



Université Mohamed Khider de Biskra  
Faculté des sciences exactes et sciences de la nature et de la vie  
Département des sciences de la nature et de la vie

## MÉMOIRE DE MASTER

Domaine : Sciences de la nature et de la vie

Filière : Sciences biologiques

Spécialité : Microbiologie appliquée

Réf. : .....

---

Présenté et soutenu par :

**Zineb LOUGHRAIEB**

Le : mardi 9 juillet 2019

### Thème

**Isolement et sélection d'une souche bactérienne productrice d'amylases thermophiles à partir de l'eau de Hamem ElHadjeb (Biskra)**

---

#### Jury :

M.	Mohamed TITAOUIN	MCA	Université de Biskra	Président
M.	Hakim HEBAL	MAA	Université de Biskra	Rapporteur
Mme.	Fatiha BENGUERAICHI	MAB	Université de Biskra	Examineur

Année universitaire : 2018 - 2019

## *Remerciements*

*Je remercie Dieu le tout puissant de nous avoir donné la santé et de m'avoir guidé, aidé et donné la foi et le courage pour accomplir ce travail.*

*J'adresse mes remerciements aux personnes qui m'ont aidé dans la réalisation de ce travail qu'il a été réalisé au Laboratoire de Biochimie et Microbiologie appliquée, Faculté des Sciences Exactes et des Sciences de la Nature et de la Vie Université Mohamed Khider Biskra.*

*En premier lieu je tiens à exprimer mes sincères remerciements à mon encadreur Monsieur HEBAL HAKIM, Docteur à l'Université Mohamed Khider Biskra, pour ses conseils judicieux et ses dirigés tout au long de ce travail, la qualité de son encadrement exceptionnel, sa rigueur, sa précieuse assistance et surtout sa patience à mon égard, ses encouragements et son suivi, ce travail n'aurait pu aboutir.*

*Un grand merci également aux membres de jury d'avoir accepté d'être président de jury, rapporteurs et membres de jury de ce travail.*

*Je remercie également tous les membres du laboratoire du département de la biologie l'Université Mohamed Khider Biskra.*

*Toute ma gratitude et mes remerciements les plus sincères à mes chers enseignants du département de la biologie qui ont participé le long de ces années à ma formation et pour leurs très grands dévouements.*

*Je tiens à remercier en outre tous ceux qui ayant soutenu et pris part, tant moralement que financièrement de près ou de loin.*

## *Dédicace*

*Je dédie ce modeste travail*

*A mes chers parents, pour tous leurs sacrifices, leur amour, leur tendresse, leur soutien et leurs prières tout au long de mes études, que Dieu leur procure bonne santé et longue vie...je vous aime*

*A mon cher frère, Yacine pour leur appui et leur encouragement*

*A mes chères sœurs Amina, Hiba, Nesrin, Ranim pour leurs encouragements permanents, et leur soutien moral*

*A mon cher fiancé Messaoud qui m'a soutenue dans ce travail et toute sa famille*

*A mes chers oncles Azzouz et abdallah...*

*A toute la famille Loughraieb et Mourzegh*

*Aux personnes qui m'ont toujours aidé et encouragé, qui étaient toujours à mes côtés mes aimables amies, Khaoula, Hamida, Amel, Amira, selma, Hafsa, Mona, Amal, mes chères collègues d'étude, Houda, Dalal, Aicha....*

*Merci d'être toujours là pour moi.*

*Zineb*

# **Sommaire**

<b>Liste des tableaux</b> .....	I
<b>Liste des figures</b> .....	II
<b>Liste des abréviations</b> .....	III

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

## **Première Partie : Synthèse bibliographique**

### **Chapitre 1. Amylases**

1.1. Définition.....	3
1.2. Nomenclature.....	3
1.3. Structure de l' $\alpha$ -amylase.....	3
1.4. Mécanisme d'action .....	4
1.5. Caractéristiques de l' $\alpha$ -amylase.....	5
1.5.1. Poids moléculaire.....	5
1.5.2. pH optimum .....	5
1.5.3. Température optimum.....	6
1.5.4. Effecteur.....	6
1.6. Différentes origines .....	6
1.6.1. Origine animale .....	6
1.6.2. Origine végétale .....	6
1.6.3. Origine microbienne .....	7
1.7. Applications industrielles .....	7
1.7.1. Utilisation de l' $\alpha$ -amylase dans les industries agro-alimentaires .....	7
1.7.2. Domaine médical et pharmaceutique.....	8
1.7.3. Autre utilisation .....	8

### **Chapitre 2. Les bactéries thermophiles**

2.1. Généralités .....	9
------------------------	---

2.2. Besoins nutritifs des bactéries thermophiles .....	9
2.3. Les thermozyms .....	10

## **Deuxième partie : Partie expérimentale**

### **Chapitre 3. Matériel et méthodes**

3.1. Prélèvement d'échantillon d'eau .....	11
3.2. Isolement et sélection de souches amylolytiques .....	11
3.2.1. Enrichissement .....	11
3.2.2. Isolement .....	11
3.2.3. Sélection .....	11
3.3. Identification de la souche .....	13
3.3.1. Observations microscopiques .....	13
3.3.2. Tests physiologiques .....	13
3.3.3. Tests biochimiques .....	16

### **Chapitre 4. Résultats et discussion**

4.1. Isolement et Sélection de souches amylolytiques .....	18
4.1.1. Isolement .....	18
4.1.2. Sélection sur milieu de culture solide .....	18
4.1.3. Sélection sur milieu de culture liquide .....	19
4.2. Identification de la souche .....	21
4.2.1. Observation macroscopique .....	21
4.2.2. Observations microscopiques .....	21
4.2.3. Tests physiologiques .....	22
4.2.4. Tests biochimiques .....	27
<b>Conclusion</b> .....	<b>32</b>
<b>Références bibliographiques</b> .....	<b>34</b>

### **Annexes**

# Liste des tableaux

<b>Tableau 1.</b> Applications industrielles de l'alpha- amylase (Nouadri, 2011). .....	7
<b>Tableau 2.</b> Activité amylase à 60°C, à pH 7 et des souches sélectionnées. ....	20
<b>Tableau 3.</b> Propriétés morphologiques, physiologiques et biochimiques de <i>Bacillus licheniformis</i> et la souche 5. ....	30

## Liste des figures

<b>Figure 1.</b> Structure tridimensionnelle de l' $\alpha$ -amylase d'après Kraulis P. J. (1991). .....	4
<b>Figure 2.</b> Mécanisme catalytique (Merabti, 2006) .....	5
<b>Figure 3.</b> Formation des zones claires autour des souches isolées sur milieu solide. ....	18
<b>Figure 4.</b> Une souche sélectionnée purifiée sur milieu de culture solide. ....	19
<b>Figure 5.</b> Les souches sélectionnées dans milieu de culture liquide. ....	19
<b>Figure 6.</b> Courbe d'étalonnage réalisée avec le glucose .....	20
<b>Figure 7.</b> Aspect macroscopique de la souche 5. ....	21
<b>Figure 8.</b> Observation microscopique après coloration de Gram (Grossissement x 100). ....	22
<b>Figure 9.</b> Aspect du milieu Mannitol mobilité avec la souche 5. ....	22
<b>Figure 10.</b> Aspect du milieu Viande-foie avec la souche 5. ....	23
<b>Figure 11.</b> Aspect du teste VP avec la souche 5. ....	23
<b>Figure 12.</b> Aspect du teste RM avec la souche 5. ....	24
<b>Figure 13.</b> Aspect du milieu d'urée-Indole teste indole négatif avec la souche 5. ....	24
<b>Figure 14.</b> Aspect du milieu KIA avec la souche 5. ....	25
<b>Figure 15.</b> Aspect du milieu citrate de Simmons avec la souche 5. ....	25
<b>Figure 16.</b> Aspect du milieu MEVAG avec la souche 5. ....	26
<b>Figure 17.</b> Aspect du milieu TSI avec la souche 5. ....	26
<b>Figure 18.</b> Aspect du milieu glycérole avec la souche 5. ....	27
<b>Figure 19.</b> Aspect du teste catalase avec la souche 5. ....	28
<b>Figure 20.</b> Aspect du teste oxydase avec la souche 5. ....	28
<b>Figure 21.</b> Aspect du teste nitrate réductase avec la souche 5. ....	29
<b>Figure 22.</b> Aspect du teste uréase avec la souche 5. ....	29

## Liste des abréviations

RM : Rouge de Méthyle.

VP : Vosges-Proskauer.

S : souche.

DNS : acide 3,5dinitrosalicylique.

Glu : Acide glutamique.

Asp : acide aspartique.

TSI : Triple Sugar Iron.

v: volume.

# **Introduction**

La biotechnologie consiste aussi l'utilisation des organismes (champignons, levures, bactéries, plantes), dans les diverses activités industrielles (Chevallier, 1990). Les biotechnologies trouvent leurs applications essentiellement dans la santé, l'énergie, l'environnement, l'agriculture et l'alimentation...etc. (Tantaoui el Araki, 2005).

Les produits des biotechnologies modernes des bactéries empiètent sur de nombreux secteurs commercialement importants, y compris alimentaires, boissons, produits chimiques, produits pharmaceutiques, cosmétiques, des enzymes industriels, agro-alimentaire et l'agriculture. La grande majorité des bactéries sont bénéfiques.

L' $\alpha$ -amylase comme toutes les enzymes est une macromolécule appartenant à la classe des protéines globulaires. Les  $\alpha$ -amylases microbiennes sont parmi les enzymes les plus utilisés dans les procédés industriels: industrie alimentaire, pharmaceutique, textile, papeterie, et détergent, en raison de leur productivité et thermo-stabilité (Merabti, 2006). Elles se caractérisent également par un faible coût, une protection de l'environnement, une plasticité et une grande disponibilité (Burhan *et al.*, 2003).

Les transformations industrielles d'amidon se font des conditions physicochimiques extrêmes (hautes températures, pH acide et basique, substrat très concentré... etc.). Les amylases intervenant dans ces industries doivent être stables dans ces conditions extrêmes. Par conséquent, la recherche d'amylases stables est l'une des nécessité pour le développement de ces industries.

Les microorganismes extremophiles sont la principale source pour l'isolement d'amylase extremophiles. Ainsi, Les microorganismes thermophiles et hyperthermophiles sont la source des amylases actives et stables à des températures élevées.

Dans notre étude portant sur la production d'amylase; nous avons choisi des souches isolées à partir de l'eau de Hamem El Baraka de la commune El-Hadjeb, Biskra, vu leur place importante sur le marché des enzymes amylolytiques.

L'objectif principal de ce travail est :

Obtenir des amylases thermophiles à partie de souche bactérienne isolée de l'eau de Hamem ElHadjeb, Biskra.

La concrétisation de ce document est comme suit:

•Première partie, concerne la synthèse bibliographique sur l'amylase, les bactéries thermophiles.

•Deuxième partie, on s'intéresse aux matériels et aux méthodes utilisées lors de la présente étude : Isolement, sélection et caractérisation de la souche la plus productrice d'amylase.

Ensuite on présente les résultats obtenus avec leur discussion et on termine par la conclusion et les perspectives.

