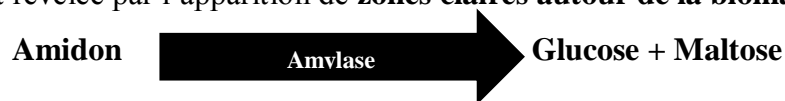


1. Recherche de l'activité amylolytique (Hydrolyse de l'amidon)

Principe

La solution de lugol permet la coloration du milieu contenant de l'amidon en bleu violacé. Ceci est dû à la formation d'un complexe entre l'iode et l'amidon. De ce fait, l'activité amylolytique est révélée par l'apparition de zones claires autour de la biomasse fongique.



- **Technique**

Un disque de gélose contenant le champignon est déposé au centre de la boîte de Pétri contenant le milieu **PDA - amidon soluble à 1%**. Les boîtes sont incubées à 30°C 5 à 7 jours.

N.B. faire un témoin avec une boîte non ensemencée.

Après incubation, le milieu gélosé est recouvert d'une solution de lugol, pendant 30 secondes suivie d'un rinçage avec de l'eau distillée. **L'eau iodée contenant l'iode se complexe avec l'amidon** présent dans le milieu et donne **un précipité bleu sombre**. **L'hydrolyse de l'amidon** est indiquée par l'apparition d'une **zone claire** autour de la colonie productrice d'amylase.

La confirmation de l'activité amyolasique est réalisée en utilisant le test des puits

- **Test des puits (EA)**

Dans des boîtes de Pétri contenant un milieu à base d'amidon (gélose nutritive + amidon à 1%), des puits de 6 mm de diamètre sont remplis avec 10 à 20 µl d'extrait enzymatique. Après 24 H d'incubation à 40°C, la révélation de l'activité amylase est réalisée par inondation des boîtes avec une solution lugol : l'iode et l'amidon donnent une coloration bleue-violette. Seule la zone où l'amidon a été hydrolysé ne se colore pas. Un halo clair autour de la culture après addition de lugol indique une hydrolyse de l'amidon.

2. Recherche de l'activité cellulase (dégradation de la cellulose)

- **Milieu solide (souche)**

Un disque de champignon est ensemencé dans des boîtes de Pétri contenant un milieu à base de Carboxyl Méthyl Cellulose (CMC-M). Incubation à 28°C pendant 5 jours.

Révélation de l'activité CMCCase : réalisée par inondation des boîtes avec une solution de **rouge Congo (1%)** pendant 10 min, suivi de lavages successifs avec une solution de **Na Cl à 1 M**. La visualisation des halos orange autour des puits (sur un fond rouge) correspond aux zones d'hydrolyse de (CMC).

- **Test des puits (EC)**

Dans des boîtes de Pétri contenant un milieu à base de CMC (CMC-S), des puits de 6 mm de diamètre sont remplis avec 10 à 20 µl d'extrait enzymatique. Incubation pendant 16H à 42°C.

Révélation de l'activité CMCCase est réalisée par inondation des boîtes avec une solution de **rouge Congo (1%)** pendant 10 min, suivi de lavages successifs avec une solution de **Na Cl à 1 M**. La visualisation des halos oranges autour des puits (sur un fond rouge) correspond aux zones d'hydrolyse de la CMC.

3. La recherche de l'activité protéolytique (hydrolyse des protéines)

- **Milieu solide (Souche)**

La gélose au lait (lait à 20% d'agar) est utilisée pour la mise en évidence de la présence d'**une activité protéolytique** chez les souches fongiques.

L'ensemencement se fait par dépôt d'un disque de biomasse fongique et l'incubation est effectuée à 30°C pendant 5 à 7 jours.

La dégradation de la caséine du lait se caractérise par l'observation visuelle et directe d'**une zone claire et transparente** autour du champignon.

- **Test des puits (EP)**

Dans des boîtes de Pétri contenant un milieu à base de lait (5% agar), des puits de 6 mm de diamètre sont remplis avec 10 à 20 µl d'extrait enzymatique. Après 24 H d'incubation à 37°C. Révélation de l'activité protéolytique : réalisée par la visualisation des **zones claires** autour des puits correspondant aux zones d'hydrolyse des micelles de caséine.