

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'enseignement Supérieur et La Recherche Scientifique

N° d'ordre :

N° de série :



Université Hassiba Benbouali de Chlef
FACULTE DES SCIENCES
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

Thèse de Doctorat

Pour l'obtention de diplôme de Doctorat LMD

Spécialité : Biologie Moléculaire et Génomique

Thème :

**Isolement et caractérisation des bactéries à intérêts
biotechnologiques à partir de niches écologiques
Algériennes**

Présenté par : TIFRIT Abdelkarim

Devant le jury composé de :

soutenue le :

M ^{me} ALLEM Rachida	Professeur à l'Université de Hassiba Ben Bouali de Chlef	Présidente
Mr. BENALI Mohammed	Professeur à l'Université de Djillali Liabès de Sidi Bel-Abbés	Examineur
Mr. BELABID Lakhdar	Professeur à l'Université de Mustapha Stambouli de Mascara	Examineur
Mr. SETTI Benali	MCA à l'Université de Hassiba Ben Bouali de Chlef	Examineur
Mr. ABOUNI Bouziane	Professeur à l'Université de Djillali Liabès de Sidi Bel-Abbés	Encadreur
Mr. SEBAIHIA Mohammed	MCA à l'Université de Hassiba Ben Bouali de Chlef	Co- Encadreur

Année universitaire : 2015-2016

DEDICACES

A

Mes très chers parents.

En témoignage de mon profond amour et mon plus grand respect. Je ne vous remercierai jamais assez pour la confiance que vous m'avez accordée, pour votre soutien tout au long de ma scolarité, pour tous vos sacrifices.

A

Mes proches, toute ma famille et tous mes amis. Merci d'être toujours à mes côtés.

A

Ma petite princesse yousra.

Ma merveille, t'es mon plus grand bonheur et ma plus grande fierté. J'espère qu'un jour tu liras cette thèse et que tu sauras que tu es la plus belle chose qui me soit arrivée. Que dieu te protège.

Tifrit Abdelkrim

Résumé

Les amylases sont les principales enzymes impliquées dans la dégradation de l'amidon. Ces enzymes possèdent divers applications c'est pourquoi elles sont très recherchées dans le domaine industriel. Dans cette étude, 100 souches bactériennes appartenant au genre *Bacillus*, isolées à partir de différentes niches écologiques, de sources thermales dans le territoire Algérien ont sélectionnées sur la base de leurs capacités de dégradation d'amidon et production des amylases sur le milieu de culture Starch agar, additionnée d'une concentration de 1% d'amidon.

La sélection des souches productrices des amylases est établie en s'appuyant sur deux critères essentiels : la mesure des diamètres des zones d'hydrolyses formées sur milieu de culture solide et le test de l'activité de dextrinisation dans un milieu de culture liquide par la méthode DNSA. La mise en évidence de la thermostabilité des amylases est effectuée par l'étude de l'influence de la température sur l'activité amylolytique. Les résultats obtenus ont montré que la souche MK7 sélectionnée productrice de l'amylase a présenté une activité enzymatique maximale de (1,537 U/ml). L'utilisation de la galerie API 20E et l'analyse par le logiciel Bacterial identification program ont permis l'identification de cette espèce comme étant *Bacillus subtilis*. Les tests de la thermostabilité effectués ont révélé la présence de quatre souches productrices d'amylases hautement résistantes (HC2, HBH2, HBH5 et HBH), avec des températures optimales de (85, 80, 75, 75°C) respectivement. L'utilisation de l'outil de la biologie moléculaire a permis une identification génétique des souches sélectionnées productrices d'amylases et l'analyse phylogénétique.

Dans le but d'augmenter la production des amylases chez la souche sélectionnée productrice MK7, un certain nombre de paramètres tels que la source d'azote, la concentration de l'inoculum, la concentration d'amidon et l'effet de quelques sels minéraux ont été optimisés. Les résultats obtenus ont montré qu'une production maximale des amylases (11,746 U/ml) est obtenue lors de l'inoculation de la souche MK7 sur un milieu de culture optimisé contenant amidon 5g/l, gélatine 5g/l, CaCl₂ ; 0.2 g/l et 0.5% v/v d'inoculum.

Mots clés : Amylase, Isolement de *Bacillus*, le gène 16s rRNA, thermostabilité, optimisation.

Abstract

Amylases are the main enzymes involved in the degradation of starch. These enzymes have various applications that's why they are very popular in the industrial field. In this study, 100 strains of bacteria belonging to the genus *Bacillus*, isolated from different ecological niches and hot springs in the Algerian territory were selected on the basis of their starch degradation capacity and production of amylases in the Starch agar culture medium, supplemented with a concentration of 1% starch.

The selection of strains producing amylases is established on the basis of two main criteria: the measurement of the diameters of the zone hydrolyses formed on solid culture medium and the test of the dextrinization activity in a liquid culture medium by the DNSA method. The demonstration of the thermostability of amylases is performed by studying the influence of temperature on the amylolytic activity.

The results obtained showed that the selected MK7 strain producing amylase presented a maximum enzymatic activity (1,537 U / ml). The use of the API 20E gallery and the analysis by the software Bacterial identification program led to the identification of this species as *Bacillus subtilis*. The tests of the thermostability carried out have revealed the presence of four strains producing highly thermostables amylases (HC2, HBH2, HBH5 and HBH), with the optimum temperature (85, 80, 75, 75 ° C) respectively. The use of molecular biology tool enabled a genetic identification and phylogenetic analysis of the selected strains producing amylases.

In order to increase the production of the amylases in the selected producing strain MK7, a number of parameters such as the nitrogen source, the concentration of the inoculum, the starch concentration and the effect of some inorganic salts were optimized. The results showed that maximum production amylases (11.746 U / ml) was obtained when inoculation MK7 strain on an optimized culture medium containing: starch 5g/L, gelatin 5 g/L, Ca Cl₂ 0.2 g/L and 0.5% v/v of inoculum.

Keywords: Amylase, Gene 16s rRNA, Screening of *Bacillus*, optimization, Thermostability.

الملخص

الاميلاز هي الإنزيمات الرئيسية المشاركة في تحلل النشا. هذه الإنزيمات لها استعمالات مختلفة لذلك فهي تحظى بشعبية كبيرة في المجال الصناعي. في دراستنا، تم عزل ما مجموعه 100 سلالات بكتيرية من جنس العصيات من بيئات ايكولوجية مختلفة والينابيع الساخنة في التراب الجزائري، وعلى أساس قدرتهم على تحليل النشاء وإنتاج الاميلاز في وسط مغذي مستكمل بواسطة 1% النشا). تم تأسيس مجموعة من أفضل سلالات أداء على أساس معيارين: قطر منطقة التحلل وقياس نسبة السكر المرجعو ذلك باستعمال طريقة DNSA. وفيما يتعلق شدة تحمل الحرارة لأميليز، قمنا بدراسة تأثير درجة الحرارة على النشاط الإنزيمات. النتائج تؤكد ان العزلة MK7 هي التي تنتج أقصى قدر من العائد (1.537U / مل) وقد تم التعرف عليها باستخدام نظام E API 20 ك *Bacillus subtilis*: تقييم صمود للحرارة تسهم في ظهور أربع سلالات منتجة للأملاز شديدة المقاومة للحرارة، وهي سلالة HC2 مع درجة الحرارة المثلى 85 درجة مئوية، وسلالة HBH2 مع درجة الحرارة المثلى 80 درجة مئوية، وسلالة HBH5 HBH6 مع درجة الحرارة المثلى 75 درجة مئوية. لقد تم التطرق في دراستنا إلى التعرف الجيني بالإضافة إلى الدراسة الفيلوجينية. الحد الأقصى من الإنتاج الاميلاز تم الحصول عليه باستعمال العزلة MK7 بعد التحسين من المعلمات التالية: تركيز مصدر النيتروجين التحلل، وتركيز النشا وتأثير بعض الأملاح غير العضوية. وزادت إنتاجية 6 مرات في العائد من (U 11,746 / مل) في الوسط الأمثل الذي هو متكون على النحو التالي: نشا 5 غرام / لتر، الجيلاتين 5 غرام; CaCl₂ 0.2. غرام / لتر و 0.5% اللقاح.

الكلمات المفتاحية: الاميلاز, الجين, 16SrRNA, مقاومة الحرارة, عزل البكتيرية من نوع *Bacillus*, تحسين الإنتاج.

Avant-propos

Ce travail s'inscrit dans le cadre de préparation d'une thèse de Doctorat, qui s'intéresse à l'isolement de bactéries appartenant au genre *Bacillus*, afin d'explorer la richesse des niches écologiques caractéristiques éparpillées au niveau du territoire Algérien.

Ensuite, la recherche des enzymes à intérêt biotechnologique et en particulier les amylases, classes d'enzymes largement exploitées par les industriels grâce à leur valeur ajoutée, est envisagée. Les souches isolées, sélectionnées productrices de l'amylase sont soumis à une identification moléculaire et une analyse phylogénétique. Le travail s'articule autour de trois grandes parties :

Une **première partie** présentant une revue générale de la littérature sur la biotechnologie et les amylases (Chapitre 1), sur la dissection du genre *Bacillus* (Chapitre 2) ;

Une **seconde partie** décrivant en détail le protocole expérimental et les différentes étapes du déroulement de la partie pratique (Matériel et méthodes) ;

Une dernière partie traitant les résultats de la partie pratique.

La rédaction du manuscrit répond aux normes internationales ISO (International Standard Organization):ISO 690 publié en 2010 pour le référencement bibliographique dans la préparation des documents, le contenu, la forme et la structure, auxquelles nous nous sommes référés.

Remerciements

J'adresse mes sincères remerciements et ma gratitude la plus profonde à tous ceux Qui m'ont aidé à l'accomplissement de cette modeste thèse. Je remercie chaleureusement mon promoteur Professeur ABBOUNI Bouziane, pour la confiance qu'il m'a accordé, et son soutien scientifique et moral tout au long du travail, et surtout pour la grande motivation qu'il a su m'insuffler durant mon parcours.

J'exprime toute ma reconnaissance à mon Co-encadreur Dr. SEBAIHIA Mohmmmed, pour avoir toujours été présent, pour ses conseils et son accueil généreux dans son laboratoire de recherche. Ce fut un réel plaisir de travailler avec vous et je tiens à tester que vous êtes un maître chevronné dans le domaine de la biologie moléculaire et la bioinformatique.

Je remercie également tous les membres du jury d'avoir accepté de lire ce manuscrit et d'évaluer ce modeste travail : la Présidente de jury Professeur ALLEM Rachida et les examinateurs: Professeur BENALI Mahmoud, Professeur BELABID Lakhdar et Dr. SETTI Benali.

J'exprime également ma gratitude à l'égard de Monsieur MOUEDDEN Nasreddine Riad. Je vous souhaite un bon rétablissement et un retour rapide parmi nous.

Mes remerciements s'adressent aussi à Monsieur DRICI Amine El Mokhtar, un coéquipier brillant de laboratoire et un ami serviable. Merci d'avoir eu le courage de plonger avec moi dans l'océan de la biologie moléculaire.

Mes remerciements vont aussi aux frères et sœurs Meriem Bachir, KARTOUBY Imène, Mohammed BENDAHA, SELOUANI Mustapha et DIAF Mustapha pour leur esprit d'équipe et leur coopération professionnelle.

J'adresse également mes remerciements aux membres de ma famille pour leur soutien et leur patience, dont ils m'ont fait preuve et leur confiance en moi, ce qui m'aidait moralement pour faire aboutir cette thèse.

Au risque de me répéter, j'exprime mes vifs remerciements à tous ceux qui m'ont aidé de près ou de loin pour la réalisation de cette thèse.

Table des matières

Introduction générale.....	1
Chapitre I.....	3
1. La biotechnologie au service de la population.....	3
1.1. Introduction.....	3
1.2. Les subdivisions de la biotechnologie.....	4
1.2.1. La biotechnologie verte.....	4
1.2.2. La biotechnologie rouge.....	4
1.2.3. La biotechnologie blanche.....	4
1.3. Historique évolutif des amylases.....	5
1.4. Définition de l'amylase.....	5
1.5. Nomenclature de l' α -amylase.....	6
1.6. L'amidon substrat des amylases.....	6
1.6.1. Définition de l'amidon.....	6
1.6.2. Structure de l'amidon.....	7
1.6.3. Propriétés de l'amidon.....	9
1.6.4. Abondance de l'amidon dans le règne végétal.....	10
1.6.5. Importance économique de l'amidon.....	10
1.7. Structure et mécanisme d'action de l'amylase.....	10
1.8. Classification des amylases.....	13
1.9. Répartition des amylases dans le monde vivant.....	14
1.9.1. L'origine animale.....	14
1.9.2. L'origine végétale.....	14
1.9.3. L'origine microbienne.....	15
1.9.3.2. L'amylase bactérienne.....	15
1.10. L'avantage de la production des enzymes par les microorganismes.....	15
1.11. Méthode de mesure de l'activité amylolytique.....	16
1.11.1. Diminution de l'intensité du complexe amidon-iode.....	16
1.11.2. Détermination de l'activité de dextrinisation.....	17
1.11.3. Sandstedt Kneen and Blish (SKB) method.....	17
1.11.4. Méthode de la pharmacopée indienne.....	17
1.11.5. Méthode de l'acide Dinitrosalicylique.....	17
1.11.6. La méthode de chute.....	18
1.11.7. Diminution de la viscosité de la suspension d'amidon.....	18
1.12. La Physiologie de la production des amylases.....	18
1.12.1. Source de carbone.....	18

1.12.2.	La source d'azote.....	19
1.12.3.	Rôle du phosphate	19
1.12.4.	Rôle du pH.....	19
1.12.5.	Effect de la temperature	19
1.12.6.	Les inducteurs et les répresseurs.....	20
1.13.	Applications industrielles et biotechnologiques des amylases	20
1.13.1.	En bioconversion de l'amidon	20
1.13.2.	En boulangerie.....	21
1.13.3.	En panification et biscuiterie	22
1.13.4.	En sucrerie.....	22
1.13.5.	En Désencollage des textiles.....	22
1.13.6.	En industrie des détergents	23
1.13.7.	Domaine médical et pharmaceutique	23
1.13.8.	Production d'alcool et du biocarburant	23
Chapitre II	24
2.	La dissection du genre <i>Bacillus</i> de la phylogénie à la systématique	24
2.1.	L'historique du genre <i>Bacillus</i>	24
2.2.	Description du genre <i>Bacillus</i>	25
2.3.	Caractères bactériologiques	26
2.4.	Habitat et écologie.....	27
2.5.	Taxonomie phénotypique du genre <i>Bacillus</i>	28
2.6.	La taxonomie génotypique du genre <i>Bacillus</i>	29
2.6.1.	<i>Bacillus</i> RNA groupe 1.....	29
2.6.2.	<i>Bacillus</i> RNA group 2	30
2.6.3.	<i>Bacillus</i> RNA groups 3 et 4	30
2.6.4.	<i>Bacillus</i> RNA group 5	31
2.6.5.	<i>Bacillus</i> RNA group 6	31
2.7.	Pouvoir pathogène du genre <i>Bacillus</i>	34
2.8.	Le genre <i>Bacillus</i> et la biotechnologie.....	34
2.9.	Intérêt de l'application du genre <i>Bacillus</i> en biotechnologie	35
2.10.	Production des amylases chez le genre <i>Bacillus</i>	35
2.11.	Régulation de la production des amylases	36
2.11.1.	Répression catabolique	36
2.11.2.	Régulation temporelle.....	36
2.12.	Méthodes de production des amylases à grande échelle	38
Matériel et méthodes	39

3.	Objectif.....	39
1.1.	Plan d'échantillonnage	39
3.1.	Prélèvements	47
3.1.1.	Prélèvement à partir des sols.....	47
3.1.2.	Prélèvement à partir des eaux	47
3.1.3.	Screening primaire.....	47
3.1.4.	Identification préliminaire du genre <i>Bacillus</i>	48
3.1.5.	Purification des souches amylolytiques	49
3.1.6.	Conservation des souches isolées	49
3.2.	Le screening secondaire des colonies productrices d'amylase.....	49
3.2.1.	Mesure de la zone d'hydrolyse	50
3.2.2.	Mesure de l'activité amylolytique sur milieu de culture liquide par La méthode DNSA 50	
3.2.3.	Etude de l'effet de la température sur l'activité et la stabilité des amylases.....	52
3.2.4.	Etude de l'effet du pH sur l'activité et la stabilité des amylases	52
3.3.	La sélection de la souche performante	53
3.4.	L'identification de l'espèce par la galerie API 20 E	53
1.2.	Interprétation probalistique des profils biochimiques par le Bacterial identification Program 54	
3.5.	L'identification moléculaire	54
3.5.1.	Extraction de l'ADN génomique	54
3.5.2.	L'amplification du gène de 16S rRNA	55
3.5.3.	L'électrophorèse sur gel d'agarose	56
3.6.	Le séquençage des gènes amplifiés (16S rRNA)	57
3.7.	Assemblage et correction des séquences brutes	58
3.8.	Soumission des séquences génétiques à la base de données Genbank	58
3.9.	Analyse phylogénétique des souches sélectionnées	58
3.10.	Optimisation de la production des amylases	59
3.10.1.	Optimisation de la concentration d'amidon	59
3.10.2.	Optimisation de la source d'azote.....	60
3.10.3.	Optimisation de l'inoculum	60
3.10.4.	Effet de différents sels minéraux sur la production de l'amylase.....	60
4.	Résultats	61
4.1.	La stratégie d'isolement.....	61
4.1.1.	Le screening primaire	61
4.2.	Screening secondaire des souches productrices d'amylase.....	68
4.2.1.	Mesure des diamètres de la zone d'hydrolyse.....	69

4.2.2.	Dosage des amylases sur milieu de culture liquide	71
4.3.	Identification de la souche sélectionnée performante par la galerie API 20 E	75
4.4.	Etude de la thermostabilité des amylases des souches isolées à partir des sources thermales 77	
4.5.	Identification génétique des souches sélectionnées.....	83
1.3.	Le séquençage, la correction et assemblage des gènes amplifiés	83
4.6.	Analyse et construction de l'arbre phylogénétique	85
4.7.	Optimisation des paramètres de la production des amylases	86
4.7.1.	Optimisation de la source d'azote	86
4.7.2.	Optimisation de la concentration d'amidon	87
4.7.3.	Optimisation de l'inoculum	88
4.7.4.	L'impact de quelques sels minéraux sur la production d'amylase chez la souche MK7 89	
	Discussion	91
	Conclusion	100
	Références bibliographiques	102

Liste des abréviations

A	:	Absorbance
ADH	:	Arginine dihydrolase
ARA	:	Arabinose
ARN	:	Acide ribonucléique
B	:	<i>Bacillus</i>
°C	:	Degré Celsius
DNSA	:	Dnitrosalicylic acide
DO	:	Densité Optique
FN	:	Falling number
GEL	:	Gélatine
GLU	:	Glucose
IOS	:	International Organization for Standardization
M	:	Masse
MAL	:	Maltose
MAN	:	Mannitol
ONPG	:	Orto-nitro-phényl- β -D- galactopyranoside
PCR	:	polymerase chain reaction
rpm	:	Rotation par minute
SKB	:	Sandstedt Kneen and Blish
SMF	:	Submerged fermentation
SSF	:	Solid state fermentation

Liste des tableaux

Tableau 1: Présentation de quelques exemples sur la production de l' α -amylase chez les microorganismes et leurs Propriétés physico-chimiques.

Tableau 2 : Présentation de certains produits de fermentation industrielle élaborés par certaines espèces du genre *Bacillus*.

Tableau 3: Présentation des sites du prélèvement de la catégorie A et leur codification.

Tableau 4: Présentation des sites du prélèvement de la catégorie B et les caractéristiques des eaux thermales.

Tableau 5: Présentation des propriétés morphologiques et biochimiques des isolats lors de l'identification préliminaire des isolats de la catégorie (A).

Tableau 6: Présentation des propriétés morphologiques et biochimiques des isolats lors de l'identification préliminaire des souches de la catégorie(B).

Tableau 7: Présentation des résultats de l'index d'activité amylolytique des isolats du genre *Bacillus*.

Tableau 8: Illustration du profil biochimique de la souche MK7.

Tableau 9: Présentation des numéros d'accessions, le pourcentage de similarité et l'identité des souches sélectionnées.

Liste des figures

Figure 1: Présentation de la structure en hélice d'amylose

Figure 2: Structure de l'amylose (A) et l'amylopectine (B).

Figure 3: Structure tridimensionnelle de l' α -amylase humaine.

Figure 4: Structure tridimensionnelle de l' α -amylase fongique.

Figure 5: Transformation enzymatique de l'amidon en sirop de glucose de maltose et de fructose.

Figure 6: L'accumulation des espèces appartenant au genre *Bacillus* à travers les années.

Figure 7: Observation microscopique du genre *Bacillus sp.*

Figure 8: La formation de l'endospore chez *Bacillus subtilis*. (A) microscopie à fluorescence de *Bacillus subtilis*. (B) une coupe transversale à partir d'une endospore maturée appartenant au genre de *Bacillus subtilis*.

Figure 9: Arbre phylogénétique des espèces du groupe RNA 1, 2 et 5.

Figure 10: Arbre phylogénétique des espèces du groupe RNA 3, 4 et 6. Les pointillés indiquent l'incertitude de l'ordre au cours de laquelle les lignées divergent les uns des autres.

Figure 11: Contrôle de la biosynthèse d'amylase chez *Bacillus subtilis*

Figure 12:Présentation du site de prélèvement (MK) Oued Mekerra de Sidi Bel Abbès.

Figure 13:Présentation du site de prélèvement TMP (Pomme de terre).

Figure 14:Présentation du site de prélèvement (LAK) lac de Sidi Mohamed Benali de Sidi Bel Abbès.

Figure 15:Présentation du site de prélèvement Step de station d'épuration de Sidi Bel Abbas.

Figure 16:Présentation du site du prélèvement Hammam Chiguer (HC).

Figure 17:Présentation du site de prélèvement Hammam ment Boughrara (HBG).

Figure 18:Présentation du site de prélèvement Hammam Bouhdjar (HBH).

Figure 19:Présentation du site de prélèvement Source thermique de Sidi Aiède (HS).

Figure 20:Présentation du site de prélèvement Hammam Ouarsenis (HO).

Figure 21:Présentation du site de prélèvement Hammam Bouhanifia (HB).

Figure 22:Détermination du type respiratoire.

Figure 23:Réduction de l'acide 3,5 dinitrosalicylique par un sucre réducteur lors du dosage de l'activité amylolytique par la méthode DNSA

Figure 24:Présentation de la galerie API 20E avant l'inoculation par la souche performante.

Figure 25:Capture d'écran de la grille d'identification dans l'onglet des résultats du Bacterial Identification Program

Figure 26:Schéma récapitulatif des étapes de séquençage selon la méthode de Sanger.

Figure 27:Capture d'écran du programme MEGA 6 Software lors de la construction de l'arbre phylogénétique.

Figure 28:Formation de la zone d'hydrolyse d'amidon autour des colonies productrices des amylases.

Figure 29:La diversité de l'aspect macroscopique des souches isolées et présence d'un mélange de formes, couleurs et de consistances des colonies.

Figure 30:La mise en évidence du test catalase chez les souches isolées, sélectionnées productrices de l'amylase, lors de l'identification préliminaire.

Figure 31:La coloration de Gram et l'observation microscopique de quelques isolats

Figure 32:Illustration de la zone d'hydrolyse formée autour de la colonie productrice d'amylaseensemencée par stries.

Figure 33:Estimation de la production d'amylase par la méthode DNSA chez les souches isolées à partir du site (MK).

Figure 34:Estimation de la production d'amylase par la méthode DNSA chez les souches isolées à partir du site (MW).

- Figure 35:** Estimation de la production d'amylase par la méthode DNSA chez les souches isolées à partir du site (STEP).
- Figure 36:** Estimation de la production d'amylase par la méthode DNSA chez les souches isolées à partir du site (SMM).
- Figure 37:** Estimation de la production d'amylase par la méthode DNSA chez les souches isolées à partir du site (LAK).
- Figure 38:** Estimation de la production d'amylase par la méthode DNSA chez les souches isolées à partir du site (TMP).
- Figure 39:** Aspect de la galerie API 20E, inoculée par la souche MK7 après l'incubation à une température 30°C pendant 24 heures.
- Figure 40:** Capture d'écran de l'affichage de l'onglet d'identification de la souche MK7 Par le Bacterial Identification Program
- Figure 41:** Illustration des optima de température des amylases à partir des isolats du prélèvement HC.
- Figure 42:** Illustration des températures optimales des amylases à partir des isolats du prélèvement HS.
- Figure 43:** Illustration des températures optimales des amylases à partir des isolats du prélèvement HB.
- Figure 44:** Illustration des températures optimales des amylases à partir des isolats du prélèvement HBH.
- Figure 45:** Illustration des températures optimales des amylases à partir des isolats du prélèvement HO.
- Figure 46:** Illustration des températures optimales des amylases à partir des isolats du prélèvement HBG.
- Figure 47:** L'impact de la température sur l'activité des amylases des souches sélectionnées
- Figure 48:** L'influence du pH sur l'activité des amylases des souches sélectionnées
- Figure 49:** L'électrophorèse sur gel d'agarose des fragments ADN amplifiés, codant le gène de 16s rRNA des souches HBH2, HBH5, HBH6, HC2.
- Figure 50:** La composition en paires de bases de la séquence consensus du gène codant la sous unité ribosomale 16s de la souche HC.