# **Partie Bibliographique**

# **Chapitre 1**

## **Amylases**

Les enzymes sont des macromolécules de nature protéique. Elles sont constituées de plusieurs acides  $\alpha$ -aminés de la série *L* unis entre eux par une liaison formée par condensation entre le groupement carboxyle d'un acide aminé et le groupement amine d'un autre acide aminé afin de former une liaison amide. Les enzymes sont donc des polypeptides de masses moléculaires élevées entre 10 à 1 000 kDa dans lequel sont arrangés les acides aminés, constitue ce que l'on appelle la structure primaire des protéines (Vincent, 1996).

Ces protéines vont avoir tendance à se replier sur elles-mêmes afin de former des arrangements secondaires principalement en hélices  $\alpha$  et en feuillets  $\beta$ , cette structure est stabilisée grâce à la génération de liaisons hydrogènes.

L'arrangement de ces structures secondaires les unes par rapport aux autres forme une structure tertiaire qui, elle, sera stabilisée par des ponts disulfures.

## 1. Amylases

### 1.1. Définition

L' $\alpha$ -amylase [ $\alpha$ -(1,4)-D-glucaneglucanohydrolase (E.C.3.2.1.1)] est une endoenzyme appartenant à la famille des hydrolases (Mercier, 1985 ; Keating *et al.*, 1998).

Elle hydrolyse au hasard, les liaisons osidiques de l'amylose, de l'amylopéctine de l'amidon, du glycogène et d'autres polysaccharides contenant plus de trois liaisons  $\alpha$  (1,4) D-Glucose (Ait Kaki-El-Hadef *et al.*, 2012).

### 1.2. Nomenclature

Nom codifié : EC 3.2.1.1

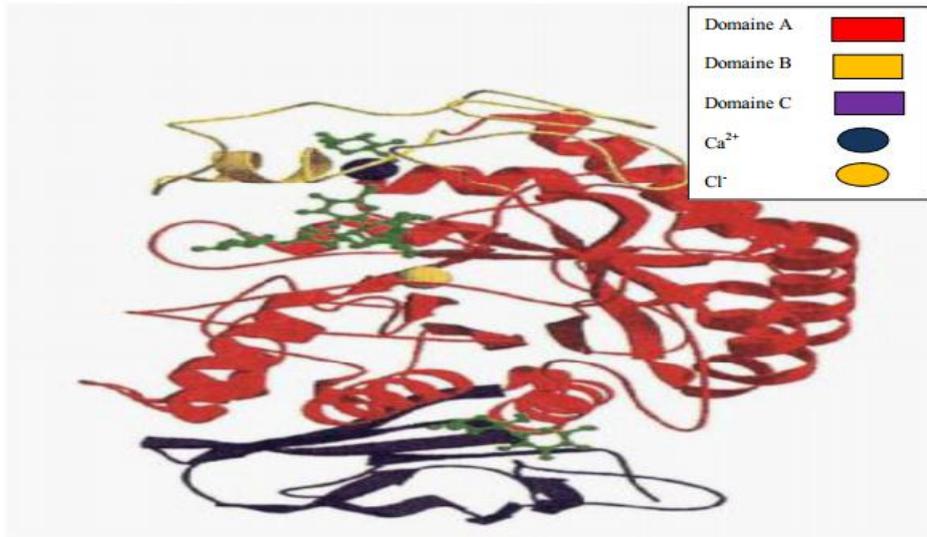
Nom commun : alpha –amylase

D'autres nom (s): glycogénase,  $\alpha$ -amylase; endoamylase; Taka-amylase A,maxilase.

Nom systématique: 1,4–alpha-D-glucane-4-glucanohydrolase (Schamburg et Slzmann, 1991 ; Brozowski et Davies, 1997 ; Dauter *et al.*, 1999).

### 1.3. Structure de l' $\alpha$ -amylase

L' $\alpha$ -amylase est une glycoprotéine, comportant trois domaines globulaires (A, B et C) (Farber et Petsko, 1990). Elle renferme une partie glucidique, qui est formée principalement, de D-mannose, D-glucose, D-galactose, D-xylose et D-glucosamine (Stefanova et Emanuilova, 1992) associés chimiquement à la chaîne polypeptidique constituée de 471 à 483 résidus d'acides aminés, avec 4 ou 5 ponts disulfure (Heslot, 1996).



**Figure 1.** Structure tridimensionnelle de l'α-amylase d'après Kraulis P. J. (1991).

- Le domaine central A, forme un tonneau ( $\beta/\alpha$ ) qui contient 8 feuillets  $\beta$  plissés et qui se disposent de façon parallèle et de 8 hélice  $\alpha$ , il porte le site actif à la partie C-terminale des feuillets  $\beta$ .

- Le domaine B est formé d'une boucle de 64 résidus d'acide aminé reliant A- $\beta$ 3 avec A- $\alpha$ 3 et constitue une sorte de « couvercle » au-dessus du site actif.

- Alors le domaine C est constitué d'un tonneau de 8 feuillets  $\beta$  antiparallèles (Kadziola et al., 1994)

- Le site actif (site de liaison) de l'α-amylase se situe dans une longue fente située entre l'extrémité carboxyle du domaine A et B.

- Le calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) est situé entre les domaines A et B (sphère bleue) et peut agir dans la stabilisation de la structure.

- Le site de liaison au substrat contient 5 sous-sites avec le site catalytique positionné au sous-site 3. Le substrat peut se lier au premier résidu de glucose dans le sous-site 1 ou 2, ce qui permet au clivage de se produire entre le premier et le deuxième ou le deuxième et le troisième résidu de glucose.

#### 1.4. Mécanisme d'action

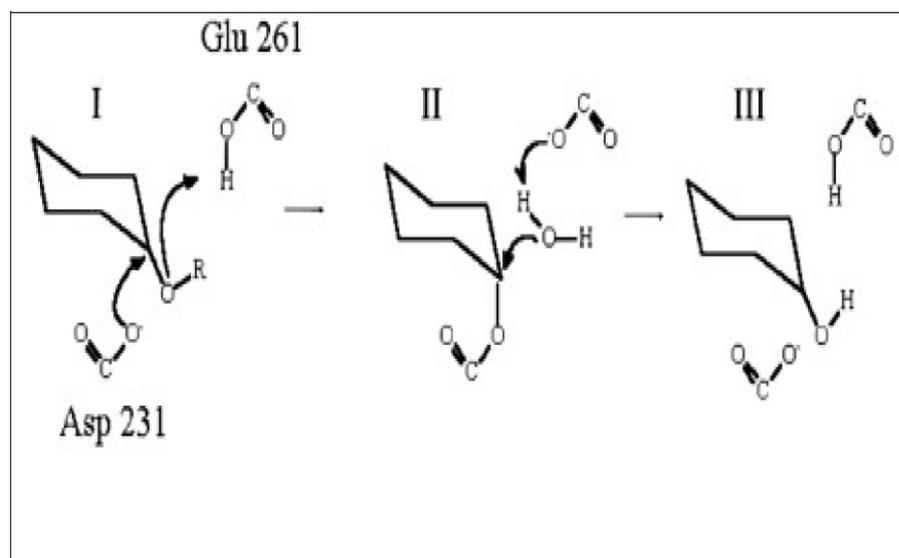
L'activité catalytique de l'enzyme implique la participation des trois acides aminés du site actif : Asp 231 (nucléophile catalytique), Glu 261 (donneur catalytique de l'hydrogène) et

Asp 328 (l'aide de catalyse) (Mc. Carter., Withers., 1996 ; Uitdehaag et al., 1999 ). En effet, la réaction catalytique est réalisée en trois étapes:

I. Protonation de l'oxygène glucosidique par le donneur de proton Glu 261 suivi d'une attaque nucléophile sur C1 du résidu du sucre en position 1 par Asp 231 et le départ de l'extrémité réductrice du substrat (Davies *et al.*, 1999).

II. Activation d'une molécule d'eau, vraisemblablement par le maintien du Glu 261 de protonné (Nielson *et al.*, 2001.)

III. Régénération de l'état initial et libération de l'autre fragment du substrat, par hydrolyse du lien covalent entre l'oxygène nucléophile de l'Asp 231 et le C1 de résidu du sucre en position 1 (Nielson *et al.*, 2001 ; Benaouida, 2008) ( figure 2).



**Figure 2.** Mécanisme catalytique (Merabti, 2006)

## 1.5. Caractéristiques de l' $\alpha$ -amylase

### 1.5.1. Poids moléculaire

Le poids moléculaire des  $\alpha$ - amylases varie d'une origine à l'autre et d'une espèce à l'autre. Il est compris entre 40.000 et 90.000 daltons (Schombury et Salzmann, 1991).

### 1.5.2. pH optimum

Les  $\alpha$ -amylases sont généralement stables dans une gamme de pH de 5 à 8, avec un optimum se situant entre 4 à 5 pour les  $\alpha$ -amylases fongiques et un optimum supérieur à la neutralité 6 à 8.5 pour les  $\alpha$ -amylases bactériennes (Ait Kaki-El-Hadef A. *et al.*, 2012). Pour les levures, l'enzyme requiert, selon les espèces, des pH entre 4 à 6 (Panchal, 1990).

### 1.5.3. Température optimum

Les amylases microbiennes, quant à elles, ont une forte thermostabilité (30-60°C) et leur température optimale peut être plus élevée, se situant entre 40°C et 70°C et (Park et al., 1997).

Selon l'origine et les espèces, les  $\alpha$ -amylases ont des températures optimales comprises entre 40°C et 90°C (Schombury et Salzmann, 1991). En effet, l'alpha amylase bactérienne est réputée pour sa grande thermo-stabilité, celle de *Bacillus amyloliquefaciens* est caractérisée par un optimum de température qui, selon les applications va de 70°C à 90°C, alors que l'alpha amylase fongique est d'une thermo-stabilité assez faible, son optimum se situe entre 50°C et 55°C (Nouadri, 2011). L'alpha amylase levurienne a des optimums de température, allant de 40°C à 60°C et parfois même 70°C pour certaines espèces comme *Lipomyces starkeyi* (Panchal, 1990).

### 1.5.4. Effecteur

Toutes les L'alpha amylases, exigent la liaison à au moins un ion calcium, pour le maintien de leur intégrité et leur stabilité structurale (Vallee *et al.*, 1959 ; Steer et Levitzki, 1973). Cependant, à une concentration supérieure à 20mM, le calcium devient inhibiteur (Boel *et al.*, 1990).

## 1.6. Différentes origines

L' $\alpha$ -amylases de différentes origines (bactérienne, fongique, animale et végétale), n'affecte pas l'activité amylolytique. Les  $\alpha$ -amylases sont abondantes dans tous les règnes, elles ont été isolées par extraction à partir des tissus végétaux et animaux ou par fermentation par des cellules microbiennes (Nouadri, 2011).

### 1.6.1. Origine animale

L' $\alpha$ -amylase animale est généralement extraite de la salive humaine et du pancréas des mammifères tels que les porcs et les veaux (Chatterton *et al.*, 1996). Chez l'homme, l'amylase est largement présente dans les sécrétions salivaires (amylase S) et pancréatiques (amylase P) (Coolbear *et al.*, 1992).

### 1.6.2. Origine végétale

Les  $\alpha$ -amylases végétales possèdent une importance primordiale dans le métabolisme glucidique où elles participent à la conversion de l'amidon en le réduisant en sucres réducteurs (Nouadri, 2011).

Ces enzymes végétales sont généralement obtenues par extraction à partir des céréales notamment le blé, l'orge, le son ou le riz (Srinivasa R. *et al.*, 2004). Elles sont souvent formées au cours de la germination des grains.

