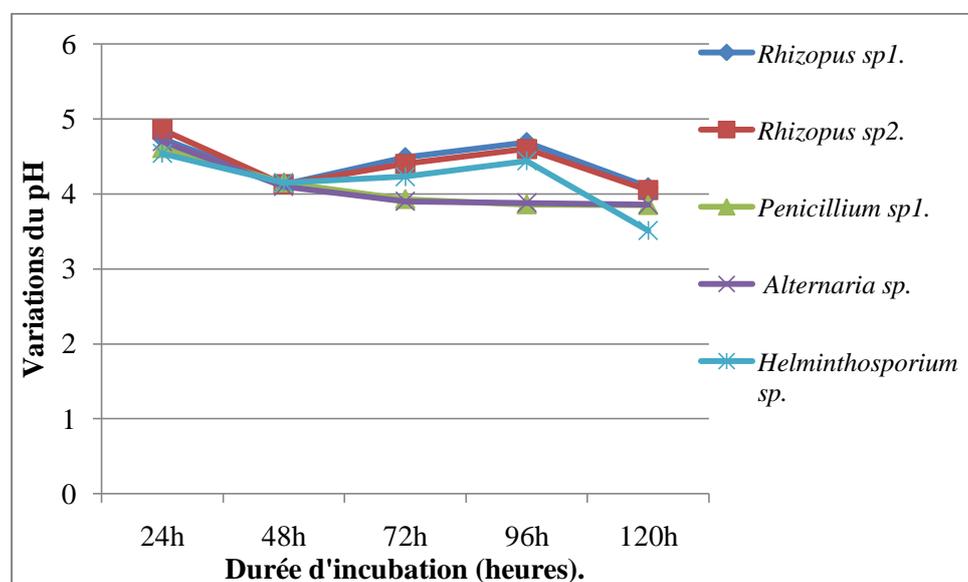


Figure 03: Variations du pH de milieu pour les cinq souches étudiées.

5.5.2. Cinétique de production d' α -amylase

La cinétique de production d' α -amylase par les cinq souches est représentée dans la figure 4. Nous constatons que l'activité amylasique varie d'une souche à l'autre suivant la durée d'incubation dont :

- Un début de production est enregistré à 48 heures d'incubation pour les cinq souches;
- Une augmentation de la production est enregistrée dans les intervalles :

[48h-72h] ; pour les souches *Rhizopus* sp (1 et 2) avec un maximum de production de **2745.35U/ml** et **2420 U/ml** enregistré à 72 heures d'incubation, respectivement pour les souches *Rhizopus* sp₁. et *Rhizopus* sp₂.

[48h-96h] ; pour les souches *Penicillium* sp₁., *Alternaria* sp et *Helminthosporium* sp. avec un maximum de production, respectivement de **2180 U/ml**, **1976.47 U/ml** et **2073.33 U/ml** enregistré à 96 heures d'incubation.

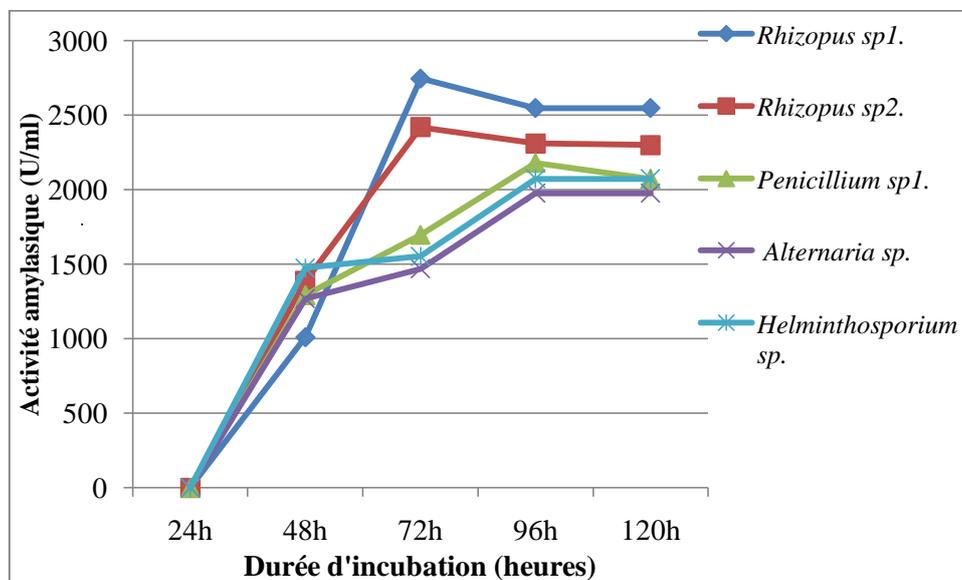


Figure 04: Cinétique de production d' α -amylase par les cinq souches étudiées.

5.5.3 Optimisation des productions (biomasse et α -amylase)

La planification expérimentale utilisée pour tester les facteurs choisis est celle de Plackett-Burman qui continue toujours à être utilisées dans l'optimisation des milieux de culture pour les productions des métabolites recherchés: production d'acides gras (Chodok *et al.*, 2010) ; production de laccase par *Pleurotus florida* NCIM 1243 (Palvannan et Sathishkumar. (2010) ; production d' α -amylase par *Penicillium camemberti* PL21 (Nouadri, 2011).

Il est à rappeler que les variations du pH ont été suivies en parallèle avec la variation de biomasse et d' α -amylase pour chaque souche.

La détermination du degré de signification des facteurs testés sur les deux réponses mesurées (biomasses et activité amylasique) n'est réalisée qu'après une analyse statistique des résultats pour chaque souche, par le logiciel Minitab (version 13.2, 2000).

Les résultats d'optimisation de la production de biomasse et d' α -amylase sont représentés pour chaque souche séparément.

5.5.3.1 Optimisation de la production de biomasse

a. Production de biomasse par la souche *Rhizopus* sp₁.

✓ Quantité de biomasse et variation du pH dans les huit essais

Les quantités de biomasse produite par la souche *Rhizopus* sp₁., ainsi que les variations du pH dans les huit expériences sont représentées dans le tableau 16.

Nous constatons que les quantités de biomasse produites ainsi que les valeurs du pH, varient d'une expérience à l'autre.

Le poids de mycélium sec de *Rhizopus* sp₁., varie de 1.80g/l à 10.20g/l, dont le meilleur rendement est obtenu dans l'essai 5. Par contre, le plus faible rendement est enregistré dans l'essai 8.

Le pH varie de 3.57 (essai 8) à 9.09 (essai 4). Le milieu 5, dans lequel le meilleur rendement en biomasse a été obtenu reste toujours acide avec un pH 4.45.

Tableau 16: pH final et quantité de biomasse produite dans les huit expériences pour la souche *Rhizopus* sp₁.

Numéro d'essai	X ₁ : pH	X ₂ : Amidon	X ₃ : Erreur	X ₄ : Urée	X ₅ : Erreur	X ₆ : E.L	X ₇ : KH ₂ PO ₄	Résultats	
								pH	Biomasse (g/l)
1	+	+	+	-	+	-	-	4.91	2.66
2	-	+	+	+	-	+	-	5.84	7.84
3	-	-	+	+	+	-	+	7.02	4.60
4	+	-	-	+	+	+	-	9.09	4.58
5	-	+	-	-	+	+	+	4.45	10.20
6	+	-	+	-	-	+	+	4.67	4.90
7	+	+	-	+	-	-	+	8.38	5.02
8	-	-	-	-	-	-	-	3.57	1.80

✓ **Effet des facteurs testés sur la production de biomasse**

Les facteurs : pH, amidon soluble, urée, extrait de levure et KH_2PO_4 , testés pour la souche *Rhizopus* sp₁. ont montré des effets plus ou moins significatifs sur la production de biomasse. L'effet de chaque facteur, ainsi que la statistique du test t de *Student* et le niveau de signification sont consignés dans le tableau 17.

Tableau 17: Effet des facteurs testés sur la production de biomasse par la souche *Rhizopus* sp₁.

Facteurs testés	Biomasse		
	Estimation	Valeur de t	Signification (%)
X₁: pH	-1,8200	-3,49	92.7
X₂: Amidon	2,4600	4,72	95.8
X₄: Urée	0,6200	1,19	N.S
X₆: Extrait de levure	3,3600	6,44	97.7
X₇: KH_2PO_4	1,9600	3,76	93.6

N.S : Non Significatif

Le tableau 17, indique que les facteurs les plus influents sur la production de biomasse sont l'amidon, l'extrait de levure, le KH_2PO_4 et le pH.

Les facteurs dont l'extrait de levure, l'amidon et le KH_2PO_4 influencent positivement la production de biomasse d'une façon hautement significative respectivement avec $p \geq 97.7\%$, $p \geq 95.8\%$ et $p \geq 93.6\%$, contrairement au pH qui l'influence négativement d'une façon hautement significative ($p \geq 92.7$) et l'urée qui ne présente aucun effet significatif sur cette réponse.

L'équation du modèle réduit avec seulement les variables explicatives à effet significatif s'écrit donc:

$$\hat{Y} = 5.20 + 1.68 X_6 + 1.23 X_2 + 0.98 X_7 - 0.91 X_1.$$

b. Production de biomasse par la souche *Rhizopus* sp₂.

✓ **Quantité de biomasse et variation du pH dans les huit essais**

Les quantités de biomasse produites par la souche *Rhizopus* sp₂., ainsi que les variations du pH dans les huit expériences sont représentées dans le tableau 18.

Nous constatons que les quantités de biomasse produites ainsi que les valeurs du pH varient d'une expérience à l'autre.

Le poids de mycélium sec de *Rhizopus sp2.* varie de 1.83g/l à 10.02g/l, dont le meilleur rendement est obtenu dans l'essai 5. Par contre le plus faible rendement est enregistré dans l'essai 8.

Pour le pH, ce dernier varie de 3.59 (essai 8) à 8.87 (essai 4). Le milieu 5 dans le quel le meilleur rendement en biomasse a été obtenu reste légèrement acide avec une valeur du pH égale à 5.11.

Tableau 18: pH final et quantité de biomasse produite dans les huit expériences pour la souche *Rhizopus sp2.*

Numéro d'essai	X ₁ : pH	X ₂ : Amidon	X ₃ : Erreur	X ₄ : Urée	X ₅ : Erreur	X ₆ : E.L	X ₇ : KH ₂ PO ₄	Résultats	
								pH	Biomasse (g/l)
1	+	+	+	-	+	-	-	5.22	2.36
2	-	+	+	+	-	+	-	6.39	9.04
3	-	-	+	+	+	-	+	6.98	4.94
4	+	-	-	+	+	+	-	8.87	4.06
5	-	+	-	-	+	+	+	5.11	10.02
6	+	-	+	-	-	+	+	4.48	4.82
7	+	+	-	+	-	-	+	7.58	5.02
8	-	-	-	-	-	-	-	3.59	1.83

✓ Effet des facteurs testés sur la production de biomasse

Les facteurs : pH, amidon soluble, urée, extrait de levure et KH₂PO₄, testés pour la souche *Rhizopus sp2.* ont montré des effets plus ou moins significatifs sur la production de biomasse. L'effet de chaque facteur, ainsi que la statistique du test t de *Student* et le niveau de signification sont consignés dans le tableau 19.

Tableau 19: Effet des facteurs testés sur la production de biomasse par la souche *Rhizopus sp2.*

Facteurs testés	Biomasse		
	Estimation	Valeur de t	Signification (%)
X ₁ :pH	-2,392	-19,11	99.7
X ₂ :Amidon	2,697	21,54	99.8
X ₄ :Urée	1,007	8,05	98.5
X ₆ :Extrait de levure	3,448	27,53	99.9
X ₇ :KH ₂ PO ₄	1,878	14,99	99.6

Le tableau 19, indique que tous les facteurs sont très influents sur la production de biomasse, sachant que l'extrait de levure, l'amidon, le KH_2PO_4 et l'urée ont respectivement des effets positifs hautement significatifs de ($p \geq 99.9\%$, $p \geq 99.8\%$, $p \geq 99.6\%$ et $p \geq 98.5\%$). Par contre le pH a une influence négative hautement significative avec $p \geq 99.7\%$.

L'équation du modèle réduit avec seulement les variables explicatives à effet significatif s'écrit donc:

$$\hat{Y} = 5.261 + 1.724 X_6 + 1.349 X_2 - 1.196 X_1 + 0.939 X_7 + 0.504 X_4$$

c. Production de biomasse par la souche *Penicillium* sp₁.

✓ Quantité de biomasse et variation du pH dans les huit essais

Les quantités de biomasse produites par la souche *Penicillium* sp₁, ainsi que les variations du pH dans les huit expériences sont représentées dans le tableau 20.

Nous constatons que les quantités de biomasse produites, ainsi que les valeurs du pH final, varient d'une expérience à l'autre.

Les quantités de biomasse produite par la souche *Penicillium* sp₁, varient de 1.24g/l à 9.60g/l, dont le meilleur rendement est obtenu dans l'essai 5. Par contre le plus faible rendement est enregistré dans l'essai 1.

Pour le pH, ce dernier varie de 4.17 (essai 1) à 4.97 (essai 2), dont sa valeur reste toujours faible pour les milieux des 8 essais. Le milieu 5 dans lequel le meilleur rendement en biomasse a été obtenu reste toujours acide avec une valeur du pH égale à 4.78.

Tableau 20: pH final et quantité de biomasse produite dans les huit expériences pour la souche *Penicillium* sp₁.

Numéro d'essai	X ₁ : pH	X ₂ : T°	X ₃ : Erreur	X ₄ : Amidon	X ₅ : Erreur	X ₆ : E.L	X ₇ : KH ₂ PO ₄	Résultats	
								pH	Biomasse (g/l)
1	+	+	+	-	+	-	-	4.17	1.24
2	-	+	+	+	-	+	-	4.97	6.75
3	-	-	+	+	+	-	+	4.22	4.96
4	+	-	-	+	+	+	-	4.76	7.10
5	-	+	-	-	+	+	+	4.78	9.60
6	+	-	+	-	-	+	+	4.60	7.60
7	+	+	-	+	-	-	+	4.18	2.14
8	-	-	-	-	-	-	-	4.42	1.54

✓ **Effet des facteurs testés sur la production de biomasse**

Les facteurs: pH, température, amidon, extrait de levure et KH_2PO_4 , testés pour la souche *Penicillium* sp. ont montré des effets plus ou moins significatifs sur la production de biomasse. L'effet de chaque facteur sur la valeur de chaque réponse, ainsi que la statistique du test t de *Student* et le niveau de signification sont consignés dans le tableau 21.

Tableau 21: Effet des facteurs testés sur la production de biomasse par la souche *Penicillium* sp₁.

Facteurs	Biomasse		
	Estimation	Valeur de t	Signification (%)
X₁: pH	-1,1925	-1,38	70
X₂: Température	-0,3675	-0,43	N.S
X₄: Amidon	0,2425	0,28	N.S
X₆: Extrait de levure	5,2925	6,14	97.5
X₇: KH₂PO₄	1,9175	2,23	84.4

Le tableau 21, indique que les facteurs les plus influents sur la production de biomasse sont l'extrait de levure, KH_2PO_4 et le pH, dont l'influence positive a été enregistrée uniquement pour l'extrait de levure et le KH_2PO_4 : d'une façon hautement significative ($p \geq 97.5\%$) pour l'extrait de levure et très significative ($p \geq 84.4$) pour le KH_2PO_4 . Cependant le pH, présente une influence négative significative ($p \geq 70$) sur cette réponse.

L'amidon et la température n'ont aucun effet sur cette réponse.

L'équation du modèle réduit avec seulement les variables explicatives à effet significatif s'écrit donc:

$$\hat{Y} = 5.116 + 2.646 X_6 + 0.958 X_7 - 0.596 X_1$$

d. Production de biomasse par la souche *Alternaria* sp.

✓ **Quantité de biomasse et variation du pH dans les huit essais**

Les quantités de biomasse produite par la souche *Alternaria* sp., ainsi que les variations du pH dans les huit expériences sont représentées dans le tableau 22.

Nous constatons que les quantités de biomasse produites par la souche *Alternaria* sp. ainsi que les valeurs du pH diffèrent d'un essai à l'autre selon la composition de chaque milieu.