Figure 51:Arbre phylogénétique présentant la distance évolutive entre les souches sélectionnées et d'autres taxons en utilisant la méthode la barre indique 0.01 substitutions par position de nucléotide.

Figure 52:L'effet de la source d'azote sur la quantité d'amylase produite chez la souche MK7

Figure 53:L'effet de la concentration d'amidon sur la quantité d'amylase produite chez la souche MK7

Figure 54:L'effet de la concentration d'inoculum sur la quantité d'amylase produite chez la souche MK7.

Figure 55:L'effet de quelques sels minéraux sur la production d'amylase chez la souche MK7.

Liste des annexes

- ✚ **Travaux réalisés dans le cadre de la thèse**
- ✚ **Annexe A : La composition des milieux de culture utilisés**
- ✚ **Annexe B : mode d'emploi de la galerie API20 E**
- ✚ **Annexe C : le logiciel PIBWIN**
- ✚ **Annexe D : Description des séquences d'ADN 16S RNA des souches sélectionnées**

Introduction générale

Les amylases constituent une classe d'enzyme industrielle ayant approximativement une part de 30% du marché mondial des enzymes (**Van der Maarel, 2002**). Elle figure parmi les principales enzymes impliquée dans la dégradation des molécules d'amidon pour donner des produits divers, y compris les dextrans et les polymères progressivement plus petits composée d'unités de glucose (**Larpen et al., 1992**).

Ces enzymes sont d'une grande importance en matière de biotechnologie d'aujourd'hui avec des applications allant de la nourriture, la fermentation, du textile aux industries du papier. Bien que les amylases puissent être tirées de plusieurs sources : plantes, animaux et microorganismes, ces derniers représentent une source de choix et répondent généralement aux exigences du secteur industrielles. Les bactéries appartenant au genre de *Bacillus* sont de loin les bactéries les plus utilisées pour la production des amylases car elles sont considérées comme de bons hôtes pour ce secteur industriel (**Emanuel et al., 2009**).

De nos jours, un grand nombre d'amylases microbiennes sont disponibles dans le commerce et ils ont presque complètement remplacé hydrolyse chimique dans l'industrie de transformation de l'amidon (**Pandey et al., 2000**). Les amylases thermostables sont plus polyvalentes que les thermolabile car elles ont une stabilité opérationnelle plus élevée et une durée de vie plus longue à des températures élevées (**Niehaus et al., 1999**). Avec la disponibilité d'amylases thermostables un certain nombre de nouvelles possibilités pour les procédés industriels ont vu le jour car ces dernières couvrent les besoins de ces technologies (**Demirijan et al., 2001**).

Le nord-ouest algérien est une région caractérisée par la présence de ressources naturelles impressionnante ainsi qu'une multitude de sources thermales et de stations géothermiques montrant une riche biodiversité qui reste microbiologiquement inexplorée dans son intégrité. Voilà pourquoi il est intéressant d'explorer ces niches spéciales dans le but d'isoler de nouvelles bactéries thermophiles et nouvelles amylases thermostables.

L'objectif de ce travail est l'isolement d'une large gamme de bactéries appartenant au genre *Bacillus* à partir de différents sites du territoire Algérien et l'étude de leur pouvoir de production des amylases.

Ensuite, l'identification des souches isolées, sélectionnées productrices des amylases par l'amplification et le séquençage des fragments ADN de la région ARN 16S.

Dans un dernier temps et dans le but d'augmenter la production des amylases un nombre important de paramètres impliqués dans la physiologie production des amylases tels que la concentration de substrat, la source d'azote, concentration de l'inoculum et l'effet de quelques éléments minéraux sont optimisés.

Chapitre I

1. La biotechnologie au service de la population

1.1. Introduction

La biotechnologie en sa plus simple définition est considérée comme l'ensemble des technologies, dont le principe est basé sur la biologie cellulaire, moléculaire, appliquée à la production des biens et services et l'amélioration de la qualité de vie et la santé publique, la création de la richesse et préservation de la planète. Etant donné que ce domaine soit assez nouveau comme champ d'étude, l'homme a fait usage des processus biologiques et des microorganismes depuis la nuit des temps notamment dans la fromagerie, la panification et la vinification. Cette branche passionnante est en constante évolution a connu une extraordinaire expansion et des inconcevables découvertes.

La biotechnologie moderne marche sur les talons des problématiques qui préoccupent l'humanité. Ça principale mission est de lutter contre les maladies rares en découvrant d'infaillibles médicaments, affronter la famine et nourrir la population ainsi que générer de l'énergie propre sans nuire à l'environnement.

Actuellement, plus de 250 produits biotechnologiques de santé et des vaccins sont disponibles sur le marché pour les patients atteints de maladies auparavant incurables. Plus de 18 millions d'agriculteurs dans le monde utilisent la biotechnologie agricole pour augmenter les rendements, prévenir les dommages d'insectes et les ravageurs et réduire l'impact de l'agriculture sur l'environnement. Plus de 50 bioraffineries sont construites en Amérique du Nord pour l'affinage des technologies, la production des biocarburants et des produits chimiques issus de la biomasse renouvelable qui peuvent intervenir dans la réduction des émissions de gaz à effet de serre.

A cet effet, les scientifiques ont structurés la biotechnologie en trois subdivisions, suivant son domaine d'application et par la suite on a vu apparaitre : la biotechnologie verte, la biotechnologie rouge et la biotechnologie blanche.

1.2. Les subdivisions de la biotechnologie

1.2.1. La biotechnologie verte

La biotechnologie verte touche à l'agriculture et à l'alimentation, et emploie l'outil du génie génétique pour transférer certains gènes d'une espèce à une autre et améliorer de façon ciblée la résistance aux insectes, champignons, aux virus et aux herbicides afin d'augmenter les rendements agricoles avec un coût minimal.

Elle a pour but le développement des cultures avec des profils nutritionnels améliorés, qui résolvent les carences en vitamines et en éléments nutritifs et la production d'aliments sans allergènes et des toxines telles que les mycotoxines.

1.2.2. La biotechnologie rouge

Elle est fortement liée à la médecine et développe des conceptions pour la production des antibiotiques, l'utilisation de thérapies géniques et diagnostiquer à l'aide de puces à ADN ou de biocapteurs et la création d'outils et appareillage plus précis pour la détection des maladies.

1.2.3. La biotechnologie blanche

Dite industrielle, Bien au-delà du secteur pharmaceutique, les biotechnologies blanches jouent un rôle croissant dans la bio-industrie, notamment dans la rubrique des biocatalyseurs et les enzymes (Amylase, protéase, Lipase... etc.) qui interviennent dans les processus innovant des astucieuses industries.

Notre thématique soulève le voile sur le mécanisme et la physiologie de la production de l'amylase, enzyme très précieuse, considérablement recherchée par les industriels.

1.3. Historique évolutif des amylases

L'amylase figure parmi les plus importantes enzymes industrielles, a fait l'objet de plusieurs études. En effet, observée par Kirchhoff en 1811 lors de la dégradation de l'amidon (**Emanuel *et al.*, 2009**). Durant l'année 1831, **Leuchs** découvrait l'action digestive de la salive sur l'amidon (**Leuchs, 1947**). Payen et Persoz ont découvert une substance dotée d'une activité amylolytique dans le malte, récupérée par précipitation avec l'alcool (**Payen and Persoz, 1833**).

Märker a rapporté en 1878 que l'amylase du malt est composée de deux enzymes différentes (**Märker, 1878**). Quelques années plus tard, **Ohlsson** a suggéré la classification de cette enzyme en α et β -amylases en fonction de la conformation anomérique des sucres produits par la réaction enzymatique.

En 1950 **Myrbäck and Neimuler** ont proposé une autre classification de l'amylase en se basant sur le mode d'action et la présence de l'exoamylase et l'endoamylase (**The Amylase Research Society Of Japan, 1988**).

Cette valeureuse enzyme a attirée largement l'attention des chercheurs avec l'apparition de l'émergence de groupement de scientifiques qui focalisent leur efforts sur l'élucidation du mode d'action, qui reste à l'époque encore mystérieux. L'accumulation des données concernant cette enzyme a attiré l'attention des industriels vers une possibilité d'exploitation, et le marché mondial des enzymes est estimé à 1.6 milliard de Dollars, dont l'amylase détient la part majeure avec environ de 25% (**Burhan, 2007**).

Par conséquence, des grandes firmes apparues sont considérées comme des Géants dans le domaine telles que Novo Nordisk A/S, Genencor International Inc., Gist-Brocades, Solvay and Showa Denko.

1.4. Définition de l'amylase

L' α -amylase est la principale enzyme impliquée dans la dégradation de l'amidon. Selon la commission des enzymes (EC), α -amylase appartient à la troisième classe, celle des hydrolases [α -(1,4)-D- glucanohydrolase (E.C.3.2.1.1)]. Cette enzyme dégrade l'amidon, le glycogène et certains polysaccharides, par rupture des liaisons glycosidiques α -(1,4) (**Larpen, 1992**).

L' α -amylase est une endoamylase qui hydrolyse au hasard les liaisons osidiques (1,4), de l'amylose, de l'amylopectine, de l'amidon et du glycogène et l'exclusion des liaisons terminales de ces chaînes. Elle provoque la libération du glucose, du maltose et surtout des dextrans (**Kelly et al., 1997**).

1.5. Nomenclature de l' α -amylase

L'action de l' α -amylase est de type endo-moléculaire, qui conduit à la formation du D-glucose, du maltose et d'une petite quantité de maltodextrines. L' α -amylase hydrolyse les molécules d'amidon exactement au niveau de la liaison α (1-4) glucanes (**Mercier, 1982**).

- **Nom systématique** : α -(1-4) D-glucane glucanohydrolase.
- **Nom codifié** : E.C .3.2.1.1
- **Nom recommandé** : Alpha-amylase.
- **Synonymes**: glycogenase, endoamylase, maxilase, taka-amylase A, thermolase, clarase, amylopsin (**Graber, 1989**).

1.6. L'amidon substrat des amylases

L'amidon est une macromolécule glucidique présente chez de nombreux végétaux, Notamment dans les organes de réserve comme le tubercule de pomme de terre et dans les graines (blé, maïs, riz,...etc.) où il constitue une forme de stockage du glucose. Il s'agit d'un polyside de structure moléculaire proche de celle du glycogène, forme de stockage du glucose rencontrée chez les animaux et certaines microorganismes (**Nadirman et al., 2002**).

1.6.1. Définition de l'amidon

L'amidon (du latin amyllum, non moulu) est un glucide complexe (polyside) composé de chaînes de molécules de D-Glucose. Il s'agit d'une molécule de réserve énergétique pour les végétaux supérieurs et un constituant essentiel pour l'alimentation humaine. Il est composé de deux substances différentes : l'amylose (15-30%) et l'amylopectine (70-85%), Le ratio entre l'amylose et l'amylopectine dépend de la source botanique de l'amidon (**Maki et al., 2012**).

1.6.2. Structure de l'amidon

1.6.2.1. L'amylose

L'amylose est un polysaccharide linéaire constitué par des unités de D-glucopyranose reliées par des liaisons α (1--4) et possédant une masse moléculaire variant de 15000 à 600000. L'unité disaccharidique de base est le maltose.

La molécule d'amylose tend à prendre une structure hélicoïdale, stabilisée par des liaisons hydrogène et contenant 6 à 7 résidus glucosyle par tour de spire. L'iode réagit avec l'amylose pour donner un complexe d'inclusion bleu foncé. Cette propriété est une conséquence de la structure hélicoïdale. En effet, le centre de l'hélice présente de nombreux points hydrophobes permettant la formation des complexes avec l'iode dont les molécules se placent parallèlement à l'axe de l'hélice.

En solution aqueuse, l'amylose a tendance à former des agrégats moléculaires entraînant la précipitation du polysaccharide. C'est le phénomène de rétrogradation, intervenant dans la fluidification des colles et empois mais également dans le durcissement du pain rassis (**Percheron, 1981**).

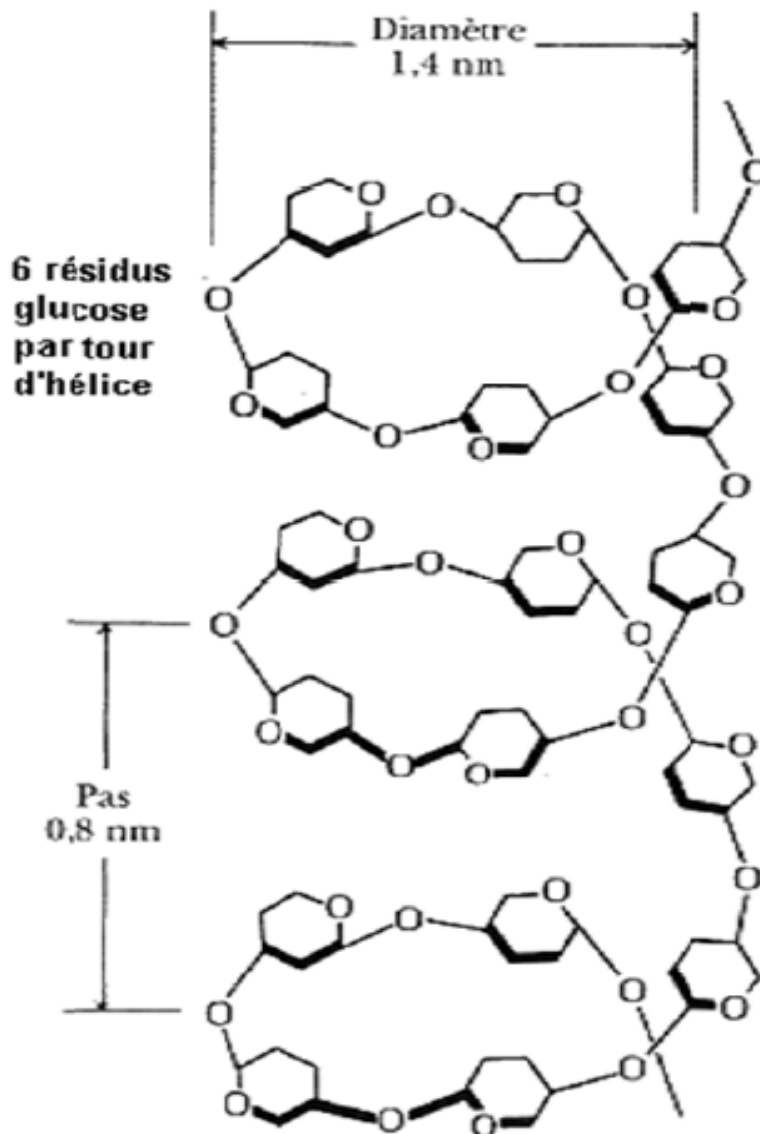


Figure 1:Présentation de la structure la structure en hélice d'amylose (Chiba, 1988).

1.6.2.2. L'amylopectine

L'amylopectine est un polysaccharide ramifié, constitué par des chaînes formées d'unités de D-glucopyranose reliées par des liaisons $\alpha(1-4)$; ces chaînes réunies entre elles par des liaisons $\alpha(1-6)$. Il existe environ un branchement de 20-25 unités de D-glucose. La molécule présente une structure arborescente. L'industrie des colles et d'adhésifs utilise des dextrines, produits issues de la dégradation partielle de l'amidon, constitués de courtes chaînes de restes de D-glucopyranoses reliés par des liaisons $\alpha(1-4)$ (Percheron, 1981).

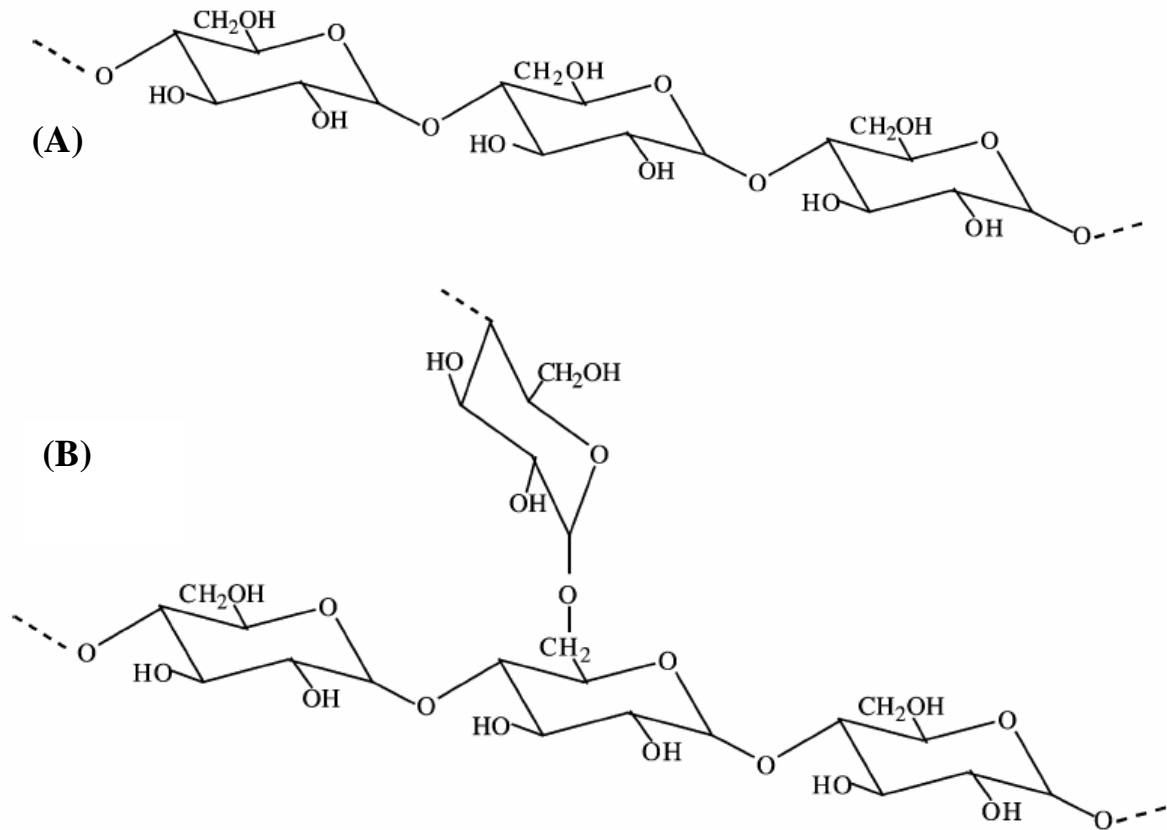


Figure 2 : Structure de l'amylose (A) et l'amylopectine (B) (Muralikrishna, 2005)

1.6.3. Propriétés de l'amidon

- L'amidon est insoluble dans l'eau froide et forme un empis dans l'eau chaude ;
- insoluble dans les solvants organiques ;
- L'amidon peut également être solubilisé par un traitement à l'acide chlorhydrique ;
- L'amidon s'hydrolyse par action enzymatique en présence d'amylase ;
- L'amidon se colore en bleu avec la solution de Lugol.

1.6.4. Abondance de l'amidon dans le règne végétal

L'amidon est le polysaccharide de réserve du règne végétal, il est localisé dans les cellules parenchymateuses sous forme de granules (amyloplastés). Il est particulièrement abondant chez certaines espèces, qui constitue les principaux aliments glucidiques de l'homme (graine de céréales telles que blé, maïs, riz et certains tubercules tels que les pommes de terre) (**Percheron, 1981**).

1.6.5. Importance économique de l'amidon

L'amidon est largement utilisé dans l'industrie agro-alimentaire dans la production des boissons, confiseries, boulangeries. L'industrie chimique utilise des procédés de fermentation pour la production de bioéthanol, les traitements de surface, la formulation de colles, l'encapsulation de produits pharmaceutiques, les cosmétiques, la papeterie et les matières plastiques biodégradables. L'empois d'amidon est autrefois utilisé pour l'empesage des vêtements. L'amidon issu de céréales est utilisé dans la production des édulcorants tels que le sirop d'orge malté, le sirop de maïs, le sirop de riz brun, le sirop de maïs à haute teneur en fructose (**Maki et al., 2012**).

1.7. Structure et mécanisme d'action de l'amylase

L'amylase a une structure tridimensionnelle capable de lier le substrat par le baïlet de l'action extrêmement spécifique de son groupe catalytique, et stimule la dégradation de la liaison glycosidique (**Monteiro et al., 2010**). L'amylase humaine est composée de 512 acides aminés avec un poids moléculaire de 57.6 kDa, contient du calcium (**Whitcomb, 2007**).

La protéine est constituée de 3 domaines : A, B, et C (**Figure 3**). Le domaine A est le plus large, représentant une forme typique de Tonneau (β/α)₈ comme super structure. Le domaine B est inséré entre les domaines A et C, attaché au domaine A par un pont disulfure. Le domaine C a une structure de feuillet β est lié au domaine A par une simple chaîne polypeptidique et qui semble être un domaine indépendant avec une fonction inconnue. Le site actif de l'amylase est situé dans une crevasse entre la terminaison carboxyle du domaine A et B. Le calcium (Ca^{2+}), localisé entre les domaines A et B et qui semble avoir un rôle important dans la stabilité de la structure tridimensionnelle et un activateur allostérique.

La liaison des analogue de substrat suggère que Asp206, Glu230 and Asp297 participent a la catalyse (**Muralikrishna, 2005**). Le site de liaison du substrat contient 5 sous-unités avec le site catalytique positionné à la sous unité 3. Le substrat peut se lier au premier résidu glucose des sous-unités 1 ou 2 permettant le clivage entre le premier et le deuxième ou le troisième glucose (**Whitcomb, 2007**).



Figure 3:Structure tridimensionnelle de l' α -amylase humaine. Le domaine A en rouge, le domaine B en jaune et en bleu le domaine C. le site catalytique au centre, l'ion du calcium en sphère bleue et l'ion chloride en sphère jaune. Et la structure verte représente une liaison avec le site catalytique et le site liaison (**Payan, 2004**).

Les amylases sont des métallo-enzymes à calcium (un ion calcium par molécule d'enzyme). Ces ions sont nécessaires à l'activité enzymatique et au maintien de la stabilité de la structure en acides aminés de l'enzyme qui varient d'une souche à une autre (**Fogarty et al, 1980**). L' α -amylases de *Bacillus amyloliquefaciens* et *Aspergillus oryzae* sont des glycoprotéines et renferment 478 acides aminés répartis en 2 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 8 feuillets β plissés et de 8 hélices α (**Chiba, 1988 ; Burhan, 2003**).

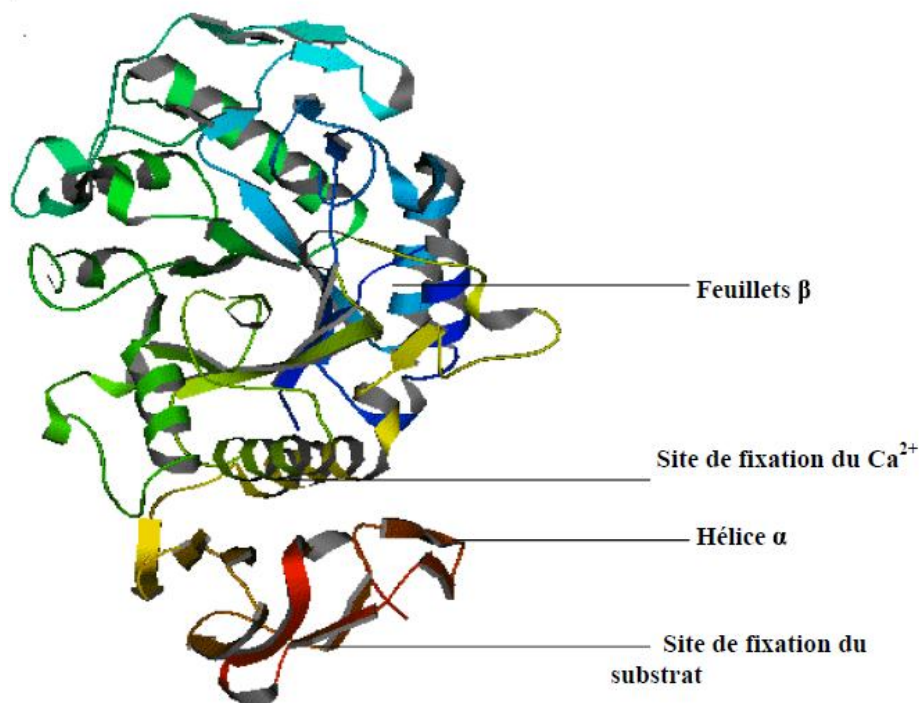


Figure 4 : Structure tridimensionnelle de l' α -amylase fongique (**Priestle, 1988**).

Les modalités d'action des enzymes dépendent de leur origine ; elles hydrolysent les liaisons α (1 \rightarrow 4) de l'amylose et l'amylopectine de l'amidon (l'amylose 25-30%), l'amylopectine (70-75%) (**Figure 2**), l'exclusion des liaisons terminales de ces chaînes (**Parkc et al., 1997**). L'attaque aléatoire de l' α -amylase sur l'amylose conduit à une dégradation rapide du substrat en maltose et en maltotriose, avec une absence de coloration iodique.

Cependant, l'amylopectine donne en plus du glucose, du maltose et du maltotriose et persiste des dextrines limites contenant des ramifications en α (1 \rightarrow 6) (**Parkc et al., 1997**). Le mécanisme d'action de l' α -amylase nécessite la participation de 3 fonctions du site actif impliquant un attaquant nucléophile, un stabilisateur de la charge positif 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 dans les conditions expérimentales telles que la Température, pH, taille et l'action des α -amylases :

- 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, afin d'hydrolyser les liaisons glucosidiques sans se dissocier du substrat (**Berry et Paterson, 1990**).