### 1.6.3. Origine microbienne

On distingue les  $\alpha$ -amylases fongiques et bactérienne.

#### 1.6.3.1. Les $\alpha$ -amylases fongiques

Les  $\alpha$ -amylases fongiques diffèrent des amylases bactériennes par une inactivation par la température, un pouvoir élevé de saccharification et un pH optimal faible (4-5) (Costes, 1982).

#### 1.6.3.2. L' $\alpha$ -amylase bactérienne

Ce type d'enzyme est exo-cellulaire, obtenu principalement par fermentation de *Bacillacées*. Historiquement la première enzyme a été produite à partir de souches de *Bacillus amyloliquefaciens*, *B. licheniformis* ou *B. subtilis* fermentant en surface (Mctigue *et al.*, 1995).

## 1.7. Applications industrielles

Actuellement, les alpha-amylases microbiennes sont parmi les enzymes les plus utilisés dans les procédés industriels : industrie alimentaire, pharmaceutique, textile, papeterie, et détergent (Behal *et al.*, 2006).

### 1.7.1. Utilisation de l' $\alpha$ -amylase dans les industries agro-alimentaires

**Tableau 1.** Applications industrielles de l'alpha- amylase (Nouadri, 2011).

Industries	Applications
Glucoserie	Solubilisation de l'amidon, accompagnée d'une chute importante de la viscosité (liquéfaction).
Sucrierie	Réduction de la viscosité des sirops de cannes à sucre, en hydrolysant les contaminants amylicés pour réussir le processus de cristallisation.
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.

### **1.7.2. Domaine médical et pharmaceutique**

Dans le domaine pharmaceutique, les  $\alpha$ -amylases sont utilisées comme agent anti-inflammatoire et aussi comme aide digestif pour éviter les dyspepsies et les fermentations intestinales (Merabti, 2006).

Dans le domaine médical, le taux de l' $\alpha$ -amylase dans les liquides biologiques peut être utilisé pour détecter certaines maladies : insuffisance cardiaque, oreillons, cancer du pancréas (Benaouida, 2008).

### **1.7.3. Autre utilisation**

Les  $\alpha$ -amylases sont aussi utilisées dans l'industrie textile pour le désencollage des tissus ainsi que dans les domaines de la tannerie, de la papeterie et des détergents pour les lessives où elles facilitent la disparition des tâches en dégradant les souillures, permettant ainsi l'augmentation du pouvoir blanchissant. Elles sont utilisées aussi dans le traitement des eaux résiduaires pour l'élimination de l'amidon (Benaouida, 2008 ; Merabti, 2006).

**Chapitre 2**

**Les bactéries**

**thermophiles**

## 2.1. Généralités

Plusieurs habitats naturellement thermophiles sur la terre abritent une flore bactérienne spéciale, supportant les hautes températures. Il existe plusieurs catégories de bactéries poussant à des températures supérieures à 55°C. En effet, les bactéries dites thermophiles ont une température optimale de croissance supérieure à 55°C, alors que celles poussant à des températures supérieures à 65°C sont considérées comme étant des thermophiles extrêmes, et celles croissant à 80°C et plus sont nommées hyperthermophiles. Fréquemment, les bactéries thermophiles (toutes classes confondues) sont retrouvées dans des environnements extrêmes mis à part le facteur température. Par exemple, des pH très acides ou très basiques ou un degré de salinité très élevé ou faible peuvent être associés aux températures élevées (Wiegel et Kevbrin, 2004). Plusieurs microorganismes thermophiles sont connus depuis plus de 100 ans comme par exemple, *Geobacillus stearothermophilus* (préalablement classifié comme *Bacillus stearothermophilus*).

La distribution géographique des bactéries thermophiles semble être beaucoup plus étendue qu'initialement présentée. Les sources géothermales, cheminées hydrothermales en mer profonde ainsi que les champs d'huile à haute température ont depuis longtemps été identifiées comme étant l'habitat naturel des bactéries thermophiles (Mcmullan *et al.*, 2004 ; Wiegel, 1998). Des genres tels *Thermus*, *Thermomicrobium*, *Geobacillus*, *Bacillus* et *Symbiobacterium*, entre autres, ont pu être isolés (Brocket Freeze, 1969 ; Rhee *et al.*, 2002 ; Wiegelet Kevbrin, 2004 ; Montanari *et al.*, 2004 ; Schäffer *et al.*, 2004 ; McMullan *et al.*, 2004).

Les bioréacteurs thermophiles et autres milieux thermophiles créés par l'activité humaine sont une autre source où des microorganismes thermophiles peuvent être isolés et identifiés. Il serait raisonnable de croire que la présence de bactéries thermophiles se limiterait à ces milieux adaptés à leurs besoins de croissance (Marchant *et al.*, 2002).

## 2.2. Besoins nutritifs des bactéries thermophiles

Les besoins nutritifs des bactéries thermophiles sont différents de ceux des bactéries mésophiles. En effet, plusieurs auteurs ont noté un besoin particulier de vitamines, d'acides aminés tels l'histidine, la méthionine, la thiamine et la riboflavine, mais aussi de calcium et de magnésium pour stimuler ou permettre la croissance des bactéries (Sürücü, 1999). Chez les *Bacillus*, par exemple, certaines espèces nécessitent l'ajout d'urée, de chlorure d'ammonium, ou même d'ammoniac pour croître (Mair, 1986). De plus,

certaines problèmes peuvent survenir lorsque la température de croissance optimale de la bactérie devient plus élevée que 75°C. En effet, Kim et Lee (2003) notent une transformation des sucres et acides aminés d'un milieu par réaction de brunissement de Maillard à des températures de 90°C et plus, alors que Park et Lee (2000) constatent le comportement létal du L-pyroglutamate formé par la transformation du L-glutamate sous l'effet de la température à partir de 75°C. Il faut également considérer l'utilisation des agents gélifiants plus thermostables que l'agar, comme par exemple, du polysilicate ou de la gomme de gellan (Gelrite). Certaines bactéries hyperthermophiles ne peuvent pas croître sur milieu solide (Huber *et al.*, 2000).

### 2.3. Les thermozyms

Beaucoup d'études ont porté sur les bactéries thermophiles et à leur habilité à produire des enzymes thermostables. Ces dernières ont par ailleurs été nommées thermozyms dû à leur optimum d'activité et à leur stabilité qui se situent au-delà de 60°C. Les enzymes ayant leur activité maximale au-dessus de 80°C sont considérées comme des enzymes hyperthermophiles (Li *et al.*, 2005). Bien que les thermozyms possèdent les mêmes mécanismes d'action que les enzymes mésophiles, elles sont cependant légèrement différentes quant à leur structure, ce qui leur permet d'améliorer leur stabilité (Zeikus *et al.*, 1998). La rigidité des thermozyms à la température de la pièce est beaucoup plus élevée que pour les mésozymes, mais redevient fluide (active) à des températures thermophiles (Zeikus *et al.*, 1998). On note aussi une meilleure stabilité des thermozyms pour une plus grande variété de pH, de salinité, de concentrations en solutés, etc. Les thermozyms peuvent donc être utiles dans différentes applications industrielles où elles remplacent avantageusement les mésozymes.

Un avantage majeur à l'utilisation de thermozyms en procédé industriel est la possibilité de conserver l'activité enzymatique désirée en conditions thermophiles, tout en prévenant la croissance de bactéries pathogènes présentes dans le milieu de réaction lorsque la température est supérieure à 70°C, et ce, en réduisant la viscosité des fluides (Bruins *et al.*, 2001). Les conditions thermophiles peuvent également permettre la destruction des pathogènes. Ainsi, des thermozyms agissant sur les sucres, les lipases, les estérases et autres substrats ont déjà été utilisées dans différents domaines d'application tels l'alimentation humaine et animale, l'industrie des détergents, des pâtes et papier, du tonnage, etc. (Pantazaki *et al.*, 2002 ; Kirk *et al.*, 2002).

# **Partie expérimentale**

# **Chapitre 3**

## **Matériel et méthodes**

### **3.1. Prélèvement d'échantillon d'eau**

L'eau de Hamem El Baraka de la commune d'El Hadjeb, Biskra, est utilisée comme source d'isolement de souches amylolytiques. Leurs richesses et haute température permanente sont des conditions physico-chimiques seraient favorables à la prolifération de types variés de microorganismes thermophiles.

L'échantillon d'eau a été collecté au niveau de la source. L'échantillonnage a été effectué pendant les mois de Février, à l'aide de boîte en plastique bouché stérile. La boîte est enfoncée au fond de l'eau jusqu'à les sédiments.

L'échantillon est ensuite transporté directement au laboratoire et conservé à 4°C.

### **3.2. Isolement et sélection des souches amylolytiques**

#### **3.2.1. Enrichissement**

10 ml d'échantillon d'eau a été mis dans 100 ml de milieu d'enrichissement à base d'amidon (voir l'annexe), l'amidon est la seule source de carbone, ensuite incubé à 50°C pendant 15 jours en présence d'oxygène, milieu humide. Cette étape favorise la réparation des bactéries stressées et permet de rétablir ainsi leur capacité à former des colonies.

#### **3.2.2. Isolement**

La suspension a été agitée, après une série de dilutions, jusqu'à  $10^{-7}$ , est réalisé à partir de solution mère.

Un milieu de culture solide ayant comme seule source de carbone l'amidon a été utilisé pour l'isolement des souches amylolytiques, le milieu d'isolement à pH 7 (voir l'annexe). Le milieu estensemencé en surface avec 1 ml de chaque dilution. Il est par la suite incubé à 50°C pendant sept jours.

#### **3.2.3. Sélection**

##### **3.2.3.1. Sélection sur milieu de culture solide**

Les colonies entourées de zones claires sont sélectionnées parmi l'ensemble des souches obtenues à la surface des milieux. Elles sont repiquées sur milieu solide (voir l'annexe) jusqu'à obtention de souches pures, puis conservées à 4°C dans des géloses nutritives inclinées (voir l'annexe).

### 3.2.3.2. Sélection sur milieu de culture liquide

Les souches isolées à pH 7 sont cultivées dans 05 ml de milieu de sélection liquide (voir l'annexe). Après 48 h d'incubation à 50°C, dans un bain marie, les surnageants des cultures sont récupérés par centrifugation (10000 rpm pendant 10 min, 4°C) (Yang *et al.*, 1995).

L'activité amylase dans les surnageants a été mesurée à 60°C dans un mélange réactionnel à pH 7.

L'activité amylase est dosée selon la méthode au DNS.

#### a) Mesure de l'activité amylase

L'activité amylase est déterminée avec la partie soluble d'amidon obtenue dans une solution tampon. 1g d'amidon mis en suspension dans 100 ml de tampon phosphate (pH 7) (voir l'annexe). Les suspensions sont agitées, puis centrifugées à 10000 rpm, 4°C pendant 10 min, afin d'éliminer la fraction d'amidon insoluble.

L'activité amylase est déterminée suivant la méthode au DNS (Miller, 1959 ; Baily, 1992) (voir annexe). 0,1 ml d'une dilution appropriée du surnageant est ajouté à 0,9 ml d'amidon soluble à pH 7. Le mélange réactionnel est incubé à 60 °C pendant 30 min.

La réaction enzymatique est arrêtée par ajout de 1,5 ml de DNS (SIGMA), et le mélange est porté à ébullition pendant 5 min.

Le mélange témoin correspond à la solution d'amidon incubée sans le surnageant, celui-ci étant ajouté après le DNS.