Les quantités de biomasse produites par la souche *Alternaria* sp. varient de 2.12g/l à 10.18g/l, dont le meilleur rendement est obtenu dans l'essai 2. Par contre le plus faible rendement est enregistré dans l'essai 8.

Pour le pH, ce dernier varie de 4.42 (essai 8) à 5.81 (essai 6). Le milieu de l'essai 2, dans lequel le meilleur rendement en biomasse a été obtenu, reste toujours acide avec une valeur de pH ne dépassant pas 4.63.

Tableau 22: pH final et quantité de biomasse produite dans les huit expériences pour la souche *Alternaria* sp.

Numéro d'essai	X ₁ : pH	X ₂ : T°	X ₃ : Erreur	X ₄ : Amidon	X ₅ : Erreur	X ₆ : E.L	X ₇ : KH ₂ PO ₄	Résultats	
								pH	Biomasse (g/l)
1	+	+	+	-	+	-	-	4.60	3.66
2	-	+	+	+	-	+	-	4.63	10.18
3	-	-	+	+	+	-	+	4.63	3.08
4	+	-	-	+	+	+	-	4.97	5.90
5	-	+	-	-	+	+	+	4.67	8.98
6	+	-	+	-	-	+	+	5.81	7.20
7	+	+	-	+	-	-	+	4.66	4.10
8	-	-	-	-	-	-	-	4.42	2.12

✓ **Effet des facteurs testés sur la production de biomasse**

Les facteurs: pH, température, amidon, extrait de levure et KH₂PO₄, testés pour la souche *Alternaria* sp. ont des effets plus ou moins significatifs sur la production de biomasse. L'effet de chaque facteur sur la biomasse, ainsi que la statistique du test t de *Student* et le niveau de signification sont consignés dans le tableau 23.

Tableau 23: Effet des facteurs testés sur la production de biomasse par la souche *Alternaria* sp.

Facteurs	Biomasse		
	Estimation	Valeur de t	Signification (%)
X ₁ : pH	-0,8750	-1,37	N.S
X ₂ : Température	2,1550	3,38	92.2
X ₄ : Amidon	0,3250	0,51	N.S
X ₆ : Extrait de levure	4,8250	7,56	98.3
X ₇ : KH ₂ PO ₄	0,3750	0,59	N.S

Le tableau 22, indique que seuls l'extrait de levure et la température influencent positivement la production de biomasse, d'une façon hautement significative ($p \geq 98.3\%$ et $p \geq 92.2\%$ respectivement). Cependant les autres facteurs dont le pH, l'amidon et KH_2PO_4 restent sans aucun effet sur cette réponse.

L'équation du modèle réduit avec seulement les variables explicatives à effet significatif s'écrit donc:

$$\hat{Y} = 5.652 + 2,412 X_6 + 1.077 X_2$$

e. Production de biomasse par la souche *Helminthosporium* sp.

✓ Quantité de biomasse et variation du pH dans les huit essais

Les quantités de biomasse produite par la souche *Helminthosporium* sp., ainsi que les variations du pH dans les huit expériences sont représentées dans le tableau 24.

Nous constatons que les quantités de biomasse produites par la souche *Helminthosporium* sp., ainsi que les valeurs du pH varient d'un essai à l'autre, selon la composition de chaque milieu.

Les quantités de biomasse produites par la souche *Helminthosporium* sp., varient de 2.24g/l à 14.98g/l, dont le meilleur rendement est obtenu dans l'essai 5. Par contre le plus faible rendement est enregistré dans l'essai 8.

Pour le pH, ce dernier varie de 4.55 (essai 5) à 5.59 (essai 3), mais reste toujours acide pour les milieux des 8 essais.

Tableau 24 : pH final et quantité de biomasse produite dans les huit expériences pour la souche *Helminthosporium* sp.

Numéro d'essai	X ₁ : pH	X ₂ : T°	X ₃ : Erreur	X ₄ : Amidon	X ₅ : Erreur	X ₆ : E.L	X ₇ : KH ₂ PO ₄	Résultats	
								pH	Biomasse (g/l)
1	+	+	+	-	+	-	-	4.68	4.60
2	-	+	+	+	-	+	-	4.70	8.10
3	-	-	+	+	+	-	+	5.59	5.02
4	+	-	-	+	+	+	-	4.71	6.75
5	-	+	-	-	+	+	+	4.55	14.98
6	+	-	+	-	-	+	+	4.77	6.98
7	+	+	-	+	-	-	+	4.89	4.04
8	-	-	-	-	-	-	-	4.97	2.24

✓ **Effet des facteurs testés sur la production de biomasse**

Les facteurs: pH, température, amidon, extrait de levure et KH_2PO_4 , testés pour la souche *Helminthosporium* sp. ont des effets plus ou moins significatifs sur la production de biomasse. L'effet de chaque facteur sur la biomasse, ainsi que la statistique du test t de *Student* et le niveau de signification sont consignés dans le tableau 25.

Tableau 25: Effet des facteurs testés sur la production de biomasse par la souche *Helminthosporium* sp.

Facteurs	Biomasse		
	Estimation	Valeur de t	Signification (%)
X₁: pH	-1,9925	- 1,07	N.S
X₂:Température	2,6825	1,44	71.4
X₄:Amidon	-1,2225	-0,66	N.S
X₆: Extrait de levure	5,2275	2,81	89.3
X₇: KH_2PO_4	2,3325	1,25	N.S

Le tableau 24, montre que seuls, l'extrait de levure et la température influencent positivement la production de biomasse par la souche *Helminthosporium* sp., d'une façon très significative ($p \geq 89.3\%$) pour l'extrait de levure et significative ($p \geq 71.4\%$) pour la température. Cependant, les autres facteurs dont le pH, l'amidon et le KH_2PO_4 sont sans aucun effet sur cette réponse.

L'équation du modèle réduit avec seulement les variables explicatives à effet significatif s'écrit donc:

$$\hat{Y} = 6.588 + 2,613 X_6 + 1.341 X_2$$

5.4.3.1 Optimisation de la Production d' α -amylase

a. Production d' α -amylase par la souche *Rhizopus* sp₁.

✓ **Activité amylasique enregistrée dans les huit essais**

La variation de l'activité amylasique de la souche *Rhizopus* sp₁., enregistrée dans les huit expériences est représentée dans la figure 05.

Nous remarquons que l'activité amylasique de la souche *Rhizopus* sp₁. varie de **00 U/ml** à **2745.35 U/ml**, où le meilleur rendement est obtenu dans l'essai **5**. Par contre, dans les essais, **1** et **8**, l'activité amylasique a été approximativement nulle.

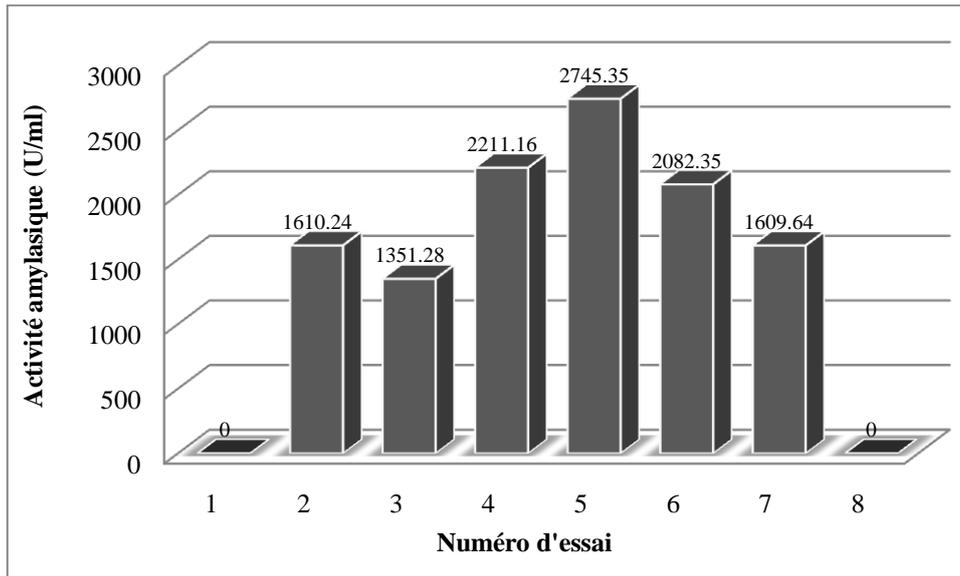


Figure 05: Variation de l'activité amylasique de la souche *Rhizopus sp*₁. en fonction des huit essais

✓ **Effet des facteurs testés sur la production d' α -amylase**

Les facteurs: pH, amidon, urée, extrait de levure et KH_2PO_4 , testés pour la souche *Rhizopus sp*₁. ont des effets plus ou moins significatifs sur la production d' α -amylase. L'effet de chaque facteur sur cette réponse, ainsi que la statistique du test t de *Student* et le niveau de signification sont consignés dans le tableau 26.

Tableau 26: Effet des facteurs testés sur la production d' α -amylase par la souche *Rhizopus sp*₁.

Facteurs	α -amylase		
	Estimation	valeur de t	Signification (%)
X₁: pH	-333.6	-1.53	73.4
X₂: Amidon	274.4	1.08	N.S
X₄: Urée	488.7	2.22	84.3
X₆: Extrait de levure	1422.0	6.45	97.7
X₇: KH_2PO_4	991.8	4.50	95.4

Le tableau 26, indique que les facteurs les plus influents sur la production d' α -amylase par la souche *Rhizopus sp*₁., sont l'extrait de levure, le KH_2PO_4 , l'urée et le pH, dont l'influence positive a été enregistrée d'une façon hautement significative avec ($p \geq 97.7\%$ et $p \geq 95.4\%$), respectivement pour l'extrait de levure et le KH_2PO_4 , et très significative ($p \geq 84.3\%$) pour

l'urée. L'influence négative a été marquée d'une façon significative avec ($p \geq 73.4\%$) pour le pH.

Par ailleurs, l'amidon n'a aucun effet sur cette réponse.

L'équation du modèle réduit avec seulement les variables explicatives à effet significatif s'écrit donc:

$$\hat{Y} = 1451.30 + 711 X_6 + 495.9 X_7 + 244.3 X_4 - 194.30 X_1$$

b. Production d' α -amylase par la souche *Rhizopus sp*₂.

✓ Activité amylasique enregistrée dans les huit essais

La variation de l'activité amylasique de la souche *Rhizopus sp*₂, enregistrée dans les huit expériences est représentée dans la figure 06.

Nous remarquons que l'activité amylasique de la souche *Rhizopus sp*₂ varie de **00 U/ml** à **2469.94 U/ml**. L'activité maximale a été enregistrée dans l'essai **5**.

Des activités amylasiques approximativement nulles, ont été enregistrées dans les essais **1** et **8**.

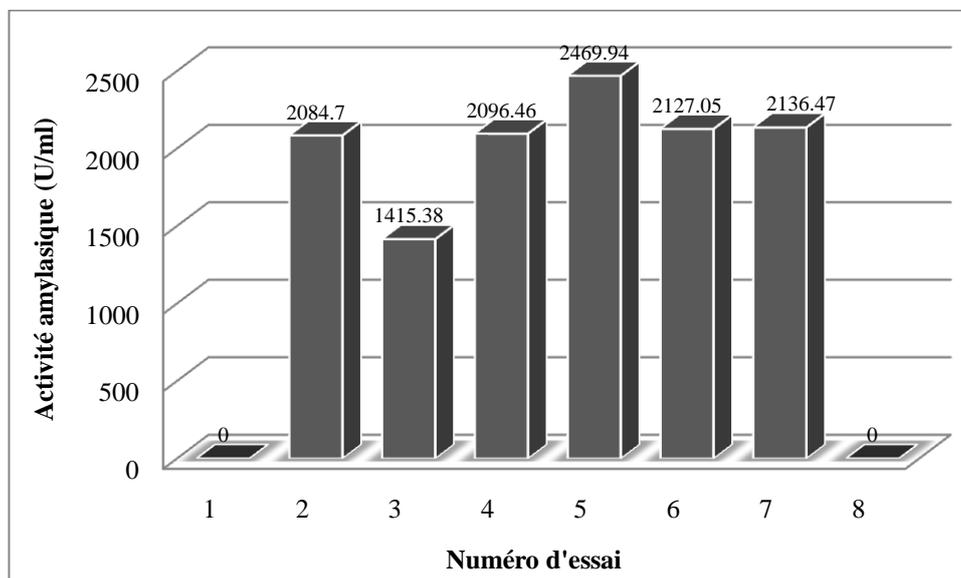


Figure 06 : Variation de l'activité amylasique de la souche *Rhizopus sp*₂ en fonction des huit essais.

✓ Effet des facteurs testés sur la production d' α -amylase

Les facteurs: pH, amidon, urée, extrait de levure et KH_2PO_4 , testés pour la souche *Rhizopus sp*₂ ont des effets plus ou moins significatifs sur la production d' α -amylase. L'effet de chaque facteur sur cette réponse, ainsi que la statistique du test t de *Student* et le niveau de signification sont consignés dans le tableau 27.

Tableau 27: Effet des facteurs testés sur la production d' α -amylase par la souche *Rhizopus* sp₂.

Facteurs	α -amylase		
	Estimation	valeur de t	Signification (%)
X₁: pH	-53.22	- 0.22	N.S
X₂: Amidon	289.67	1.20	N.S
X₄: Urée	784.01	3.74	93.5
X₆: Extrait de levure	1306.58	6.23	97.5
X₇: KH₂PO₄	991.92	4.73	95.8

Le tableau 27, indique que l'activité amylasique de la souche *Rhizopus* sp₂. n'est influencée que par l'extrait de levure, le KH₂PO₄ et l'urée. Ces facteurs influencent positivement la production d' α -amylase par cette souche, d'une façon hautement significative, avec ($p \geq 97.5\%$, $p \geq 95.8\%$ et $p \geq 93.5\%$), respectivement pour l'extrait de levure, KH₂PO₄ et l'urée. Par contre, le pH et l'amidon n'ont aucun effet significatif sur cette réponse.

L'équation du modèle réduit avec seulement les variables explicatives à effet significatif s'écrit donc:

$$\hat{Y} = 1541.25 + 653.29 X_6 + 495.96 X_7 + 392 X_4$$

c. Production d' α -amylase par la souche *Penicillium* sp₁.

✓ Activité amylasique enregistrée dans les huit expériences

La variation de l'activité α -amylasique de la souche *Penicillium* sp₁. enregistrée dans les huit expériences est représentée dans la figure 07.

Nous remarquons que l'activité amylasique varie de **00 U/ml** à **2880 U/ml**, avec un rendement maximum enregistré dans l'essai **2**. Des activités amylasiques approximativement nulles, ont été enregistrées dans les essais **1, 3, 7** et **8**.

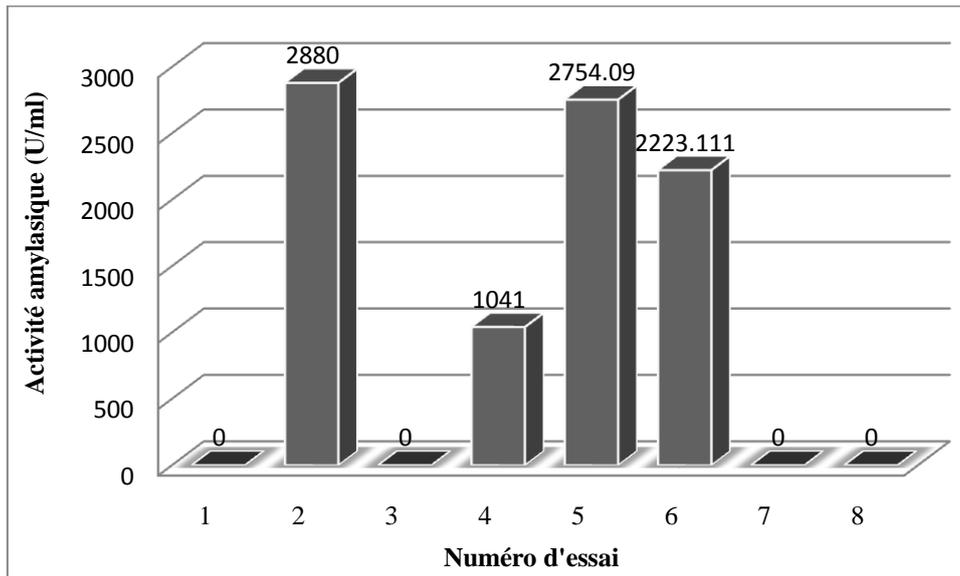


Figure 07 : Variation de l'activité amylasique de la souche *Penicillium sp.* en fonction des huit essais

✓ **Effet des facteurs testés sur la production d' α -amylase**

Les facteurs: pH, température, amidon, extrait de levure et KH_2PO_4 , testés pour la souche *Penicillium sp.* ont des effets plus ou moins significatifs sur la production d' α -amylase. L'effet de chaque facteur sur cette réponse, ainsi que la statistique du test t de *Student* et le niveau de signification sont consignés dans le tableau 28.