1.8. Classification des amylases

Les amylases peuvent être divisées en deux catégories **endoamylases** et **exoamylases**. Les endoamylases catalysent l'hydrolyse à l'intérieur de la molécule d'amidon d'une manière aléatoire. Cette action provoque la formation d'oligosaccharides linéaires et ramifiés de diverses longueurs de chaîne. Les exoamylases hydrolysent l'extrémité non réductrice, pour donner successivement des produits finaux plus courts. (**Gupta et al., 2003**).

1.9. Répartition des amylases dans le monde vivant

Les amylases sont universellement distribuées à travers les règnes végétal, animal et microbien. Aux cours de la dernière décennie, des recherches considérables ont été entrepris avec l' α -amylase extracellulaire étant produite par une grande variété de micro-organismes. L'avantage majeur de l'utilisation des microorganismes pour la production des amylases est la capacité de production à grande échelle ainsi que la facilité de manipulation pour obtenir des enzymes avec des caractéristiques souhaitées (**Lonsane *et al.*, 1990**). l' α -amylase a été dérivée de plusieurs champignons, levures, bactéries et actinomycètes, Cependant, les enzymes d'origine bactérienne ont dominés les applications dans les secteurs industriels (**Pandey *et al.*, 2000**).

1.9.1. L'origine animale

Les amylases d'origine animale sont généralement extraites à partir de la salive et du pancréas des mammifères. Les α -amylases animales sont incapables d'hydrolyser la liaison α (1 \rightarrow 6) de l'amylopectine ou du glycolyse oligosaccharides, l'hydrolyse complète de l'amylose et de l'amylopectine par les α -amylases animales donne respectivement du maltose et du D-glucose pour l'amylose et du glucose, maltose et des dextrans limites pour l'amylopectine (**Coolbear *et al.*,1992**).

1.9.2. L'origine végétale

Les α -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 qui sont la source énergétique nécessaire à la germination et elles sont généralement incapable d'hydrolyser le maltose (**Octávio *et al.*,2000**). Ces enzymes végétales sont synthétisées par un mécanisme cellulaire compliqué 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 al.*,1993**).

1.9.3. L'origine microbienne

1.9.3.1. L'amylase fongique

La production industrielle d'enzymes à partir des microorganismes fongiques, parmi les 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 al., 1994**).

1.9.3.2. L'amylase bactérienne

Ce type d'enzyme est obtenue principalement par des fermentations de Bacillacées (**Milner et al., 1997**). *Bacillus amyloliquefaciens*, *B. licheniformis* ont été caractérisées comme souches productrices d'enzymes d' α -amylase (**Bousseboua, 2002**). De nombreuses amylases de propriétés industrielles ont été découvertes chez des bactéries acidophiles, alcalinophiles et thermophiles. Ces enzymes interviennent dans la transformation de l'amidon par fragmentation rapide en clivant les liaisons α (1→4) (**Nadirman et al., 2006**).

1.10. L'avantage de la production des enzymes par les microorganismes

Le développement de la microbiologie a permis de mieux comprendre les systèmes qui président à la synthèse des enzymes chez les microorganismes. La production industrielle d'enzymes s'est orientée vers les procédés fermentaires. Les principaux avantages des enzymes de fermentation par rapport aux enzymes d'extraction sont les suivant :

- Une production indépendante des contraintes saisonnières et géographiques ;
- Une possibilité d'utilisation de matières premières bon marché ;
- Des rendements de production pouvant être augmentés de façon importante par l'amélioration des souches microbiennes par génie génétique et l'optimisation des conditions de fermentation (**Scriban, 1982**).

Tableau 1: Présentation de quelques exemples sur la production de l' α -amylase chez les microorganismes et leurs Propriétés physico-chimiques

microorganisme	T° optimale(C°)	pH optimal	PM (D)	références
Bactéries				
<i>Bacillus sp</i>	60	11-12	96.000	Kim <i>et al.</i> ,(1995)
<i>Bacillus subtilis</i>			59.000	Brumm <i>et al.</i> ,(1991)
<i>Bacillus licheniformis</i>	45-55	6,5-8,5	56.000	Ramesh et al (1990)
Moisissure				
<i>Aspergillus awamori</i>	50	4.8 - 5.0	54.000	Bhella <i>et al.</i> ,tosar(1985)
<i>Aspergillus flavus</i>	55	6.0	52.500	Khoo <i>et al.</i> ,(1994)
<i>Aspergillus fumigatus</i>	40	5,5	65,000	Plancho colona, (1995)
Levures				
<i>Saccharomycopsis Cerevisiae</i>	60	5.0	--	Olasupo <i>et al.</i> ,(1996)

1.11. Méthode de mesure de l'activité amylolytique

L'amylase est généralement analysée par l'utilisation de l'amidon soluble comme substrat. Cette enzyme catalyse l'hydrolyse des liaisons glycosidiques α -1,4 de l'amidon pour produire du glucose, des dextrines et des dextrines limites. La réaction est suivie par une augmentation du taux de sucres ou par une diminution de l'intensité de la couleur du complexe (amidon-Lugol) du substrat traité ainsi que la diminution de la viscosité de la suspension d'amidon (Gupta *et al.*, 2003).

1.11.1. Diminution de l'intensité du complexe amidon-iodé

L'amidon forme un complexe bleu foncé avec l'iode. Avec hydrolyse progressive, l'amidon se transforme en rouge brun. Plusieurs protocoles ont été décrits pour la détermination quantitative de l'amylase sur la base de cette propriété. Cette méthode détermine l'activité dextrinisation de l'amylase en termes de diminution de la réaction de couleur d'iode.

1.11.2. Détermination de l'activité de dextrinisation

Dans le but de mesurer l'activité de dextrinisation de l' α -amylase, l'amidon soluble est utilisé comme substrat et la réaction est stoppée par l'ajout du HCl dilué, par la suite une solution d'iode est ajoutée pour la révélation. La diminution de l'absorbance à 700 nm est ensuite mesurée par rapport à une unité de contrôle. Une unité d'activité enzymatique est considérée comme étant la quantité d'enzyme capable d'hydrolyser 0,1 mg d'amidon sous condition standard (**Muhammad *et al.*, 2005**).

1.11.3. Sandstedt Kneen and Blish (SKB) method

La méthode SKB est largement adoptée dans la détermination de l'activité des amylases dans l'industrie boulangère. L'activité de la plupart des amylases commerciales est décrite en termes d'unité SKB. Cette méthode est généralement utilisée pour exprimer la force diastasique du malt (**Kulp , 1993**).

1.11.4. Méthode de la pharmacopée indienne

La méthode de la pharmacopée indienne est utilisée dans le calcul l'activité de l' α -amylase en termes de grammes d'amidon digéré par un volume donné de l'enzyme. Cette procédure implique d'incubation de la préparation enzymatique dans une gamme de dilutions dans le substrat d'amidon tamponné à 40°C pendant une heure. Les solutions sont ensuite traitées avec une solution d'iode. Le tube présentant une couleur bleue est ensuite utilisé pour le calcul de l'activité en termes de grammes d'amidon digéré. Cette méthode est généralement employée pour l'estimation de l'activité de α -amylase dans les céréales (**Indian standard, 1982**).

1.11.5. Méthode de l'acide Dinitrosalicylique

Cette méthode permet la détermination de l'augmentation de la réduction des sucres résultant de l'action de l'amylase sur son substrat. Le principe de cette technique se base sur la réduction de l'acide Dinitrosalicylique (DNSA) par les produits finaux de la dégradation de l'amidon, présent dans le milieu réactionnel sous forme de glucose, maltose et d'autres dextrines (**Gupta *et al.*, 2003**). Une lecture s'effectue par mesure de l'absorbance à une longueur d'onde de 540nm à l'aide d'un spectrophotomètre.

1.11.6. La méthode de chute

La méthode Falling Number (FNM) standardisée mondialement est utilisée pour l'évaluation de l'activité céréalière lors du control de la qualité du blé et de l'orge (**IOS, 1974**) et permet de calculer l'indice de chute, fortement lié à l'activité des amylases lors de la germination de la graine.

1.11.7. Diminution de la viscosité de la suspension d'amidon

Cette méthode est généralement utilisée dans le secteur de la boulangerie afin d'évaluer la qualité de la farine par la mesure de diminution de la viscosité de la suspension d'amidon, qui présente un critère très recherché dans la panification et l'industrie boulangère (**Gupta et al., 2003**).

1.12. La Physiologie de la production des amylases

La production des amylases par fermentation submergée (SMF) et la fermentation à l'état solide (SSF) ont été examinées minutieusement. Elles sont affectées par une variété de facteurs physico-chimiques. La composition du milieu de croissance, le pH du milieu, la concentration de phosphate, de l'âge inoculum, la température, l'aération, la source de carbone et source d'azote constituent des facteurs physiologiques majeurs (**Lonsane et al., 1990**).

1.12.1. Source de carbone

La source de carbone constitue l'un des facteurs primordiaux exigés pour la croissance des bactéries, car il s'emble que l'amylase est une enzyme inductible, généralement induite en présence du substrat l'amidon ou de ses dérivés obtenus lors de l'hydrolyse (**Morkeberg et al., 1995**). Dans certains cas, la présence du glucose, du fructose et du lactose peuvent réprimés la synthèse de cette enzyme.

1.12.2. La source d'azote

La physiologie de la synthèse des amylases chez les bactéries a motivée les chercheurs dans le domaine de la biotechnologie des enzymes. En conséquence des sources d'azote organiques et minérales ont été étudiées cependant les sources d'azotes organique sont préférées pour la production des amylases. Par ex l'extrait de levure a été utilisé dans la production d'une α -amylase à partir de *Streptomyces sp* et *Bacillus sp*. De même d'autre source peuvent être utilisées comme extrait de bœuf, peptone....etc. pour la production des amylases par des souches bactériennes (McMahon *et al.*, 1999).

1.12.3. Rôle du phosphate

Le phosphate joue un rôle régulateur important dans la synthèse des métabolites primaires et secondaires chez les micro-organismes et affecte considérablement la croissance de l'organisme et la production de l' α -amylase. Des résultats similaires ont démontré avec *B. amyloliquefaciens* où de faibles niveaux de phosphate ont abouti à une croissance sévèrement faible et pas de production d'amylase. En revanche, les concentrations de phosphate élevées étaient inhibitrices de la production d'enzymes par *B. amyloliquefaciens* (Hillier *et al.*, 1997).

1.12.4. Rôle du pH

Parmi les paramètres physiques, le pH du milieu de croissance joue un rôle important par induction des changements morphologiques de l'organisme et de la sécrétion de l'enzyme. La plupart des souches de *Bacillus* utilisées commercialement dans la production des amylases par SMF ont préféré une valeur de pH optimal de la croissance comprise 6,0-7,0 (Gupta *et al.*, 2003).

1.12.5. Effect de la temperature

L'influence de la température sur la production d'amylase est fortement liée à la croissance de l'organisme. L' α -amylase est produite à un éventail beaucoup plus large de température chez les bactéries. (Castro *et ses collaborateurs* (1992) ont rapporté que la production de l'amylase chez *B. amyloliquefaciens* continue à une température de 36°C.

1.12.6. Les inducteurs et les répresseurs

L'inducteur doit être présent et le milieu ne doit pas contenir de substances répressives. L'amidon est un bon inducteur pour la production des amylases. Les produits de la réaction enzymatique peuvent également agir comme inducteurs : maltodextrines pour l'amylase de *Bacillus stearothermophilus*. La synthèse des amylases est réprimée par la présence des produits finaux de la réaction enzymatique ex glucose pour l'amylase fongique (Larpent, 1992).

1.13. Applications industrielles et biotechnologiques des amylases

En raison de leur productivité et leur thermostabilité, les amylases sont largement utilisées dans l'industrie alimentaire, pharmaceutique, textile, papeterie, et détergent (Behal *et al.*, 2006). Avec l'arrivée de nouvelles frontières en biotechnologie, le spectre d'application des amylases s'est élargi vers d'autres domaines, comme la chimie clinique, médicale et analytique (Pandey *et al.*, 2000).

1.13.1. En bioconversion de l'amidon

Les α -amylases sont largement utilisées dans l'industrie boulangère, qui interviennent dans l'hydrolyse de cette macromolécule en sirops de glucose et fructose dans les procédés de liquéfaction (Nielsen, 2007). Initialement, l' α -amylase de *Bacillus amyloliquefaciens* est utilisée, remplacée par l' α -amylase de *Bacillus stearothermophilus* ou *Bacillus licheniformis* (Tester, 2004). Les enzymes en provenance des espèces du genre *Bacillus* sont d'un intérêt spécial pour les procédés biotechnologiques à grande échelle en raison de leur remarquable thermostabilité et de leurs systèmes d'expression efficaces sont disponibles pour ces enzymes (Prakash, 2009).

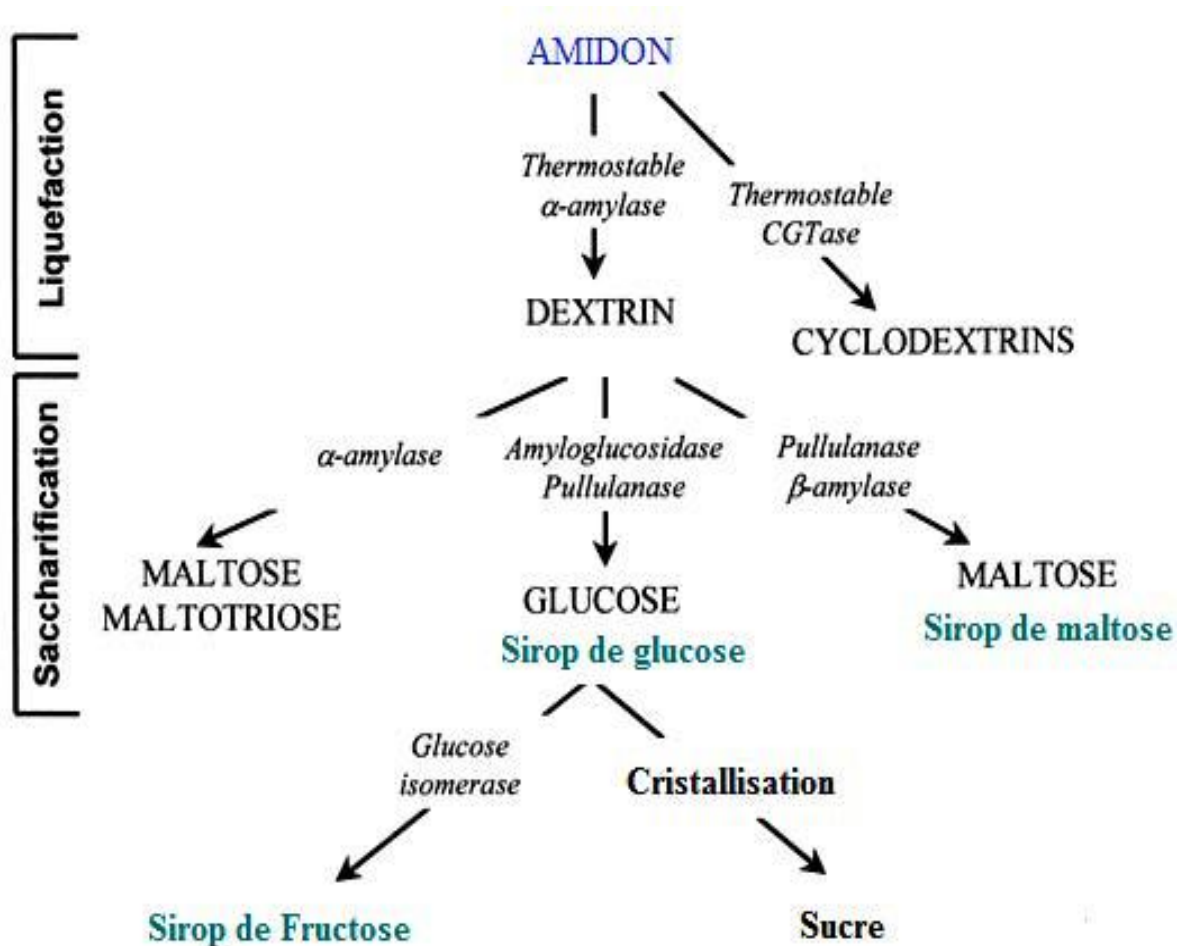


Figure 5 : Transformation enzymatique de l'amidon en sirop de glucose de maltose et de fructose (Maktouf, 2013).

1.13.2. En boulangerie

Les amylases sont considérées comme des additifs alimentaires dans l'industrie boulangère. L'ajout d'une petite quantité d'amylase dans la farine, permet de fournir des sucres simple et bien assimilables pour les levures, ce qui augmente la production du gaz carbonique après fermentation et conduit à l'obtention d'un pain aéré (Pandey *et al.*, 2000).

1.13.3. En panification et biscuiterie

L'usage de l'alpha amylase « améliorant de panification » est devenue une pratique de fabrication machinale dans l'industrie panaière, non seulement pour améliorer la qualité du pain mais aussi pour contrôler le processus de fabrication. Cette industrie utilise les α -amylases pour la régulation des activités diastasiques des farines par hydrolyse de l'amidon en maltose. Cette opération favorise la formation de la mie souple en boulangerie et améliore la texture des gâteaux pâtisseries et des biscuits (**Malhotra *et al.*, 2002**).

1.13.4. En sucrerie

Parfois, les sirops de canne peuvent se trouver perturbés par la présence de contaminations amyliques augmentant aussi leur viscosité et de nuire ensuite au processus de cristallisation. Cet inconvénient est éliminé par l'introduction d'une petite quantité d'amylase bactérienne immobilisée à une température égale ou supérieure à 80°C (**Reddy *et al.*, 2003**). De plus l' α - amylase est utilisée pour faciliter les opérations d'extraction et de raffinage du saccharose à partir de la betterave ou de la canne à sucre pour éliminer des traces d'amidon gênant la purification. Néanmoins, des α - amylases fongiques et bactériennes sont très utilisées pour la préparation des sirops sucrés à base d'amidon de maïs et de sirops de chocolats (**Martin *et al.*, 2003**).

1.13.5. En Désencollage des textiles

Les procédés modernes de production de textiles exigent souvent l'application de fortes pressions entraînant le cassage des fils, notamment pendant le tissage. Une couche de protection temporaire peut être appliquée sur les fils, dont l'amidon constitue un des matériaux attrayant par son faible coût et sa disponibilité. A cause de leurs stabilités à la chaleur, les amylases bactériennes conviennent très bien à l'industrie de textile, par dégradation de l'apprêt amylicé lors du désencollage (**Ahlawat, 2009**).

1.13.6. En industrie des détergents

L'industrie des détergents est la première consommatrice des enzymes, tant en termes de volume et de valeur. L'utilisation des enzymes dans la formulation des détergents améliore leur capacité à enlever les taches difficiles et la lessive, tout en respectant l'environnement. Les amylases viennent en seconde position dans la formulation de détergent enzymatique, et elles sont représentées dans 90% de tous les détergents liquides (Gupta, 2003, Hmidet, 2009 et Mitidieri, 2006).

Ces enzymes sont utilisées pour la lessive et le lave-vaisselle automatique afin de dégrader les résidus de féculents tels que les pommes de terre, les sauces, la crème, le chocolat...etc. et générer des dextrans et d'autres oligosaccharides plus petits par conséquent, la tâche est physiquement découpée (Mukherjee, 2009).

1.13.7. Domaine médical et pharmaceutique

Dans le domaine pharmaceutique, les amylases sont utilisées comme agent anti-inflammatoire et aussi comme aide digestif pour éviter les dyspepsies et les fermentations intestinales (Sanofi, 1996). Dans le domaine médical, le taux de l' α -amylase dans les liquides biologiques peut être utilisé pour détecter certaines maladies : insuffisance cardiaque, oreillons, cancer du pancréas (Pandey *et al.*, 2000).

1.13.8. Production d'alcool et du biocarburant

La commercialisation d'amylases est fortement stimulée par le développement des biocarburants de première génération, en particulier pour la production de bioéthanol. L'amidon est le substrat souvent utilisé en raison de son faible prix et de sa disponibilité (Chi *et al.*, 2009). Lors du processus de fabrication, l'amidon doit être solubilisé et soumis à deux étapes enzymatiques afin d'obtenir des sucres fermentescibles par l'application des microorganismes amylolytiques suivis par une fermentation où les sucres sont convertis en éthanol en utilisant la levure *Saccharomyces cerevisiae* (Öner, 2006).

La production de l'éthanol par les levures fermentaires joue un rôle colossal dans l'économie du Brésil. Parmi les bactéries amylolytiques utilisées dans ce domaine, on a *Bacillus licheniformis* ou bien des souches de *Escherichia coli* modifiées génétiquement ou de *Bacillus subtilis* (Sanchez, 2008).

Chapitre II

2. La dissection du genre *Bacillus* de la phylogénie à la systématique

2.1. L'histoire du genre *Bacillus*

L'histoire du genre *Bacillus* est ancienne, entrelacées avec celle de la bactériologie. '*Vibrio subtilis*' appelé maintenant *Bacillus subtilis* a été décrit en 1835 par Ehrenberg et en 1864 Davaine attribue le nom '*Bacteridium*' à l'organisme associé à l'anthrax. cependant, c'est Cohn en 1872 qui proposa la nomination du genre *Bacillus* (**Emanuel et al., 2009**). Tout cela est arrivé avant la résolution finale du débat sur si la génération spontanée a eu lieu ou pas!

Depuis la création de ce genre sa systématique a subi des changements radicaux. Ceux jusqu'à 1979 ont été examinés par Gordon en 1981, et un résumé numérique de son chapitre, énumérant le nombre d'espèces attribué à *Bacillus* dans chacune des huit premières éditions du (Bergey's Manual of Determinative Bacteriology) (**Brenner, 2001**), donne une idée des changements dans les derniers 50 ans. Ruth Gordon remarqua le nombre considérable des espèces assignées au genre *Bacillus* ce qui la motivait à mener une étude comparative dans le but de mettre chaque souche dans sa place convenable on se basant initialement sur une collections de 621 souches agrandi plus tard à 1134 souches (**roger et al., 2002**).

Par ailleurs les différentes espèces de *Bacillus* ont été divisées en trois groupes sur la base du phénotype de l'endospore, les tests biochimiques et quelques propriétés de la croissance. Cependant l'hétérogénéité au sein de l'espèce persistait toujours, ce qui a motivé les chercheurs a utilisé des méthodes ultra- sophistiquées avec l'introduction d'une classification basée sur la biologie moléculaire (**Bavykin et al., 2004**).

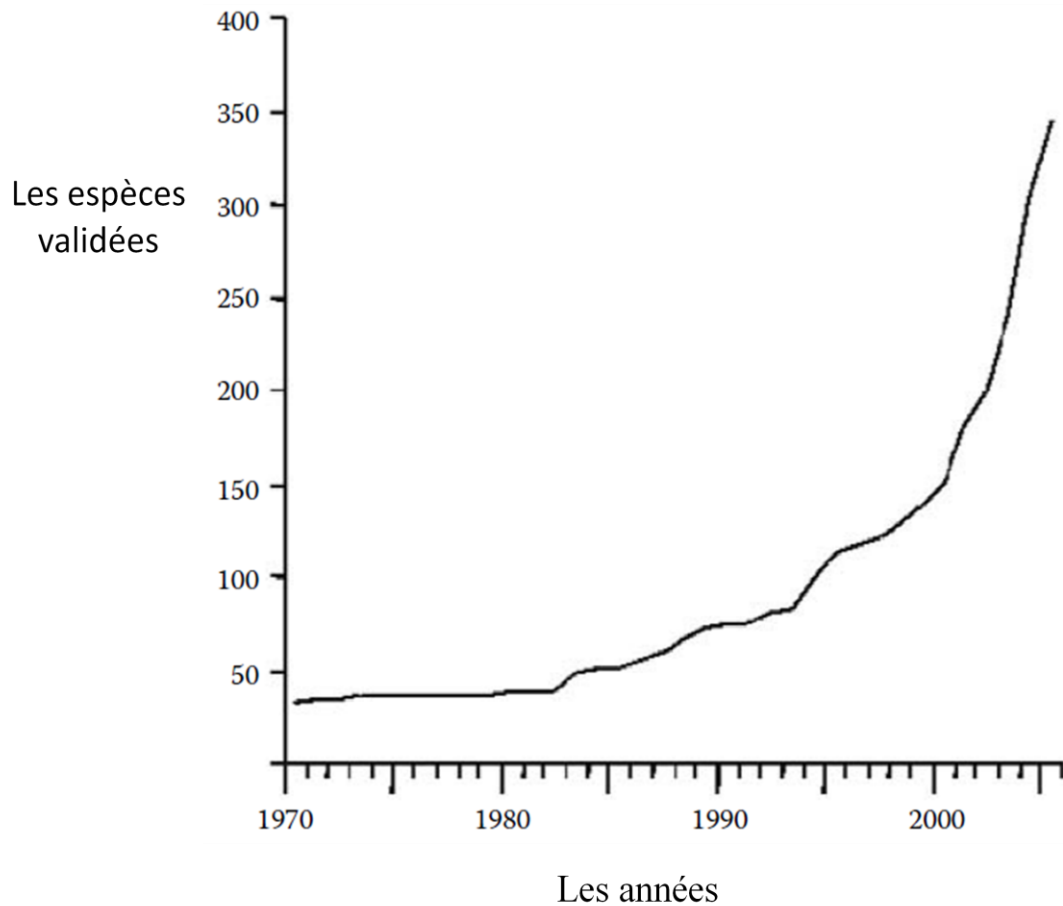


Figure 6 : L'accumulation des espèces appartenant au genre *Bacillus* à travers les années (Roger *et al.*, 2002).