La lecture des absorbances est effectuée à 540 nm, au spectrophotomètre (voir l'annexe).

L'activité amylase a été calculée d'après la relation suivante (Baily, 1992) :

$$\text{Activité amylase (UI/ml)} = \frac{(C_x - C_{tb}) \times D}{t}$$

$C_x$  : Concentration des sucres réducteurs du mélange réactionnel (µmole/ml).

$C_{tb}$  : Concentration des sucres réducteurs du mélange témoin (µmole/ml).

D : facteur de dilution

t : temps d'incubation (minutes)

Une unité d'activité amylase est définie comme étant la quantité d'enzyme qui produit une  $\mu$ mole de sucres réducteurs (équivalent en amidon), en une minute, dans un ml de surnageant, et dans les conditions expérimentales mentionnées ci-dessus.

### **3.3. Identification de la souche**

La caractérisation morphologique, biochimique et physiologique de la souche sélectionnée la plus productrice est effectuée selon les méthodes d'identification conventionnelles (Renaud *et al.*, 2000), et celles du manuel de Bergey (Claus et Berkeley, 1989)

#### **3.3.1. Observations microscopiques**

La souche âgée de 24 h et 48 h fait l'objet d'une coloration de Gram, afin de déterminer le Gram et la forme des cellules et le teste d'endospores.

#### **Mobilité**

Cette propriété est déterminée par examen microscopique de la souche à l'état frais entre lame et lamelle ; et par observation de l'aspect de la croissance dans le milieu mannitol mobilité. Dans ce dernier cas, la souche est ensemencée par piqûre centrale jusqu'au fond du tube au moyen d'une pipette boutonnée. Le tube est incubé à 37°C pendant 48 heures (Renaud *et al.*, 2000).

#### **3.3.2. Tests physiologiques**

##### **3.3.2.1. Type respiratoire**

Le comportement de souche vis-à-vis de l'oxygène a été déterminé dans la gélose viande-levure. La souche est ensemencée, dans la gélose maintenue en surfusion, par piqûre centrale jusqu'au fond du tube à l'aide d'une pipette pasteur. Celle-ci est remontée, par la suite, dans un mouvement en spirale, jusqu'à 1 cm de la surface du milieu. La croissance est observé après 24, 48 ou 72 h d'incubation à 37°C (Renaud *et al.*, 2000).

##### **3.3.2.2. Fermentation du glucose**

Le glucose est incorporé, aseptiquement, à une concentration finale de 0,5 % (v/v), au milieu MEVAG (Milieu pour l'Etude de la Voie d'Attaque des Glucides.) maintenu en surfusion. La souche est ensemencée par piqûre centrale jusqu'au fond du tube au moyen d'une pipette pasteur. Le milieu est recouvert par une couche de paraffine, puis incubé à 37°C pendant 48 h. La fermentation du glucose se traduit par un jaunissement dans tout le milieu (Renaud *et al.*, 2000).

### 3.3.2.3. Voies fermentaires

Les microorganismes diffèrent sur la base des produits terminaux qui dérivent de l'acide pyruvique durant la fermentation du glucose.

#### a) Réaction de Voges-Proskauer

Elle met en évidence les produits de la fermentation butanediolique. Le milieu Clark et Lubs estensemencé par la souche puis incubé à 37 °C pendant 48 h. Par la suite, dans un tube à hémolyse stérile, 1 ml de la culture est additionné, dans l'ordre, de 0,5 ml d' $\alpha$ -naphthol (6%) et de 0,5 ml de KOH (4M). Après une légère agitation pendant 30 secondes à une minute, le tube est maintenu en position inclinée pendant 10 à 15 minutes. La présence de l'acétoïne (réaction positive) se traduit par l'apparition, dans 2 à 5 min, d'une coloration rouge en surface pouvant diffusé dans le milieu (Renaud *et al.*, 2000).

#### b) Réaction au rouge de méthyle

Le rouge de méthyle révèle l'acidification qui résulte des fermentations acides mixtes. Le milieu Clark et Lubs estensemencé par la souche puis incubé à 37 °C pendant 4 jours. Par la suite, 2 ml de la culture sont transvasés dans un tube à hémolyse stérile, suivi de deux gouttes de l'indicateur. Une teinte rouge franche indique une réaction positive, une teinte jaune, une réaction négative (Renaud *et al.*, 2000).

### 3.3.2.4. Production d'indole

Elle est mise en évidence dans 1 ml de milieu urée-indol et dans 5 ml d'eau peptonée exempte d'indole. Les milieux ont étéensemencés abondamment par la souche et incubés à 37°C pendant 24 h. Par la suite, cinq gouttes du réactif de Kovacs sont ajoutées à la culture, suivi d'une agitation. Au repos, la présence d'indole se traduit par la formation d'un anneau rouge à la surface des milieux (Renaud *et al.*, 2000).

### 3.3.2.5. Production de sulfure d'hydrogène

La souche estensemencée par piqûre centrale jusqu'au fond du milieu KIA (Hajnaligler). Après 24 h d'incubation à 37°C, La production de sulfure d'hydrogène se traduit par la formation d'un précipité noir dans le culot (Renaud *et al.*, 2000).

### **3.3.2.6. Utilisation du citrate**

La gélose inclinée de Citrate de Simmons estensemencée abondamment par la souche, puis incubée à 37°C pendant 24 h. L'utilisation du citrate se traduit par un virage de la couleur du milieu au bleu.

### **3.3.2.7. Milieu TSI (Triple Sugar Iron)**

Le milieu incliné de TSI estensemencé abondamment par la souche, puis incubé à 37°C pendant 24 h. C'est un milieu différentiel par la capacité à mettre en évidence les fermentations du glucose, lactose et/ou saccharose ainsi que la production d'hydrogène sulfuré (H<sub>2</sub>S) et de gaz. Le rouge de phénol est l'indicateur colorant virant du rouge au jaune pour un résultat positif. Le noircissement du culot indique la présence de H<sub>2</sub>S.

### **3.3.2.8. Production de dihydroxyacétone**

La souche estensemencée par strie le long de la surface de la gélose au glycérol. Après 10 jours d'incubation à 30°C, la boîte est inondée par le mélange des solutions suivantes : solution (a) : 34,66 g de sulfate de cuivre hydraté dans 500 ml d'eau distillée, solution (b) : 173 g tartrate de sodium potassium et 50 g d'hydroxyde de sodium dans 500 ml d'eau distillée. Les solutions (a) et (b) ont été conservées au réfrigérateur et mélangées, dans un rapport de 1:1, juste au moment d'utilisation. L'observation, après 2 h, d'un halo rouge autour de la croissance indique une production de dihydroxyacétone (Claus et Berkeley, 1989).

### **3.3.2.9. Températures de croissance**

L'aptitude à croître à différentes températures, à 10°C d'intervalle, est déterminée dans la gélose nutritive inclinée. Avant ensemencement, les géloses sont préincubées jusqu'à équilibre de leur température avec la température d'incubation. Les milieuxensemencés sont incubés pendant 3 jours à 60°C ou plus, 05 jours entre 30 et 50°C, 14 jours à 20°C (Claus et Berkeley, 1989).

### **3.3.2.10. pH de croissance**

La souche estensemencée dans 05 ml de bouillon nutritif ajusté au pH de 4 à 12 (pas de 1). Un trouble microbien est observé après 21 jours d'incubation à 30° (Claus et Berkeley, 1989).

### **3.3.2.11. Croissance à différentes concentrations de NaCl**

Des bouillons nutritifs (3 ml) contenant 0, 2, 5, 7, 10, 12, 15, 18 et 20 g /l de NaCl sont ensemencés par la souche. Les tubes sont incubés à 30°C, en position inclinée afin de favoriser l'aération. Un trouble microbien est observé après 7 et 14 jours d'incubation (Claus et Berkeley, 1989).

### **3.3.3. Tests biochimiques**

#### **3.3.3.1. Catalase**

Ce test est réalisé selon la méthode sur lame. La souche est dissociée dans une goutte de peroxyde d'hydrogène sur une lame d'observation microscopique. La présence d'une catalase se caractérise par la formation immédiate de bulles d'oxygène (Renaud *et al.*, 2000).

#### **3.3.3.2. Oxydase**

L'action de l'oxydase sur le réactif de Gordon et McLeod donne lieu à un produit chromogène. Ainsi, une colonie est versée directement sur le disque ensuite inondée par l'eau distillée stérile. La production de l'oxydase se traduit par une coloration violette intervenant dans les 10 à 30 secondes.

#### **3.3.3.3. Réduction des nitrates en nitrites**

Le bouillon nitrate est ensemencé par une demi öse de la culture solide. Après 24 h d'incubation à 37°C, 5 gouttes de chacun des réactifs NR1 et NR2 sont ajoutées avec agitation. L'apparition d'une coloration rose ou rouge indique une réduction des nitrates en nitrites. Dans le cas contraire, le test est complété par l'épreuve de Zobell. Dans cette dernière, une pincée de poudre de Zinc est ajoutée au milieu, suivie d'une agitation pendant 5 min. L'apparition d'une couleur rouge brin indique la présence des nitrates, et la souche est nitrate réductase négative (Renaud *et al.*, 2000).

#### **3.3.3.4. Uréase**

Un ml de milieu urée-Indole est ensemencé abondamment par la culture puis incubé à 37°C pendant 48 h. La variation de la couleur du milieu de l'orange au rouge indique un test positif (Renaud *et al.*, 2000).

#### **3.3.3.5. Gélatinase**

La souche est ensemencée par strie dans deux géloses nutritives contenant 0,4% de gélatine. Après 3 ou 5 jours d'incubation, les boîtes sont inondées par 10 ml d'une solution

d'acide sulfurique (1N) saturée par le sulfate de sodium. L'apparition, dans une heure, d'un éclaircissement autour et au-dessous de la croissance indique une hydrolyse de la gélatine (Claus et Berkeley, 1989).

#### **3.3.3.6. Détermination de l'activité protéolytique**

La dégradation de caséine est déterminée par l'ensemencement par strie de la souche sur gélose au lait (50% de lait écrémé et 50% d'agar). Une zone claire autour et au-dessous de la croissance est observée après 7 ou 14 jours d'incubation à 30°C (Claus et Berkeley, 1989).