Tableau 28: Effet des facteurs testés sur la production d' α -amylase par la souche *Penicillium sp.*

Facteurs	α -amylase		
	Estimation	valeur de t	Signification (%)
X₁: pH	41.3	0.07	N.S
X₂: Température	572.3	0.93	N.S
X₄: Amidon	- 263.6	- 0.50	N.S
X₆: Extrait de levure	2225.1	4.19	94.7
X₇: KH_2PO_4	263.6	0.50	N.S

Le tableau 28, indique que l'activité α -amylasique de la souche *Penicillium sp.* n'est influencée que par l'extrait de levure qui a un effet positif hautement significatif, avec ($p \geq 94.7\%$). Par contre les autres facteurs dont le pH, la température, l'amidon et le KH_2PO_4 ne présentent aucun effet significatif sur cette réponse.

L'équation du modèle réduit avec seulement les variables explicatives à effet significatif s'écrit donc:

$$\hat{Y} = 1112.5 + 1112.5 X_6$$

d. Production d' α -amylase par la souche *Alternaria* sp.

✓ Activité amylasique enregistrée dans les huit expériences

La variation de l'activité α -amylasique de la souche *Alternaria* sp. enregistrée dans les huit expériences est représentée dans la figure 08.

Nous remarquons que l'activité amylasique varie de **00 U/ml** à **2820 U/ml**, avec un rendement maximum enregistré dans l'essai **4**. Par contre, des activités amylasiques approximativement nulles, ont été enregistrées pour cette souche, dans les essais **1, 3, 7 et 8**.

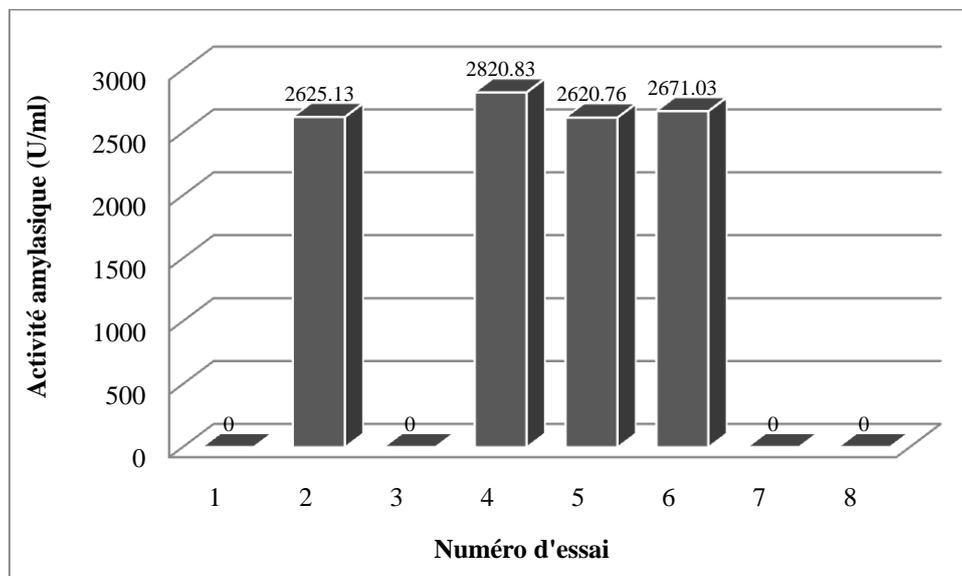


Figure 08: Variation de l'activité amylasique de la souche *Alternaria* sp. en fonction des huit essais

✓ Effet des facteurs testés sur la production d' α -amylase

Les facteurs: pH, température, amidon, extrait de levure et KH_2PO_4 testés pour la souche *Penicillium* sp. ont des effets plus ou moins significatifs sur la production d' α -amylase. L'effet de chaque facteur sur cette réponse, ainsi que la statistique du test t de *Student* et le niveau de signification sont consignés dans le tableau 29.

Tableau 29: Effet des variables étudiées sur la production d' α -amylase par *Alternaria* sp.

Facteurs	α -amylase		
	Estimation	valeur de t	Signification (%)
X₁: pH	- 7.48	- 0.11	N.S
X₂: Température	- 57.75	- 0.89	N.S
X₄: Amidon	38.54	0.68	N.S
X₆: Extrait de levure	2684.44	47.52	99.99
X₇: KH₂PO₄	- 38.54	- 0.68	N.S

Le tableau 29, indique que seul l'extrait de levure a un effet positif hautement significatif sur la production d' α -amylase par la souche *Alternaria* sp. avec ($p \geq 99.99\%$). Les autres facteurs dont le pH, la température, l'amidon et le KH₂PO₄ n'ont aucun effet significatif sur cette réponse.

L'équation du modèle réduit avec seulement les variables explicatives à effet significatif s'écrit donc:

$$\hat{Y} = 1342.22 + 1342.22 X_6$$

e. Production d' α -amylase par la souche *Helminthosporium* sp.

✓ Activité amylasique enregistrée dans les huit essais

La variation de l'activité α -amylasique de la souche *Helminthosporium* sp. enregistrée dans les huit expériences est représentée dans la figure 09.

Nous remarquons que l'activité α -amylasique varie de **00 U** à **2486.78 U**, avec un rendement maximum enregistré dans l'essai **2**. Des activités amylasiques approximativement nulles, ont été obtenues dans les essais **1, 3, 7** et **8**.

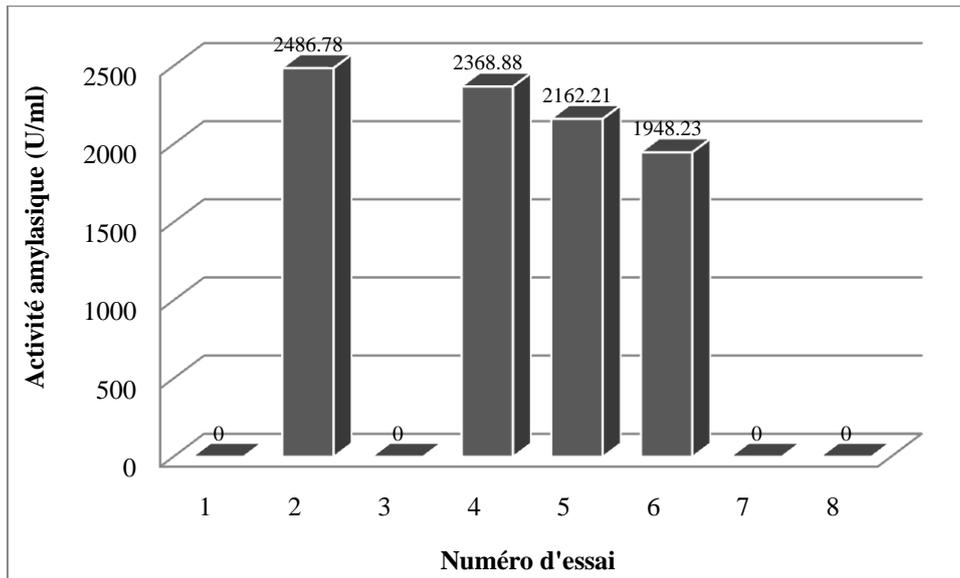


Figure 09: Variation de l'activité amylasique de la souche *Helminthosporium* sp. en fonction des huit essais

✓ **Effet des facteurs testés sur la production d' α -amylase**

Les facteurs: pH, température, amidon, extrait de levure et KH_2PO_4 , testés pour la souche *Helminthosporium* sp. ont des effets plus ou moins significatifs sur la production d' α -amylase. L'effet de chaque facteur sur cette réponse, ainsi que la statistique du test t de Student et le niveau de signification sont consignés dans le tableau 30.

Tableau 30: Effet des facteurs testés sur la production d' α -amylase par la souche *Helminthosporium* sp.

Facteurs	α - amylase		
	Estimation	valeur de t	Signification
X₁: pH	- 85.76	- 2.01	81.8
X₂: Température	128.31	3.01	90.5
X₄: Amidon	188.81	5.11	96.4
X₆: Extrait de levure	2244.03	60.78	99.99
X₇: KH_2PO_4	- 188.81	- 5.11	96.4

Le tableau 30, indique que tous les facteurs testés influencent plus ou moins l'activité amylasique de la souche *Helminthosporium* sp., dont une influence positive d'une façon hautement significative avec ($p \geq 99.99\%$, $p \geq 96.4\%$, $p \geq 90.5\%$) a été marquée, respectivement par l'extrait de levure, l'amidon et la température. Une influence négative :

d'une façon hautement significative ($p \geq 96.4\%$) a été marquée par le KH_2PO_4 et très significative ($p \geq 81.8\%$) par le pH.

L'équation du modèle réduit avec seulement les variables explicatives à effet significatif s'écrit donc:

$$\hat{Y} = 1122.01 + 1122.01 X_6 + 94.40 X_4 - 94.40 X_7 + 64.15 X_2 - 42.84 X_1$$

Discussion

6.1 Isolement et identification des souches

Nos résultats représentés dans le tableau 12, montrent que les genres identifiés dont, *Rhizopus*, *Penicillium*, *Alternaria*, *Helminthosporium* et *Ustilago* sont tous, parmi les micromycètes phytopathogènes de champ et du stockage des céréales, comme a été signalé par Larpent-gourgaud et Sanglier (1992) et Godon et Loisel (1997).

Jouani et yiannicouris (2002) signalent que la croissance fongique est régie par de nombreux paramètres physico-chimiques, notamment la température. La différence de la température du climat des deux régions chez les deux échantillons d'orge, peut être à l'origine du changement de la flore fongique d'un échantillon à un autre.

Plusieurs travaux d'étude de la flore fongique de nombreuses céréales (orge, blé, maïs et riz), dont les travaux de Belyagoubi (2006); Yahiyaoui et Zouaghi (2007); Bouhelal et Lemchama, (2009) ont abouti à l'isolement et l'identification des souches appartenant aux mêmes genres identifiés dans notre travail ; cela nous renseigne sur la contamination fréquente des céréales par ces genres.

6.2 Réponse des souches au test amylolytique

Les isolats appartenant au genre *Rhizopus* ont une réponse positive au test amylolytique, avec des activités amylasiques différentes d'un isolat à l'autre, ce qui confirme qu'ils sont producteurs d' α -amylase.

Plusieurs études faites par Soccol *et al.* (1994); Lucio de-Sousa *et al.*, 1996 ; Akbache et Bariout (2007) et Ayugu et Amadi (2010) montrent que certaines espèces du genre *Rhizopus* sont productrices d'amylases (glucoamylase et α -amylase).

Le premier isolat appartenant au genre *Penicillium* isolé à partir d'orge de la région de Sétif, révèle une activité α -amylasique. Plusieurs espèces du genre *Penicillium* telles que *P. fellutanum* et *P. crysogenum* sont productrices d' α -amylase, comme a été monté par les études de Kathiresan et Mannivanan (2006) ; Ertan et Balkan (2007).

Le second isolat appartenant au genre *Alternaria* présente aussi une réponse positive au test amylolytique. Ce résultat concorde avec les travaux de Lateef *et al.* (2004), montrant que l'espèce *Alternaria Alternata* est productrice d'une α -amylase.

Le genre *Helminthosporium* révèle aussi un potentiel amylolytique. Ceci peut être expliqué, par le fait que ce genre englobe des espèces productrices d' α -amylase.

6.3 Caractéristiques biochimiques du moût de datte

6.3.1 pH

D'après les résultats représentés dans le tableau 15, le moût de datte utilisé présente un pH de 5.09, ce qui nous montre que c'est un milieu acide, favorable au développement des moisissures pouvant croître en aérobiose sur des déchets organiques à des pH compris entre 3 et 7 (Reynes *et al.*, 1994 ; Nicklin *et al.*, 2000).

En outre, Bourgeois (2003) ; Benchelah et Maka (2008), signalent que les vitamines du groupe B contenues en quantités appréciables dans la datte se conservent bien aux pH compris entre 5 et 6, ce qui semble important pour les moisissures, dont certaines vitamines de ce groupe restent l'un de leurs facteurs de croissance (Rivière, 1975; Botton *et al.*, 1990).

6.3.2 Teneur en eau

Le moût de dattes étudié présente une teneur en eau de 68.47 % ; cette valeur paraît juste pour un milieu, dont une quantité de 2.5 litres d'eau distillée en est ajoutée lors de son extraction. Cette valeur nous a permis également de déduire la teneur en matière sèche qui est de 31%. Cette valeur paraît importante et nous renseigne sur la quantité de matière organique susceptible d'être exploitée par les microorganismes (Akbache et Bariout, 2007).

6.3.3 Sucres

Les résultats obtenus (tableau15), montrent que le moût de dattes extrait présente une teneur de 17.92 % de sucres totaux, dont 9.08% des sucres réducteurs et 8.40 % du saccharose.

Nous résultats se rapprochent de ceux trouvés par Ould El Hadj *et al.* (2006); Chaira *et al.* (2007) qui ont enregistré respectivement des teneurs de 16.64% et 17 % de sucres totaux pour les rebuts de la même variété. Comme il est à signaler aussi, que d'autres auteurs dont Açourène et Tama (2001); Belaidi et Barka (2009), ont analysé le moût extrait des rebuts de la même variété, et obtenu une teneur de sucres totaux de 22.61 à 23 % dont 12 % de saccharose et 9.13 des sucres réducteurs.

La teneur en sucres réducteurs de 9.08% de ce moût, fait de ce dernier un milieu riche en sucres fermentescibles indispensables au développement de divers microorganismes à intérêt industriel utilisés en fermentation pour la valorisation de ces rebuts, et permet de mettre sur le

marché local et international une nouvelle génération de produits à haute valeur ajoutée, tels que la levure boulangère, l'éthanol et l'acide citrique (Ould El Haj *et al.* 2006; Boulal *et al.* 2010 ; Açourène *et al.*, 2011).

6.3.4 Protéines

Le moût de dattes étudié présente une faible teneur en protéines (1.09%). Ce résultat est en accord avec ceux d'Al Hooti *et al.* (1997); Khalil *et al.* (2002) et Besbes *et al.* (2009) qui signalent que la teneur en protéines des dattes est faible et ne dépasse pas généralement les 3%.

D'après ces résultats, nous avons conclu que le moût de dattes est pauvre en azote, qui reste un élément indispensable pour le développement des moisissures. En conséquence son utilisation comme milieu de culture nécessite l'ajout d'une source azotée.

6.3.5 Cendres

Le moût de dattes utilisé, présente un taux de cendres de 1.95%. Ce résultat concorde avec les résultats d'Amellal (2008) qui mentionne un taux de 2%.

Par ailleurs, nos résultats paraissent moyens, car plusieurs auteurs dont Lambiote (1983) ; Favier *et al.* (1993) affirment que la datte renferme des teneurs en cendres de l'ordre de 2%.