2.2. Description du genre *Bacillus*

Le genre *Bacillus* appartient à la famille des *Bacillaceae*. Il se distingue des autres représentants de la famille par de nombreux caractères. Ce sont des bacilles à extrémités carrées ou arrondies, de taille variable (de 0,5 à 1,2 μm de diamètre et une longueur de 2,5 à 10 μm), à coloration de Gram positive, capable de produire des endospores (forme de résistance et critère important sur le plan taxonomique du genre *Bacillus*), ce sont des bactéries qui se cultivent en aérobiose (aéroanaérobie, ou aérobie stricte), mobiles grâce à une ciliature péritriche sauf *Bacillus anthracis*. Ils possèdent une catalase très active et se cultivent facilement sur milieu ordinaire car ce ne sont pas des germes exigeants (Garrity *et al.*, 2004).

L'observation microscopique du genre *Bacillus* présente généralement de bacilles assez gros, parfois à bouts carrés. Les cultures de *Bacillus* de tout âge montrent des formes de Gram positif et Gram négatif sur le même frottis, ces dernières étant probablement des morts. L'examen microscopique est très important pour l'identification : on notera en particulier la place, la forme et l'effet de la spore sur le "sporange" (Emanuel *et al.*, 2009).

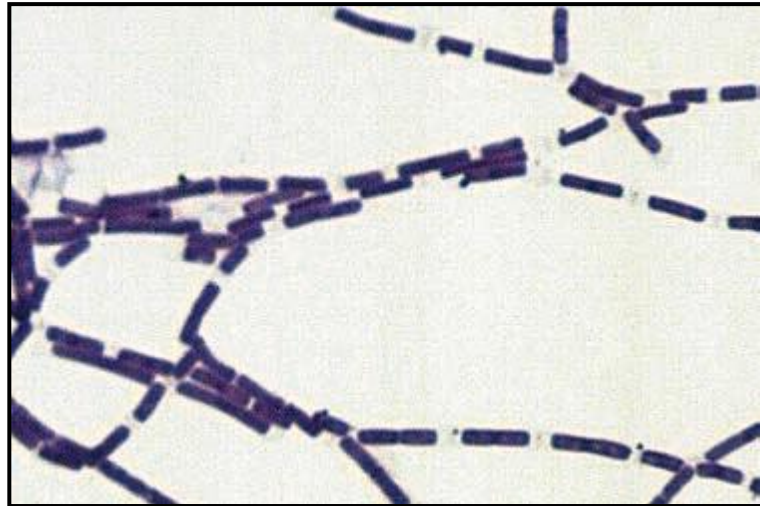


Figure 7 : Observation microscopique du genre *Bacillus sp* (Jeffrey, 2011).

2.3. Caractères bactériologiques

Les colonies du genre *Bacillus* obtenues sur un milieu de culture gélosé sont extrêmement variables et les phénomènes de dissociation sont fréquents :

- La plupart des espèces donne des colonies d'un diamètre variable selon le substrat et les nutriments disponibles dans le milieu de culture.
- *Bacillus circulans* et *Bacillus sphaericus* donnent des colonies qui envahissent la surface de la gélose des milieux utilisés (essaimage).
- *Bacillus mycoides* donne des colonies rhizoïdes qui recouvrent toute la surface de la gélose en 48 heures.
- Certaines espèces produisent des pigments lorsqu'elles sont cultivées sur des milieux particuliers (pigment rouge pour *Bacillus cereus*, pigment jaune pour *Bacillus fastidiosus*, rose pour *Bacillus sphaericus*, jaune, orange, brun ou rose pour *Bacillus subtilis*, ...etc.)

- Lorsque les conditions deviennent défavorables, les *Bacillus* sporulent (figure 8) et donnent des spores (une seule spore par cellule végétative) souvent très résistantes dans le milieu extérieur. Le phénomène de sporulation, contrairement à ce qui se produit pour les espèces du genre *Clostridium*, n'est pas inhibé par l'oxygène. La sporulation dépend des conditions de culture et, *in vitro*, certaines espèces ne sporulent que dans des milieux spéciaux de fabrication difficile (Riva *et al.*, 2001).

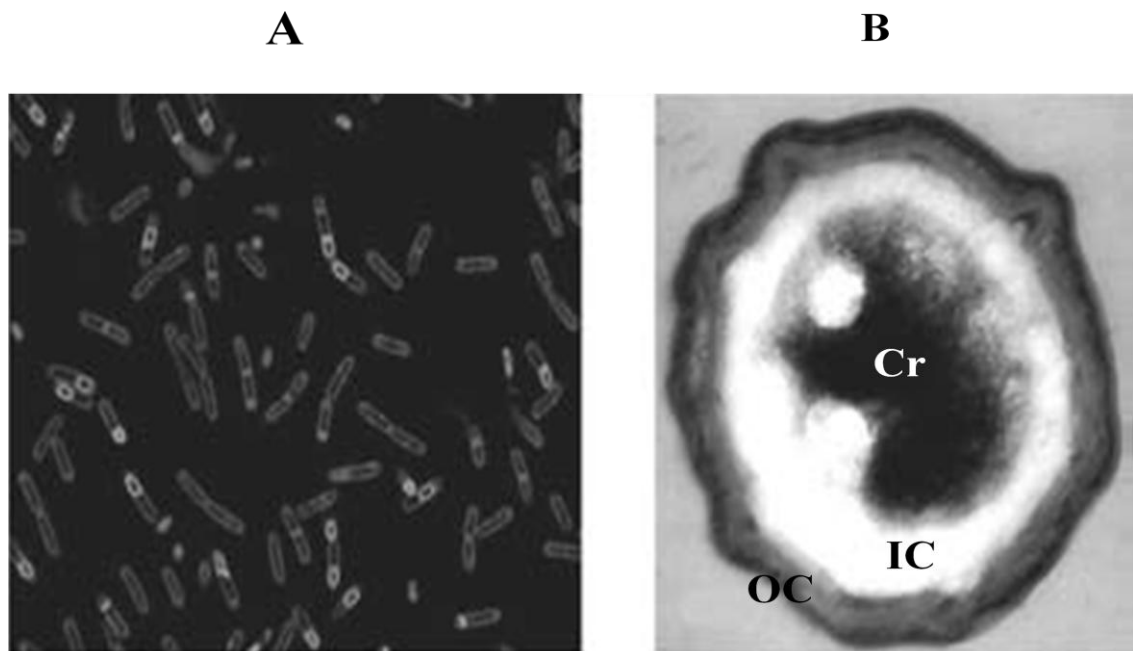


Figure 8 : La formation de l'endospore chez *Bacillus subtilis*. (A) microscopie à fluorescence de *Bacillus subtilis*. (B) une Coupe transversale à partir d'une endospore mature appartenant à *Bacillus subtilis*. L'endospore mesure approximativement 1.2 μm de diamètre et elle est composé de 60 protéines réticulées ensemble pour former deux couches ; une couche extérieure épaisse (OC) et une couche intérieure moins tandis que le noyau de l'endospore est appelé le Core(Cr) (Driks, 2004).

2.4. Habitat et écologie

Les *Bacillus* sont des germes ubiquitaires de l'environnement car leurs spores leur confèrent une grande résistance. Ils sont fréquemment isolés à partir des niches écologiques très variées (des sols, plantes, eaux douces, eaux de mers...etc.). Le sol constitue l'habitat principal de ce genre bactérien où ils joueraient un rôle dans les cycles du carbone et de l'azote. Certaines souches du genre *Bacillus* telles que

Bacillus stearothermophilus sont thermophiles et préfèrent une température optimale de croissance de 55°C. Par ailleurs, d'autres souches sont psychrophiles et possèdent une température optimale de croissance de 3°C.

A l'opposé, certaines espèces, récemment isolées sont halophiles, alcalophiles et acidophiles (**Emanuel et al., 2009**).

Le comportement de *Bacillus* vis-à-vis le potentiel d'hydrogène (pH) est très variable, auxquelles certaines espèces acidophiles peuvent se multiplier à une valeur de pH de 2 et d'autres sont alcalinophiles et se développent à une valeur de pH de 10. La thermo-résistance des spores et leur diversité physiologique des formes végétatives en font de bactéries du genre *Bacillus* très ubiquistes, isolées de l'eau de mer telle que *Bacillus licheniformis* et de l'eau douce telle *Bacillus stearothermophilus* sont très souvent présentes dans des sources chaudes, dans les denrées alimentaires (cacao, sucre, épices, lait, ...) et même dans des produits alimentaires stérilisés ou médicamenteux à cause de la thermorésistance des spores (**Hamilton et al., 1999**).

2.5. Taxonomie phénotypique du genre *Bacillus*

Le genre *Bacillus* est très hétérogène et comprend un nombre considérable d'espèces. Ce genre apparaît extrêmement hétérogène tant sur le plan génétique (le G + C p. cent des diverses espèces varie de 32% à 69%) que phénotypique (type respiratoire, métabolisme des sucres, composition de la paroi, habitat, ..). Leur taxonomie n'est pas simple car on regroupe sous ce nom un grand nombre de bacilles Gram positif très différents (**Fritze, 2004**).

Cette situation complexe montre les difficultés rencontrées pour l'identification des bactéries sporulées dont l'intérêt est avant tout industriel. La classification la plus utilisée se fonde sur la forme de la spore et distingue 3 groupes :

- Bacilles à spore ovale non déformante ;
- Bacilles à spore ovale déformante ;
- Bacilles à spore ronde déformante.

2.6. La taxonomie génotypique du genre *Bacillus*

L'étude des ARNr 16S et 23S confirme l'hétérogénéité et montre que le genre *Bacillus* doit être scindé en plusieurs genres. La réorganisation de ce genre a été initiée en 1992 par la création du genre *Alicyclobacillus* rassemblant 3 espèces acidophiles et thermophiles. Des études antérieures ont proposées et validées les genres suivants : *Aneurinibacillus* (1996), *Brevibacillus* (1996) (ex *B. brevis* et *laterosporus*), *Gracilibacillus* (1999), *Geobacillus* (2001), *Paenibacillus* (1994) (incluant d'anciens *Bacilluspolymyxa*, *macerans*, *alvei*...), *Ureibacillus* (2001), *Virgibacillus* (1998) et *Salibacillus* (1999) (XU *et al.*, 2003).

2.6.1. *Bacillus* RNA groupe 1

Ce groupe contient l'espèce type de ce genre *Bacillus subtilis*. (Ash *et al.*, 1991) ont rapporté que la diversité phylogénétique de ce groupe est immense. Lorsque des espèces sont incluses dans une base de données des organismes de référence (Roger, 2004), ils ne se regroupent pas nécessairement ensemble indiquant éventuellement que ce groupe ne forme pas une entité phylogénétique cohérente.

L'ignorance des propriétés phénotypiques lors du classement le RNA group1 peut être scindé en plusieurs genres, avec des espèces apparentées, transférés à *Virgibacillus*, *Salibacillus*, *Halobacillus* et *Gracilibacillus* (Figure 9). Ce groupe contient les espèces suivantes : *B. vallismortis*, *B. mojavensis*, *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. atrophaeus* and *B. licheniformis*; a second one contains *B. cohnii*, *B. horikoshii* and *B. halmapalus*; *B. cereus*, *B. pseudomycoides*, *B. anthracis*, *B. thuringiensis*, *B. weihenstephanensis* and *B. mycoides*; *B. simplex*, *B. psychrosaccharolyticus*, *B. maroccanus*, *Brevibacterium* et *Arthrobacter*. La plupart des autres espèces de ce groupe forme un enracinement profond, qui se déploie sans permettre la détermination de leur ramification (Fritze, 2004).

2.6.2. *Bacillus* RNA group 2

Ce groupe constitue une énigme évolutive, englobe un mélange d'espèces sphérique sporulées (*Sporosarcina*) et d'espèces de forme bacillaire non sporulées (*Filibacter* (Clausen *et al.*, 1985), *Kurthia*, *Caryophanon* et des cocci (*Planococcus*). Les caractères de ce groupe sont la présence de l-lysine, l'ornithine en position 3 de la sous-unité peptidique et un acide aminé dicarboxylique dans le pont peptidique (Roger, 2002).

La majorité des autres taxons du genre *Bacillus* contient du peptidoglycane directement lié avec l'acide meso-diaminopimelique à la position 3 de la sous-unité. Tandis que, les autres espèces au sein de ce groupe forment des entités phylo-génétiquement cohérentes (Gurtler, 2001).

La convergence phénotypique du genre *Bacillus* avec d'autres espèces appartenant à d'autre genre constitue un problème agaçant. Afin de rendre la classification compatible avec la phylogénie, les quatre différentes lignées d'espèce de *Bacillus* (*B. globisporus*, *B. insolitus*, *B. fusiformis* et *B. silvestris*) sont décrits comme étant de nouveaux genre en raison de l'absence de la monophylie et la différence morphologique (Bavykin, 2004).

2.6.3. *Bacillus* RNA groups 3 et 4

Les membres de ces deux groupes sont reclassés comme *Paenibacillus* et *Brevibacillus*, respectivement (Figure 10). Ces deux genres sont séparés phylogénétiquement. et avec l'intégration de *Thermobacillus xylanilyticus* au genre *Paenibacillus*, la netteté phylogénétique de ce dernier semble disparaître. Il convient de noter que la souche de type de *P. amylolyticus* se regroupe avec la souche type de *P. illinoisensis* et *P. pabuli* (Fritze, 2004).

2.6.4. *Bacillus* RNA group 5

C'est un groupe cohérent phylogénétiquement suivant les résultats d'analyse de distance des matrices (**Roger *et al.*, 2002**), mais selon l'arbre phylogénétique (**Figure 9**), *B. stearotherophilus* ne se branche pas avec l'un des représentants de ce groupe, à savoir *Saccharococcus thermophilus*. L'une des propriétés distinctives de ce groupe est ratio G+C% de la séquence codant la sous unité ribosomal (16S rDNA). Les bacilles du RNA group 5 sont classés comme des espèces du nouveau genre *Geobacillus* (**Nazina *et al.*, 2001**).

2.6.5. *Bacillus* RNA group 6

Les membres de ce groupe, définis par **Nielsen** et ces collaborateurs (**1994**) sont principalement alcalophiles, alcalotolérants et trois différents sous-groupes émergent par l'analyse de la matrix de distance.

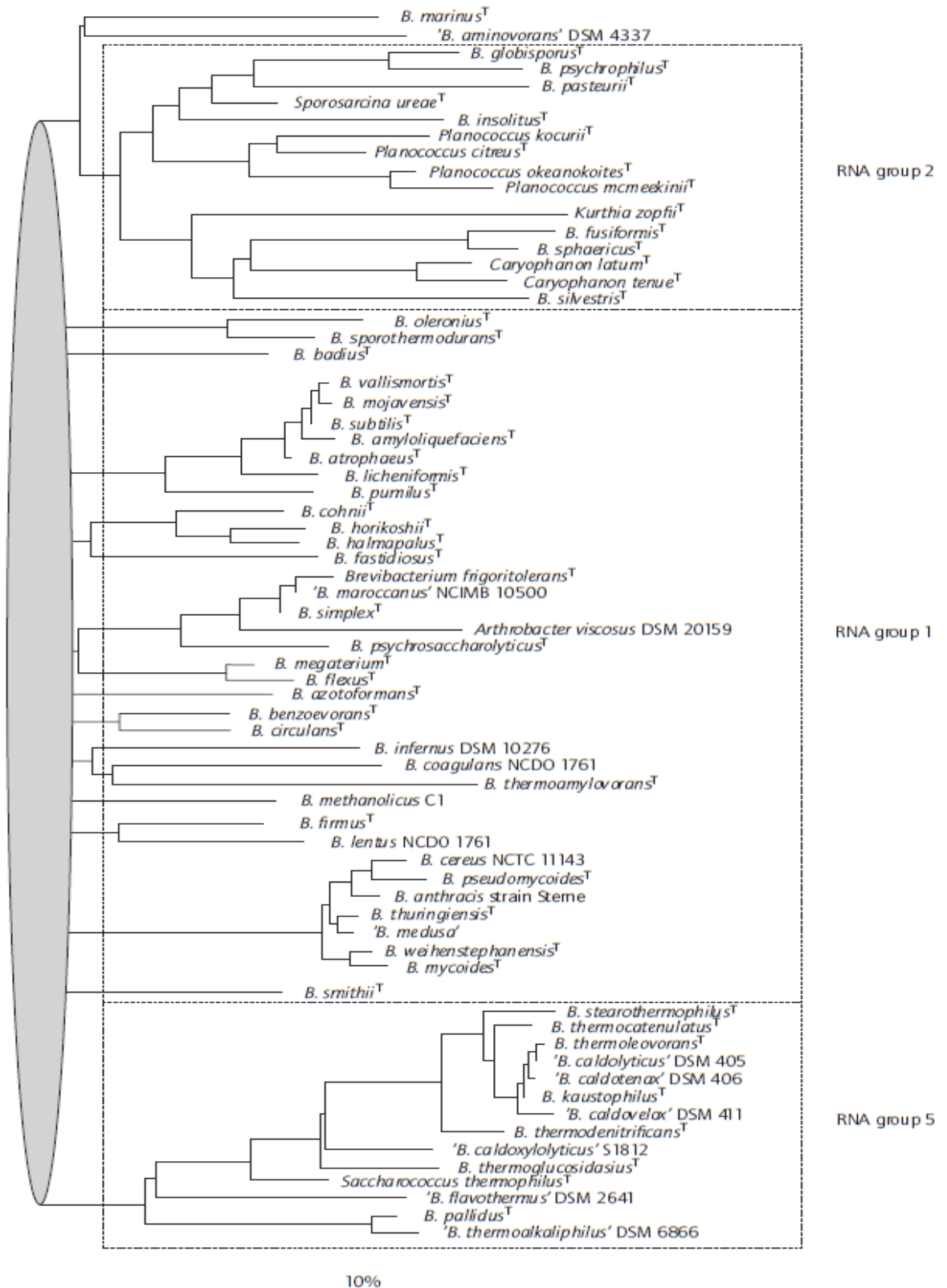


Figure 9 : Arbre phylogénétique des espèces du groupe RNA 1-, 2 et 5. Les pointillés indiquent l'incertitude de l'ordre au cours de laquelle les lignées divergent les uns des autres. La barre indique 10% substitutions nucléotidiques (Berkeley,2002).

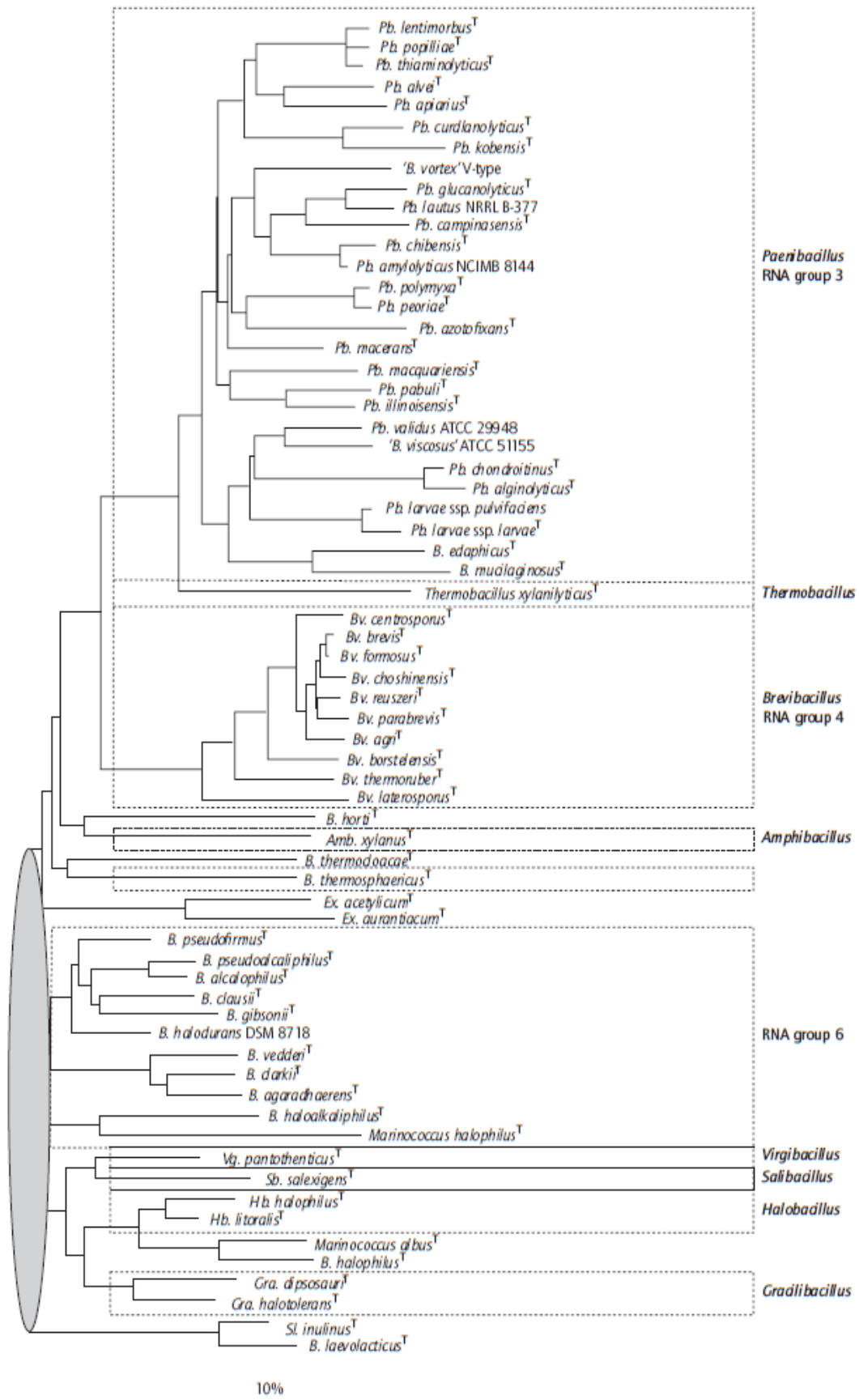


Figure 10 : Arbre phylogénétique des espèces du groupe RNA 3, 4 et 6. Les pointillés indiquent l'incertitude de l'ordre au cours de laquelle les lignées divergent les uns des autres. La barre indique 10% substitutions nucléotidiques (Berkeley, 2002).

2.7. Pouvoir pathogène du genre *Bacillus*

Le pouvoir pathogène des *Bacillus* est très restreint, avec la présence de deux espèces avec un pouvoir pathogène indiscutable : *Bacillus anthracis* et *Bacillus cereus*.

- *Bacillus anthracis* est l'espèce pathogène, responsable de la maladie du "charbon" qui atteint les animaux, mammifères (ovins, caprins), certains oiseaux (autruches, canards), des insectes et leurs larves et occasionnellement l'homme.
- *Bacillus cereus* cause des intoxications alimentaires surtout chez les sujets fragiles, des septicémies, méningites, infections respiratoires et des myonécroses (**Hsueh et al., 1999**).
- *Bacillus licheniformis* est régulièrement incriminé dans des cas d'avortements chez les ovins et les bovins, notamment quand les animaux sont nourris avec du foin de mauvaise qualité récolté après des étés pluvieux. La bactérie a été isolée en culture pure de lésions nécrotiques, hémorragiques ou suppurées du placenta et du vagin de la mère ainsi que du contenu stomacal, du sang, du foie, des poumons et des nœuds lymphatiques du fœtus.
- Plusieurs espèces ont un pouvoir pathogène pour les insectes notamment, *Bacillus thuringiensis* pour les lépidoptères, les coléoptères et les diptères et *Bacillus sphaericus* pour les larves de moustiques. Ces espèces sont utilisées dans la lutte contre ces arthropodes (**Forsyth et al., 1998**).

2.8. Le genre *Bacillus* et la biotechnologie

Les bactéries du genre *Bacillus* sont considérées comme des sources de choix pour la production des enzymes et les métabolites secondaires. Les espèces de *Bacillus* ont joué un rôle crucial dans l'établissement d'un large éventail de procédés de fermentation industrielle telle que la production de la riboflavine. Les produits commerciaux obtenus à partir des espèces de *Bacillus* sont les antibiotiques, les vitamines et les enzymes alimentaires. (**Schallmey et al., 2004**).

Tableau 2 : Présentation de certains produits de fermentation industrielle élaborés par les espèces du genre *Bacillus* (Emanuel *et al.*, 2009).

Produit	Espèce	Application de <i>Bacillus</i>
Riboflavine	<i>B. subtilis</i>	Pharmaceutique et alimentaire
nucléosides (purine)	<i>B. subtilis</i>	Alimentaire
Thaumatine	<i>B. subtilis</i>	Alimentaire
α -Amylase	<i>B. licheniformis</i> , <i>B. amyloliquefaciens</i> , , <i>B. subtilis</i> ,	Alimentaire, papeterie, textile, amidonnerie
β -Galactosidase	<i>G. stearothermophilus</i>	Alimentaire, boisson
Lipases	<i>Bacillus</i> sp.	Détergeant
Lutte biologique	<i>B. thuringiensis</i> , <i>B. sphaericus</i>	Agriculture

2.9. Intérêt de l'application du genre *Bacillus* en biotechnologie

Le métabolisme et la physiologie des bactéries appartenant au genre *Bacillus* est très bien étudiée. Certaines espèces sont dotés d'un statut Gras (Generally Recognized as Safe), possèdent de bons systèmes d'exportation de protéines et peuvent produire certaines enzymes extracellulaires telles que les amylases, xylanases, protéases à des concentrations de l'ordre de 20-25 g/L (Schallmey *et al.*, 2004).