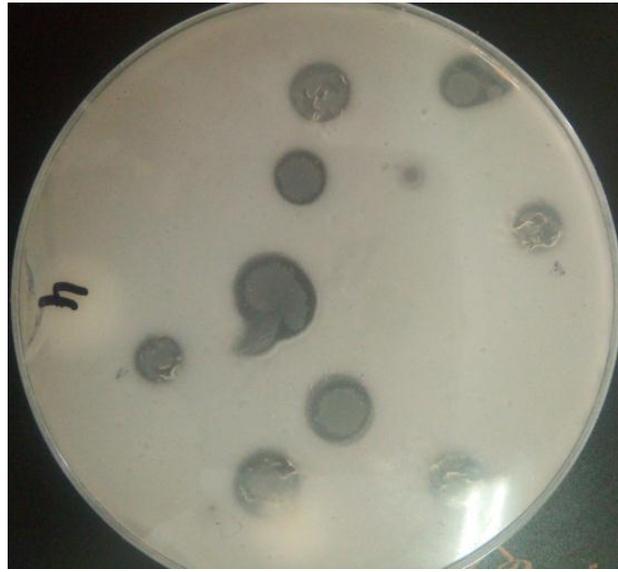
# **Chapitre 4**

## **Résultats et discussion**

## 4.1. Isolement et Sélection de souches amylolytiques

### 4.1.1. Isolement

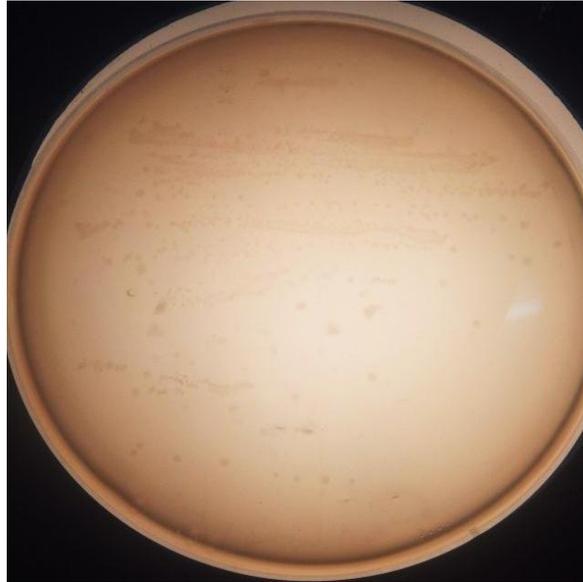
Une centaine de souches amylolytiques ont été isolées à pH 7, sur des milieux solides à base d'amidon. Un nombre important des isolats est issu de l'eau. L'amendement de ce dernier par l'aération, humidité la température élevée favorisent l'activité microbienne, en l'occurrence, l'activité amylolytique.



**Figure 3.** Formation des zones claires autour des souches isolées sur milieu solide.

### 4.1.2. Sélection sur milieu de culture solide

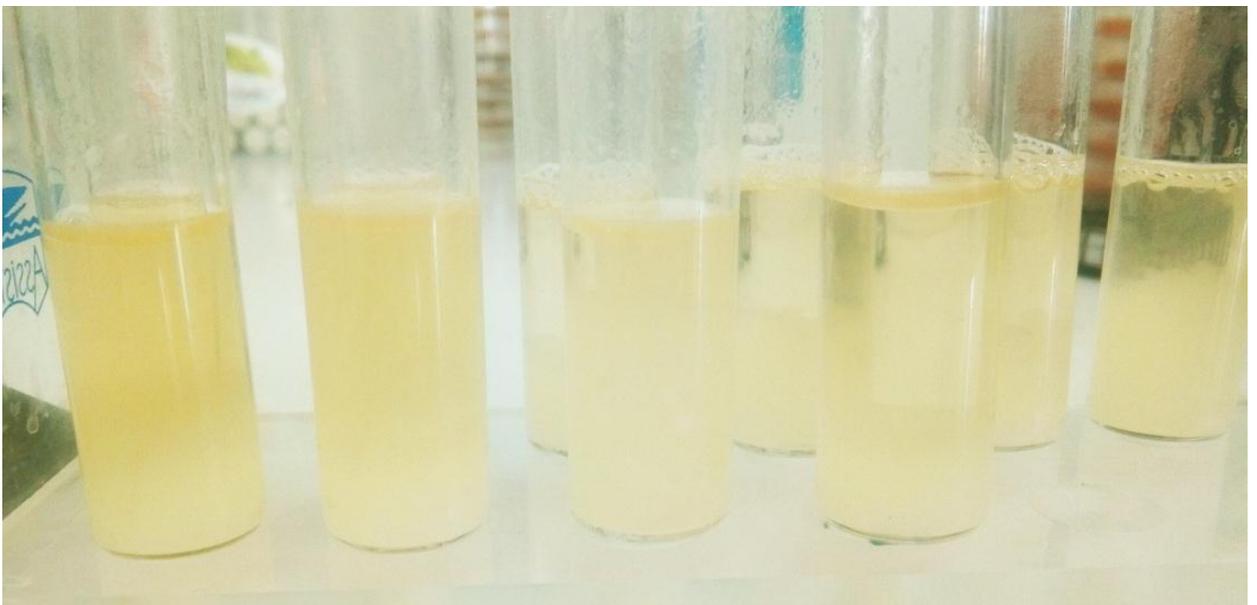
Cette sélection a pour but l'obtention de souches productrices d'amylase extracellulaire. Cette propriété se traduit dans le milieu par la formation de zones claires autour des colonies (Figure 3). Ainsi, 10 souches ont été sélectionnées et purifiées; et isolées sur le milieu d'isolement solide à pH 7 à température 50°C.



**Figure 4.** Une souche sélectionnée purifiée sur milieu de culture solide.

#### 4.1.3. Sélection sur milieu de culture liquide

Cette sélection est basée sur la mesure de l'activité des amylases sécrétées dans le milieu de culture liquide (figure 5). Les activités amylase des 10 souches sélectionnées sont rassemblées dans le tableau 2.

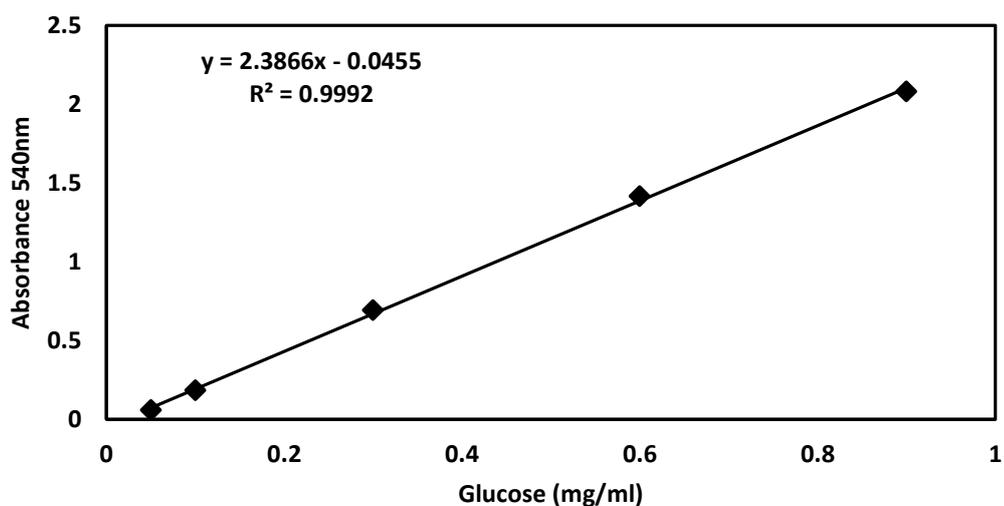


**Figure 5.** Les souches sélectionnées dans milieu de culture liquide.

**Tableau 2.** Activité amylase à 60°C, à pH 7 et des souches sélectionnées.

Souche	Activité enzymatique (UI/ml)	Ecart type
S1	0.080	0.008
S2	0.106	0.018
S3	0.014	0.038
S4	-0.095	0.003
S5	0.154	0.026
S6	0.111	0.015
S7	0.084	0.007
S8	0.049	0.007
S9	0.069	0.031
S10	0.010	0.008

La courbe d'étalonnage réalisée avec le glucose est montée sur la figure 6.

**Figure 6.** Courbe d'étalonnage réalisée avec le glucose

Les amylases de souche 2,5 et 6 ont montrées les activités les plus élevées (Tableau 2). A pH 7 et à 60°C, et on choisit la plus productrice pour l'identifier c'est la souche 5.

#### **4.2. Identification de la souche**

L'identification a été réalisée sur gélose nutritive sur la base de critères morphologiques et microscopique, à l'instar de ces physiologiques et biochimiques.

##### **4.2.1. Observation macroscopique**

L'aspect macroscopique des colonies isolées est présenté dans la figure 7.



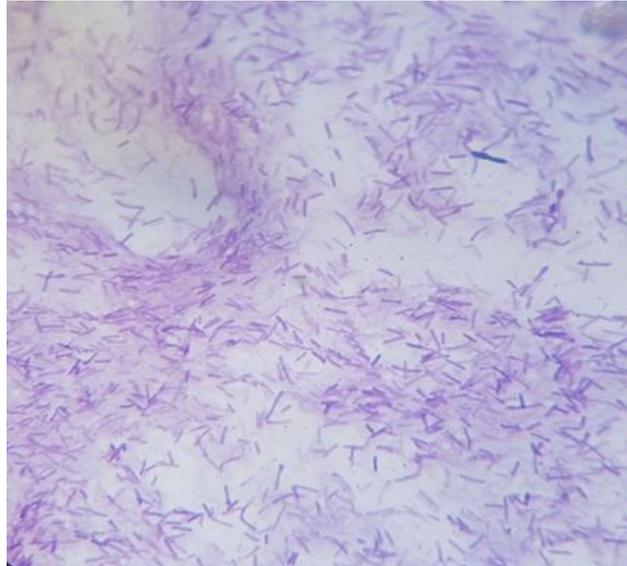
**Figure 7.** Aspect macroscopique de la souche 5.

Les colonies obtenues peuvent avoir les aspects macroscopiques suivants :

- La forme des colonies: isolées, enchainement, leur surface est lisse, bombée, forme circulaire et les bords sont réguliers.
- La couleur de colonies est crémeuse et transparent.
- Aucune odeur ressentie dans les colonies.

##### **4.2.2. Observations microscopiques**

Après la coloration de Gram, on obtient des cellules bacilles de Gram positif (figure 8).



**Figure 8.** Observation microscopique après coloration de Gram (Grossissement x 100).

### **Mobilité**

L'observation de l'aspect de la croissance dans le milieu mannitol mobilité, une teinte rouge indique que la souche n'a pas utilisé le mannitol donc le teste mannitol est négatif et on n'observe pas des troubles alors la souche est immobile (figure 9).



**Figure 9.** Aspect du milieu Mannitol mobilité avec la souche 5.

### **4.2.3. Tests physiologiques**

#### **4.2.3.1. Type respiratoire**

On observe que la culture est sur toute la hauteur donc la souche est aéro-anaérobie facultatif comme le montre la figure 10.

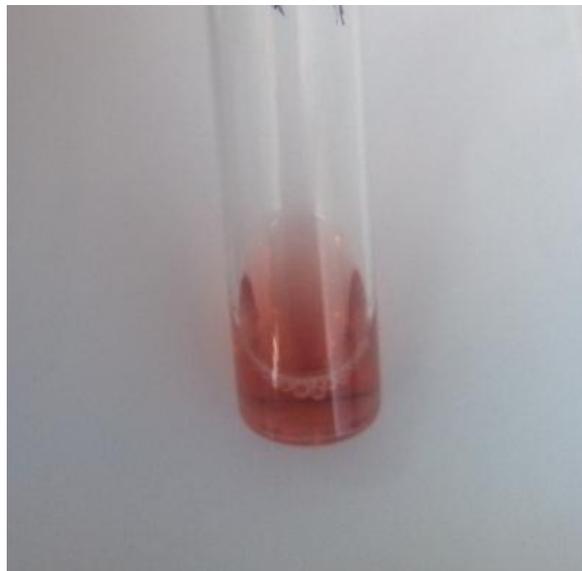


**Figure 10.** Aspect du milieu Viande-foie avec la souche 5.

#### **4.2.3.2. Voies fermentaires**

##### **a) Réaction de Voges-Proskauer**

L'apparition d'une coloration rouge dans le milieu (réaction positive), ce qui montre la présence de l'acétoïne (Fermentation butanediolique) comme le montre la figure 11.