6.4 Production de biomasse et d' α -amylase par fermentation submergée

6.4.1 Cinétique de production de biomasse

6.4.1.1 Cinétique de production de biomasse et variation du pH pour les cinq souches

La figures 02 représentant la variation de la biomasse et du pH en fonction du temps d'incubation pour les souches : *Rhizopus* sp₁., *Rhizopus* sp₂., *Penicillium* sp₁., *Alternaria* sp. et *Helminthosporium* sp., montre que la croissance des cinq souches débute dès les premières heures d'incubation. Cette croissance est due certainement à la richesse du moût de dattes en nutriments indispensables au développement des moisissures. Ceci est en accord avec Malloch (1997) ; Halwyn *et al.* (2002) qui signalent que toute substance organique peut constituer un substrat de croissance idéal pour les moisissures, car la spore n'a besoin que de trois éléments principaux pour germer : éléments nutritifs nécessaires, eau en quantité suffisante et une température appropriée (10 à 40°C).

L'augmentation rapide de la quantité de biomasse dès 48 heures d'incubation, pour atteindre son maximum de 8.88g/l, 8.90g/l, 8.05g/l et 8.20 g/l à 72 heures, respectivement pour les souches *Rhizopus* sp₁., *Rhizopus* sp₂., *Alternaria* sp. et *Helminthosporium* sp., et 7.90g/l à 96

heures pour la souche *Penicillium* sp₁., peut être expliquée par la phase exponentielle, qui est caractérisée par une accélération de croissance.

La diminution de la quantité de biomasse, atteignant 6.50g/l, 6.84g/l, 6.90g/l et 6.46 g/l à 96 heures, respectivement pour les souches *Rhizopus* sp₁., *Rhizopus* sp₂., *Alternaria* sp. et *Helminthosporium* sp., et 5.10 g/l à 120 heures pour la souche *Penicillium* sp₁., est due à la phase de décélération qui se termine par une phase de déclin caractérisée par la présence dans le milieu, de substances ou déchets sécrétés par ces moisissures, inhibant la croissance progressivement jusqu'à l'arrêter. L'accumulation de ces substances d'excrétions, provoque une autodestruction des cellules microbiennes ; ce qui explique la diminution de leur quantité (Leclerc *et al.*, 1995; Leveau et Bouix, 1993; Arnaud et Guiraud 1999).

Nos résultats se rapprochent de ceux de Benaouida (2008), qui montre que la croissance de *Schwanniomyces* sp. productrice d' α -amylase sur un milieu de culture à base de rebuts de dattes passe par quatre phases : Phase d'adaptation, stationnaire et enfin une phase de déclin dès 72 heures.

Pour les fluctuations du pH, la figure 03 décrit une diminution du pH dès les premières heures d'incubation, enregistrée pour les cinq souches étudiées. Ceci peut être expliqué par l'acidification du milieu de culture due à la sécrétion d'acides organiques extracellulaires par ces souches (Boiron, 1996 ; Akin, 2008).

Par ailleurs, Socol *et al.*, 1994 ont prouvé la production d'acides fumarique et lactique par le genre *Rhizopus*.

En outre, Uhlig (1998) et Ellaiah *et al.* (2003), indiquent que certaines espèces du genre *Penicillium*, dont *Penicillium notatum*, *Penicillium patulum*, *Penicillium expansum*, *Penicillium glandicola* et *Penicillium vulpinum* sont connues par leur production d'acides, de pénicilline et de dérivés d'acides engendrant ainsi une forte acidification de milieu.

6.4.2 Cinétique de production d' α -amylase par les cinq souches

La figure 04 décrit un début d'apparition d' α -amylase à 48 heures d'incubation, pour toutes les souches. Ceci peut être expliqué par le fait qu'au début de fermentation (24heures), les souches utilisent les nutriments facilement assimilables, tels que les sucres fermentescibles du moût de dattes pour leur croissance (Leveau et Bouix, 1993).

Cependant, au-delà de 24 heures et avec l'épuisement des sucres fermentescibles, les souches secrètent des enzymes extracellulaires, telles que l' α -amylase leur permettant de dégrader l'amidon pour garantir leur survie.

L'augmentation de la production d' α -amylase par les souches *Rhizopus* sp₁. et *Rhizopus* sp₂. ayant respectivement un maximum de **2745 U/ml** et **2420 U/ml** à 72 heures, et *Penicillium* sp₁. atteignant son maximum de **2180 U/ml** à 96 heures, est proportionnelle à leur croissance. Ceci peut être expliqué par le fait que, ces moisissures sont en phase exponentielle de croissance (Ramachandran *et al.*, 2004).

Pour la souche *Penicillium* sp₁., nos résultats se rapprochent de ceux trouvés par Kathiresan et Manivannan (2006) enregistrant un maximum d'activité α -amylasique de la souche *Penicillium fellutanum* à une durée d'incubation de 96 heures à 30°C, contrairement aux résultats de Tiwari *et al.* (2007) ; Taskin et Erdal (2010) ; Nouadri (2011) qui ont trouvé que l'activité α -amylasique de diverses espèces appartenant au genre *Penicillium*, apparaît dès 24 heures d'incubation en augmentant progressivement pour atteindre leur maximum de production à des durée de 72 heures à 57 °C, 144 heures à 30 °C et 168 heures à 22 °C, respectivement pour les souches *Penicillium regulosum*, *Penicillium expansum* et *Penicillium cammenberti*.

Les souches *Alternaria* sp. et *Helminthosporium* sp., ont une forte activité α -amylasique après la diminution de leur croissance à 96 heures d'incubation, avec respectivement un maximum de **1976.47 U/ml** et **2073.33 U/ml**; ce qui peut être expliqué par le fait que, la synthèse d' α -amylase par ces souches n'est pas associée à leur croissance. Ces résultats concordent avec ceux trouvés par Ayogu et Amadi (2010), étudiant la production d' α -amylase par la souche *Rhizopus nigricans* cultivée sur le maïs écrasé.

La diminution de l'activité α -amylasique atteignant **2548.50 U/ml**, **2300 U/ml** à 120 heures, respectivement pour les souches *Rhizopus* sp₁. et *Rhizopus* sp₂. et **2073.33 U/ml**, **1976.47 U/ml** et **2073.33 U/ml**, respectivement pour les souches *Penicillium* sp₁., *Alternaria* sp. et *Helminthosporium* sp., peut être le résultat d'une inactivation d' α -amylase, due à l'interaction avec d'autres métabolites (enzymes, telles que les protéases ou substances toxiques) secrétés dans le milieu, ou aux changements de pH affectant négativement le rendement en α -amylase (Leclerc *et al.*, 1995; Haq *et al.*, 2002 ; Ramachandran *et al.*, 2004; Nahar *et al.*, 2008).

6.5 Optimisation des productions (biomasse et α -amylase)

6.5.1 Effet des facteurs testés sur la croissance des souches

6.5.1.1 Effet des facteurs testés sur la croissance de la souche *Rhizopus* sp₁.

D'après le tableau 16, la biomasse varie de 1.28g/l (expérience 8) à 10.20g/l (expérience 5). Les facteurs favorables pour la croissance de la souche (production de biomasse) sont donc ceux de l'expérience 5.

En parallèle, les résultats de l'analyse statistique ont permis d'évaluer l'effet de chaque facteur sur la production de biomasse.

Le tableau 17, indique que l'extrait de levure, l'amidon et le KH_2PO_4 présentent respectivement des effets positifs hautement significatifs de ($p \geq 97.7$, $p \geq 95.8\%$ et $p \geq 93.6\%$) sur la production de biomasse. Ceci est expliqué par le rôle primordial de l'azote dans la croissance et la prolifération des mycètes et la construction de leurs molécules protéiques (Botton *et al.*, 1990 ; Scriban, 1999 ; Nicklin *et al.*, 2000).

L'amidon constitue une source adéquate de carbone provoquant une bonne croissance de la souche *Rhizopus* sp₁. Ceci concorde avec les résultats annoncés par Dercova *et al.* (1992) ; Calderon *et al.* (2003) ; Bennamoun *et al.* (2004), où l'amidon est utilisé comme source d'énergie ayant un effet significatif important sur la croissance.

En outre, Jaccard (2008) signale que le phosphore est essentiel pour la synthèse des acides nucléiques et d'ATP, et il est apporté sous forme de (HPO_4^{2-}).

L'influence négative d'une façon hautement significative du pH ($p \geq 92.7\%$) peut être probablement expliquée, par le fait que le pH 5, est plus convenable au développement de la souche *Rhizopus* sp₁. Selon l'étude de Dubey *et al.* (2000), un pH 5 semble être optimal pour la croissance d'*Aspergillus niger* et *Thermobifida fusca* (Yang *et al.*, 2004).

6.5.1.2 Effet des facteurs testés sur la croissance de la souche *Rhizopus* sp₂.

D'après le tableau 18, la biomasse varie de 1.83g/l (expérience 8) à 10.02g/l (expérience 5). Les facteurs favorables pour la production de biomasse par la souche *Rhizopus* sp₂, sont donc ceux de l'expérience 5.

Par ailleurs, les résultats de l'analyse statistique (tableau 19) ont permis de définir l'extrait de levure, l'amidon, le KH_2PO_4 et l'urée comme facteurs ayant des effets positifs hautement significatifs, respectivement avec ($p \geq 99.9$, $p \geq 99.8$, $p \geq 99.6$ et $p \geq 98.5$) sur la production

de biomasse. Ces résultats concordent avec plusieurs références, dont Boiron (1996) ; Scriban (1999) et Jaccard (2008) qui montrent qu'un bon développement des microorganismes a été enregistré en présence de ces éléments.

Par contre, l'influence négative d'une façon hautement significative ($p \geq 99.7\%$) du pH sur la production de biomasse par cette souche, peut être probablement due au fait que le pH maximum toléré par cette souche ne dépassant pas 5.

6.5.1.3 Effet des facteurs testés sur la croissance de la souche *Penicillium* sp₁.

D'après le tableau 20, la biomasse varie de 1.24g/l (expérience 1) à 9.60g/l (expérience 5). Les facteurs favorables pour la production de biomasse par la souche *Penicillium* sp₁, sont donc ceux de l'expérience 5.

En parallèle, les résultats de l'analyse statistique (tableau 21), ont permis de définir l'extrait de levure et KH_2PO_4 comme facteurs ayant des effets positifs respectivement hautement significatifs ($p \geq 97.5\%$) et très significatif ($p \geq 84.4\%$), sur la production de biomasse par cette souche. Alors que le pH a un effet négatif significatif ($p \geq 70\%$).

Ces résultats sont en accord avec l'étude de Nouadri (2011), montrant que l'extrait de levure à une concentration de 5.25 g/l et un pH de 5 sont très favorables au développement de la souche *Penicillium cammemberti* productrice d' α -amylase. Comme pour les souches *Rhizopus* sp. (1 et 2), le KH_2PO_4 semble être meilleur comme source de phosphore favorisant une bonne croissance (Jaccard, 2008).

6.5.1.4 Effet des facteurs testés sur la croissance de la souche *Alternaria* sp.

D'après le tableau 22, la biomasse varie de 2.12g/l (expérience 8) à 10.18g/l (expérience 2). Les facteurs favorables pour la production de biomasse par la souche *Alternaria* sp., sont donc ceux de l'expérience 2.

En parallèle, les résultats de l'analyse statistique (tableau 23), ont permis de définir l'extrait de levure et la température comme facteurs ayant des effets positifs hautement significatifs respectivement ($p \geq 98.3$) et ($p \geq 92.2\%$), sur la production de biomasse. Alors que le pH, l'amidon et KH_2PO_4 n'ont aucun effet significatif sur cette réponse. Ces résultats peuvent être expliqués par le fait que, l'extrait de levure est une source d'azote convenable au développement de la souche *Alternaria* sp., ce qui est de même pour une température de 35°C.

Boiron (1996), indique qu'un grand nombre d'espèces fongiques se développent bien à des températures de 30 à 40 °C.

La non signification des facteurs (pH, amidon et KH_2PO_4), peut être expliquée par le fait que le moût de dattes contient une quantité suffisante de sources de carbone plus assimilables que l'amidon et de sels minéraux plus exigés par cette souches d'une part, et que la souche appartient au groupe fongique qui tolère les variations du pH de 4 à 8, d'autre part (Bourgeois *et al.*, 1989).

6.5.1.5 Effet des facteurs testés sur la croissance d'*Helminthosporium* sp.

D'après le tableau 24, la biomasse varie de 2.24g/l (expérience 8) à 14.98g/l (expérience 5). Les facteurs favorables pour la production de biomasse par la souche *Helminthosporium* sp., sont donc ceux de l'expérience 5.

En parallèle, les résultats de l'analyse statistique (tableau 25), ont permis de définir l'extrait de levure et la température comme facteurs ayant une influence positive : d'une façon très significative ($p \geq 89.3$) pour l'extrait de levure et significative ($p \geq 71.4\%$) pour la température. Alors que le pH, l'amidon et le KH_2PO_4 n'ont aucun effet significatif. Ces résultats ont une explication similaire à celle de la souche *Alternaria* sp.

6.5.2 Effet des facteurs testés sur la production d' α -amylase

Les résultats de l'analyse statistique ont montré que les facteurs : pH, amidon, urée, extrait de levure et KH_2PO_4 , testés pour les souches *Rhizopus* sp. (1 et 2) et ceux testés pour les souches *Penicillium* sp₁., *Alternaria* sp. et *Helminthosporium* sp. (pH, température, amidon, extrait de levure et KH_2PO_4), ont des effets plus ou moins significatifs sur la production d' α -amylase par les cinq souches, sachant que leur degré de signification varie d'une souche à l'autre.

6.5.2.1 Effet du pH

D'après les tableaux 25, 26, 27, 28 et 29, la légère variation du pH (de 5 à 5.5 et de 5 à 6) n'influe la production d' α -amylase que pour les souches *Rhizopus* sp₁. et *Helminthosporium* sp., où cette variation présente une influence négative très significative ($p \geq 81.8\%$) pour la souche *Helminthosporium* sp. et significative ($p \geq 73.4\%$) pour *Rhizopus* sp₁.

Ces résultats peuvent être expliqués par le fait que, l' α -amylase produite par les deux souches *Rhizopus* sp₁. et *Helminthosporium* sp. a un pH optimum de 5 ; ce qui est en accord avec les résultats d'Ellaih *et al.* (2002) qui montrent que la production d' α -amylase par la souche

Aspergillus sp. était bonne aux valeurs de pH acides excepté pH 3.0, avec une production relativement basse enregistrée aux conditions neutres et alcalines.

Cependant ce facteur, reste sans aucun effet pour la production d' α -amylase par les souches *Rhizopus* sp₂., *Penicillium* sp₁. et *Alternaria* sp.; ce qui corrobore les études de Lucio de-Sousa et al. (1996) sur *Rhizopus oryzae*, confirmant qu'une légère variation du pH (4-6) ne présente aucun effet sur l'activité amylasique.

Par ailleurs, Khatirsan et Manivannan (2006) ont démontré qu'une meilleure production d' α -amylase par la souche *Penicillium fellutanum* a été obtenue à pH 5.

6.5.2.2 Effet de la température

La température est le facteur testé uniquement pour les souches *Penicillium* sp₁., *Alternaria* sp. et *Helminthosporium* sp. La légère augmentation de la température (de 30 à 35°C) a un effet positif hautement significatif ($p \geq 90.5\%$), sur la production d' α -amylase par la souche *Helminthosporium* sp. Ce résultat peut être expliqué par l'étude de Sindhu et al. (2009) qui indiquent qu'une meilleure production d'enzymes amylolytiques par les micromycètes a été obtenue sur une gamme de température de 30°C à 45°C, avec une production optimale à 35°C.

Contrairement à cette souche, la variation de la température ne semble pas avoir un effet significatif sur la production d' α -amylase par les souches *Penicillium* sp. et *Alternaria* sp. Ceci corrobore les résultats de Taskin et Erdal (2010), qui montrent que la température optimale pour la production maximale d' α -amylase par *Penicillium expansum* ne dépasse pas 30 °C.

6.5.2.3 Effet de l'amidon soluble

La présence de l'amidon soluble dans le milieu à 5 g/l a un effet positif hautement significatif ($p \geq 96\%$) sur la production d' α -amylase par la souche *Helminthosporium* sp. Ce résultat confirme que l' α -amylase produite par la souche *Helminthosporium* sp. est une enzyme fortement induite par l'amidon (Bakri et al., 2003).

Nos résultats corroborent ceux de Bennamoun et al. (2004) qui ont trouvé que l'amidon soluble stimule la production d' α -amylase d'*Aspergillus oryzae*.