2.10. Production des amylases chez le genre *Bacillus*

La production des enzymes par les espèces appartenant au genre *Bacillus* représente environ 50% de la taille totale du marché mondiale. Vu le taux important des protéines sécrétées dans le milieu extracellulaire, les espèces de *Bacillus* sont également de excellents candidats producteurs des amylases (Emanuel *et al.*, 2009). Les amylases sont été élaborées à partir de différentes espèces telles que *Bacillus megaterium*, *Bacillus licheniformis* (Oyeleke, *et al.*, 2010), *Bacillus subtilis* (Riaz *et al.*, 2003).

2.11. Régulation de la production des amylases

Des études antérieures réalisées ont montré que les amylases sont produites dans des milieux de culture basale, qui permet l'hydrolyse de l'amidon et la libération de produits de faible masse moléculaire. Les produits d'hydrolysés pénètrent à l'intérieure de la cellule et induisent la synthèse d'amylases. Par ailleurs, le maltose et d'autres dextrines sont des excellents inducteurs des amylases chez *Bacillus stearothermophilis* et *Bacillus licheniformis* (Shukla *et al.*, 2013 ; Sun *et al.*, 2011).

2.11.1. Répression catabolique

Chez le genre *Bacillus*, en présence de glucose (substrat facilement assimilable), la biosynthèse des amylases est généralement réprimée. Cette répression implique principalement deux protéines : la protéine HPr composante du système PTS (phosphoenolpyruvate-dépendant phosphotransférase) et la protéine CcpA répresseur de la synthèse des amylases (Martin *et al.*, 2003). Dans ces conditions de répression, certains intermédiaires de la glycolyse comme le fructose-1,6-biphosphate vont activer la Hpr kinase (Warner *et al.*, 2000). Cette dernière induit une phosphorylation de la protéine Hpr au niveau d'un résidu serine. La Hpr (serP) interagit avec la protéine CcpA et le complexe Hpr-CcpA réprime la transcription des gènes codant pour les amylases, par fixation sur une séquence consensus *cre* (catabolite responsive élément).

2.11.2. Régulation temporelle

Chez le genre *Bacillus*, la synthèse de plusieurs enzymes est réprimée durant la phase exponentielle de croissance, principalement durant les phases de différenciation cellulaire, et la sporulation. Entre la phase exponentielle et la sporulation, la bactérie passe par un état transitoire au cours duquel elle essaye de chercher de nouvelles sources de nutriments afin de garder son état végétatif. Elle s'adapte alors à nouvelles conditions environnementales par la régulation de la synthèse de certaines protéines (Figure 11). Ce mécanisme fait intervenir deux composantes du système de régulation (Fergus, 2000) :

- Une histidine kinase DegS qui va répondre aux changements de certains facteurs (pH, pression, oxygène), produisant en début de phase stationnaire par phosphorylation d'une protéine régulatrice DegU au niveau d'un résidu histidine ;
- DegU phosphorylée active certains opérons et induit la synthèse de plusieurs enzymes extracellulaires telles que les amylases.

D'ailleurs, la capacité de la bactérie à s'adapter aux changements environnementaux a motivé certains chercheurs à exploiter cette caractéristique pour la surproduction d'amylases. En effet, **Mishra** et ses collaborateurs (2005) ont surproduit une amylase de *Bacillus subtilis* par induction d'un stress oxydatif par l'ajout d'agents inducteurs tel que le peroxyde d'hydrogène.

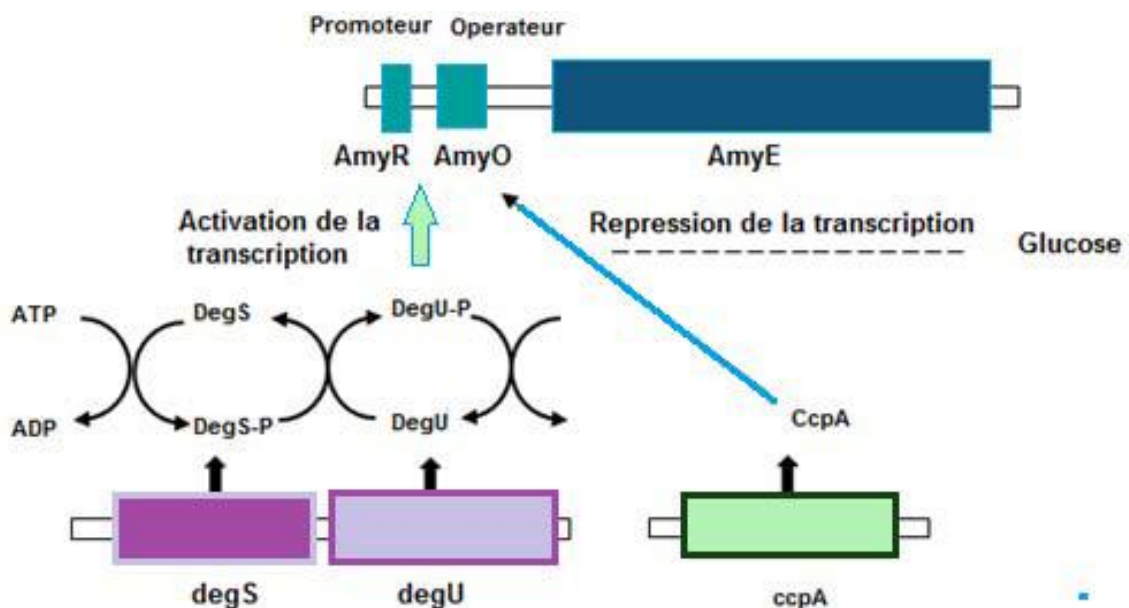


Figure 11 : Contrôle de la biosynthèse d'amylase chez *Bacillus subtilis* (Priest , 2000).

2.12. Méthodes de production des amylases à grande échelle

Le procédé de production couramment utilisé pour la production des enzymes amylolytiques est la fermentation sur milieu de culture liquide. Cependant les études s'intéressent de plus en plus à la production de ces enzymes par fermentation sur milieu de culture solide (SSF) (**Dhayna et al., 2006 ; Hema et al., 2006**). Parmi les substrats solides utilisés sont le son d'orge, les épluchures de pomme de terre, le sorgho ou encore la noix de coco (**Kunamneni et al., 2005 ; Ashis et al., 2009**). Cependant, le son de blé, souvent complétement d'une solution nutritive ou d'amidon, semble être le substrat de choix pour la production en SSF (**Kunamneni et Singh, 2005 ; Soni et al., 2005 ; Hashemi et al., 2010**). En vue de minimiser davantage le coût de production de ces enzymes en SSF, l'utilisation d'une agro-ressource comme seule composante du milieu de production pourrait être une alternative.

Parmi les agro-ressources décrites comme étant des milieux riches susceptibles de stimuler la croissance microbienne et la production enzymatique, le millet est un support prometteur. En effet, cette céréale, faiblement exploitée appartient à la famille des graminées, est caractérisée par sa tolérance aux conditions extrêmes de sécheresse, d'aridité et d'alcalinité du sol et présente une importante forte teneur en protéines et en minéraux (**Caballero et al., 2003 ; O'Kennedy et al., 2006**).

El Huq (2005) et ces collaborateurs ont rapporté que la production d'amylase chez *Bacillus licheniformis* par fermentation sur milieu de culture liquide lors l'utilisation de différentes agro-ressources telles que millet, riz, maïs, blé avec des teneurs de 1.5% (P/P) a permis l'atteinte d'un excellent taux de production. En effet, l'activité amylolytique produite sur un milieu de culture contenant de l'amidon de pomme de terre a manifesté un taux de production de 700 U/ml contre 936 U/ml lors d'une culture sur millet.

La richesse du millet en protéines et en minéraux, son utilisation a permis de réduire les concentrations de sources d'azote (peptone et extrait de viande) additionnées au milieu de culture concentration de 0.25-1% à (P/V).

Matériel et méthodes

3. Objectif

Le but de ce travail est l'isolement et le criblage d'une large gamme de bactéries appartenant au genre *Bacillus* à partir d'une diversité de niches écologiques : sols, Oueds et les sources Thermales situés dans la région de l'Ouest Algériens afin de tester leur capacité à produire des amylases pour ensuite sélectionner les souches hyper-productrices ainsi que l'étude de la thermostabilité des souches isolées à partir des sources thermales à fin d'en sélectionner les thermorésistantes celle qui s'adaptent à des condition extrêmes de pH et les caractériser sur le plan moléculaire par une identification génétique et une études phylogénétique.

Les différentes démarches entreprises dans la partie pratique de la thèse sont récapitulées comme suit :

- ✓ Isolement des bactéries appartenant au genre *Bacillus* productrices d'amylases ;
- ✓ Sélection les souches surproductrices et celles dotées d'une grande thermo-résistance ainsi que la résistance à des conditions extrêmes de pH ;
- ✓ Optimisation de quelques paramètres impliqués dans le processus de production des amylases ;
- ✓ Caractérisation génétique et analyse phylogénétique des meilleurs isolats retenus.

1.1. Plan d'échantillonnage

Vue le caractère d'ubiquité des bactéries appartenant au genre *Bacillus*, des prélèvements ont été effectués à partir de différents sites, ayant en commun la présence d'une matière organique hétérogène afin de pouvoir augmenter la probabilité d'isoler des bactéries du genre *Bacillus* productrices d'amylases. La première catégorie (A) désigne un ensemble de localité, caractérisée par la présence d'une matière organique hétérogène. A cet effet, six prélèvements ont été effectués des sites suivants : Oued de Makerra (MK), station d'épuration des eaux usées de Sidi Bel Abbes (STEP), moulins de blé à la wilaya de Ain Témouchent (MW), champ de pomme de terre à Ain Témouchent (TMP), l'amidonnerie de Maghnia

dans la wilaya de Tlemcen (SMM) et le lac de Sidi Mohamed Benali à Sidi Bel Abbès (LAK).

La deuxième catégorie (B) est constituée de plusieurs sources thermales et des stations géothermiques : La station thermale de Hammam Bouhrara (HBG) à Tlemcen, la station thermale de Chiguer (HC) à Tlemcen, la source thermale de Sidi Aiède (HS) à Ain Témouchent, la station thermale de Bouhanifia (HB) à Mascara, la source thermale de Hamman Boudjar (HBH) à Ain Témouchent et la station thermale d'Ouarsenis (HO) à Tissemsilt.

Tableau 3 : Présentation des différents sites du prélèvement de la catégorie A et leur codification.

L'origine de prélèvement	Codification	Volume ou poids prélevé
Oued de Makerra à Sidi Bel Abbès	MK	100 ml
Lac de Sidi Mohamed Benali à Sidi Bel Abbès	LAK	100ml
Station d'épuration des eaux usées de Sidi Bel Abbès	STEP	100ml
moulins de blé à (Ain Témouchent)	ML	50g
Champ de pomme de terre (Ain Témouchent)	TMP	50g
Amidonnerie de Maghnia à Tlemcen	SMM	50g

Tableau 4 : Présentation de différents sites du prélèvement de la catégorie B et les caractéristiques des eaux thermales.

L'origine du prélèvement	Codification	Temperature/pH
La station géothermale de Boughrara à la wilaya Tlemcen,	HBG	55°C/8.18
Hammam Chiguer hot à Maghnia, la wilaya de Tlemcen	HC	57°C/8.02
La source thermale de Sidi Aiède à Ain Temouchent	HS	65°C/7.9
Hammam Bouhanifia à la wilaya de Mascara	HB	65°C/8.41
Hammam Bouhjar à la wilaya d'Ain Temouchent,	HBH	75°C/8.12
La station thermale d'Ouarsenis à lawilaya de Tissemsilt	HO	55°C/7.89



Figure 12 : Présentation du site de prélèvement (MK) Oued Mekerra de Sidi Bel Abbès.



Figure 13 Présentation du site de prélèvement TMP (champ de Pomme de terre Ain Témouchent.



Figure 14 : Présentation du site de prélèvement(LAK) lac de Sidi Mohamed Benali de Sidi Bel Abbès.



Figure 15 : Présentation du site de prélèvement (STEP), station d'épuration de Sidi Bel Abbès.



Figure 16 : présentation du site du prélèvement Hammam Chiguer (HC)



Figure 17 : Présentation du site de prélèvement Hammam Boughrara (HBG)



Figure 18 : Présentation du site de prélèvement Hammam Bouhdjar (HBH)



Figure 19 : présentation du site de prélèvement Source thermale de Sidi Aiède (HS)



Figure 20 : présentation du site de prélèvement Hammam Ouarsenis (HO)



Figure 21 : Présentation du site de prélèvement Hammam Bouhanifia (HB)

3.1. Prélèvements

Les échantillons ont été prélevés dans des conditions d'asepsie. Les eaux et les sols sont collectés dans des flacons stériles.

3.1.1. Prélèvement à partir des sols

Une pesée de 100 grammes de sol est prélevée à partir de chaque site à une profondeur de 10 centimètres de la surface. Les échantillons sont déposés dans des flacons stériles d'un volume de 250ml et ensuite acheminés vers le laboratoire pour être analysés dans les 24 heures après les prélèvements.

3.1.2. Prélèvement à partir des eaux

Les prélèvements des eaux sont effectués dans des flacons stériles d'un volume de 250 ml dans des conditions d'asepsie. Les échantillons sont collectés puis fermés hermétiquement, analysés dans les 24 heures. Les échantillons des sources thermales sont procédés de la même façon toute en respectant la mesure de la température et du pH des eaux prélevées.

Stratégie d'isolement

3.1.3. Screening primaire

Dans le but d'isoler des bactéries du genre *Bacillus* capables de produire des amylases, des dilutions décimales ont été préparées à partir de chaque échantillon jusqu'à la dilution 10^{-5} , ensuite cette dernière a été soumise à un choc thermique afin de détruire toute formes végétatives, seules les bactéries capables de produire des spores peuvent survivre. Les tubes à essai ont été déposés dans un bain marie à une température de 80°C à un intervalle de temps de 10min (**Lynn et al., 1999**). La seconde étape consiste à ensemercer une gélose nutritive contenant l'amidon comme seule source d'énergie (starch agar : gélose nutritive additionnée de 1% d'amidon) (**voir Annexe A**) à partir du tube soumis au choc thermique. Les boîtes de Pétri inoculées sont ensuite incubées à une température de 30°C à un intervalle de temps de 3 jours. L'activité amylolytique est mise en évidence par l'inondation de la boîte de Pétri inoculée avec le Lugol qui colore en bleu l'amidon. Une lecture positive de la production de l'amylase chez les bactéries se manifeste par l'apparition d'une zone claire autour de la colonie (**Aneja, 2003**).

3.1.4. Identification préliminaire du genre *Bacillus*

Afin d'explorer l'appartenance des souches isolées au genre *Bacillus*, six tests ont été mis en évidence à savoir l'aspect macroscopique des colonies sur la gélose (la forme R), la coloration de Gram positive, la forme bacillaire, la réaction positive de la catalase et la présence des spores à l'intérieure des cellules bactériennes et le type respiratoire.

3.1.4.1. Coloration de Gram

La coloration de Gram et l'observation microscopique permet de distinguer deux grands groupes bactériens : les bactéries à Gram négatives se colorent en rose et les bactéries à Gram positives apparaissent violettes.

3.1.4.2. La réaction de catalase

La catalase est une enzyme qui dégrade l'eau oxygénée en eau et en oxygène moléculaire selon la réaction suivante :



Une réaction positive de la présence du catalase se manifeste par la production des bulles d'oxygène, après mélange d'une culture bactérienne avec quelques gouttes d'eau oxygénée à 10 volumes.

3.1.4.3. Détermination du type respiratoire

La détermination du type respiratoire s'effectue sur la gélose viande foie semi-solide 0,6% à une valeur de pH de 7,6. Le milieu est régénéré au bain-marie, refroidi à une température de 45°C, coulé dans des tubes à essai stériles. Les tubes sont ensuite inoculés à l'aide d'une pipette boutonnée et incubés à une température 30°C pendant 24heures (**Figure 22**) (**Prescott, 2002**).

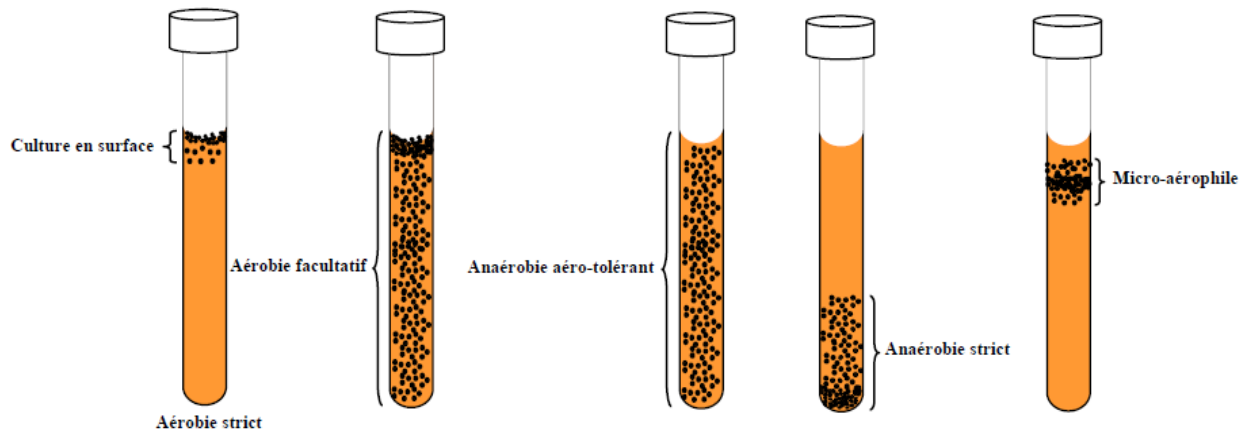


Figure 22 : Détermination du type respiratoire (Prescott, 2002).

3.1.5. Purification des souches amylolytiques

Les colonies sélectionnées productrices des amylases appartenant au genre de *Bacillus* sont repiquées sur milieu de culture de Starch Agar, par la méthode des cadrant (stries serrées et par épuisement). Des repiquages successives ont été procédés afin d'obtenir des colonies pures.

3.1.6. Conservation des souches isolées

Les souches bactériennes purifiées, sélectionnées productrices d'amylase sont inoculées à partir d'une pré-culture dans un bouillon nutritif contenant une concentration de 20% de glycérol (Annexe A), incubées à une température 30°C pendant 24 heures (Gallagher et Wiley, 2008). Les souches sont ensuite conservées par congélation à une température -20°C. La pureté de la colonie est assurée par des repiquages successifs toutes les quatre semaines.

3.2. Le screening secondaire des colonies productrices d'amylase

Le criblage secondaire des bactéries productrices d'amylase est procédé par la mesure des diamètres de la zone d'hydrolyse formée sur un milieu de culture solide et par le dosage des sucres réducteur qui fait appel à la méthode de l'acide dinitrosalicylique (DNSA) dans un milieu de culture liquide (Aneja *et al.*, 2003 ; Gupta *et al.*, 2003).

3.2.1. Mesure de la zone d'hydrolyse

Une colonie isolée, sélectionnée productrice de l'amylase, âgée de 24h est ensemencée par strie sur la surface du milieu de culture gélosé starch, contenant la composition suivante g/l : 10 g d'amidon, 10g de bouillon nutritif, 15g d'agar-agar et l'eau distillée. Les boîtes ont été incubées à 30°C pendant 3 jours (**Jahir *et al.*, 2011**).

Après incubation les boîtes de pétri sont inondées avec une solution de Lugol et l'activité amylolytique est évaluée par la mesure des diamètres des zones d'hydrolyse formées autour de la colonie ensemencée par strie (**Wisdomkofi *et al.*, 2006**). Les isolats montrant les zones maximales d'hydrolyse sont sélectionnés pour la suite des études (**Aneja *et al.*, 2003**).

$$D : \text{diamètre} \quad \text{Index d'activité amylolytique} : \frac{D(\text{zone}) - D(\text{colonie})}{D(\text{zone})}$$

3.2.2. Mesure de l'activité amylolytique sur milieu de culture liquide par La méthode DNSA

Cette méthode décrite par Bernfeld en 1955 est largement utilisée dans la sélection des bactéries productrices des amylases est basée sur l'augmentation de l'intensité de la couleur du complexe (sucres réducteurs-réactif DNSA), mesurée à une longueur d'onde de 540 nm. Le principe de cette technique se focalise sur l'action de l'amylase sur l'amidon, qui le transforme en produits libres sous forme sucres réducteurs. Dans un milieu alcalin, chaud, l'acide 3,5-dinitrosalicylique (3,5-DNSA) jaune est réduit par les oses réducteurs en acide 3-amino 5-nitrosalicylique rouge orangé (**Figure 23**).

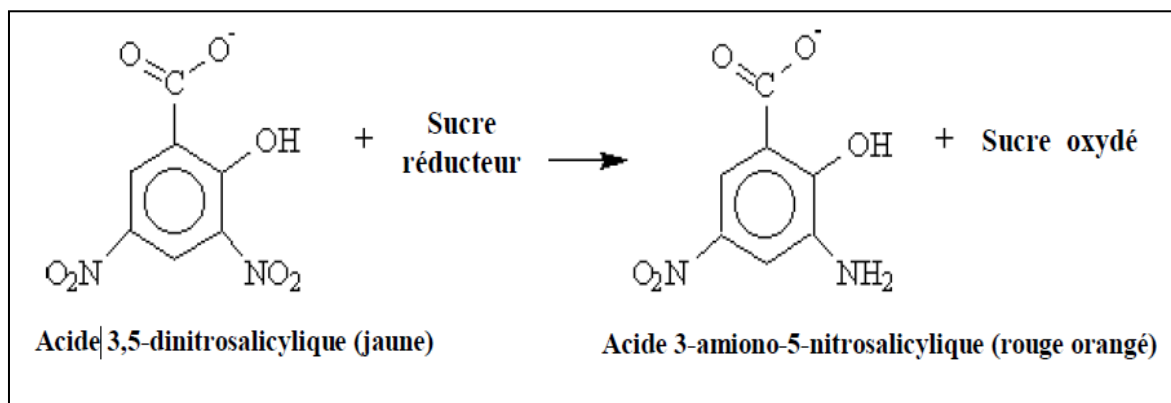


Figure 23 : Réduction de l'acide 3,5 dinitrosalicylique par un sucre réducteur lors du dosage de l'activité amylolytique par la méthode DNSA (**Maktouf *et al.*, 2013**).

3.2.2.1. Préparation de l'inoculum

Dans le but de sélectionner les souches bactériennes productrices des amylases, des pré-cultures sont préparées par l'ensemencement des colonies de *Bacillus*, prélevée à l'aide d'une anse de platine stérile, dans un bouillon nutritif enrichi avec une concentration de 1% d'amidon, incubées à une température de 30°C pendant 18 heures. Des suspensions bactériennes sont prélevées à des intervalles de temps réguliers (1 heure), afin de mesurer densité optique à une longueur d'onde de 600 nm, ajustées au 0,5 Mc Farland, qui correspond à une population bactérienne de 10^6 à 10^8 , dont l'absorption à une longueur d'onde de 600 nm se situe entre 0,08 et 0,10).

3.2.2.2. La culture en batch

Une suspension bactérienne d'un volume de 1ml est inoculée dans un volume de 100 ml de milieu de culture de Starch fermentation Broth. Les cultures sont ensuite incubées à une température de 30°C avec une vitesse d'agitation de 75 rpm pendant 72 heures.

3.2.2.3. La méthode DNSA

Un volume 2 ml d'une suspension bactérienne de chaque culture en batch est prélevé dans un Eppendorf, récupéré par centrifugation à une vitesse de 4000 \times g pendant 15 min à une température de 4°C. Ensuite, un volume de 500 μ l du surnageant est ajouté avec un volume de 500 μ l d'une solution tampon de 0,1M de phosphate, contenant l'amidon à une concentration de 2g/l, ajustée à un pH de 7. Le mélange réactionnel est ensuite incubé à une température de 40°C pendant 30 min. La réaction est ensuite stoppée par l'ajout de 1ml du réactif DNSA. Les tubes sont portés à l'ébullition pendant 5 minutes, refroidis à la température ambiante. Le mélange est ensuite complété à 5 ml par l'ajout de l'eau distillée. L'estimation du taux de sucre réducteurs est mesuré par la lecture de l'absorbance à une longueur d'onde 540 nm à l'aide d'un spectrophotomètre. Les résultats obtenus sont exprimés U/ml. Une unité d'enzyme est considérée comme étant la quantité d'enzyme qui catalyse la production de 1 mg de glucose par minute à 40°C (**Ahmed *et al.*, 2011**).

3.2.3. Etude de l'effet de la température sur l'activité et la stabilité des amylases

Dans le but d'explorer l'influence de la température sur la réaction enzymatique et la détermination de la température optimale des amylases, un volume de 2 ml est prélevé dans des Eppendorfs à partir des cultures en batch âgées de 72 heures. Le surnageant est récupéré par centrifugation à une vitesse de 4000 \times g pendant 10 minutes. Ensuite, l'activité amylolytique est mesurée par la méthode DNSA avec la variation de la température de la réaction enzymatique de 45-95°C (**Bernfeld 1955**).

3.2.4. Etude de l'effet du pH sur l'activité et la stabilité des amylases

L'influence du pH sur l'activité et la stabilité des amylases chez les souches isolées à partir des sources thermales, sélectionnées productrices est mise en évidence, après le prélèvement d'un volume de 2 ml dans des Eppendorfs à partir des cultures en batch âgées de 72 heures. Le surnageant est récupéré par centrifugation à une vitesse de 4000 \times g pendant 10 minutes. Ensuite, l'activité amylolytique est mesurée par la méthode DNSA avec la variation des valeurs du pH entre de pH de 6-12. (**Bernfeld 1955**).