**Figure 11.** Aspect du teste VP avec la souche 5.

##### **b) Réaction au rouge de méthyle**

Une teinte rouge franche qui résulte des fermentations acides mixtes, le teste est négatif comme le montre la figure 12.



**Figure 12.** Aspect du teste RM avec la souche 5.

#### 4.2.3.3. Production d'indole

Les deux milieux restaient incolore donc la souche n'a pas la capacité de dégrader le tryptophane en indole, le teste est négatif comme le montre la figure 13.



(a). L'urée-Indole



(b). L'eau peptonée exempte d'indole

**Figure 13.** Aspect du milieu d'urée-Indole teste indole négatif avec la souche 5.

#### 4.2.3.4. Production de sulfure d'hydrogène

L'absence d'un précipité noir dans le culot donc la souche ne produit pas le  $H_2S$ , le teste est négatif comme le montre la figure 14.



**Figure 14.** Aspect du milieu KIA avec la souche 5.

#### **4.2.3.5. Utilisation du citrate**

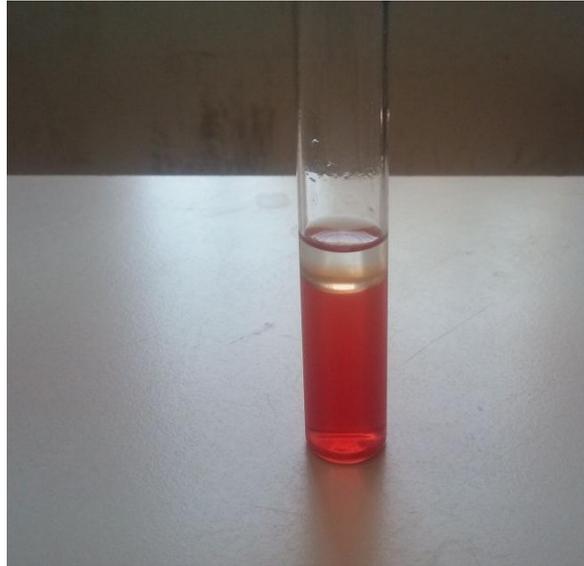
Le milieu reste vert, donc la souche n'utilise pas le citrate comme seule source de carbone, le teste est négatif comme le montre la figure 15.



**Figure 15.** Aspect du milieu citrate de Simmons avec la souche 5.

#### **4.2.3.6. Fermentation du glucose**

Le milieu reste rouge ce qui indique un teste négatif donc la souche ne fermente pas le glucose, comme le montre la figure 16.



**Figure 16.** Aspect du milieu MEVAG avec la souche 5.

#### **4.2.3.7. Milieu TSI (Triple Sugar Iron)**

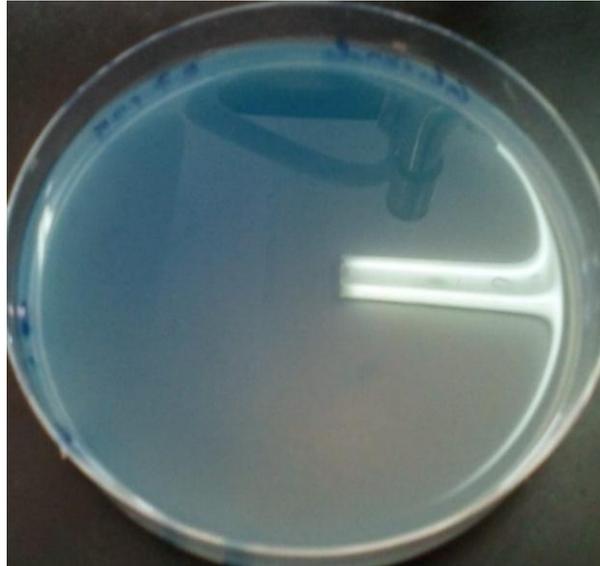
Le milieu reste au couleur rouge qui montre que le teste est négatif, alors la souche n'a rien fermenté et n'a pas produit de gaz ni de H<sub>2</sub>S comme le montre la figure 17.



**Figure 17.** Aspect du milieu TSI avec la souche 5.

#### **4.2.3.8. Production de dihydroxyacétone**

L'absence de formation d'un halo rouge autour de la croissance indique que la souche ne produit pas la dihydroxyacétone, comme le montre la figure 18.



**Figure 18.** Aspect du milieu glycérole avec la souche 5.

#### **4.2.3.9. Températures de croissance**

L'intervalle de température explorée varie de 20 à 60°C. L'isolat tolère des variations de températures de 20 à 60°C et la température optimale de croissance de ce dernier est 50-60°C (Tableau 3). Donc il s'agit d'une souche thermophile.

#### **4.2.3.10. pH de croissance**

L'évaluation de la croissance de la souche à différents montre que un trouble microbien est observé après 21 jours d'incubation à 30° dans les tubes à pH 6, 7, 8, 9 et 10 et le pH optimum pH 8 et 9, alors la souche tolère des pH alcalins.

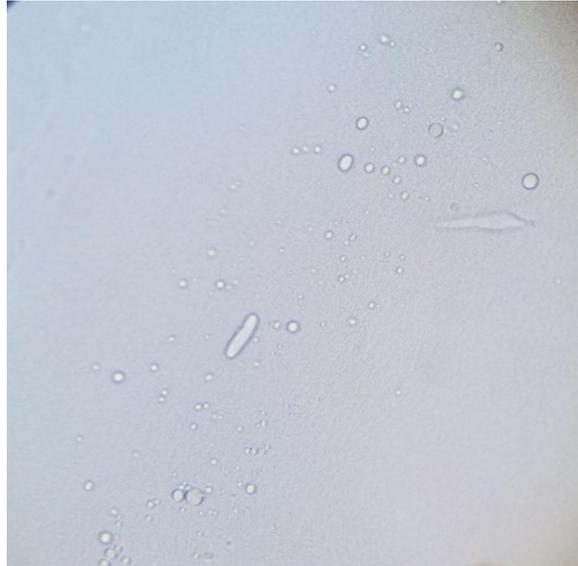
#### **4.2.3.11. Croissance à différentes concentrations de NaCl**

Un trouble microbien est observé après 7 et 14 jours d'incubation dans les tubes contenant 0, 2, 5, 7, 10, 12, 15, 18 et 20 g /l de NaCl ce qui nous permet de la considérer comme une extrêmement halotolérant selon DasSarma (2001), qui explique que les souches qui tolèrent des concentrations en NaCl supérieur à 15% sont considérées comme des souches extrêmement halotolérants. Cette dernière souche représente les traits typiques des espèces appartenant au genre *Bacillus*.

### **4.2.4. Tests biochimiques**

#### **4.2.4.1. Catalase**

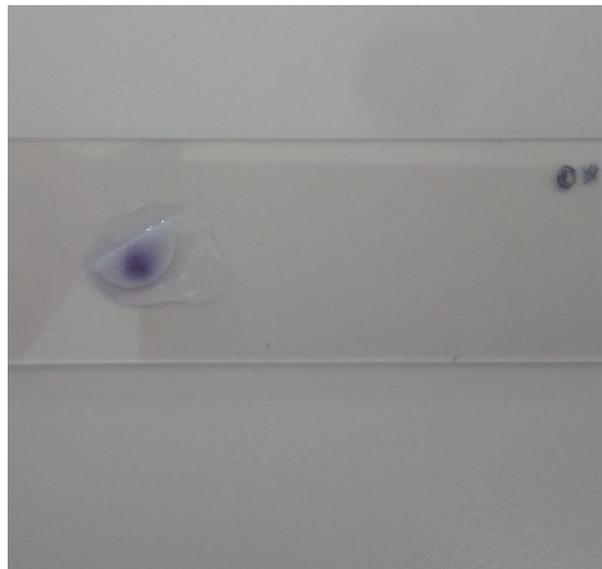
La présence d'une catalase se caractérise par la formation immédiate de bulles observées par le microscope, le teste est positif comme le montre la figure 19.



**Figure 19.** Aspect du teste catalase avec la souche 5.

#### 4.2.4.2. Oxydase

La production de l'oxydase se traduit par une coloration violette intervenant dans les 10 à 30 secondes, le teste est positif comme le montre la figure 20.



**Figure 20.** Aspect du teste oxydase avec la souche 5.

#### 4.2.4.3. Réduction des nitrates en nitrites

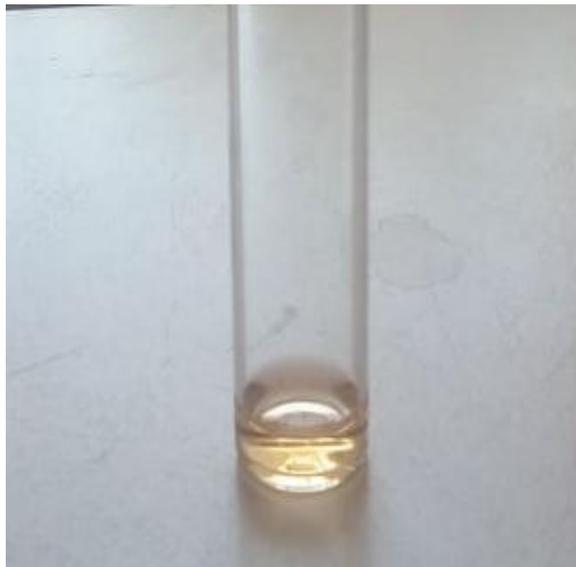
L'apparition d'une coloration rose indique que la souche possède la nitrate réductase est une enzyme qui catalyse la réaction de réduction des nitrates en nitrites, le teste est positif comme le montre la figure 21.



**Figure 21.** Aspect du teste nitrate réductase avec la souche 5.

#### 4.2.4.4. Urease

Le milieu restait incolore, donc le teste est négatif comme le montre la figure 22.



**Figure 22.** Aspect du teste uréase avec la souche 5.

#### 4.2.4.5. Gélatinase

L'absence d'un éclaircissement autour et au-dessous de la croissance indique que n'y a pas d'une hydrolyse de la gélatine, le teste est négatif.

#### 4.2.4.6. Détermination de l'activité protéolytique

L'absence d'une zone claire autour et au-dessous de la croissance indique que la souche ne dégrade pas la caséine, le teste est négatif

**Tableau 3.** Propriétés morphologiques, physiologiques et biochimiques de *Bacillus licheniformis* et la souche 5.

Teste	Souche 5	<i>Bacillus licheniformis</i>
Aspect des colonies	isolées, enchainement, lisse, bombée circulaire régulier, en couleur crémeuse et blanche	Enchainement, petites, rondes à bordure régulière et transparente
Morphologie des cellules	Bacille	Bacille
Endospores	+	+
Coloration de Gram	+	+
Mobilité	-	-
Type respiratoire	Aéro-anaérobie facultative	Aéro-anaérobie facultative
Mannitol	-	+
Réaction de VP.	+	+
Réaction au rouge de méthyle	+	+
Utilisation de citrate	-	+
Production de H <sub>2</sub> S	-	-
Indole	-	-
Fermentation du glucose	-	-
Température de croissance	20- 60°C	20-60°C
pH de croissance	6-10 (8-9 optimum)	5-10 (9 optimum)
Croissance à différentes NaCl%	0-20%	0-15%
TSI	-	-

Suite : tableau 3

Production de gaz	-	-
Catalase	+	+
Oxydase	+	+
Urease	-	-
Nitrate réductase	+	+
Gélatinase	-	-
Décomposition de la caséine	-	+
Production de dihydroxyacétone	-	+

D'après la comparaison des résultats obtenues dans le tableau 3 qui montre que 80% des caractères de la souche identifiée sont identiques à ces de *Bacillus licheniformis*.