En effet, l'efficacité de l'amidon soluble dans la synthèse de l' α -amylase en tant que substrat idéal de son induction, a été démontré par plusieurs auteurs (Dercova *et al.*, 1992; Cruz *et al.*, 1997 ; Uriyo et Eigel, 1999 ; Chen *et al.*, 2000 ; González *et al.*, 2008).

Selon Vallier *et al.* (1977); Aguilar *et al.*, (2000), la présence d'amidon soluble dans les milieux de culture stabilise et protège l'enzyme.

Contrairement à cette souche, ce facteur n'a aucun effet significatif sur la production d' α -amylase par *Rhizopus* sp. (1 et 2), *Penicillium* sp₁. et *Alternaria* sp. Ceci peut être expliqué par le fait que le niveau supérieur de ce facteur (5g/l) n'est pas adéquat.

Selon Gupta *et al.* (2008), la présence des sucres réducteurs (glucose et fructose) ainsi que le saccharose dans le milieu, bien qu'ils puissent induire la production d' α -amylase, ils deviennent répresseurs en dépassant certaines concentrations.

6.5.2.4 Effet de l'extrait de levure

D'après les résultats de l'analyse statistique (tableaux 26, 27, 28, 29 et 30), l'extrait de levure reste le facteur le plus influent sur la production d' α -amylase par toutes les souches, car sa présence dans le milieu à 5g/l présente des effets positifs hautement significatifs de ($p \geq 99.99\%$) pour les souches *Alternaria* sp. et *Helminthosporium* sp., et de ($p \geq 97,7$, $p \geq 97.5$ et $p \geq 94.7$ %), respectivement pour les souches *Rhizopus* sp₁., *Rhizopus* sp₂. et *Penicillium* sp₁. Ces résultats confirment ceux de Hamilton *et al.*, (1999) ; Emanuilova et Toda, (1984); Krishnan et Chandra (1982) ; Hayashida *et al.*, (1988) qui signalent que les sources organiques d'azote sont préférées pour la production d' α -amylase, avec un rendement maximum soutenu par l'extrait de levure, la peptone ou l'extrait de bœuf .

Par ailleurs, Nouadri (2011) a montré que la production d' α -amylase par la moisissure *Penicillium camemberti* est influencée significativement, par l'extrait de levure (à 5g/l).

6.5.2.5 Effet de l'urée

L'urée est le facteur testé uniquement pour les deux souches *Rhizopus* sp. (1 et 2). Les tableaux 26 et 27, montrent que la présence de l'urée (à 5g/l) dans le milieu de culture influence positivement la production d' α -amylase : d'une façon hautement significative ($p \geq 93.5\%$) pour la souche *Rhizopus* sp₁. et très significative ($p \geq 84.3\%$) pour la souche *Rhizopus* sp₂.

Ces résultats corroborent ceux d'Ellaiah *et al.* (2002) qui montrent que parmi diverses sources d'azote, l'addition de l'urée a donné une meilleure production d'enzymes amylolytiques par la souche *Aspergillus sp.*

6.5.2.6 Effet de KH_2PO_4

Les tableaux 26, 27, 28, 29 et 30, montrent que le passage de 4g/l à 6 g/l, pour le KH_2PO_4 a une influence positive hautement significative ($p \geq 95.8$) et ($p \geq 95.4$ %), respectivement pour les souche *Rhizopus sp*₁. et *Rhizopus sp*₂. Ceci peut être expliqué par le fait que, le phosphore joue un rôle primordial dans la régulation de la production de plusieurs métabolites primaires et secondaire de microorganismes (Dean, 1972 ; Mertz et Doolin, 1973).

Contrairement à ces souches, le KH_2PO_4 a un effet négatif hautement significatif sur la production d' α -amylase par la souche *Helminthosporium sp.* Cela est probablement expliqué par le fait que, le passage de 4g/l à 6g/l n'est pas adéquat pour la production d' α -amylase par cette souche. Zhang *et al.* (1983) montrent que la concentration élevée de phosphore dans le milieu, le rend inhibiteur de la production d' α -amylase microbienne.

Pour les *Penicillium sp*₁. et *Alternaria sp.*, ce facteur reste sans aucun effet. Ceci peut être expliqué par le fait que ces souches sont indifférentes à sa concentration dans le milieu.

6.6 pH de milieu à la fin de fermentation

A la fin de fermentation, le pH diminue ou augmente selon la composition des milieux et les souches.

Selon Bellon-Maurel *et al.*, (2003), Ces variations du pH résultent d'une consommation en substrat (hydrolyse des protéines) et/ou des synthèses métaboliques (synthèse d'acides organiques) ; elles sont donc des indicatrices des changements dans les activités métaboliques.

Pour les souches *Rhizopus sp.* (1 et 2), nos résultats corroborent ceux de Soccol *et al.* (1994) et Saito *et al.* (2003), qui montrent que la diminution du pH à la fin des fermentations réalisées par *Rhizopus oryzae* ATCC 34612 est due à la synthèse des acides fumarique et lactique qui s'accumulent dans le milieu. Par contre l'augmentation du pH, surtout dans les milieux associant l'urée et l'extrait de levure est probablement expliquée par la libération des acides aminés et des ions ammonium rendant ainsi le milieu alcalin (Botton *et al.*, 1990).

*Conclusion générale et
perspectives*

L' α -amylase est l'une des plus importantes hydrolases actives sur l'amidon dont les domaines d'application s'élargissent de plus en plus. La production de cette enzyme a été réussie par certaines bactéries, levure et certains genres de moisissures dont *Aspergillus* et *Penicillium*.

Dans notre travail portant sur la production d' α -amylase par des moisissures cultivées sur milieu à base de rebuts de dattes, nous avons réussi à l'isolement et la sélection des nouvelles moisissures productrices d' α -amylase sur un milieu complexe (à base des rebuts de dattes) optimisé, et donc aboutir à la valorisation de ces rebuts par des procédés biotechnologiques à moindre coût.

Pour l'isolement et la sélection des souches amylolytiques, l'examen microscopique et le test amylolytique, nous ont permis d'identifier cinq souches potentiellement amylolytiques dont *Rhizopus* sp.₁, *Rhizopus* sp.₂, *Penicillium* sp.₁, *Alternaria* sp. et *Helminthosporium* sp.

La cinétique de croissance et de production d' α -amylase, étudiée pour les cinq souches a montré une production maximale de biomasse à 72 heures d'incubation à 30 °C, pour les souches *Rhizopus* sp.₁, *Rhizopus* sp.₂, *Alternaria* sp. et *Helminthosporium* sp. et à 96 heures pour la souche *Penicillium* sp.₁, et une meilleure production d' α -amylase enregistrée à 72 heures pour les souches *Rhizopus* sp. (1 et 2), et à 96 heures pour les souches *Penicillium* sp.₁, *Alternaria* sp. et *Helminthosporium* sp.

Quant à l'optimisation du milieu de culture, le plan expérimental de Plackett-Burman a permis la sélection de :

- L'extrait de levure, l'amidon et le KH_2PO_4 , comme facteurs ayant une influence positive hautement significative sur la croissance de la souche *Rhizopus* sp.₁ et le pH comme facteur ayant un effet négatif hautement significatif ;
- L'extrait de levure, l'amidon, le KH_2PO_4 et l'urée, comme facteurs ayant une influence positive hautement significative sur la croissance de la souche *Rhizopus* sp.₂, et le pH, comme facteur ayant un effet négatif hautement significatif ;
- L'extrait de levure et le KH_2PO_4 , comme facteurs ayant une influence positive, respectivement hautement significative et très significative pour la croissance de la souche *Penicillium* sp.₁, et le pH, comme facteur qui a un effet négatif significatif.
- L'extrait de levure et la température, comme facteurs ayant une influence positive hautement significative sur la croissance de la souche *Alternaria* sp. ;
- L'extrait de levure et la température ayant une influence positive respectivement, très significative et significative pour la croissance de la souche *Helminthosporium* sp.

Pour la production d' α -amylase, l'extrait de levure demeure le seul facteur présentant une influence positive hautement significative sur la production d' α -amylase par les cinq souches, suivi de :

- KH_2PO_4 qui présente un effet positif hautement significatif sur l' α -amylase produite par les souches *Rhizopus* sp. (1 et 2) ;
- L'amidon et la température qui ont une influence positive hautement significative uniquement, sur la production d' α -amylase par la souche *Helminthosporium* sp.
- L'urée qui présente un effet positif respectivement, hautement significative pour la production d' α -amylase par la souche *Rhizopus* sp.₂ et très significatif pour la souche *Rhizopus* sp.₁.
- Le pH qui a une influence négative significative, sur la production d' α -amylase par les souches *Rhizopus* sp.₁ et *Helminthosporium* sp. La production d' α -amylase par cette dernière souche a été influencée négativement d'une façon hautement significative par le KH_2PO_4 .

Bien que les résultats obtenus, confirme la possibilité d'utiliser le moût de rebuts de dattes de la variété Deglet-Nour pour la production d' α -amylase, une étude complémentaire est recommandée pour :

- Déterminer la meilleure concentration en sucres de ce moût, ainsi que les optima des facteurs sélectionnés par le plan d'expérience de Plackett et Burman par l'utilisation d'un plan composite centré de Box et Wilson (1951) ;
- Identifier les souches isolées;
- Produire l' α -amylase par les mêmes souches, par fermentation solide (SSF), pour pouvoir choisir le procédé le plus rentable ;
- Purifier et caractériser l'enzyme.

*Références
bibliographiques*

Açourène S. et Ammouche A., 2011. Optimization of ethanol, citric acid, and α -amylase production from date wastes by strains of *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus niger*, and *Candida guilliermondii*. Society for Industrial Microbiology and Biotechnology. DOI 10.1007/s10295-011-1070-0, pp.1-8.

Açourène S., Ammouche A. et Djaafri K., 2008. Valorisation des rebuts de dattes par la production de la levure boulangere, de l'alcool et du vinaigre. Sciences & Technologie C - (28), pp.38 -45.

Açourene S. et Tama M., 2006. Utilisation des Dattes de Faible Valeur Marchande (Rebuts de Deglet-Nour, Tinissine et Tantboucht) Comme Substrat pour la Fabrication de la Levure Boulangère. *Rev. Energ. Ren. : Production et Valorisation – Biomasse*, pp.1-10.

Açourene, S., Buelguedj, M., Tama, M. et Taleb, B., 2001. Caractérisation, évaluation de la qualité de la datte et identification des cultivars rares de palmier dattier de la région des Ziban. *Revue Recherche Agronomique*, N° 8, Ed. INRAA, pp.19-39.

Aehle W. et Misset O., 1999. Enzymes for industrial applications. *In*: Rehm H.J., Reed G., editors. *Biotechnology*, 2nd ed. Germany: Wiley-VCH, pp.189-216.

Aguilar G., Mordon-Guyot J., Trejo-Aguilar B. et Guyot, J. P., 2000. Purification and characterization of an extracellular alphaamylase produced by *Lactobacillus manihotivorans* LMG1801 (T), an amyolytic lactic acid bacterium. *Enzyme and Microbial Technology*, 27(6), pp.406-413.

Ait kaki- El-Hadef El-Okki A., Leghlimi H., Dakhmouche S., Bennamoun L. et Meraihi Z. , 2012. Utilisation de la planification expérimentale pour l'optimisation de la production de l' α -amylase par *Rhizopus oryzae*. *Rev. Microbiol. Ind. San et Environn.* Vol 6, (1), pp. 1-17.

Akbache N. et Bariout S., 2007. Utilisation de planification expérimentale pour l'optimisation d'un milieu de culture à base de farine de dattes déclassées pour la production d' α -amylase de *Rhizopus oryzae*. Mémoire d'ingénieur, INATAA, université Mentouri, Constantine, 42p.

Akin, H., 2008. Evolution du pH pendant la fermentation alcoolique de moûts de raisins : modélisation et interprétation métabolique. Thèse doctorat, Institut National Polytechnique de Toulouse, option : Génie des Procédés et Environnement, 121p.

Alais C., Linden G. et Miclo L., 2008. Biochimie alimentaire, DUNOD. 6^{ème} édition, paris, pp.67-71.

Al-Hooti, S., Sidhu, J.S., Qabazard, H, 1997. Physicochemical characteristics of five date fruit cultivarss grown in the united Arab Emirates. *Journal of Plants Foods for Human Nutrition*, Vol. 50, pp. 101-113.

Amellal H., 2008. Aptitude technologiques de quelques variétés commune de dattes : Formulation d'un yaourt naturellement sucré et aromatisé. Thèse de doctorat ; Option Technologies alimentaires.Université de Boumerdes, 127 p.

Arnaud A. et Guiraud J.P., 1999. Le métabolisme microbien. *In*. Scriban. R. *Biotechnologie*. 5^{ème} édition. Techniques et Documentation-Lavoisier (Ed.), pp: 91-96.

Audigié C-I., Figarelle J. et Zonszani F., 1984. Manipulations d'analyses biochimiques. Doin éditeurs, Paris, pp. 88 - 97

Ayogu T-E, Amadi E-S., 2010. Amylase production by *Rhizopus nigricans* using mashed maize. *The internet journal of microbiology*. Vol 8 (1), pp.1937-8289.

Badot R.M. et Merlin D., 1984. Métabolisme énergétique et mouvement révolutif chez le haricot (*Phaseolus vulgaris*). *Ann. Sci. Uni. Franche-Comté, Biol.Veg.* (4), pp.7-12.

Bakri Y., Jacques P-H. et Thonart P-H., 2003. Xylanase production by *Penicillium canescens 10 10c* in solidstate fermentation. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, (108), pp.737-748.

Baldwin P., Van E. C., Istasse L., Bienfait J.M., 1986. Fermentation en silos de laboratoire de pulpes de bettraves sucrières. *Belgian Journal of Food Chemistry and Biotechnology*. (98), pp.792-797.

Barnett E. A. et Fergus C. L., 1971. Mycopathologie. *Mycol. Appl.*, 44, pp.131–141.

Belaidi M. et Barka I., 2009. Activité α - amylasique d'*Aspergillus niger* et *Candida guilliermondii* cultivées dans un milieu à base de rebuts de dattes. Mémoire d'Ingénieur. INATAA. Constantine, 76p.

Bel'en O., Juliana K., Ana M., Pedregos A., Inmaculada F. Monistro L., Fernando L. et Carmen S.E., 2006. Bacterial biofilm removal using fungal enzymes, *Enzyme and Microbial Technology*, (40), pp.51-56.

Bellon-Maurel V., Orliac O. et Christen P., 2003. Sensors and measurements in solid-state fermentation: A review.*Process Biochem.* (38), pp.881-896.

Belyagoubi L., 2006. Effet de quelques essences végétales sur la croissance des moisissures de détérioration des céréales. Mémoire de magister. Université Abou Bekr Belkaid, Telemcen, 110 p.

Benaouida K., 2008. Etude de l' α -amylase des levures isolées d'un écosystème extrême (sol environnant les sources thermale) et cultivées sur milieu à base de lactosérum. Thèse de Magister ; Option Biotechnologie microbienne. Université Mentouri, Constantine, 67p.

Benchelah A.-C. et Maka, M., 2006. Les dattes, de la préhistoire à nos jours. *Phytothérapie (ethnobotanique) Springer*, (1), pp.43 - 47.

Bennamoun L., Meraihi Z., Dakhmouche S., 2004. Utilisation de la planification expérimentale pour l'optimisation de la production de l' α -amylase par *Aspergillus oryzae* Ahlburg (Cohen) 1042.72 cultivé sur milieu à base de déchets d'oranges, *Journal of Food Engineering.* (64), pp.257- 264.

Bennett J.W. (1998). Mycotechnology: the role of fungi in biotechnology. *J. Biotechnol.*, (66), pp.101-107.

Bensamira S. 2006. Isolement et caractérisation de souches fongiques de milieux extrêmes (sol et sebkhia de la région de Biskra) productrices de cellulase thermostable à intérêt industriel. Mémoire du Magistère, Biochimie-microbiologie appliquée. Université Mentouri, Constantine, 75p.