3.3. La sélection de la souche performante

La performance des souches sélectionnées productrices des amylases est effectuée par mesure des diamètres des zones d'hydrolyse formées autour des colonies ensemencées sur un milieu de culture solide et mesure du taux de sucres réducteurs produits dans un milieu de culture liquide.

La souche présentant une zone d'hydrolyse la plus large ainsi qu'une importante activité de dextrinisation sera retenue pour l'identification avec le système API et l'optimisation des conditions de production. Les souches témoignant d'une importante résistance à la température ont été retenue pour l'identification moléculaire et l'étude phylogénétique.

3.4. L'identification de l'espèce par la galerie API 20 E

L'appartenance de la souche sélectionnée productrice d'amylase au genre *Bacillus* est effectuée par la mise en évidence de certains tests phénotypiques et biochimiques. La galerie API 20E composée de 20 microtubes contenant des milieux et substrats sous forme déshydratée est utilisée selon les recommandations décrite par Biomerieux, France (Annexe B)(**Figure 24**).Les microtubes de la galerie API 20E sont inoculés avec une suspension bactérienne, incubées à une température de 30°C à un intervalle temps de 48 h. Les réactions produites durant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs et la lecture est effectuée par l'utilisation du logiciel Bacterial Identification Program (**Emanuel et al., 2009**).



Figure 24: Aspect de la galerie API 20 E avant l'inoculation de la souche sélectionnée productrice de l'amylase.

1.2. Interprétation probalistique des profils biochimiques par le Bacterial identification Program

Le Bacterial Identification Program est un logiciel développé durant les années 90 au niveau de l'Université de Southampton(Grande-Bretagne), qui permet l'identification des souches bactériennes. Les matrices d'identification utilisées dans ce programme sont enregistrées sous forme de fichiers Excel. Une fois le programme est ouvert, l'emplacement de la matrice correspondante au type de galerie utilisée doit être indiqué en cliquant deux fois sur la matrice. Le programme utilise directement, l'onglet est affiché avec une grille des résultats de la galerie API 20^E (Figure 25).

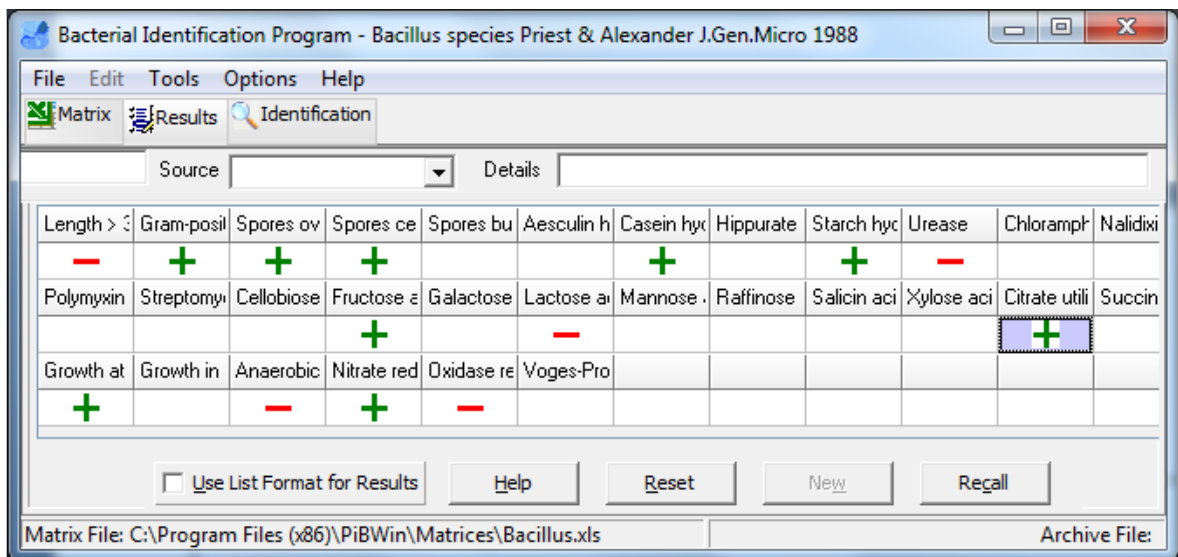


Figure 25 : Capture d'écran de la grille d'identification dans l'onglet des résultats de Bacterial Identification Program.

3.5. L'identification moléculaire

3.5.1. Extraction de l'ADN génomique

Dans le but d'extraire ADN, des souches des souches sélectionnées productrices de l'amylase, des pré-cultures ont été préparées par l'ensemencement des souches sélectionnées productrices de l'amylase dans un bouillon nutritif, incubées à une température de 30°C pendant 24 heures. Une suspension bactérienne d'un volume de 1,5 ml est prélevée dans des Eppendorfs stérile. La biomasse bactérienne est récupérée par centrifugation à une vitesse de 4000×g pendant 10 min. La biomasse est lavée dans un volume de 500µl de l'eau distillée stérile.

La technique d'extraction DNA(choc thermique) utilisée pour la récupération de l'ADN génomique est basée sur l'éclatement des membranes bactériennes par le traitement des pré-cultures avec une température de 100°C, suivie d'une température de -20°C (Queipo *et al.*, 2007).

3.5.2. L'amplification du gène de 16S rRNA

Le gène codant la sous unité 16S rRNA constitue un outil fondamental pour l'identification génétique et le traçage de la phylogénie (Emmanuel *et al.*, 2009).

3.5.2.1. Préparation du Master mix PCR

Dans le but d'amplifier les gènes codant la sous unité 16S rRNA, des amorces universelles spécifiques pour le règne bactérien sont utilisées. L'amorce du brin matrice est 27F (5'AGAGTTTGATCC- TGGCTCAG3') et l'amorce du brin complémentaire est 1492R reverse primer (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'). La pertinence de ces amorces est approuvée, testée tant *in silico* par simulation sur ordinateur tant en laboratoire *in vitro* (Arzu *et al.*, 2011).

Le master mix d'une réaction PCR d'un volume final de 25µl est constitué de :

- Nuclease Free Water :11.825µl
- Tampon Taq : 5 µl
- Diméthylsulfoxyde (DMSO) : 0.125 µl
- MgCl₂ : 4 µl
- Les Désoxyribonucléotides : 0.6 µl
- L'amorce F : 0.625 µl
- L'amorce R : 0.625 µl
- La Taq polymérase (Hot Start) : 0.2 unité
- L'ADN à analyser : 2 µl

3.5.2.2. La programmation du Thermocycleur

La PCR est réalisée par l'utilisation d'un thermocycleur Perkin Elmer (PE corporation, USA), programmé comme suite :

- ✓ Dénaturation initial : 94 °C pendant 7 minutes → 1 cycle
 - ✓ Dénaturation : 94 °C pendant 1 minute
 - ✓ Hybridation : 53 °C pendant 45 secondes
 - ✓ Extension : 72 °C pendant 45 secondes
 - ✓ Extension finale : 72 °C pendant 7 minutes → 1 cycle
- } 35 cycles

A la fin de la réaction, le gène d'intérêt est amplifié qui est de l'ordre d'un million de copies, ce qui est visible par électrophorèse sur gel d'agarose et en suffisant pour le séquençage moléculaire.

3.5.3. L'électrophorèse sur gel d'agarose

L'électrophorèse en gel d'agarose est une méthode très utilisée en biologie moléculaire qui permet la séparation des fragments d'ADN selon leur poids moléculaire. Elle est basée sur la migration des acides nucléiques chargés négativement en présence d'un champ électrique. La migration des fragments d'ADN s'effectue sur la matrice du gel d'agarose, dont les molécules de petites tailles se déplacent rapidement que les molécules de tailles supérieures.

L'électrophorèse fournit des informations nécessaires, notamment le poids moléculaire du gène amplifié grâce à la comparaison avec des marqueurs de taille. Une concentration de 1,5% (poids/volume) du gel d'agarose est préparée dans un volume final de 100 ml, chauffé à l'aide d'une micro-onde pendant 1 minute.

L'ajout d'un volume de 7 µl de Midori green avant la solidification du gel d'agarose à une température ambiante, permet la révélation des acides nucléiques à travers son intercalation entre les bases d'ADN, visualisé par les rayonnements ultra violette.

le peigne est inséré dans le gel d'agarose avant sa solidification afin des créer les puits, qui vont être utilisés pour accueillir les amplifias d'ADN.

Le gel d'agarose est immergé dans la cuvette contenant le liquide de migration : Tris/Acétate/EDTA (TAE). Ensuite, le couvercle de la cuvette est fermé et le générateur du champ électrique est ajusté à 120 voltes pendant 25 minutes. Le gel est déposé sous une lampe ultraviolette afin d'observer les bandes d'ADN fluorescentes obtenues.

3.6. Le séquençage des gènes amplifiés (16S rRNA)

Le séquençage d'un ADN, consiste à déterminer la succession des nucléotides qui le composent. La méthode de séquençage de Maxam-Gilbert utilise des produits chimiques pour rompre l'ADN et déterminer sa séquence.

Par ailleurs, Frederick Sanger a mis au point la seconde méthode, de Maxam et Gilbert. Le séquençage par la méthode de Sanger est devenu la méthode de choix. Dans ce présent travail, les amplifiats d'ADN sont purifiés à partir du gel d'agarose par l'utilisation d'un kit (QIA quick® gel extraction), séquencés par la firme (DIAG GENE, Anger-France) par l'application de la technologie de séquençage (Big Dye terminator, Applied Biosystems, UK) (**Figure 26**).

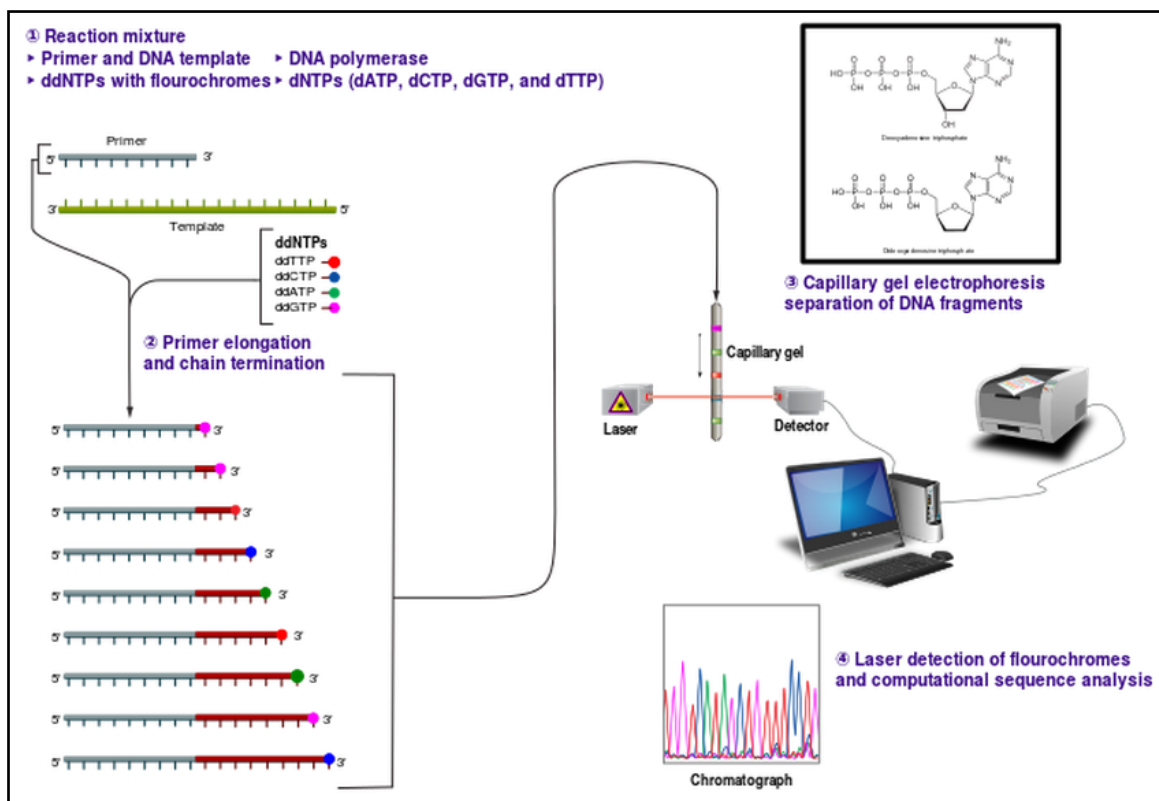


Figure 26 : Schéma récapitulatif des étapes de séquençage selon la méthode de Sanger (Rowland, 2003)

3.7. Assemblage et correction des séquences brutes

Les séquences brute fournies par le séquençage ont été analysée afin d'éliminer toute les erreurs de la Taq polymérase ainsi que les séquences des deux amorces insérées de part et d'autre des deux brins d'ADN. Dans un premier temps, la séquence brute synthétisée de chaque souche à partir du brin matrice est alignée avec la séquence brute synthétisée à partir du brin matrice. Le programme CLUSTAL W est utilisé pour l'alignement des séquences brutes (**Higgins *et al.*, 1996**). Après correction des erreurs, les deux brins sont assemblés pour former une séquence consensus.

3.8. Soumission des séquences génétiques à la base de données Genbank

Après l'assemblage et correction des séquences brutes et l'obtention des séquences consensus de chaque souche sélectionnée. Les séquences sont publiées dans la base de données Genbank à NCBI, (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) afin d'obtenir des numéros d'accession, considérés comme des codes identifiants de la séquence génétique. Ensuite, chaque séquence est comparée avec l'ensemble des gènes codant la sous unité 16S rRNA, disponibles la base de données NCBI afin de connaître le degré de similarité et déterminer l'identité la plus exacte de chaque souche.

3.9. Analyse phylogénétique des souches sélectionnées

Dans le but de déterminer le degré d'homologie des souches sélectionnées productrices de l'amylase, le BLAST N, programme incorporé dans la base de données NCBI, est utilisé. Ce programme permet de repérer des séquences nucléotidiques et la comparaison entre un ou plusieurs gènes. Ensuite, des alignements multiples en été performés grâce au programme CLUSTAL W program (**Higgins *et al.*, 1996**) afin de générer un fichier téléchargeable et exploitable par les logiciels d'analyse phylogénétique. Dans cette étude le programme MEGA 6.0 software (**Tamura *et al.*, 2013**) est utilisé pour construire un arbre phylogénétique interactif et estimer la distances évolutive en se basant sur le principe de neighbor joining method (**Weisburg *et al.*, 1991**).

La méthode Composite Likelihood (MCL) est appliquée pour apprécier la distance évolutive entre l'ensemble des paires de séquences avec une valeur de 1000 bootstrap (**Figure 27**) (**Felsenstein 2004**).

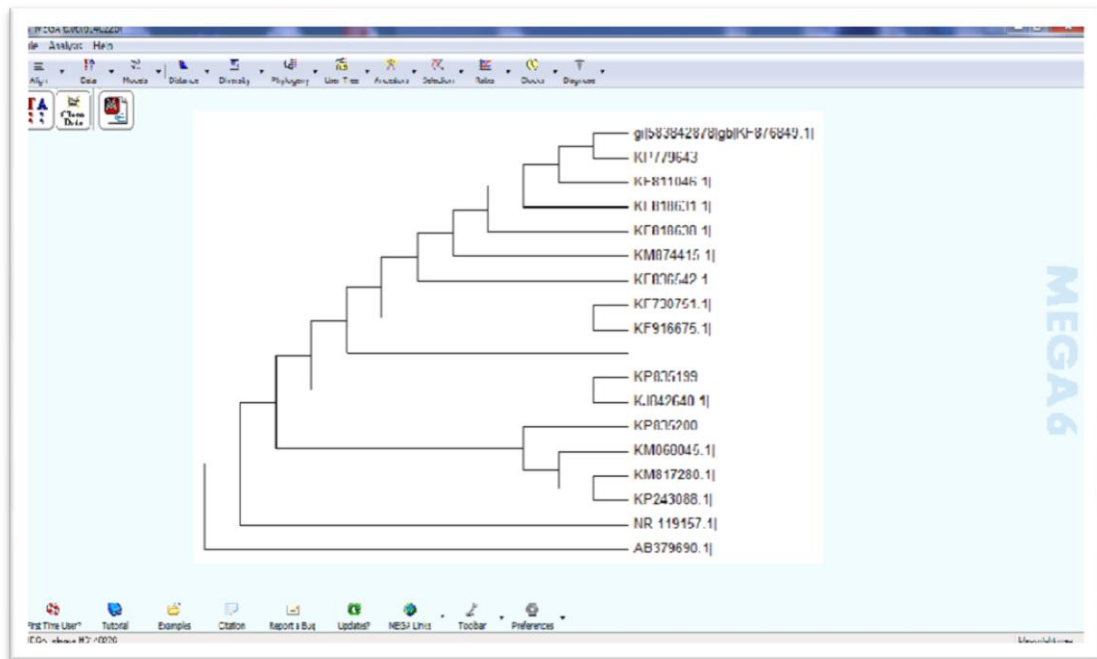


Figure 27: Capture d'écran du programme MEGA 6 Software lors de la construction de l'arbre phylogénétique.

3.10. Optimisation de la production des amylases

Dans le but d'optimiser la production des amylases et d'explorer l'influence des différents paramètres sur l'activité amylolytique de la souche sélectionnée productrice, quatre facteurs sont étudiés, à savoir la source d'azote, la concentration d'amidon, la concentration de l'inoculum et l'effet de différents sels minéraux.

3.10.1. Optimisation de la concentration d'amidon

La présence d'amidon dans le milieu de culture à une certaine concentration peut intervenir dans l'inhibition de la production des amylases. Dans cette optique, l'effet de la concentration d'amidon sur la production des amylases est mis en évidence par l'ajout des concentrations d'amidon de (0,5, 1, 1,5, 2%), dans le milieu de culture, contenant les ingrédients suivants :

- Amidon : La variable
- Source d'azote optimale retenue : 10g/l (1% poids/ volume)
- KH_2PO_4 : 1g/l
- Mg SO_4 : 0,2g/l
- Ca Cl_2 : 0,2g

3.10.2. Optimisation de la source d'azote

Afin d'explorer la source d'azote adéquate impliquée dans la production des amylases chez la souche sélectionnée productrice, les composés suivants : peptone, caséine, gélatine, urée et le sulfate d'ammonium ($\text{NH}_4^+\text{SO}_4^-$) sont ajoutées séparément aux milieux de culture contenant une concentration de 10g/L d'amidon additionnés des sources d'azotes telles que KH_2PO_4 :1g/l, Mg SO_4 :0,2g/l, Ca Cl_2 : 0,2g. L'activité amylolytique est mesurée par la méthode DNSA.

3.10.3. Optimisation de l'inoculum

Afin d'explorer l'influence de la quantité d'inoculum sur la production des amylases, une suspension bactérienne d'une densité de 0,5 Mc Farland préparée à partir d'une pré-culture âgée de 24heures, est inoculée dans un volume de 100ml de milieu de culture optimisé. Les concentrations d'inoculum (0,5, 1, 1,5 et 2%) sont testées. Ensuite, les culturesensemencées avec les différentes concentrations de la biomasse bactérienne sont incubées à une température de 25°C, avec une agitation de 75rpm à des intervalles de temps réguliers (24, 28, 72h. L'activité amylolytique est mesurée par la méthode DNSA.

3.10.4. Effet de différents sels minéraux sur la production de l'amylase

La présence de certains sels minéraux joue un rôle important dans la synthèse des enzymes. En effet, la régulation génétique de la synthèse des enzymes semble être affectée par l'absence de certains éléments, qui peuvent intervenir soit dans la répression ou soit dans l'inhibition. Dans ce présent travail, l'effet du calcium (CaCl_2), du magnésium (MgCl_2), du fer (FeCl_3), du Zinc (Zn SO_4) et de Chrome (Cr_2O_3) est mis en évidence. Les éléments sont incorporés dans le milieu de culture à une concentration de 0,1% à partir d'une solution mère concentrée à 1,5 mM.

4. Résultats

4.1. La stratégie d'isolement

4.1.1. Le screening primaire

Le criblage primaire des bactéries productrices d'amylase appartenant au genre *Bacillus* sur milieu de culture Starch agar a permis l'isolement de 100 souches dotées d'une activité amylolytique, dont 54 souches sont isolées à partir des sites de prélèvement de catégorie A et 46 souches à partir des sites de prélèvement de la catégorie (B). Une réaction positive de la dégradation d'amidon (**Figure 28**) se manifeste par l'apparition d'une zone d'hydrolyse claire autour de la colonie après inondation de la boîte par le Lugol (**Aneja, 2003**). Le screening primaire a permis l'observation une zone d'hydrolyse claire qui témoigne la production et la sécrétion des amylases dans le milieu de culture et la dégradation de l'amidon en sucres simple et l'absence de la coloration bleue après l'ajout de Lugol.

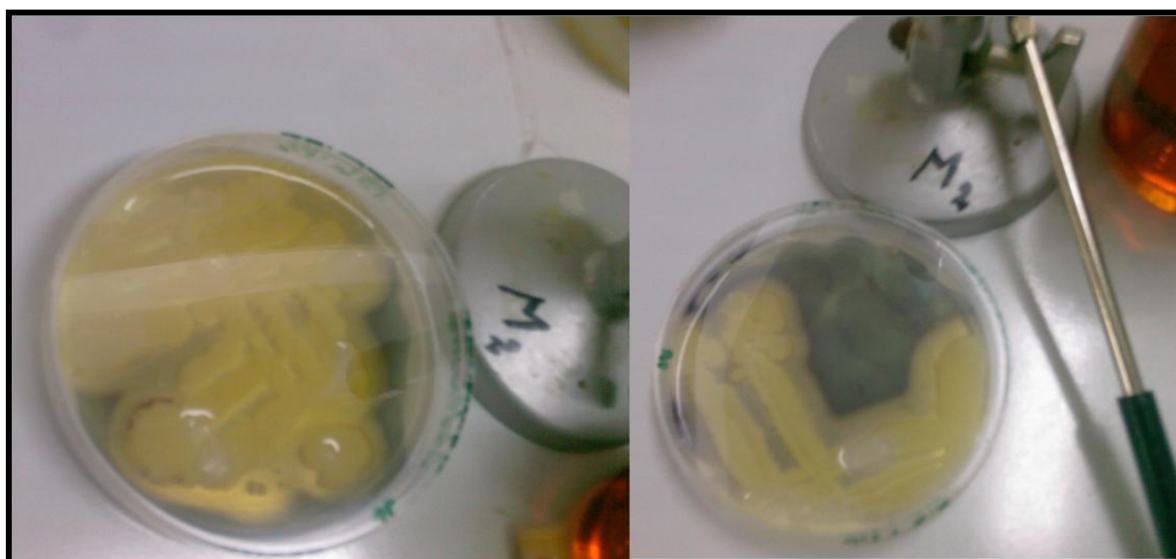


Figure 28 : Formation de la zone d'hydrolyse d'amidon autour des colonies productrices des amylases.

Les souches isolées, sélectionnées productrices de l'amylase sont purifiées par des repiquages successifs par stries d'épuisement, indiquent la présence d'un aspect macroscopique très hétérogène de différentes formes, couleurs et de colonie assez diverses :

- Colonies crémeuses, blanchâtre, translucides et à bord régulier
- Colonies sèches, couleur jaunâtre et à bord irrégulier.
- Colonies transparentes, bombées, collante et à bord régulier
- Colonies blanches, de grande taille et d'un aspect ramifié

L'identification préliminaire a fourni des informations cruciales vis-à-vis la vérification de l'appartenance au genre *Bacillus*. Ce dernier est bien présenté dans le livre de manuel *Bergey's of determinative bacteriology* qui exige comme conditions d'intégration à ce genre les caractères suivant : L'aspect macroscopique des colonies (**Figure 29**), une coloration de Gram positive (**Figure 31**), la présence des spores, une réaction positive du catalase (**Figure 30**), ainsi que le type respiratoire qui doit être soit aérobic stricte ou bien aéro-anaerobe. Les résultats de l'identification préliminaire sont présentés dans le **tableau 5**.