Alors la souche identifiée appartient à *B. licheniformis* et on explique les points différents (20%) comme des cas particulier à cause de milieu ou bien des changements au niveau des gènes responsables de ces fonctions ou bien caractères.

*Bacillus licheniformis* se distingue par sa capacité à produire de nombreux métabolites d'intérêt commercial, parmi lesquelles le protéase, l'alpha-amylase, le pénicillinase et le cellulase (Archana *et al.*, 2003 ; Meunier, 1999 ; Perego *et al.*, 2003).

*B. licheniformis* croît de façon optimale en milieu aérobie, et aussi en anaérobiose, et elle peut croître sur une grande plage de température, de 20°C jusqu'à 60°C (Gupta *et al.*, 2002). Sa température optimale de croissance est de 50°C mais elle peut survivre à des températures bien plus élevées c'est une bactérie thermophile. La température optimale pour la sécrétion d'enzymes se situe à 37 °C. Parce que la bactérie peut se développer à une température plus élevée, les enzymes qu'elle produit sont naturellement thermostables. *B. licheniformis* a la capacité de produire l'amylase en grande quantité (Kubrak *et al.*, 2010). Et selon M.M. Adeyanju (2007) L'alpha-amylase produit par *B. licheniformis* il s'agit d'une amylase thermostable jusqu'à température 90°C et tolère aux alcalin en même temps.

# **Conclusion**

Il y a un regain d'intérêt dans l'étude des enzymes amylolytiques, principalement en raison de la reconnaissance du fait que ces enzymes jouent non seulement un rôle important dans les processus cellulaires métaboliques, mais ont également gagné une attention considérable dans la communauté industrielle.

Le but de cette étude a été d'isoler et de caractériser une souche thermophile productrice d'amylase à partir de l'eau de Hamem EL Baraka, El Hadjeb, Biskra.

Plusieurs souches ont été isolées sur un milieu solide à base d'amidon comme seule source de carbone. Ceci montre la richesse de ces eaux chaudes en microorganismes thermophiles dégradant l'amidon. Ces souches produisent des zones claires montrant par lesquelles elles sécrètent des amylases extracellulaires. Cette caractéristique a permis de sélectionner 10 souches.

La sélection sur le milieu liquide par mesure de l'activité amylases de ces souches, a permis de sélectionner une souche avec la plus grande activité (S5).

L'identification de cette souche révèle qu'elle appartient au genre *Bacillus*. Ce dernier est très connu par sa production prolifique d'amylases extracellulaire, ce qui est un avantage pour faciliter la production et la purification de ces enzymes, réduisant ainsi le coût de leur production. Une caractérisation plus poussée de la souche a montré qu'elle appartiendrait à l'espèce *Bacillus licheniformis*.

Les amylases sécrétées par cette souche sélectionnée sont actives à 60°C, ce qui représente un grand avantage d'un point de vue industriel. En effet, travailler avec ces enzymes à des températures élevées permettrait d'éviter les contaminations et le refroidissement de la matière première.

A la lumière de ces résultats, nous pourrions proposer en perspective d'autres travaux de recherche complémentaires tels que :

- Identification génétique de la souche isolée (*B. licheniformis*).
- Recherche d'autre source de carbone pour la souche identifiée plus abondante au niveau de notre région.
- Etudier le type de fermentation adéquat (solide, liquide ou semi-liquide).

- Optimiser la production d'alpha-amylase de cette souche en fonction de la composition du milieu et d'autres paramètres tels l'aération, pH, la température.
- Il serait intéressant d'utiliser ces souches amylolytiques comme des bioréacteurs pour dépolluer les sites contaminées par les déchets biodégradables.

# **Références bibliographiques**

- 1- Ait Kaki- El-Hadef El-Okki H., Leghlimi S., Dakhmouche L., Bennamoun., Z Meraihi. 2012. utilisation de la planification experimentale pour l'optimisation de la production de l'  $\alpha$ -amylase par rhizopus oryzae, Vol. 6 Rev. Microbiol. Ind. San. et Environn. (1):pp. 1-17.
- 2- Archana A. and Satyanarayana T. 2003. Purification and characterization of a cellulase-free xylanase of a moderate thermophile *Bacillus licheniformis* A99. World Journal of Microbiology and Biotechnology 19(1): pp. 53-57.
- 3- Bailey M. J., Biely P. and Poutanen K. 1992. Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. Journal of biotechnology 23(3): pp. 257-270.
- 4- Behal A., Singh, J., Sharma M. K., Puri P. and Batra N. 2006. Characterization of alkaline  $\alpha$ -amylase from *Bacillus* sp. AB 04. International Journal of Agriculture and Biology 8(1):8083 p.
- 5-Benaouida K. 2008. Etude de l'alpha amylase de levures isolées d'un écosystème extrême (sol environnement des sources thermales) et cultivées sur un milieu à base de lactosérum. Thèse magister. Biotechnologie microbiennes, Université Mentouri, Constantine, 104 p.
- 6- Boel E., Brady L., Brzozowski A.M., Derewenda Z., Dodson G. G., Jensen V. J., Petersen S.B., Swift H., Thim L. and Woldike H. F. 1990. Calcium binding in. alpha.-amylases: an x-ray diffraction study at 2.1- Å resolution of two enzymes from *Aspergillus*. Biochemistry 29(26):pp. 6244-6249.
- 7- Brock T. D. and Freeze H. 1969. *Thermus aquaticus* gen. n. and sp. n., a nonsporulating extreme thermophile. Journal of bacteriology 98(1):pp. 289-297.
- 8- Bruins M. E., Janssen A. E. and Boom R. M. 2001. Thermozyms and their applications. Applied biochemistry and biotechnology 90(2):p. 155.
- 9- Burhan A., Nisa U., Gökhan C., Ömer C., Ashabil A. and Osman G. 2003. Enzymatic properties of a novel thermostable, thermophilic, alkaline and chelator resistant amylase from an alkaliphilic *Bacillus* sp. isolate ANT-6. Process Biochemistry 38(10):pp. 1397-1403.
- 10- Chatterton Jr, R. T., Vogelsong K. M., Lu Y. C., Ellman A. B. and Hudgens G. A. 1996. Salivary  $\alpha$ -amylase as a measure of endogenous adrenergic activity. Clinical physiology 16(4):pp. 433-448.

- 11- Chevallier D. 1990. Rapport sur les applications des biotechnologies à l'agriculture et à l'industrie agro-alimentaire. Office parlementaire d'évaluation des choix scientifiques et technologiques. Tom 1. N° 1827.177 p.
- 12- Claus D. and Berkeley R. C. W. 1989. Genus *Bacillus* Cohn 1872, 174:pp. 1105-1139. In Sneath P. H. A., Mair N. S., Sharpe M. E. and Holt J. G. (ed), *Bergey's manual of systematic bacteriology*. 1986. 2:pp. 529-50.
- 13- Coolbear T., Daniel R. M., Morgan H.W. 1992. The enzymes from extreme thermophiles: bacterial sources, thermostabilities and industrial relevance. *Advanced Biochemistry and Engineering Biotechnology* 45: pp. 57–97.
- 14- COSTES C. 1982. Les enzymes, Production et utilisations industrielles. Bordas, Paris, pp. 37- 195.
- 15- DasSarma S., DasSarma P. Halophiles. *eLS*. 2001 May 30:pp. 1-3.
- 16- Dauter Z., Dauter M., Brzozowski A. M., Christensen S., Borchert T. V., Beier L., Wilson K. S. and Davies G.J. 1999. X-ray structure of Novamyl, the five-domain “maltogenic”  $\alpha$ -amylase from *Bacillus stearothermophilus*: maltose and acarbose complexes at 1.7 Å resolution. *Biochemistry* 38(26):pp. 8385-8392.
- 17- Davies G. J., Wilson K. S. et Henrissat B. 1999. Nomenclature for sugar binding subsites in the glycosylhydrolases. *Biochem. J.* 321:pp. 557-559.
- 18- Farber G. K. and Petsko G. A. 1990. The evolution of barrel enzyme. *Trends. biochem.SCI.* 15:pp. 228-234.
- 19- Gupta R., Beg Q. K. et Lorenz P. 2002. Bacterial alkaline proteases : molecular approaches and industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology* 59(1):pp. 15-32.
- 20- Heslot H. and Menez A. 1996. L'ingénierie des protéines et ses applications. Lavoisier Tec et Doc. pp. 424-432.
- 21- Huber H., Burggraf S., Mayer T., Wyschkony I., Rachel R. and Stetter, K.O. 2000. *Ignicoccus* gen. nov., a novel genus of hyperthermophilic, chemolithoautotrophic Archaea, represented by two new species, *Ignicoccus islandicus* sp nov and *Ignicoccus pacificus* sp nov. and *Ignicoccus pacificus* sp. nov. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 50(6):pp. 2093-2100.

- 22- Kadziola A., Abe J., Svensson B. And Aser R. 1994. Crystal and molecular structure of barley- amylase. *J. Mol. Biol.* 239:pp. 104-121.
- 23- Keating L., Kelly C., Forgartry W. 1998. Mechanism of action and the substrate dependant pH maximum shift of the- amylase of *Bacillus coagulans*. *Carbohydrate Research* pp. 311-318.
- 24- Kim K. W. et S. B. Lee. 2003. Inhibitory effect of Maillard reaction products on growth of the aerobic marine hyperthermophilic archaeon *Aeropyrum pernix*. *Applied Environmental Microbiology* 69:pp. 4325-8.
- 25- Kirk O., Borchert T. V. and Fuglsang C.C. 2002. Industrial enzyme applications. *Current Opinions in Biotechnology* 13:pp. 345-51.
- 26- Kubrak O. I., J. M. Storey K.B. Storey and V. I. Lushchak. 2010. Production and properties of  $\alpha$ -amylase from *Bacillus* sp. BKL20. *Can. J. Microbiol.* 56:pp. 279-288.
- 27- Li W. F., Zhou X. X. and Lu P. 2005. Structural features of thermozyms. *Biotechnology Advances* 23:pp. 271-81.
- 28- Mair N. S., M. E. Sharpe J. G. Holt. 1986. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. P. H. A. Sneath. 2, Section 13.
- 29- Marchant R., Banat I.M., Rahman T.J. and Berzano M. 2002. The frequency and characteristics of highly thermophilic bacteria in cool soil environements. *Environmental Microbiology* 4:pp. 595-602.
- 30- Mc. Carter J.D and Withers S.G. 1996. Unequivocal identification of Asp 214 as the catalytic nucleophile of *Saccharomyces cerivisiae* -glucosidase using 5 fluoro glycosyl fluorides. *J. Biol. Chem.* 271:pp. 6889-6894.
- 31- McMullan G., Christie J. M., Rahman T. J., Banat I. M., Ternan N. G. and Marchant R. 2004. Habitat, applications and genomics aerobic, thermophilic genus *Geobacillus*. *Biochemical Society transactions* 32:pp. 214-7.
- 32- McTigue, 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.
- 33- Merabti R. 2006. Isolement et caractérisation de souches levuriennes amylolytiques à partir de sol saharien algérien. Diplôme de magistère, Université Mentouri, Constantine, 139 p.