Berguiya M. et Hafi M., 2012. Optimisation de la production de l'invertase par *Saccharomyces cerevisiae* et *Aspergillus niger* cultivées sur un milieu de culture à base de rebuts de dattes. Mémoire d'ingénieur. INATAA, Université Mentouri-Constantine, pp 69.

Bernfeld P., 1955. Amylase. In: Clowck S.P and Kaplan N.O.(Ed): Methods in enzymology. Volume 1. Academic press. New York, pp.149-157.

Berry D. et Paterson A., 1990. Enzymes in food industry. In: Sucking C.J. (ed.), Enzyme chemistry impact and application. Edition champman and hall London, 2nd edition, pp. 306 - 351.

Bertheau Y., Kotoujansky A. et Colenoa A., 1985. Sources actuelles et potentielles d'enzymes d'hymolyses et de dépolymérisation. In : Mouranche A. et Coste C. (Ed) : Hydrolyses et dépolymérase enzymes, d'intérêt industriel. Ed. Gautier-Villard, pp.47-108.

Besbes S., Drira L., Blecker K., Deroanne C. et Hamadi A., 2009. Adding value to hard date (*Phoenix dactylifera* L.): compositional, functional and sensory characteristics of date jam. *Journal of Food Chemistry*, Vol. (112), pp. 406-411.

Boiron p. (1996). Organisation et Biologie des champignons. Edition Nathan, 149p.

Botton B., Breton A., Fevre M., Gauthier S., Guy P.H., Larpent J.P., Reymond P., Sanglier J.J., Vayssier Y., Veau P., 1990. Moisissures utiles et nuisibles importance industrielle. 2^{ème} édition. Masson. Collection Biotechnologies, pp.34-428.

Bouddrar C., Bouzid L. et Nait Larbi H., 1997. Etude des fractions minérale et glucidique de la datte Deglet-Nour au cour de la maturation. Mémoire d'ingénieur agronome, INA el Harrach, 60 p.

Bouhelal H. et Lemchama S., 2009. Mycologie de blé tendre local et importé : conséquence sur les produits finis. Mémoire d'ingénieur, INATAA. Université Mentouri-Constantine, 76 p.

Boukhiar A., 2009. Analyse du processus traditionnel d'obtention du vinaigre de dattes tel qu'appliqué au sud algérien : essai d'optimisation. Thèse de magister; Option Technologies alimentaires. Université de Boumerdes, 101 p.

Boulal A., Benali B., Moulai M. et Touzi A., 2010. Transformation des déchets de dattes de la région d'Adrar en bioéthanol. Revue des Energies Renouvelables Vol. 13 (3), pp.455-463.

Bourgeois, C., 2003. Les vitamines dans les industries agroalimentaires. Ed. Tech et Doc-Lavoisier, Paris, 483 p.

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

- Bousseboua H., 2002.** Eléments de Microbiologie Générale. Programmes de graduation. Editions de l'Université Mentouri. Constantine Algérie, pp.230-231.
- Brawn S.H. et Kelly R.M., 1993.** Characterization of amylolytic enzymes having both (alpha)-1,4 and (alpha)-1,6 hydrolytic activity from the thermophilic *archaea Pyrococcus furiosus* and *Thermococcus litoralis* Applied and Environmental Microbiology; 59; (8), pp.2614-2621.
- Buelguedj M., 2001.** Caractéristiques des cultivars de dattes dans les palmeraies du Sud-Est Algérien., INRAA El-Harrach N° 11, Alger, 289 p.
- Cahagnier B.1998.** Moisissure des aliments peu hydratés. Lavoisier-Tec &Doc, Paris., pp. 96-135.
- Calderon M., Loiseau G., et Guyot J. P., 2003.** Fermentation by *Lactobacillus fermentum* Ogi E1 of different combinations of carbohydrates occurring naturally in cereals: consequences on growth energetics and alpha-amylase production. International Journal of Food Microbiology, 80 (2), pp.161–169.
- Chaira N., Ferchichi A., Mrabet A. et Sghairoun M., 2007.** Chemical composition of the flesh and the pit of date palm fruit and radical scavenging activity of their extracts. *Journal of Pakistan journal of Biological Sciences*, Vol. 10 (13), pp. 2202-2207.
- Champion R., 1997.** Identifier les champignons transmis par les semences. Techniques et pratiques édition, INRA, 398 p.
- Charles A., Guy L. et Laurent M., 2003.** Biochimie alimentaire, 5^{ème} édition de l'abrégé. Dunod, Paris.
- Chatterton J-R. VogelsongK-M., Lu Y- Ellman A-B. et Hudgens G-A., 1996.** Salivary-amylase as a measure of endogenous adrenergic activity. *Clin. Physiol. J.* 16 (4), pp.344-348.
- Chehma A., Longo H-F. et Belbey A., 2003.** Utilisation digestive de régimes à base de rebuts de dattes chez le dromadaire et le mouton. *Courrier du Savoir* - N°03, pp. 17-21.
- Chehma A. et Longo H-F., 2001.** Valorisation des sous-produits du palmier dattier en vue de leur utilisation en alimentation du bétail. *Rev. Energ. Ren. : Production et Valorisation-Biomasse*, pp.59-64.
- Chen D. C., Wang B. D., Chou P. Y. et Kuo, T. T., 2000.** Asparagine as a nitrogen source for improving the secretion of mouse alpha-amylase in *Saccharomyces cerevisiae* protease A-deficient strains. *Yeast*, 16(3), pp.207-217.
- Chiba S., 1988.** Amyloglycosidase. *In. Handbook of Amylases and related enzymes (The Amylase Research Society of Japan, éd.)*. Pergamum Press, Oxford, U.K, pp 104-116.
- Chodok P., Kanjana-opas A., Kaewsuwan S., 2010.** The Plackett-Burman Design for Evaluating the Production of Polyunsaturated Fatty Acids by *Physcomitrella patens*. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 87(5), pp.521-529.

Cruz R., Lucio de Souza E., Hoffman E. H. E., Bellini M. Z., Cruz V. D. et Vieire C. R., 1997. Relationship between carbone source. Production and pattern action of a-amylase from *Rhizopus sp.* *Revista Microbiologia*, 28, pp.101-105.

Dao H-P., 2005. Caractérisation de certains gènes polycetones synthases chez *Aspergillus ochraceus* NRRL 3174 producteur d'ochratoxine A et d'acide penicillique. Thèse de doctorat d'état ; Option Microbiologie. Institut national polytechnique de Toulouse, 126 p.

Davet R., 1997. La Communauté Fongique : Son organisation et rôle dans l'écosystème. Marcel Dekker, Inc., New York.

Dean A.C.R., 1972. Influence of environment on the control of enzyme synthesis. *J Appl Chem Biotechnol* (22), pp.245-59.

Djekrif-dakhmouche S., Gheribi-aoulmi Z., Meraihi Z. et Bennamoun L., 2006. Application of a statistical design to the optimization of culture medium for α -amylase production by *Aspergillus niger* ATCC 16404 grown on orange waste powder. *J. Food Eng.* (73), pp.190-197.

Delgado-Jarana J., Rincon A. M. et Benitez T., 2002. Aspartyl protease from *Trichoderma harzianum* CECT 2413: cloning and characterization. *Microbiology*. (148), pp.1305-1315.

Dercova K., Augustin J. et Krajcova, D., 1992. Cell growth and aamylase production characteristics of *Bacillus subtilis*. *Folia Microbiologica*, 37(1), pp. 17–23.

Devshony S., Etesshola E. et Shani A., 1992. Nouveau dictionnaire des huiles végétales.

Diomi M., Elisavet K. et Paul C., 2008. Fungal multienzyme production on industrial by-products of the citrus-processing industry, *Biotechnology Laboratory.Technology*. (99), pp.2373-2383.

Djekrif-Dakhmouche S., Gheribi-Aoulmi Z., Meraihi Z. et Bennamoun L., 2006. Application of a statistical design to the optimization of culture medium for a-amylase production by *Aspergillus niger* ATCC 16404 grown on orange waste powder. *J. Food Eng.* 73, pp. 190-197.

Djelal H. et Perrot M., 2009. Utilisation de champignons spécifiques pour la biodégradation d'effluents industriels. L'eau, l'industrie, les nuisances. *Revue Ain* N° 306. Ecole des Métiers de l'Environnement, Bruz Damien Grizard, Aquaprox, filiale du groupe Protex International, pp.85-90.

Djerbi M., 1994. Précis de phoéniculture : FAO, 192 p.

Djouab, A., 2007. Contribution à l'identification des constituants mineurs de la datte Mech-Degla. Essai de valorisation par incorporation dans une recette de margarine allégée. Mémoire de Magistère spécialité génie alimentaire, Université de Boumerdès, 133p.

Dubey AK., Suresh C., Kavitha R., Karanth N-G. et Umesh-kumar S., 2000. Evidence that the glucoamylases and α -amylase secreted by *Aspergillus niger* are proteolytically processed products of a precursor enzyme, *Journal of Basic Microbial* .471(2), pp.251-255.

Dubost D., 1991. Ecologie, aménagement et développement agricole des oasis algériennes. Thèse de doctorat, Université de Tours, France, 191 p.

Duo-Chuan L., Yijun Y., You-liang P., Chong-yao S., Peijin Z., Yicun H., 1997. Purification and properties of a thermostable alpha amylase from the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus*. *Acta Microbiol. Sin.* (37), pp.107-114.

Egas M.C.V., DA Costa M.S., Cowan D.A. et Pires E.M.V., 1998. Extracellular α -amylase from *Thermus filiformis* OrkA2. Purification and biochemical characterization. *Extremophiles Applied and Environmental Microbiology.* (2), pp.23-32.

Ellaiah P., Adinarayana K., Sunitha M., Devi R.B., 2003. Alpha amylase product by *Penicillium* sp. from some soil in India. Lab: pharmaceutical biotech. *Indian journal of microbiology.*43 (2), pp.135-137.

Ellaiah P., Adinarayana K., Bhavani Y., Padmaja P. et Srinivasulu B., 2002. Optimization of process parameters for glucoamylase production under solid state fermentation by a newly isolated *Aspergillus* species, *Process Biochem.* (38), pp. 615–620.

Emanuilova EI., Toda K. (1984). α -Amylase production in batch and continuous cultures by *Bacillus caldolyticus*. *Appl Microbiol Biotechnol.* (19), pp.301-5.

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

Espiard, E., 2002. Introduction à la transformation industrielle des fruits. Ed. Tech et Doc Lavoisier, pp.147-155.

Favier J-C, Erland R-J., Lausscq C. et Feinberg M., 1993. Répertoire général des aliments. Table de composition des fruits exotiques, fruits de cueillette d’Afrique. Tom III, Ed. ORSTOM., Lavoisier, INRA, pp.27-28.

Fethi H-A. et El Kouhtani M-N., 1979. Production de dattes dans le monde arabe et Islamique. Université Ain Chems, pp.535-541.

Fogarty W. M. et Kelly, C. T., 1994. Microbial Enzymes and Biotechnology *Applied Science*, London, New York. (43):71-132.

Frazier W.C., 1967. Food microbiology. Academic presse. London, pp.3-429.

Godon B. et Loisel W. 1997. Guide pratiques d’analyses dans les industries céréales. 2^{ème} édition. Tech &Doc, Paris, 817 p.

González C.F., Fariña J.I., Figueroa L.I.C., 2008. Optimized amylolytic enzymes production in *Saccharomycopsis fibuligera* DSM-70554. An approach to efficient cassava starch utilization”, *Enzyme and Microbiol Technology.* 4(2), pp.272-277.

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

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), pp.551-556. Asian Network For Scientific Information. ISSN 1686-296X.

Haasum I., Eriksen S. H. Jensen B. et Olsen J., 1991. Growth and glucoamylase production by the thermophilic fungus, *Thermomyces lanuginosus* in a synthetic medium. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 34, pp.656–660.

Halwyn. M.A., Lercterc J.M., King N., Belonger M., Legris M. et Frenett Y., 2002. Les risques à la santé associés à la présence de moisissure en milieu interieur, Rapport scientifique. ISBN.Quebec. Canada, 165 p.

Hamilton L.M., Kelly C.T. et Fogarty W.M., 1999. Production and properties of the raw starch-digesting alpha-amylase of *Bacillus sp. IMD 435*. *Process Biochemistry*. (35), pp.27-31.

Haq I.U., Rani S., Ashraf H. et Qadeer M.A., 2002. Biosynthesis of alpha amylase by chemically treated mutant of *Bacillus subtilis*. *J.Biol. Sci.* 2 (2), pp 73-75.

Hart H.E., Parish M.E., Burns J.K. et Wicker L., 1991. Orange finisher-pulpe as substrat of polygalacturonase production by *Rhizopus oryzae*. *J. of food sciences*. (55), pp.480-83.

Hayashida S., Teramoto Y. et Inoue T., 1988. Production and characteristics of raw potato starch digesting α -amylase from *Bacillus subtilis* 65. *Appl Environ Microbiol*, 54, pp.1516-22.

Hendriksen H.V., Pedersen S., Bisgard-Frantzen H., 1999. A process for textile warp sizing using enzymatically modified starches. *Patent Application* WO 99/35325.

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

Jackard, 2008. Composition des milieu de culture. *In: Development of an Industrial Biotechnology Process : Metabolic basis of product formation and development of medium*, HES-SO Valais.

Jensen B., Olsen J. et Allermann K., 1987. Effect of media composition on the production of extracellular amylase from the thermophilic fungus, *Thermomyces lanuginosus*. *Biotechnol. Lett.*, 9, pp. 313–316.

Jouani J-P. et et yiannicouris A., 2002. Les mycotoxines dans les aliments des ruminants, leur devenir, leurs effets chez l'animal. INRA ; *Production animale* 15 (1), pp.3-16.

Julien R., 2002. Les moisissures parlons-en. *Objectif prevention*. 25 (4), pp.7-8.

Kaidi, F., Touzi A., 2001. Production de bioalcool à partir des déchets de dattes. *Rev. Energ. Ren. Production et Valorisation-Biomasse*, pp.75-78.

Kathiresan K. et Manivannan S., 2006. α -amylase production by *Penicillium fellutanum* isolated from mangrove rhizosphere soil. *African Journal of Biotechnology* Vol. 5 (10), pp. 829-832.

Kendri S., 1999. Caractéristiques biochimiques de la biomasse "*Saccharomyces cerevisiae*" produite à partir des dattes «Variété Ghars». Mémoire d'Ingénieur. Département d'agronomie, Batna, 51 p.

Khalil K.E., Abd-El-Bari M. S., Hafiz N. E. et Entsar, Y. A., 2002. Production, evaluation and utilization of date syrup concentrate (Debis). *Egypt. J. Food Sci.* 30 N° 2, pp.179-203.

Kiffer E. et Morelet M. 1997. Les deutéromycètes. Institut National de la Recherche Agronomique.

Kocher G.S et Katyal P., 2003. Use of potato starch for extracellular amylase production by a yeast isolate. Ludhana, India.

Kosikowski F. V., 1988. Dairy foods research papers. Enzyme behavior utilization in dairy technology. *J. Dairy Sci.* 71, pp.557-573.

Kottwitz B., Upadek H., Carrer G., 1994. Applications and benefits of enzymes in detergent. *Chim Oggi*, 12, pp.21-4.

Krishnan T. et Chandra A.K., 1982. Effect of oilseed cakes on α -amylase production by *Bacillus licheniformis* CUMC-305. *Appl. Environ. Microbiol.* 44, pp.270-274.

Lambiote B., 1983. Some aspect of the role of dates in humain nutrition. The first symposium on dates palm, King Faysal university, El Hassa Kingdomof Saudi Arabia, pp. 517-579.

Larpen-gourgaud M. et Sanglier J.J., 1992. Biotechnologies, principes et méthodes. Ed Doin., pp 574-581.

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

Leclerc H., Meyer A. et Deiana J., 1995. Cours de microbiologie générale. Nouveau programme. Biosciences et Techniques. Doin éditeurs, Paris, pp.73-92.

Lenoir J., Auburger B., Gripon J.C., 1979. Les caractères du système protéolytiques de *P.caseicolum* III, le lait. (503), pp.138-157.