Tableau 5 : Présentation des propriétés morphologiques et biochimiques des isolats lors de l'identification préliminaire des isolats de la catégorie (A)

Isolats	Aspect des colonies	Gram	Mode d'appariement	Position de la spore	catalase	Type respiratoire
MK1	L'ensemble des souches sont représentées par des colonies de grande taille, Blanchâtres plates, muqueuses et à bord irrégulier	+	Bacille en chaînette	Spore centrale	+++	Aérobic stricte
MK2		+	Petit bacille	Spore centrale	+++	Aérobic stricte
MK3		+	Bacille isolé	Spore centrale	+++	Aérobic stricte
MK4		+	Petit bacille	sub-terminale	+++	Aérobic stricte
MK5		+	Bacille isolé	Spore centrale	+++	Aérobic stricte
MK6		+	Petit bacille en chaînette	sub-terminale	+++	Aéro-anaerobic
MK7		+	Bacille isolé	sub-terminale	+++	Aérobic stricte
MK8		+	Bacille isolé	Spore centrale	+++	Aéro-anaerobic
MK9		+	Bacille en chaînette	Spore centrale	+++	Aéro-anaerobic
MK10		+	Bacille en chaînette > 3 μ m	sub-terminale	+++	Aéro-anaerobic

Résultats

MK11		+	Bacille isolé	Spore centrale	+++	Aérobie stricte
STEP1		+	Petit bacille	sub-terminale	+++	Aéro- anaerobie
STEP2	Un mélange de colonies de	+	Grand bacille en chaînette	sub-terminale	+++	Aéro- anaerobie
STEP3	grande taille,	+	Petit bacille en chaînette	Spore centrale	+++	Aérobie stricte
STEP4	Blanches ou jaunâtre, sèches	+	Bacille isolé >3 µm	sub-terminale	+++	Aéro- anaerobie
STEP5	et à bord	+	Petit bacille	sub-terminale	+++	Aérobie stricte
STEP6	irrégulier	+	Petit bacille en chaînette	Spore centrale	+++	Aérobie stricte
STEP7		+	Bacille isolé	sub-terminale	+++	Aéro- anaerobie
STEP8		+	Petit bacille	Spore centrale	+++	Aérobie stricte
STEP9		+	Petit bacille	sub-terminale	+++	Aérobie stricte
MW1		+	Petit bacille	Spore centrale	+++	Aérobie stricte
MW2	Formes	+	Bacille isolé	Spore centrale	+++	Aérobie stricte
MW3	Variables de	+	Petit bacille	Spore centrale	+++	Aérobie stricte
MW4	Colonies	+	Bacille isolé	sub-terminale	+++	Aérobie stricte
MW5	Translucides	+	Petit bacille en chaînette	Spore centrale	+++	Aérobie stricte
MW6	Blanches et	+	Bacille isolé	sub-terminale	+++	Aéro- anaerobie
MW7	Visqueuses	+	Bacille isolé	Spore centrale	+++	Aérobie stricte
MW8	A bord	+	Bacille en chaînette	Spore centrale	+++	Aérobie stricte
MW9	régulier	+	Bacille en chaînette > 3 µm	Spore centrale	+++	Aérobie stricte
MW10		+	Bacille isolé	sub-terminale	+++	Aérobie stricte
MW11		+	Petit bacille	Spore centrale	+++	Aérobie stricte
MW12		+	Grand bacille en chaînette	sub-terminale	+++	Aéro- anaerobie
MW13		+	Petit bacille en chaînette	Spore centrale	+++	Aérobie stricte
TMP1		+	Bacille isolé >3 µm	Spore centrale	+++	Aérobie stricte
TMP2	des colonies	+	Petit bacille	Spore centrale	+++	Aérobie stricte
TMP3	sèches, jaunâtres	+	Bacille isolé	sub-terminale	+++	Aérobie stricte
TMP4	plates,	+	Petit bacille	Spore centrale	+++	Aérobie stricte
TMP5	muqueuses et à bord irrégulier	+	Bacille isolé	sub-terminale	+++	Aéro- anaerobie

Résultats

TMP6		+	Petit bacille chaînette	Spore centrale	+++	Aérobic stricte
TMP7		+	Bacille isolé	Spore centrale	+++	Aérobic stricte
TMP8		+	Bacille isolé	Spore centrale	+++	Aérobic stricte
SMM1		+	Bacille en chaînette	sub-terminale	+++	Aérobic stricte
SMM2	Présence de colonies sèches ou crémeuse, blanches ou transparentes, à bord régulier ou forme ramifié	+	Bacille en chaînette > 3 μm	Spore centrale	+++	Aérobic stricte
SMM3		+	Bacille isolé	sub-terminale	+++	Aéro-anaerobic
SMM4		+	Petit bacille	Spore centrale	+++	Aérobic stricte
SMM5		+	Grand bacille en chaînette	Spore centrale	+++	Aérobic stricte
SMM6		+	Petit bacille en chaînette	Spore centrale	+++	Aérobic stricte
SMM7		+	Bacille isolé >3 μm	sub-terminale	+++	Aérobic stricte
SMM8		+	Petit bacille	Spore centrale	+++	Aérobic stricte
SMM9		+	Bacille isolé	sub-terminale	+++	Aéro-anaerobic
SMM10		+	Petit bacille	Spore centrale	+++	Aérobic stricte
SMM11		+	Bacille isolé	Spore centrale	+++	Aérobic stricte
SMM12		+	Petit bacille en chaînette	Spore centrale	+++	Aérobic stricte
LAK1		Un mélange de colonies de taille moyenne, blanches ou jaunâtre, sèches et à bord irrégulier	+	Bacille isolé	sub-terminale	+++
LAK2	+		Bacille isolé	Spore centrale	+++	Aérobic stricte
LAK3	+		Bacille en chaînette	sub-terminale	+++	Aéro-anaerobic
LAK4	+		Bacille en chaînette > 3 μm	Spore centrale	+++	Aérobic stricte
LAK5	+		Bacille isolé	Spore centrale	+++	Aérobic stricte
LAK6	+		Petit bacille	Spore centrale	+++	Aérobic stricte
LAK7	+		Grand bacille en chaînette	sub-terminale	+++	Aérobic stricte
LAK8	+		Petit bacille en chaînette	Spore centrale	+++	Aérobic stricte
LAK9	+		Bacille isolé >3 μm	sub-terminale	+++	Aéro-anaerobic
LAK10	+		Bacille isolé	Spore centrale	+++	Aérobic stricte
LAK11	+		Bacille isolé	Spore centrale	+++	Aéro-anaerobic

Tableau 6 : Présentation des propriétés morphologiques et biochimiques des isolats lors de l'identification préliminaire des isolats de la catégorie (B).

Isolat	Aspect des colonies	Gram	La forme	Position de la spore	la catalase	Type respiratoire
HBG1		+	Bacille en chaînette	Spore centrale	+++	Aérobie stricte
HBG2	des colonies	+	Petit bacille	Spore centrale	+++	Aérobie stricte
HBG3	sèches, jaunâtres	+	Bacille isolé	Spore centrale	+++	Aérobie stricte
HBG4	plates ou	+	Petit bacille	sub-terminale	+++	Aérobie stricte
HBG5	muqueuses et à	+	Bacille isolé	Spore centrale	+++	Aérobie stricte
HBG6	bord irrégulier	+	Bacille en chaînette	sub-terminale	+++	Aéro-anaerobie
HBG7		+	Bacille isolé	sub-terminale	+++	Aérobie stricte
HC1	colonies	+	Bacille isolé	Spore centrale	+++	Aéro-anaerobie
HC2	blanches,	+	Bacille en chaînette	Spore centrale	+++	Aéro-anaerobie
HC3	visqueuses	+	Bacille en chaînette	sub-terminale	+++	Aéro-anaerobie
HC4	bombés, et à	+	Bacille isolé	Spore centrale	+++	Aérobie stricte
HC5	bord régulier	+	Petit bacille	sub-terminale	+++	Aéro-anaerobie
HC6		+	Grand bacille $\geq \mu\text{m}$	sub-terminale	+++	Aéro-anaerobie
HS1		+	Bacille isolé	Spore centrale	+++	Aérobie stricte
HS2	Un mélange de	+	Bacille isolé $>3 \mu\text{m}$	sub-terminale	+++	Aéro-anaerobie
HS3	colonies de	+	Petit bacille	sub-terminale	+++	Aérobie stricte
HS4	taille moyenne,	+	Bacille isolé	Spore centrale	+++	Aérobie stricte
HS5	Blanches ou	+	Bacille isolé	sub-terminale	+++	Aéro-anaerobie
HS6	jaunâtre, sèches	+	Petit bacille	Spore centrale	+++	Aérobie stricte
HS7	et à bord	+	Petit bacille	sub-terminale	+++	Aérobie stricte
HS8	irrégulier	+	Petit bacille	Spore centrale	+++	Aérobie stricte
HS9		+	Bacille isolé	Spore centrale	+++	Aérobie stricte
HB1		+	Petit bacille	Spore centrale	+++	Aérobie stricte
HB2	colonies	+	Bacille isolé	sub-terminale	+++	Aérobie stricte
HB3	blanches,	+	Petit bacille $<3\mu\text{m}$	Spore centrale	+++	Aérobie stricte
HB4	translucide	+	Bacille isolé	sub-terminale	+++	Aéro-anaerobie
HB5	bombés, et à	+	Bacille isolé	Spore centrale	+++	Aérobie stricte
HB6	bord régulier	+	Bacille en chaînette	Spore centrale	+++	Aérobie stricte
HB7		+	Bacille en chaînette	Spore centrale	+++	Aérobie stricte
HBH1		+	Bacille isolé	sub-terminale	+++	Aérobie stricte
HBH2	colonies jaunes,	+	Petit bacille	Spore centrale	+++	Aérobie stricte
HBH3	sèches et	+	Grand bacille $\geq 3 \mu\text{m}$	sub-terminale	+++	Aéro-anaerobie

Résultats

HBH4	ramifiées	+	Bacille isolé	Spore centrale	+++	Aérobic stricte
HBH5		+	Bacille isolé	sub-terminale	+++	Aéro-anaerobie
HBH6		+	Bacille en chaînette	sub-terminale	+++	Aérobic stricte
HO1		+	Petit bacille	Spore centrale	+++	Aérobic stricte
HO2	Présence de	+	Bacille isolé	sub-terminale	+++	Aéro-anaerobie
HO3	colonies sèches	+	Petit bacille <3µm	Spore centrale	+++	Aérobic stricte
HO4	ou crémeuse,	+	Bacille isolé	sub-terminale	+++	Aérobic stricte
HO5	blanches ou	+	Bacille isolé	Spore centrale	+++	Aérobic stricte
HO6	transparentes, à	+	Bacille en chaînette	Spore centrale	+++	Aérobic stricte
HO7	bord régulier ou	+	Bacille isolé	Spore centrale	+++	Aérobic stricte
HO8	forme ramifié	+	Petit bacille <3µm	sub-terminale	+++	Aérobic stricte
HO9		+	Bacille isolé	Spore centrale	+++	Aérobic stricte
HO10		+	Bacille isolé	sub-terminale	+++	Aérobic stricte
HO11		+	Bacille en chaînette	sub-terminale	+++	Aérobic stricte

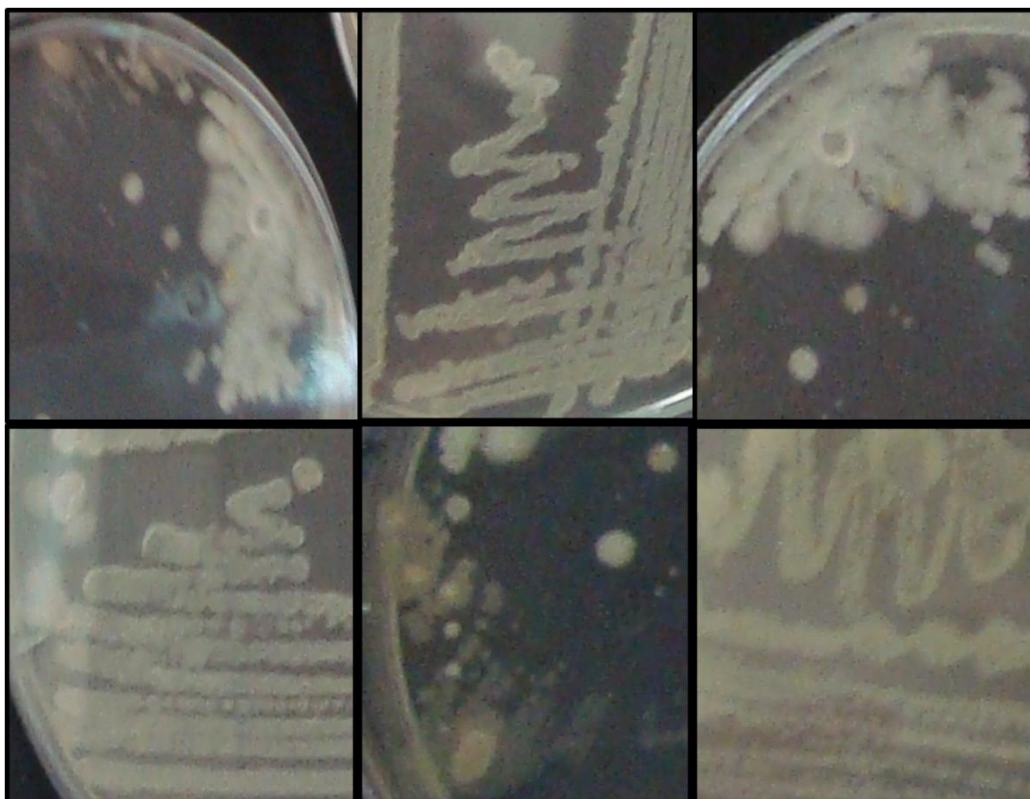


Figure 29 : Diversité de l'aspect macroscopique des souches isolées en présence d'un mélange de formes, couleurs et de consistances des colonies.

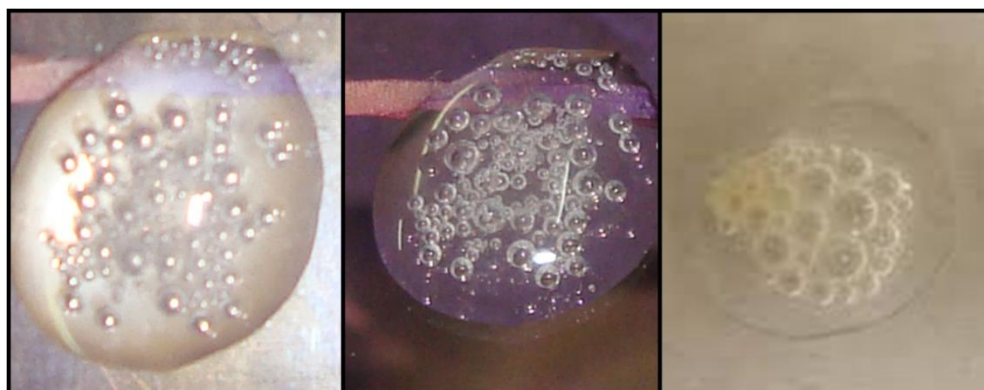


Figure 30 : La mise en évidence du test catalase chez les souches isolées, sélectionnées productrices de l'amylase, lors de l'identification préliminaire.

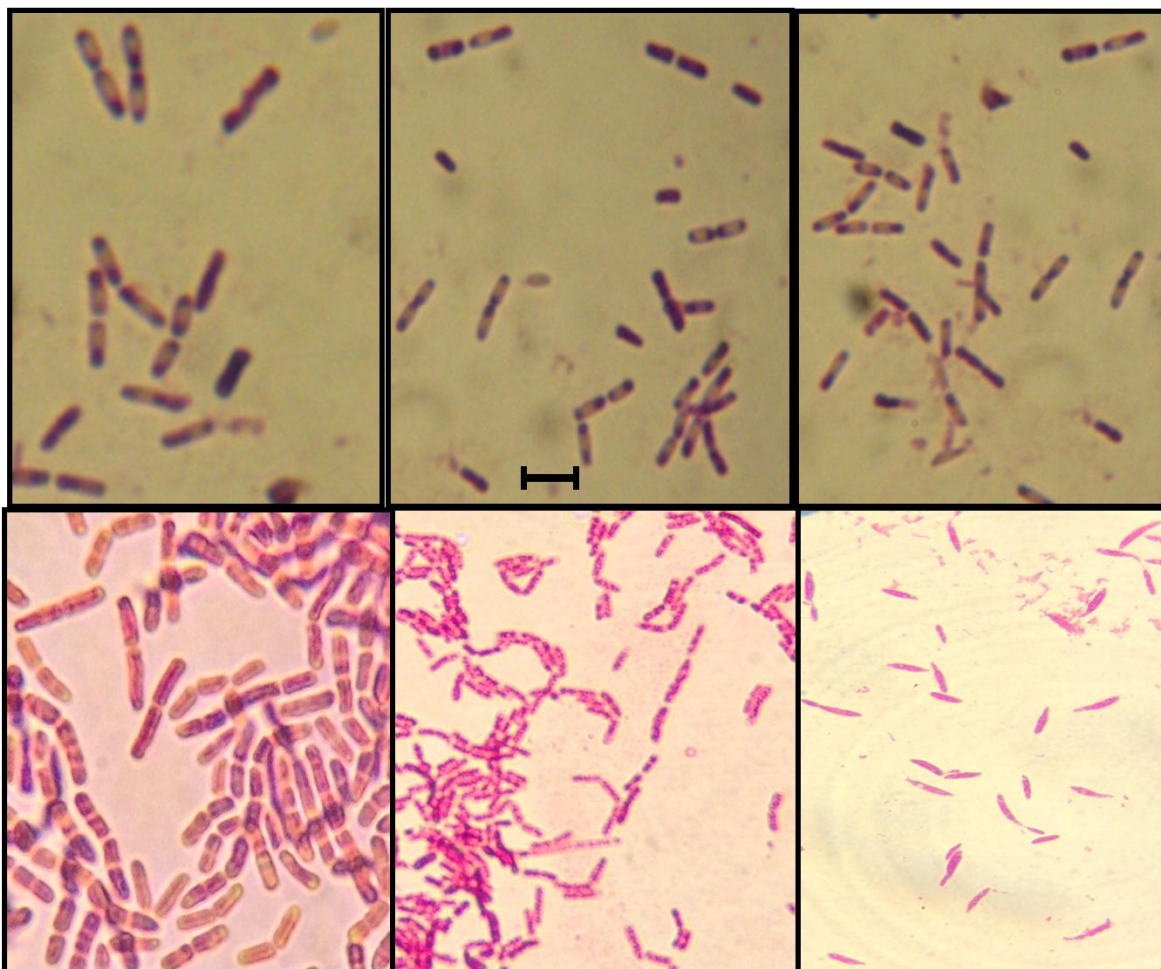


Figure 31 : La coloration de Gram et l'observation microscopiques de quelques souches de *Bacillus* isolées (grossissement $\times 100$ et barre représente $3\mu\text{m}$).

4.2. Screening secondaire des souches productrices d'amylase

Le criblage secondaire consiste à sélectionner la souche hyperproductrice d'amylase parmi les isolats de la première catégorie, ainsi que les souches ayant des amylases thermostables et résistantes au pH au sein des isolats de la catégorie (B).

4.2.1. Mesure des diamètres de la zone d'hydrolyse

La présence de l'activité amylolytique chez les bactéries productrices d'amylase dans le milieu de culture Starch agar, se manifeste par la formation d'une zone d'hydrolyse claire autour des coloniesensemencées par stries (**Figure32**). L'activité amylolytique est quantifiée par mesure des diamètres de la zone claire formées autour de la colonieensemencée par strie sur la surface du milieu de culture Starch agar (**Wisdomkofi et al., 2006**). Ce paramètre permet le calcul l'index de l'activité amylolytique des souches sélectionnées productrices des amylases (**Tableau 7**).

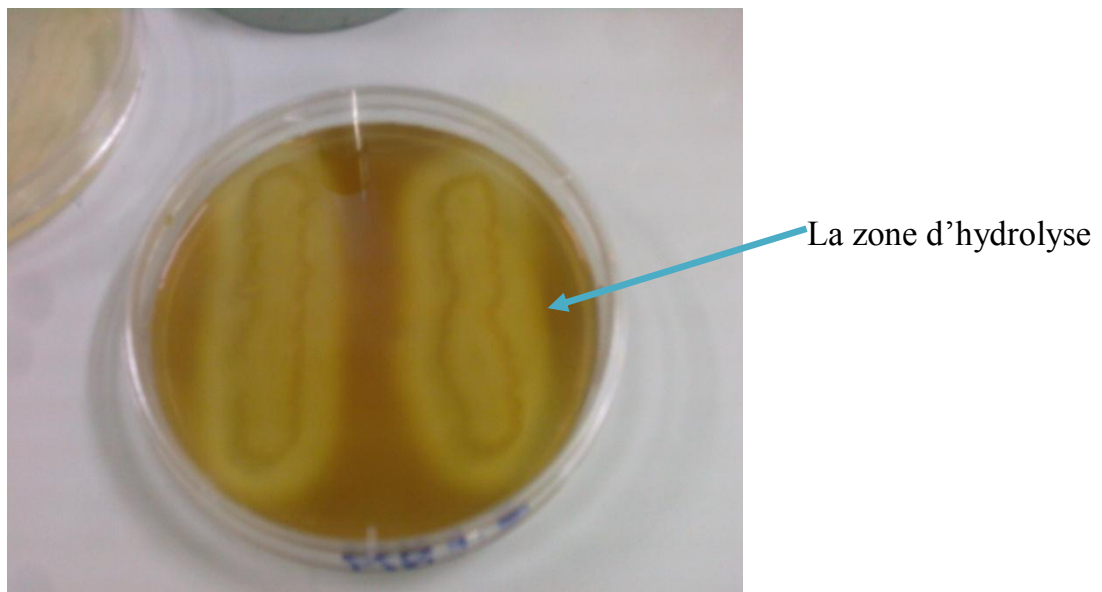


Figure 32 : L'apparition de Zone d'hydrolyse autour de la colonie productrice d'amylaseensemencée par stries de la souche MK7.

Tableau 7 :Présentation des résultats de l'index d'activité amylolytique des isolats du genre *Bacillus*.

La souche	L'index d'activité amylolytique	La souche	L'index d'activité amylolytique	La souche	L'index d'activité amylolytique
MK1	0,95	STEP1	0,82	MW1	1,2
MK2	0,84	STEP2	1,65	MW2	1,78
MK3	0,75	STEP3	2,05	MW3	0,96
MK4	1,1	STEP4	0,56	MW4	1,56
MK5	0,65	STEP5	1,52	MW5	1,63
MK6	0,78	STEP6	0,63	MW6	1,87
MK7	2,93	STEP7	1,54	MW7	0,88
MK8	1,92	STEP8	0,72	MW8	1,03
MK9	0,89	STEP9	2,58	MW9	1,42
MK10	1,24			MW10	2,56
MK11	1,56			MW11	1,33
				MW12	0,98
				MW13	2,07
La souche	L'index d'activité amylolytique	La souche	L'index d'activité amylolytique	La souche	L'index d'activité amylolytique
LAK1	1,05	SMM1	1,25	TMP1	1,77
LAK2	0,87	SMM2	0,68	TMP2	1,23
LAK3	0,95	SMM3	0,96	TMP3	0,88
LAK4	1,26	SMM4	1,85	TMP4	1,03
LAK5	2,03	SMM5	1,74	TMP5	1,42
LAK6	1,75	SMM6	2,25	TMP6	1,59
LAK7	2,01	SMM7	1,32	TMP7	1,33
LAK8	1,52	SMM8	2,63	TMP8	1,28
LAK9	1,36	SMM9	1,57		
LAK10	0,89	SMM10	1,30		
LAK11	1,44	SMM11	1,48		
		SMM12	0,98		

L'étude de la production de l'amylase des souches sélectionnées performantes sur milieu de culture solide a fourni des résultats très intéressants et exploitables pour le calcul de l'index de l'activité amylolytique. L'expression de cette enzyme a révélé une importante variabilité avec une valeur maximale de 2.93 chez la souche MK7, caractérisée par un potentiel de production des amylases très élevé par rapport aux autres souches.

4.2.2. Dosage des amylases sur milieu de culture liquide

Le dosage des amylases par la méthode de DNS consiste l'appréciation de la quantité des amylases produites dans un milieu de culture liquide chez les souches sélectionnées productrices de cette enzyme.

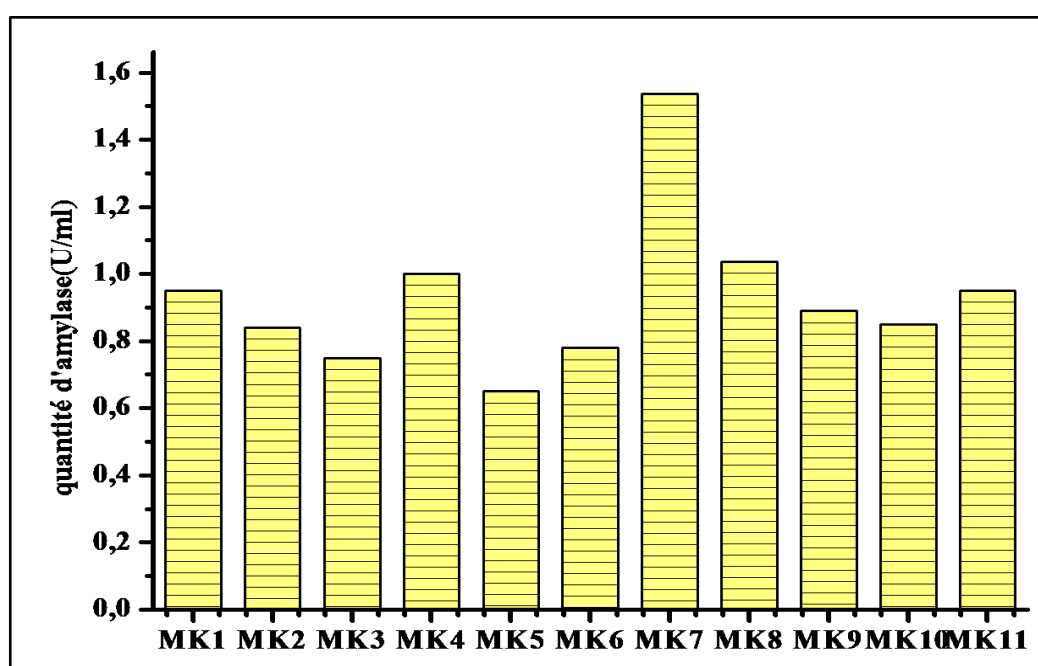


Figure 33: Estimation de la production d'amylase par la méthode DNSA chez les souches isolées à partir du site (MK).