- 34- Mercier C. 1985. Les enzymes amylolytiques. In : Mouranche A. Coste C. hydrolases et dépolymérase. Ed Gauthier-Villars, pp. 110-140.
- 35- Meunier N. 1999. Évaluation du potentiel de production de protéases bactériennes à partir des boues d'épuration municipales. Mémoire de maîtrise, INRS-Eau, Université du Québec, Canada, 168 p.
- 36- Miller G. L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Anal. Chem. 31:pp. 426-428.
- 37- MM Adeyanju, FK Agboola, BO Omafuvbe, OH Oyefuga et OO Adebawo. 2007.  $\alpha$ -amylase thermostable extracellulaires de *Bacillus licheniformis* isolé de Manioc Steep eau. Biotechnologie 6:pp. 473-480.
- 38- Montanari G., Borsari A., Chiavari C., Ferri G., Zambonelli C. and Grazia L. 2004. Morphological and phenotypical characterization of *Bacillus sporothermodurans*. Journal of Applied Microbiology 97:pp. 802-9.
- 39- Nielson J-E., Borchert T-V et Vriend G. 2001. The determinant of  $\alpha$ -amylase pH activity profiles. Protein Engineering. Oxford University Press. 14(7):pp. 505-512.
- 40- Nouadri T. 2011. L'  $\alpha$ -amylase de *Penicillium camemberti* PL21: Production, Purification, Caractérisation et Immobilisation. Diplôme de Doctorat, Université Mentouri, Constantine, 143 p.
- 41- Panchal C. 1990 Yeast strain selection. Marcel Dekker (ed.), USA, 189 p.
- 42- Pantazaki, A., Pritsa A. et Kyriakidis D. 2002. Biotechnologically relevant enzymes from *Thermus thermophilus*. Applied Microbiology and Biotechnology 58:pp. 1-12.
- 43- Park C.S., Chang C.C., Kim J.Y., Ogrydziak D.M. et 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.
- 44- Park C. B., et S. B. Lee. 2000. Effect of exogenous compatible solutes on growth of the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*. Journal of Bioscience and Bioengineering 89:pp. 318-22.

- 45- Perego P., Converti A. et Del Borghi M. 2003. Effects of temperature, inoculum size and starch hydrolysate concentration on butanediol production by *Bacillus licheniformis*. *Bioresource Technology* 89:pp. 125-131.
- 46- Renaud F. N. R. 2000. Précis de bactériologie clinique. ESKA.
- 47- Rhee S.K., Jeon C., Bae J.W., Kim K., Song J., Kim J.J., Lee S.G., Kim H.I., Hong S.P., Choi Y.H. and Kim S.M. 2002. Characterization of *Symbiobacterium toebii*, an obligate commensal thermophile isolated from compost. *Extremophiles* 6:pp. 57-64.
- 48- Schäffer C., Franck, W. L., Scheberl, A., Kosma, P., McDermott, T. R., and Messner, P. 2004. Classification of isolates from locations in Austria and Yellowstone National Park as *Geobacillus tepidamans* sp. nov. *International Journal of Systemic Evolutionary Microbiology* 54: 2361-8.
- 49- Schomburg D. and Salzmann M. 1991. Enzyme Hand book 4. Classe 3: Hydrolases Springer-Verlag (ed). Berlin Heidelberg, Germany, pp. 1-12.
- 50- Srinivasa R M., Reddy G. Venkateswara Rao G. and Sambasiva R. R.S. 2004. Studies on the extraction and characterisation of thermostable  $\alpha$ -amylase from pericarp of *Borassus indica*. *African Journal of Biotechnology* 4:pp. 289-291.
- 51- Steer M. and Levitzki A. 1973. The metal specificity of mammalian  $\alpha$ -amylases as revealed by enzyme activity and structural probes. *FEES Leu.* 31:pp. 89-92.
- 52- Stefanova M. et Emanuilova E. 1992. Characterization of a thermostable Amylase from *Bacillus brevis*. *Eu. J. Biochem.* 207(1):pp. 345-349.
- 53- Sürücü G. 1999. Growth requirements of thermophilic aerobic microorganisms in mixed cultures for the treatment of strong wastes. *Water Science Technology* 41:pp. 53-60.
- 54- Tantaoui El Araki A. 2005. biotechnologies et agro-alimentaire au Maroc. *Biotechnologies et sécurité alimentaire.* p. 5.
- 55- Uitdehaag J. C. M., Mosi R. Kalk K. H., Vander Veen B. A. Dijkhuizen L., Withers S. G. et Dijkstra B. W. 1999. X-ray structure along the reaction pathway of cyclodextrin glycosyltransferase elucidate catalysis in the amylase family. *Nat. Struct. Biol.* 6:pp. 432-436.
- 56- Vallee B. L., Stein E. A., Summer W.N et Fisher E. H. 1959. Metal content of  $\alpha$ -amylases of various origins. *J Biol Chem.* 234:pp. 2901-2929.

- 57- Vincent M. 1996. Blood glucose: Its measurement and clinical importance. *Clinica Chimica*.
- 58- Vickers J. E., Hamilton, S. E., De Jersey, J., Henry, R. J., Marschke, R. J. and Inkerman, P. A. 1996. Assessment of *Bacillus licheniformis*  $\alpha$ -amylase as a candidate enzyme for genetic engineering of malting barley 1. *Journal of the Institute of Brewing* 102(2):pp. 75-78.
- 59- Wiegel J. et Kevbrin V. V. 2003. Alkalithermophiles. *Biochemical Society Transactions* 32:pp. 103-8.
- 60- Zeikus J. G., Vieille C., and Savchenko A. 1998. Thermozyms: Biotechnology and structure-function relationships. *Extremophiles* 2(3):pp. 179-183.

# **Annexes**

## Les Milieux préparés

Composition de Milieu liquide d'enrichissement à base d'amidon.

Amidon.....	1g
NaCl.....	0,25g
MgSO <sub>4</sub> .....	0,02g
NH <sub>4</sub> Cl.....	0,5g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	0,5g
L'eau distillée.....	100 ml

Solution liquide de NaOH jusqu'à pH = 7

**NB** : Pour la préparation de milieu solide d'isolement à base d'amidon, les mêmes compositions sauf que l'ajout l'agar.

Composition milieu solide de purification et sélection à base d'amidon pour la production d'amylase.

NaCl.....	0,25g
MgSO <sub>4</sub> .....	0,02g
NaNO <sub>3</sub> .....	0,5g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	0,5g
Agar.....	1,5g
Extrait de levure.....	0,2g
Amidon.....	1g
L'eau distillée.....	100 ml

Solution liquide de NaOH jusqu'à pH = 7

**NB** : Pour la préparation de milieu de sélection liquide à base d'amidon, les mêmes compositions sauf que l'élimination de l'agar.

Composition de Milieu gélose nutritive.

Gélose nutritive.....	23g
-----------------------	-----

L'eau distillée.....1000 ml

Solution liquide de NaOH jusqu'à pH = 7

Tampon phosphate

Solution NaHPO<sub>4</sub> (0.2M).....39 ml

Solution Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0.2M).....61 ml

L'eau distillée.....150 ml

Solution liquide de NaOH jusqu'à pH = 7

DNS (acide 3,5dinitrosalicylique).

NaOH.....16g

KNa Tartrate.....300g

DNS.....10g

L'eau distillée.....1000 ml

Les valeurs d'absorbance à 540 nm et pH 7.

Souche	Blanc	Tube 1	Tube 2	Tube 3
S1	0.440	0.476	0.418	0.396
S2	0.670	0.545	0.679	0.495
S3	2.981	0.275	-0.136	0.089
S4	2.770	-0.505	-0.531	-0.498
S5	2.864	0.847	0.961	0.685
S6	2.137	0.554	0.555	0.692
S7	1.785	0.485	0.409	0.460
S8	1.235	0.258	0.233	0.310
S9	2.472	0.219	0.343	0.550
S10	1.729	0.031	0.106	0.027

## Activité enzymatique à 60°C, à pH 7 et des souches sélectionnées.

Souche	AE T1	AE T2	AE T3	Moyenne	Ecart type
S1	0.088	0.077	0.073	0.080	0.008
S2	0.101	0.126	0.092	0.106	0.018
S3	0.051	-0.025	0.016	0.014	0.038
S4	-0.093	-0.098	-0.092	-0.095	0.003
S5	0.157	0.178	0.127	0.154	0.026
S6	0.103	0.103	0.128	0.111	0.015
S7	0.090	0.076	0.085	0.084	0.007
S8	0.048	0.043	0.057	0.049	0.007
S9	0.041	0.063	0.102	0.069	0.031
S10	0.006	0.020	0.005	0.010	0.008

## ملخص

من مياه حمام البركة من بلدية الحاجب، بسكرة، تم عزل 10 سلالات محبة للحرارة تنتج الأميلاز خارج الخلية ويتم اختيارها على أساس تكوين مناطق الشفافة حول المستعمرات على وسط اساسه النشا. الاختيار الثاني، بناءً على قياس نشاط الأميلاز في وسط سائل عند 60 درجة مئوية ودرجة الحموضة 7، مما جعل من الممكن اختيار سلالة تنتمي إلى فصيلة *Bacillus licheniformis*. يمكن أن تنمو هذه السلالة المعزولة عند درجة الحموضة من 6 إلى 10 وفي درجة حرارة 20 إلى 60 درجة مئوية مع تركيزات عالية من كلوريد الصوديوم من 0 إلى 20 ٪ لذلك فهي بكتيريا محبة للوسط المعتدل و تتسامح مع درجة الحموضة القلوية والمحبة للحرارة. هذا الأميلاز سيكون قابلاً للتطبيق في العمليات الصناعية.

**الكلمات المفتاحية:** الأميلاز ، المحبة للحرارة ، النشا ، الحمام ، الحاجب ، *Bacillus licheniformis*.

## Résumé

A partir de l'eau de Hamem El Baraka de la commune d'El Hadjeb, Biskra, 10 souches thermophiles productrices d'amylases extracellulaires sont isolées et sélectionnées sur la base de formation de zones claires autour des colonies sur un milieu solide à base d'amidon. Une deuxième sélection, basée sur la mesure de l'activité amylases dans un milieu liquide à 60°C et pH 7, a permis de sélectionner une souche qui appartiendrait à l'espèce *Bacillus licheniformis*. Cette souche isolée peut croître à pH de 6 à 10 et à température de 20 à 60°C avec des concentrations de NaCl élevées de 0 à 20 % donc c'est une bactérie neutrophile tolère des pH alcalins et thermophile. Ces amylases seraient être applicables dans des procédés industriels.

**Mots clé :** amylase, thermophile, amidon, Hamem, ElHajeb, *Bacillus licheniformis*.

## Abstract

From the water of Hamem El Baraka of the municipality of El Hadjeb, Biskra, 10 thermophilic strains producing extracellular amylases are isolated and selected on the basis of formation of clear zones around the colonies on a solid medium based on 'starch. A second selection, based on the measurement of the amylase activity in a liquid medium at 60 ° C. and pH 7, made it possible to select a strain which belongs to the species *Bacillus licheniformis*. This isolated strain can grow at a pH of 6 to 10 and at a temperature of 20 to 60 ° C with high NaCl concentrations of 0 to 20% so it is a neutrophilic bacteria tolerates alkaline pH and thermophilic. These amylases would be applicable in industrial processes.

**Key words:** amylase, thermophilic, starch, Hamem, ElHajeb, *Bacillus licheniformis*.