Leveau J.Y. et Bouix M., 1993. Les moisissures. In : Florent J. Ed. Microbiologie industrielle. Les micro-organismes d'intérêt industriel. Edition Tec et Doc .Lavoisier .Apria, pp.110-170.

Liese A., Seelbach S., Wandrey C. et Wileyu VCH., 2000.Industrial biotransformations.

Little A.D., 2004. Comité Biotechnologies de LEEM, 2 Novembre 2004.

Lucio de-Sousa E., Erika M-E-H., Castilho V-M., Dclima A., Bellini M-Z. et Cruz Z-R., 1996. Production and characterization of α -amylase from *Rhizopus sp.* *Art.Biol. Technol.*, 39 (4), pp.813-839.

Mahmoud A.U., Greenman J., Scragg A.I.I., 1998. Orange and potato peel extracts. Analysis and use as *Bacillus* substrat for the production of extracellular enzymes in continuous culture. *Enzyme and Microbial Technology*.22 (2), pp.130-37.

Malloch D., 1997. Moulds: their isolation, cultivation and identification. Department of Botany, University of Toronto. <http://www.botany.utoronto.ca/ResearchLabs/MallochLab/lloch/oulds/oulds.html>.

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

Mattalah M.A.A., 1970. Contribution à l'étude de la conservation des dattes variété Deglet-Nour: Isotherme d'adsorption et de désorption. Mémoire d'ingénieur agronome, INA. El-Harrach, 79 p.

Mazur A. K. et Nakatani H., 1993. Multiple attack mechanisme in the porcine pancreatic amylase hydrolysis of amylose and amylopectine. *Arch. Bioch. Biophysics*. Vol., 306 (1), pp. 29-38.

Mc Tigue, Kelly C.T., Doyle E.M. et Fogarty W.M., 1995. The alkaline amylase of the alkalophilic *Bacillus sp.* IMD 370. *Enzyme and Microbial Technology*. (17), pp 570-573.

Merabti R., 2006. Isolement et caractérisation de souches levuriennes amylolytiques à partir de sol saharien algérien. Thèse de Magistère. Université Mentouri-Constantine, 86 p.

Meunier P., 1973. Le palmier dattier. Ed. MAISONNEUVE, Paris, 221 p.

Mercier C., 1985. Les enzymes amylolytiques. *In* : Mouranche A. Coste C. hydrolases et dépolymérasés. Ed Gauthier-Villars., pp.110-140.

Mertz F.P. et Doolin L.E., 1973. The effect of phosphate on the biosynthesis of vanilomycin. *Can J Microbiol*; 19, pp.263-70.

Mills G-T., 1990. Mycotoxin and fungi on cereal grains in western Canada. *Can. J phisiol. Pharmacol.* (68), pp.968-989.

Milner J.A., Martin D.J. et Smith A., 1997. Two-stage inoculate for the production of alphaamylase by *bacillus amyloliquefaciens*. *Enzyme and microbial technology*. (21), pp.382-386.

Molinié A.et Pfohl-leszkowics A., 2003. Les mycotoxines dans les céréales : Les points importants de contrôle de la production au stockage, le devenir dans les produits dérivés. Laboratoire de toxicologie et sécurité alimentaire, Auzeville-Tolozane. Note de l'ASEDIS SO N° spécial mycotoxines, 9 p.

Morvan J., 2010. Marché européen des enzymes dans les applications alimentaires.M55B. <http://www.frost.com>.

Nahar S., Hossain F., Ferozal B. et Halim M-A., 2008 Production of glucoamylase by *Rhizopus sp.* in liquid culture. *Pak. J. Bot.*, 40(4), pp.1693-1698.

Nguyen Q.D., Rezessy-szab J.M. et Hoschke D., 2000. Optimisation of composition of media for the production of amylolytic enzymes by *Thermomyces lanuginosus* ATCC 34626. *Food Technol. Biotechnol.* 38 (3), pp.229-234.

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

Niehaus F., Bertoldo C., Kahler M. et Antranikian G., 1999. Extremophiles as a source of novel enzymes for industrial application. *Applied Microbiology and Biotechnology.* (50), pp.711-729.

Nielson J-E., Borchert T-V et Vriend G., 2001. The determinant of α -amylase pH-activity profiles. *Protein Engineering.* Oxford University Press. 14 (7), pp.505-512.

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

Nouadri T., 2011. L' α -amylase de *Penicillium camemberti* PL21: Production, Purification, Caractérisation et immobilisation. Thèse de Doctorat d'Etat; Option Biochimie-Biotechnologies. Université Mentouri-Constantine, 125p

Ould El Hadj M.D., Bitour Z. et Siboukeur O., 2006. Etude de la production de levure boulangère (*Saccharomyces cerevisiae*) cultivée sur moût de rebuts de dattes. *Courrier du Savoir* -N°07, pp.13-18.

Özdemir S., Güven K., Baysal Z. et Uyar1 F., 2009. Screening of Various Organic Substrates and the Development of a Suitable Low-Cost Fermentation Medium for the Production of α -Amylase by *Bacillus subtilis*. *Food Technol. Biotechnol.* 47 (4), pp.364–369.

Palvannan T. et Sathishkumar P., 2010. Production of laccase from *Pleurotus florida* NCIMn1243 using Plackett–Burman Design and Response Surface Methodology. *Journal of Basic Microbiology.* 50 (4), pp.325-335.

Pandey A., Nigam P., Soccol C.R., Soccol V. T., Singh D. et Mohan R., 2000. Advances In. Microbial amylases. *Biotechnology. Appl. Biochem.* (31), pp.135-152.

Park C.S., Chang C.C., Kim J.Y., Ogrydziak D.M., Ryui D.D.Y., 1997. Expression, secretion, and processing of rice Alpha-amylase in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *J. Biol. Chem.*, 272 (11), pp.6876-6881.

Pascal B. et Thomas-Jeffries W. (1990). Selective Production of Extracellular Peroxidases from *chrysosporium* in an Airlift Bioreactor, *Journal of fermentation and Bioengineering.* 70 (3), pp.158-163.

Pederson H., Nielsen J., 2000. The influence of nitrogen sources on the alpha-amylase productivity of *A.oryzae* in continuous cultures. *Appl. Microbial. Biota.* (53), pp.278-281.

Peixoto-nogueira S.C., Sandrim V.C., Guimarães L.H.S., Jorge J.A., Terenzi H.F. et Polizeli M.L.T.M., 2008. Evidence of thermostable amylolytic activity from *Rhizopus microsporus* and *Rhizopodiformis* using wheat bran and corncob as alternative carbon source, *Bioprocess and Biosystem Engineering*, (31), pp.329-334.

Plackett K-L., et Burman J-P., 1946. The design of optimum multifactoriel experminets. *Biometrika*, 33, pp.305-325.

Punt P. J., Van Biezen N., Conesa A., Albers A., Mangnus J. et Van den Hondel C., 2002. Filamentous fungi as cell factories for heterologous protein production. *Trends Biotechnol.* 20 (5), pp.200-206.

Radhouane K., Belgacem N., Samir B., 2008. Application of a statistical design to the optimization of parameters and culture medium for α -amylase production by *Aspergillus oryzae* CBS 819.72 grown on gruel (wheat grinding by-product); Laboratoire d'Enzymes et Metabolites des Prokaryotes Bioresource Technology .(99), pp.56-62.

Raimbault M., 1998. General and microbiological aspects of solid substrate fermentation, *Electron. J. Biotechnol.* 1 (<http://www.ejbiotechnology.info>).

Raimbault M., 1981. Fermentation en milieu solide : Croissance de champignons filamenteux sur substrat amylicé. *Travaux et documents de L'O.R.ST.O.M*, N°127, 273p.

Ramachandran S., Patel A-K., Nampootheri M-M., Francis F., Nagy V., Szakacs G. et Pandey A., 2004. Coconut oil cake a potential raw material for the production of α -amylase, *Bioresour. Technol.* 93, pp.169–174.

Ramesh M-V. et Lonsane B-K., 1987. A novel bacterial thermostable alpha amylase system produced under solid-state fermentation, *Biotechnol. Lett.* (9), pp.501–504.

Reynes M., Bouabidi H., Piombo G. et Risterucci A.M., 1994. Caractérisation des principales variétés de dattes cultivées dans la région du Djérid en Tunisie. *Journal of Fruits*, Vol. 49, pp.289-298.

Richard R., 1972. *Eléments de biologie végétale.* Ed. Touchet, Paris, 235p

Riviere J. (1975). *Les applications industrielles de la microbiologie.* Collection Sciences agronomiques. Ed. Masson et Cie, p : 31-195.

Saito K., Kawamura Y. et Oda Y., 2003. Role of the pectinolytic enzyme in the lactic acid fermentation of potato pulp by *Rhizopus oryzae*. *Id Microbiol Biotechnol* 30 (7), pp.440-444.

Samson R.A., Eckalorolt C. et Orthe R., 1977. The taxonomy of *Penicillium* spies for fermented cheese Henkel et cie GmbH, dept of microbiology D- 4000 Düsseldorf, pp.341-350.

Savcheko A., Vieille C., Kang S. et Zeikus J-C., 2002. Pyrococcus -amylase is stabilised by calcium and zinc .Department of biochemistry and molecular biology. University east Lausing, pp.111-123.

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

Siboukeur O., Ould El Hadj MD. et Zargat F., 2001. Contribution à l'Etude de la Production d'Acide Citrique par *Aspergillus niger* cultivée sur moût de dattes de la variété Ghars. *Rev. Energ. Ren. : Production et Valorisation- Biomasse*, pp 93-96.

Siboukeur O., 1997. Qualité nutritionnelle, hygiénique et organoleptique du jus de dattes. Thèse de magistère, INA, El Harrach, Alger, 106p.

Sindhu R., Suprabha G-N. et Shashidhar S., 2009. Optimization of process parameters for the production of α -amylase from *Penicillium janthinellum* (NCIM 4960) under solid state fermentation. *African Journal of Microbiology Research Vol. 3(9)*, pp.498-503.

Soccol C-R., Marin B. et Raimbault M., 1994. Breeding and grwth of *Rhizopus* in raw cassava by solide state fermentation. *App. Microbiol. Biotechnol.* (41), pp.330-336.

Sonjoy S., Bill B. et Houston K-H., 1995. Cellulase activity of *Trichoderma reesei* (RUT-C 30) on municipal solid waste. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 15, pp.145-153.

Srinivasa Rao M. Reddy G. Venkateswara Rao G and Sambasiva Rao K. R.S. (2004). Studies on the extraction and characterisation of thermostable -amylase from pericarp of *Borassus indica*. *African Journal of Biotechnology.* (4), pp.289-291.

Talamond P., Desseaux V., Moreau Y., Santimone M. et Marseillemouren G., 2002. Isolation, characterization and inhibition by acarbose of the alpha-amylase from *Lactobacillus* fermentation: comparison with *Lb.Manihotivorans* and *Lb.Plantarum* amylases. *Comp Biochem. Physiology. Biochem. Mol Biol.*, 133 (3), pp.351-60.

Taskin M. et Erdal S., 2010. Production of α -amylase by *Penicillium expansum* MT-1 in solid-state fermentation using waste Loquat (*Eriobotrya japonica* Lindley) kernels as substrate. *Romanian Biotechnological Letters Vol. 15 (3)*, pp.5342-5350.

Tatsinkou F.B., Taveai F. et Ndjouenkeui R., 2005. Production and partial characterization of a thermostable amylase from ascomycetes yeast strain isolated from starchy soils. *African Journal of biotechnology.*, 4 (1), pp.14-18.

Tiwari K.L., Jadhav S.K. et Fatima A., 2007. Culture condition for the production of thermostable amylase by *Penicillium rugulosum*. *Global journal of Biotechnology and Biochemistry.* 2 (1), pp.21-24.

Tolan J-S., 1996. Pulp and paper. *In: Godfrey T, West S., editors. Industrial enzymology*, 2nd ed. New York: Stockton Press, pp.327-38.

Uhlig H., 1998. Industrial Enzymes and Their Applications. Ph.D, Translated and Updated by Elfride M. Linsmaier-Bednar, Ph.D. John.Wiley & Sons, Inc ed., 158 p.

Uriyo, M., et Eigel, W. E., 1999. Duration of kilning treatment on α -amylase, β -amylase and endo-(1, 3) (1, 4)- β -D-glucanase activity of malted sorghum (*Sorghum bicolor*). *Process Biochemistry*, 35, pp.433–436.

Vallier, P., Bata, J. et Colabert, L., 1977. Optimal conditions of alpha-amylase production by *Aspergillus oryzae* in liquid media. *Annals of Microbiology (Paris)*, 128(3), pp.359–371.

Van Der Maarel MJ, Van der Veen B., Uitdehaag J.C.M., Leemhuis H. et Dijkhuizen L., 2002. Properties and applications of starch converting enzymes of alpha amylase family. *Biotechnol*; 94, pp.137-55.

Vertiani C., Maeder D-I., Yip K-S, Stilman T-J., Britten K-L., Rice D-H, Klump H. et Robb F-T., 1998. Protein thermostability above 100 °C a key role for ionic interaction. *Proc.Nat.Sci. USA*, 95, pp.12300-12305.

Voca S., Dobricevic N., Dragovic-Uzelac V., Duralija B., Druzic J., Cmelik Z., Skendrovic-Babojelic M., 2008. Fruit Quality of New Early Ripening Strawberry Cultivars in Croatia. *Journal of Food Technol. Biotechnol.*, Vol. 46 (3), pp. 292-298.

Yahyaoui H. et Zouaghi N., 2007. Isolement, purification et identification des moisissures de quatre espèces de céréales stockées à Constantine et Mila. Mémoire d'ingénieur, INATAA. Université Mentouri-Constantine, 80 p.

Yang J., Kang S., Park S., Yoon H., Kim M., Heu S. et RYU S., 2004. Characterization of a novel amylolytic enzyme encoded by a gene from a soil-derived metagenomic library. *Applied. And Environnemental Microbiology* ,70 (12), pp.7229-7235

Zhang Q., Tsukagoshi N., Miyashiro S. et Udaka S., 1983. Increased production of α -amylase by *Bacillus amyloliquefaciens* in the presence of glycine. *Appl Environ Microbiol*, 46, pp.293-5.

Annexes

Annexe 1 : Composition des milieux d'isolement préparés au laboratoire

Malt agar (MA)

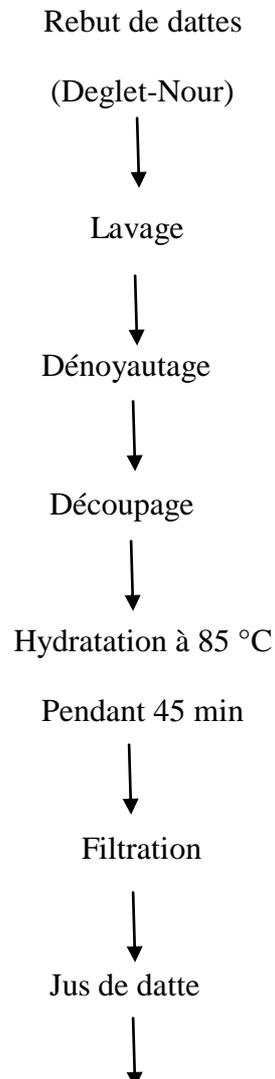
- 10g d'extrait de malt;
- 20g d'Agar ;
- 1000ml d'eau distillée.

Potato dextrose agar (PDA)

- 200g de pomme de terre;
- 20g de glucose;
- 20g d'agar;
- 1000ml d'eau distillée.

Annexe 2 : Extraction du moût de dattes et ses caractéristiques biochimiques

2.1 Extraction du moût de dattes



Analyses physico-chimiques et biochimiques

Teneur en eau

pH

Cendres

Sucres totaux

Sucres réducteurs

Protéines

2.2 Caractéristiques biochimiques du moût

2.2.1 Détermination du pH

✓ Mode opératoire

- Placer une quantité du jus de datte dans un bécher ;
- Procéder à la détermination du pH en prenant soins que l'électrode soit complètement immergée dans la solution ;
- Lire la valeur de pH enregistrée sur l'écran.

2.2.2 Détermination de la teneur en eau

✓ Mode opératoire

- Sécher des capsules vides à l'étuve durant 15 min à 105 °C ;
- Tarer les capsules après refroidissement dans un dessiccateur ;
- Peser dans chaque capsule 10 ml d'échantillon et les placer dans l'étuve réglée à 105 °C ± 2 °C pendant 24 h ;
- Retirer les capsules de l'étuve, les placer dans le dessiccateur, et après refroidissement, les peser;

✓ Expression des résultats

La teneur en eau est déterminée selon la formule suivante :

$$H \% = \frac{(M_1 - M_2)}{P} \times 100$$

Soit :

H% : teneur en eau ou humidité ;

M₁ : masse de la capsule + matière fraîche avant étuvage ;

M₂ : masse de la capsule + matière sèche après étuvage ;

P : masse de la prise d'essai.

$$\text{Matière sèche \%} = 100 - \text{H\%}$$

2.2.3 Détermination de la teneur en cendres

➤ Mode opératoire

- Peser 3 ml d'échantillon dans des creusets.
- Placer les creusets dans un four à moufle réglé à 600°C pendant 3 heures.
- Retirer les creusets du four, les refroidir dans le dessiccateur, puis les peser.

➤ Expression des résultats

$$\text{TC \%} = \frac{(M_1 - M_2)}{P} \times 100$$

Soit :

TC % : Taux de cendres ;

M₁ : Masse du creuset + prise d'essai ;

M₂ : masse du creuset + cendres ;

P : masse de la prise d'essai.

$$\text{Taux de Cendres \%} = 100 - \text{MO \%}$$

2.2.4 Dosage des sucres de la datte (Méthode de Bertrand)

✓ Mode opératoire

- Mettre 100 ml de moût de dattes et 10 ml d'acétate de plomb à 10 % dans une fiole de 300ml ;
- Agiter et filtrer à l'aide d'un papier filtre ;
- Eliminer l'excès de plomb par l'ajout d'un gramme de Na₂CO₃ dans le filtrat ;
- Filtrer une deuxième fois pour obtenir le jus **J** ;

Les dosages des sucres totaux et réducteurs sont effectués sur le jus **J**.

✓ Dosage des sucres réducteurs

- Mettre 10 ml de jus **J** + 90 ml d'eau distillée (dilution 10 fois) pour obtenir le jus **J₁**.
- Dans un Erlenmeyer, mettre :
 - 20 ml de la liqueur **A**
 - 20 ml de la liqueur **B**
 - 20 ml de jus **J₁**
- Couvrir l'Erlenmeyer et porter à l'ébullition ;
- Compter 3 minutes dès la solution entre en ébullition, puis laisser refroidir ;
- Après refroidissement l'oxyde cuivreux se dépose ;
- Filtrer la solution par l'aspiration de la trompe à vide ;
- Laver à trois reprises l'oxyde cuivreux avec 20 ml d'eau bouillie froide ;
- Rejeter le filtrat de la fiole à vide et la rincer à l'eau distillée ;
- Remettre en place le filtrat sur la fiole ;
- Dissoudre l'oxyde cuivreux avec 30 ml de la liqueur **C**, puis verser sur le filtre ;
- Mettre l'oxyde cuivreux en suspension par agitation.
- Récupérer la solution ferrique partiellement réduite dans la fiole à vide et rincer l'Erlenmeyer et le filtre à cinq reprises avec 30 ml d'eau distillée ;
- Ajouter une goutte d'orthophénantroline ferreuse à la solution ;
- Titrer le sel ferreux par le permanganate de potassium KMnO_4 (N/10) (le virage est obtenu par le passage de la couleur verte orange à la couleur verte).

✓ **Dosage des sucres totaux**

- Mettre dans une fiole: 50 ml de jus **J** et 5 ml d'HCl ;
- Porter la fiole au Bain Marie à 70 °C pendant 12 min ;
- Agiter, refroidir et ajuster à 55ml (jus inversé **J₁**) ;
- Prélever 10 ml de **J₁** et faire le dosage comme précédemment.

✓ **Teneur en saccharose**

La teneur en saccharose est obtenue par la différence entre la teneur en sucres totaux et les sucres réducteurs présents dans l'échantillon X 0.95.

La teneur en saccharose est déterminée de la façon suivante :

$$\text{Saccharose} = (\text{Sucres totaux} - \text{Sucres réducteurs}) \times 0,95$$

Préparation de la liqueur de Fehling

✓ **Solution cuprique A**

- Sulfate de cuivre pur : 40 g
- Acide sulfurique : 2 ml
- Eau Q.S.P : 1 L

✓ **Solution Tartro-Alcaline B**

- Tartrate Sodico-Potassique : 200 g
- Soude : 150 g
- Eau Q.S.P : 1 L

✓ **Solution Ferrique C**

- Sulfate Ferrique sec pur : 50 g
- Acide sulfurique pur : 110 ml
- Eau Q.S.P : 1 L

✓ **Dosage des protéines**

- Introduire dans un matras de minéralisation 2 ml de dattes et une pincée de catalyseur (sulfate de cuivre et de potassium), puis ajouter 15 ml d'acide sulfurique pur ;
- Appliquee un chauffage progressif : d'abord une attaque à froid pendant 15 mn jusqu'à l'apparition de vapeur blanche d'anhydride sulfurique, puis le chauffage est rendu plus énergique, attaque à chaud pendant 4 à 5 heures ; quand la solution devient limpide, elle est refroidie et complétée à 100 ml avec de l'eau distillée ;
- La distillation est réalisée dans un distillateur semi automatique, où l'ajout de 20 ml de lessive de soude à 35 % dans le matras et 25 % d'acide borique dans une fiole de 250 ml est réalisé. Le dégagement d'ammoniac est récupéré dans une solution d'acide borique contenant l'indicateur coloré (mélange de bleu de méthylène et rouge de méthyle). L'excès d'ammoniac est alors dosé par l'acide sulfurique 0.05 N dans un titrateur automatique.
- Un témoin est réalisé dans les mêmes conditions sans échantillon.
- La teneur en azote total est déterminée par la formule suivante :

$$N \% = \frac{V/V'. (N-N').0.05 \times 1.4}{P} \times 100$$

Où :

V : Le volume de la solution minéralisée (ml) ;

V' : Le volume de la solution de la soude ajoutée (ml) ;

N : La quantité d'acide sulfurique lue après titrage (ml) avec l'acide sulfurique de normalité 0,05 N ;

N' : Le volume d'acide sulfurique dépensé dans le titrage du témoin (ml) ;

P : Le poids ou volume de la prise d'essai (g ou ml).

La teneur en protéines est calculée en multipliant le taux d'azote total N (%) par le coefficient 6,25.

Annexe3 : Dosage de l'activité amylasique

3.1 Préparation des réactifs

✓ DNSA

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

✓ Tampon acétate à pH 5.6

Dissoudre 13,60g d'acétate de sodium trihydraté, 2,94g de chlorure de calcium dihydraté, 0,40g de Tween 20. Ajuster le pH à 5,6 avec de l'acide acétique et compléter à 1 litre dans une fiole avec de l'eau distillée.

✓ Solution du substrat

Dissoudre 1g d'amidon dans 100 ml de tampon acétate 0,1 à pH 5.6.

3.2 Courbe étalon du glucose

- Préparer la solution mère du glucose à 1g/L : Dissoudre 1g du glucose dans 1 litre d'eau distillée ;
- Préparer les dilutions : 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 et 90 ml de solution mère compléter à 100 ml d'eau distillée ;
- Dans des tubes à essai, prendre 1 ml de chaque dilution et 3 ml du réactif DNSA.
- Couvrir les tubes avec du papier aluminium ;
- Percer un trou dans la couverture de chaque tube avec une aiguille de seringue ;
- Faire bouillir pendant 5 min dans un Bain-marie à 90 °C ;
- Refroidir les tubes avec l'eau de robinet pendant 3 min.
- Mesurer l'absorbance à 540 nm en utilisant un spectrophotomètre ;
- Tracer la courbe d'étalonnage.

Nom et prénom : **ZOUBIRI Lamia**

Année universitaire : **2011-2012**

Thème : **Production d'alpha-amylase par des moisissures cultivées sur milieu à base de rebuts de dattes de la variété Deglet-Nour produite en Algérie.**

Nature du diplôme : **Magister en Sciences Alimentaires**

Option : **Biotechnologie Alimentaire**

Résumé

En Algérie, des quantités importantes de rebuts de dattes sont générées à chaque récolte. Ces rebuts de dattes, riches en sucres fermentescibles, sels minéraux et vitamines peuvent être un milieu favorable aussi bien pour le développement des microorganismes que pour la production des métabolites à forte valeur ajoutée telles que les enzymes amylolytiques, en particulier l' α -amylase.

Dans le but de sélectionner de nouvelles moisissures productrices d' α -amylase et d'optimiser un milieu de culture à base de rebuts de dattes, cinq moisissures dont *Rhizopus* sp₁., *Rhizopus* sp₂., *Penicillium* sp₁., *Alternaria* sp. et *Helminthosporium* sp. ont été isolées à partir des grains d'orge et cultivées sur moût de dattes pour la production de cette enzyme par fermentation submergée. La cinétique de production de biomasse et d' α -amylase a été étudiée en se basant sur le calcul quotidien de la biomasse et le dosage de l'activité enzymatique par la méthode de Bernfeld.

Afin d'améliorer considérablement le développement de ces moisissures et la production d' α -amylase, le milieu de base a été enrichi par différentes sources de carbone, d'azote et de phosphore, et optimisé en utilisant une méthode statistique de planification expérimentale (les matrices de Plackett-Burman).

Nos résultats ont montré que la biomasse apparaît dès les premières heures d'incubation et atteint son maximum à 72 heures pour les souches *Rhizopus* sp. (1 et 2), *Alternaria* sp. et *Helminthosporium* sp. et à 96 h pour la souche *Penicillium* sp., alors que la sécrétion de l'enzyme ne débute qu'à 48 heures pour atteindre son maximum à 72 heures pour les souches *Rhizopus* sp. (1 et 2) et à 96 heures pour les souches *Penicillium* sp., *Alternaria* sp. et *Helminthosporium* sp.

L'analyse statistique a permis la sélection de l'extrait de levure, l'amidon, le KH_2PO_4 , l'urée et la température comme facteurs influençant positivement la production de biomasse par toutes les souches, et l'extrait de levure comme facteur le plus influent positivement sur la production d' α -amylase par les cinq souches, comparativement aux facteurs : pH, température, amidon, urée et KH_2PO_4 dont l'influence varie d'une souche à l'autre.

Mots-clés : Rebuts de dattes, moisissures, α -amylase, optimisation, Matrices de Plackett-Burman.

Name and first name: **ZOUBIRI Lamia**

Academic year: **2011-2012**

Theme: **Production of alpha-amylase by moulds cultivated on medium containing date rejects of the Deglet-Nour variety produced in Algeria.**

Nature of the diploma: **Magister in Food Sciences**

Option: **Food biotechnology**

Abstract

In Algeria, significant amounts of date rejects are generated with each harvest. These date rejects, rich in fermentable sugars, rock salt and vitamins can be a medium favorable as well for the development of the micro-organisms as for the production of the metabolites to strong added value such as the amyolytic enzymes, in particular l' α -amylase.

With an aim of selecting new producing moulds d' α -amylase and of optimizing a culture medium containing date rejects, five moulds of which *Rhizopus* sp1., *Rhizopus* sp2. *Penicillium* sp1., *Alternaria* sp. and *Helminthosporium* sp. were isolated starting from the grains from barley and were cultivated on date must for the production of this enzyme by submerged fermentation. The kinetics of production of biomass and α -amylase was studied while being based on the daily calculation of the biomass and the proportioning of the enzymatic activity by the method of Bernfeld.

In order to improve considerably the development of these moulds and the d' α -amylase production, the basic medium was enriched by various sources carbon, nitrogen and by phosphorus, and was optimized by using a statistical method of experimental planning (matrices of Plackett-Burmun).

Our results showed that the biomass appears as of the first hours of incubation and reached its maximum at 72 hours for the strains of *Rhizopus* sp. (1 and 2), *Alternaria* sp. and *Helminthosporium* sp. and to 96 H for the strains of *Penicillium* sp., whereas the secretion of the enzyme begins only at 48 hours to reach its maximum at 72 hours for the strains of *Rhizopus* sp. (1 and 2) and at 96 hours for the stocks *Penicillium* sp., *Alternaria* sp. and *Helminthosporium* sp.

The statistical analysis allowed the selection of the yeast extract, the starch, the KH_2PO_4 , urea and the temperature like factors positively influencing the production of biomass by all the strains, and the yeast extract like the most influential factor positively on the α -amylase production by the five strains, compared to the factors: pH, temperature, starch, urea and KH_2PO_4 whose influence varies from one strain to another.

Key words: Date rejects, moulds, α -amylase, optimization, Plackett-Burman design.

الاسم واللقب: زوبيري لامية
الموضوع: إنتاج الالفـا-اميلاز بواسطة فطريات مزروعة في وسط متشكـل من بقايا التمر من فصيلة دقلة النور المنتجة في الجزائر

طبيعة الشهادة: ماجستير في العلوم الغذائية
اختصاص: بيوتكنولوجيا غذائية

ملخص

في الجزائر كميات هائلة من بقايا القمّر تخلّف خلال كلّ عمليّ جني. هته البقايا الغنيّة بالسكّريات القابلة للتخّمّر، الأملاح المعدنية و الفيتامينات، يمكنها أن تشكّل وسطا ملائما لنمو الكائنات المجهرية و إنتاج مواد ذات قيمة مضافة عالية على حد سوى، مثل الأنزيمات المحلّلة للرّشاء، خاصة الالفـا-اميلاز.

بههدف اختيار سلالات جديدة من الفطريات المنتجة للالفـا-اميلاز و كذا تحسين وسط الزرع المتكوّن من بقايا القمّر، خمسة فطريات تتمثّل في ريزوبوس₁، ريزوبوس₂، بينيسليوم₁، الترناريا و المنتوسبوريوم قد عزلت من بذور الشّعير و زرعت في مستخلص القمّر السائل لإنتاج هذا الأنزيم بطريقة التخّمّر الغطسي.

الرّاسة الحركية لإنتاج الكتلة الحيّة (البيوماس) والالفـا-اميلاز قد درست بالتركيز على الحساب اليومي للكتلة الحيّة و معايرة الرّشّاط الأنزيمي بطريقة برنفاـلـد.

من اجل النّظوير المعتبر لنمو هته الفطريات و إنتاج الالفـا-اميلاز، قد تمّ إضافة مصادر مختلفة، كربونية، أزوتية و فوسفورية للوسط القاعدي، كما تمّ تحسينه باستعمال طريقة إحصائية تعتمد على المخطّط التجريبي (جداول بلاكيت-برمان).

النّتائج بيّنت أن الكتلة الحيّة تظهر خلال الساعات الأولى من الحضن و تصل إلى حدّها الأقصى خلال 72سا بالنسبة للفطريات ريزوبوس (1 و 2)، الترناريا و المنتوسبوريوم و خلال 96سا من الحضن بالنسبة لبيينيسليوم₁، على عكس إفرار الأنزيم الذي لا يبدأ إلا بعد 48 ساعة ليصل إلى حدّه الأقصى خلال 72سا بالنسبة للفطريات ريزوبوس (1 و 2) و خلال 96سا بالنسبة لبيينيسليوم₁، الترناريا و المنتوسبوريوم.

النّخليل الإحصائي ماثقنا من اختيار مستخلص الخميرة، الرّشاء، ثنائي هيدروجين فوسفات البوتاسيوم، حمض البول و درجة الحرارة، كعوامل مؤثرة ايجابية على إنتاج الكتلة الحيّة من طرف جميع السلالات و كذا مستخلص الخميرة كعامل اشرّي تأثيرا بطريقة ايجابية على إنتاج الالفـا-اميلاز من طرف السلالات الخمس، مقارنة مع العوامل: معدّل الحموضة، درجة الحرارة، الرّشاء، حمض البول و ثنائي هيدروجين فوسفات البوتاسيوم بتأثير مختلف من سلالة إلى أخرى.

الكلمات الدالة: بقايا التمر، الفطريات، الالفـا-اميلاز، تحسين، بلاكيت-برمان.