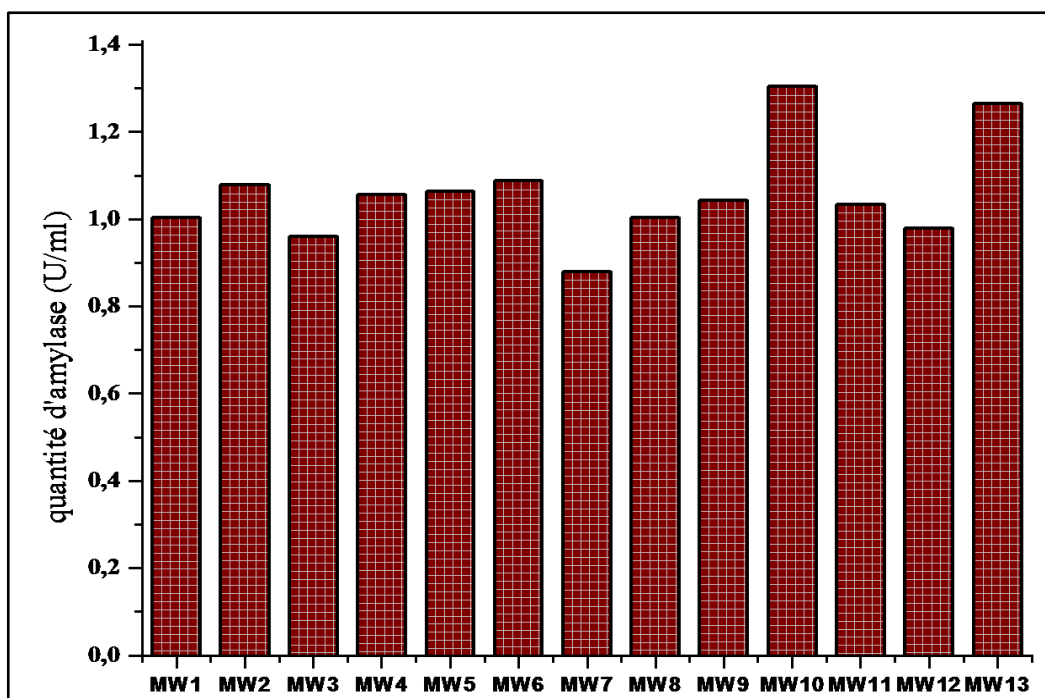


Figure 34: Estimation de la production d'amylase par la méthode DNSA chez les souches isolées à partir du site (MW).

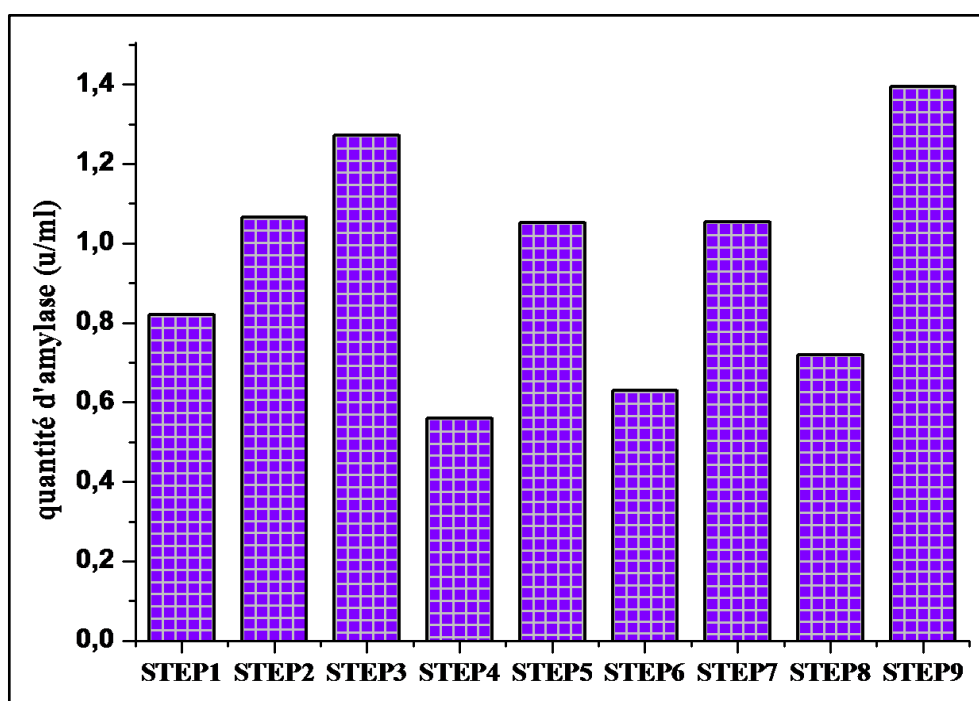


Figure 35: Estimation de la production d'amylase par la méthode DNSA chez les souches isolées à partir du site (STEP).

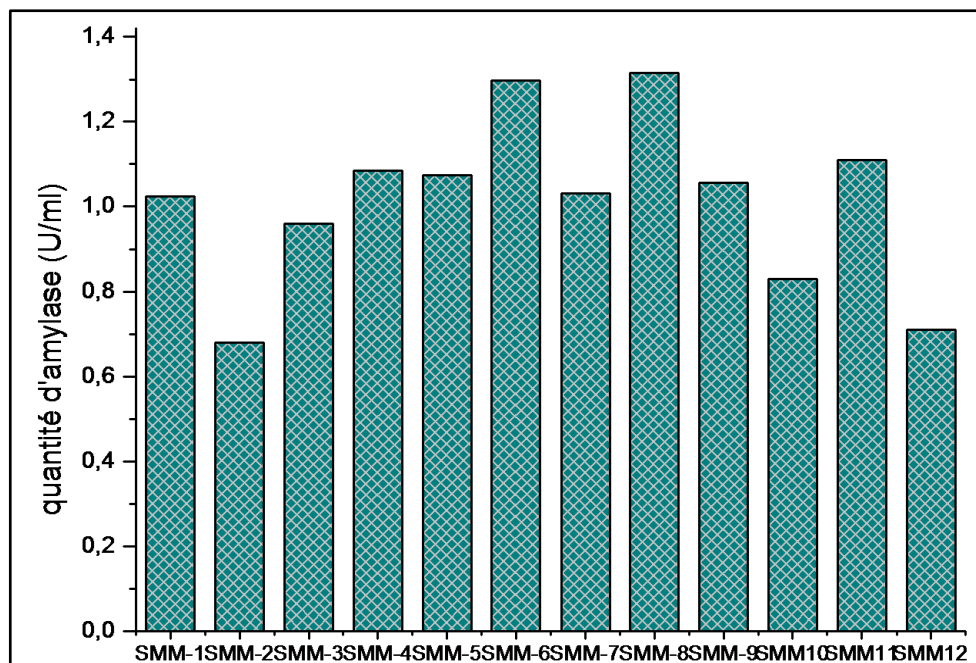


Figure 36: Estimation de la production d'amylase par la méthode DNSA chez les souches isolées à partir du site (SMM).

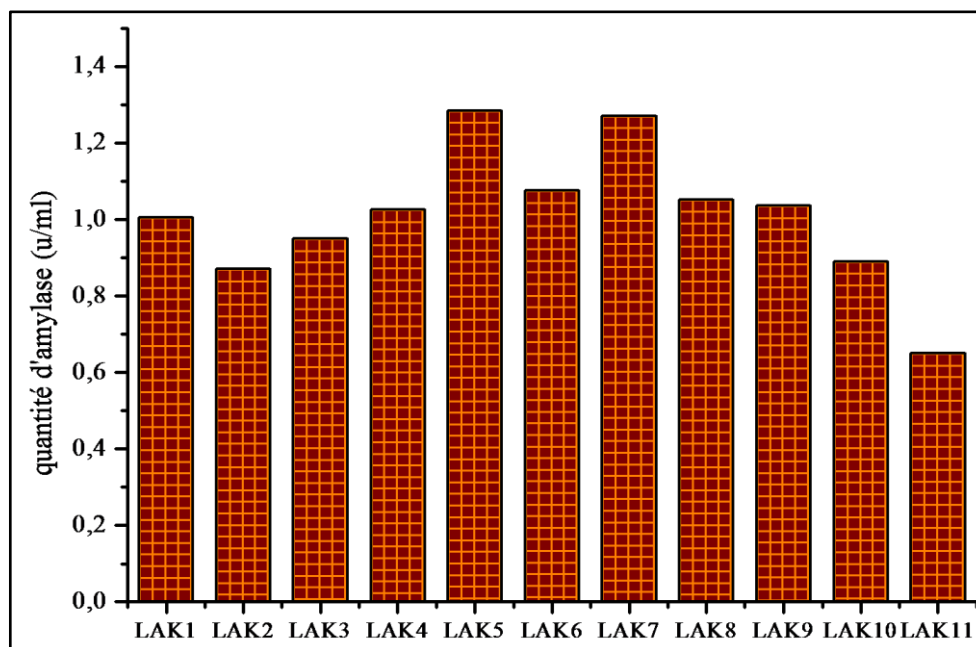


Figure 37: Estimation de la production d'amylase par la méthode DNSA chez les souches isolées à partir du site (LAK).

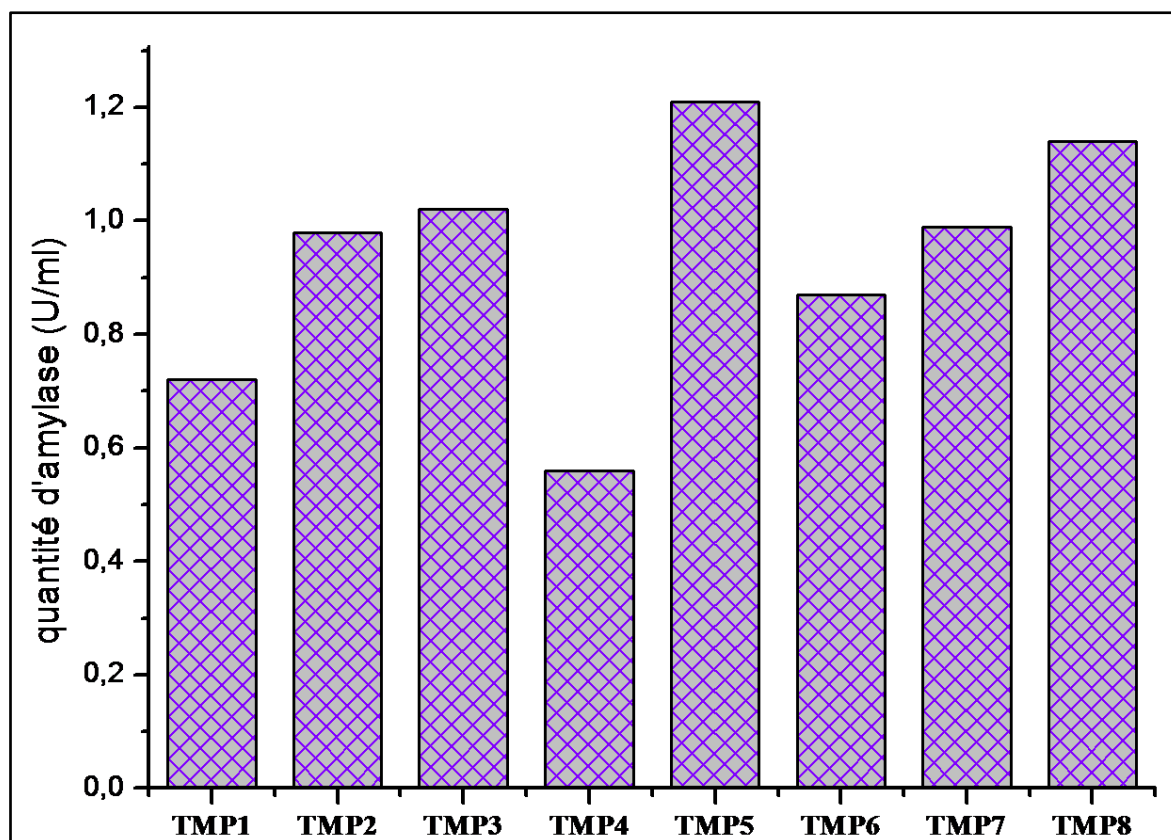


Figure 38 : Estimation de la production d’amylyase par la méthode DNS chez les souches isolées à partir du site (TMP).

Les résultats de l’estimation de la production d’amylyase par la méthode DNS exprimées en unité/ml chez les souches isolées à partir de différents sites (MK, MW, STEP, SMM, LAK) sont illustrés dans les **Figures (33, 34, 35, 36, 37, 38)**. La comparaison des données obtenues a révélé une variabilité de la quantité de d’amylyases produites d’une souche à une autre avec une production maximale de (1,537 U/ml) chez la souche MK7. A cet effet, la souche MK7, sélectionnée productrice de l’amylyase est utilisée pour optimisation des différents paramètres impliqués dans la production de cette enzyme.

4.3. Identification de la souche sélectionnée performante par la galerie API

20 E

Les résultats du profil biochimique de la souche MK7, inoculée sur la galerie API 20E (Figure 39, tableau 8) sont exprimés en se référant au Tableau d'interprétation de la galerie Api 20 E en (+, -) pour les tests positifs et négatifs (Annexe c).



Figure 39 : Aspect de la galerie API 20E, inoculée par la souche MK7 après l'incubation à une température 30°C pendant 24 heures.

Tableau 8 : Illustration du profil biochimique de la souche MK7

Les tests	Les résultats
ONPG	-
ADH	+
LDC	+
ODC	+
CIT	+
H ₂ S	-
URE	-
TDA	-
IND	-
VP	+
GEL	+
GLU	+
MAN	-
INO	-
SOR	+
RHA	-
SAC	+
MEL	-
AMY	+
ARA	-
AMI	+
CAS	+
OX	-

Les résultats des tests biochimiques obtenus suite à l'inoculation de galerie API 20 E avec la souche MK7 sont introduits dans la grille des résultats du Bacterial identification Program.

Lors de l'introduction du gille d'identification, le programme engendre une comparaison entre les résultats de la souche MK7 avec la matrice disponible sur les banques de données de *Bacillus*. Le programme a suggère que la souche MK7 est une *Bacillus subtilis* avec un score d'identification de 0,99949 (**Figure 40**).

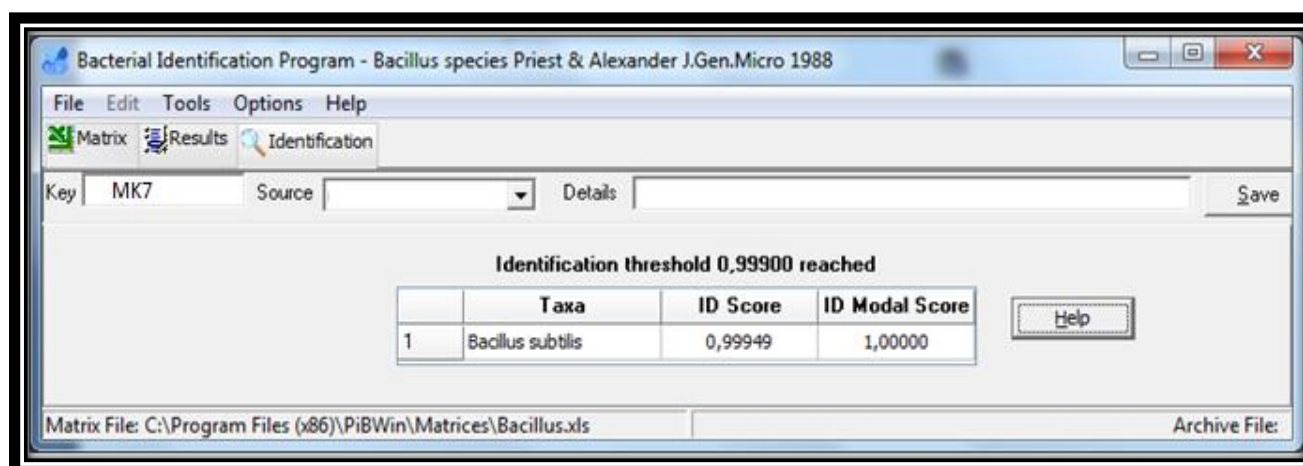


Figure 40: Capture d'écran de l'affichage de l'onglet d'identification de la souche MK7Par le Bacterial Identification Program

4.4. Etude de la thermostabilité des amylases des souches isolées à partir des sources thermales

L'étude de la thermostabilité de l'activité des amylases des souches isolées, sélectionnées productrices des amylases demeure un caractère très recherché dans l'industrie enzymatique, car la présence d'une gamme de température, ou ces enzymes sont fonctionnelles est large offre un éventuel étendu pour les industriels. A cet effet, un ensemble de six sources thermales ont été explorées à la conquête de ces enzymes valeureuses.

Dans le but d'explorer la température optimale impliquée dans la production de l'amylase, les souches isolées, sélectionnées productrices des amylases sont inoculées dans un milieu de culture de production, incubées à différentes températures. Les résultats obtenus illustrés dans les **Figures (41, 42, 43, 44, 45, 46)** ont montré que les souches (HC2, HBH2, HBH5 et HBH6) ont manifesté des températures optimales de production de (85, 80, 75, 75°C) respectivement.

L'évolution de l'activité amylolytique et leur stabilité par rapport à la température ont illustrés dans la **Figure 47**. Les souches productrices de l'amylase sélectionnées thermostables sont retenues une éventuelle identification moléculaire et une analyse phylogénétique.

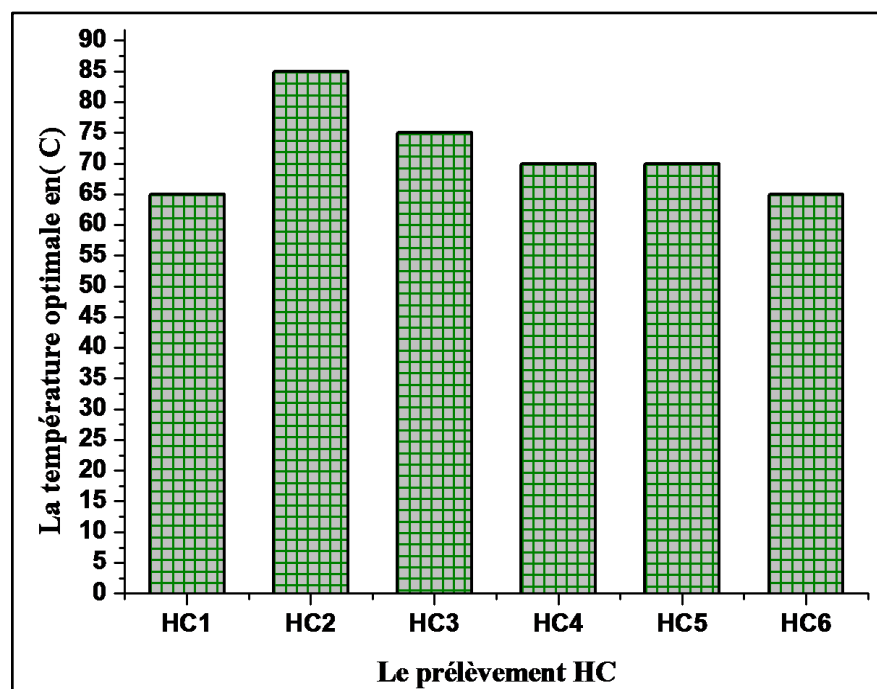


Figure 41 : Illustration des optima de température des amylases à partir des isolats du prélèvement HC

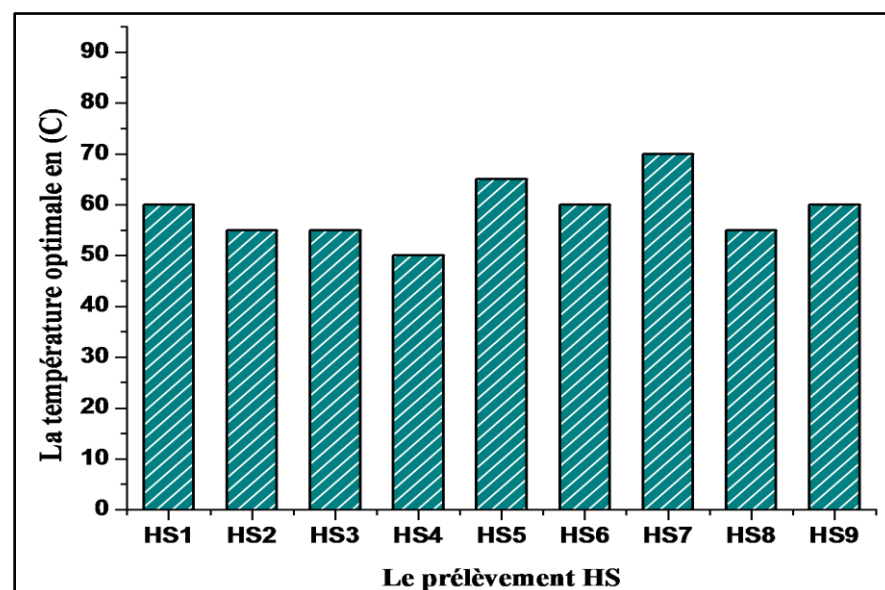


Figure 42 : Illustration des optima de température des amylases à partir des isolats du prélèvement HS.

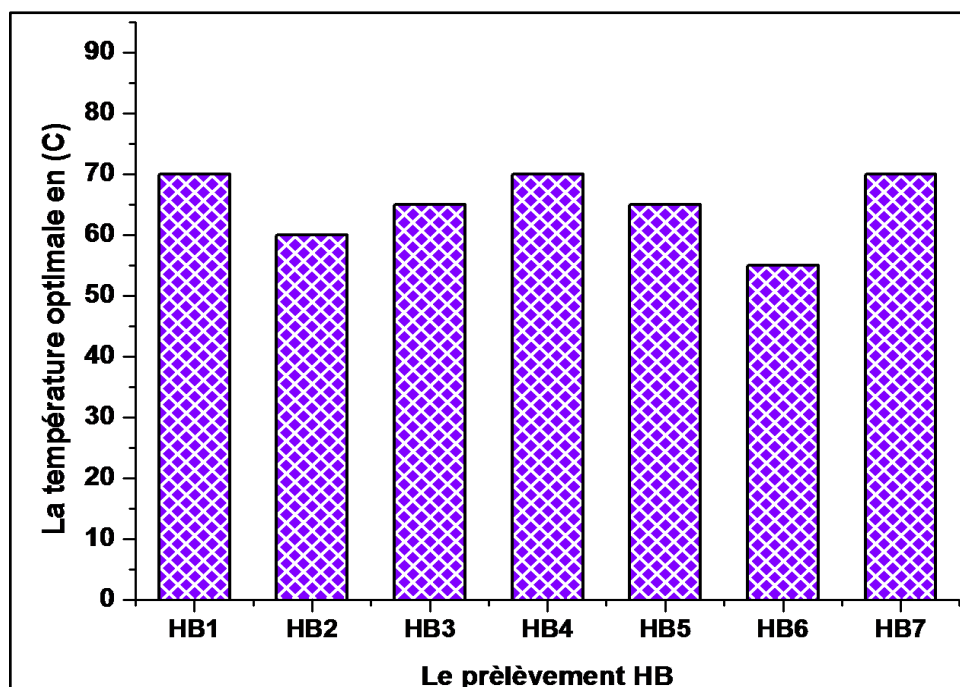


Figure 43 : Illustration des températures optimales des amylases des souches isolées à partir des prélèvements HB.

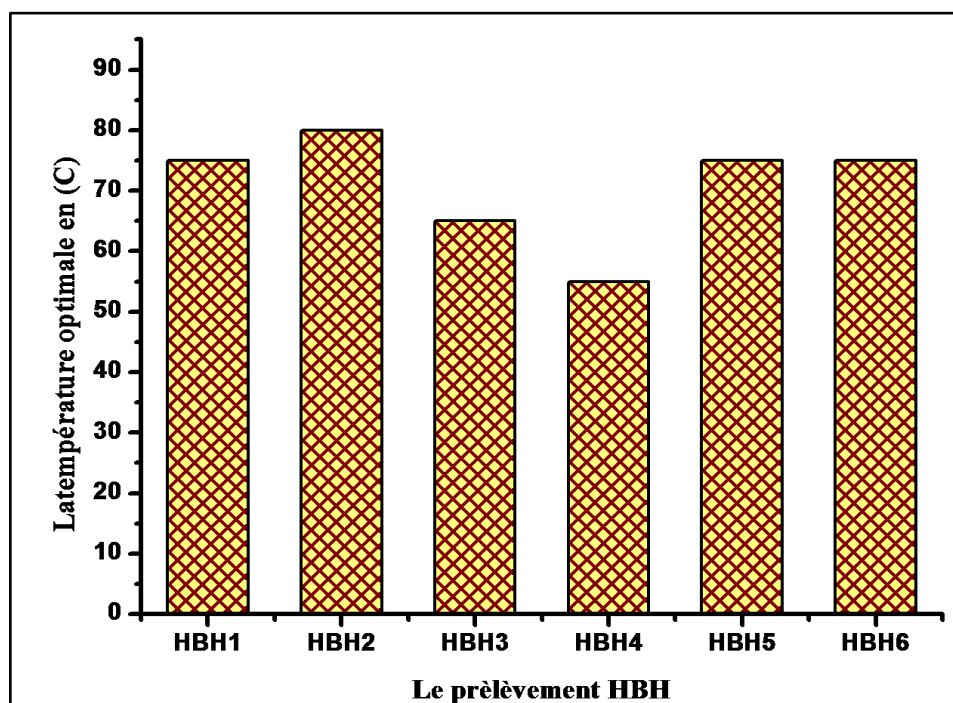


Figure 44 : Illustration des températures optimales des amylases des souches isolées à partir du prélèvement HBH.

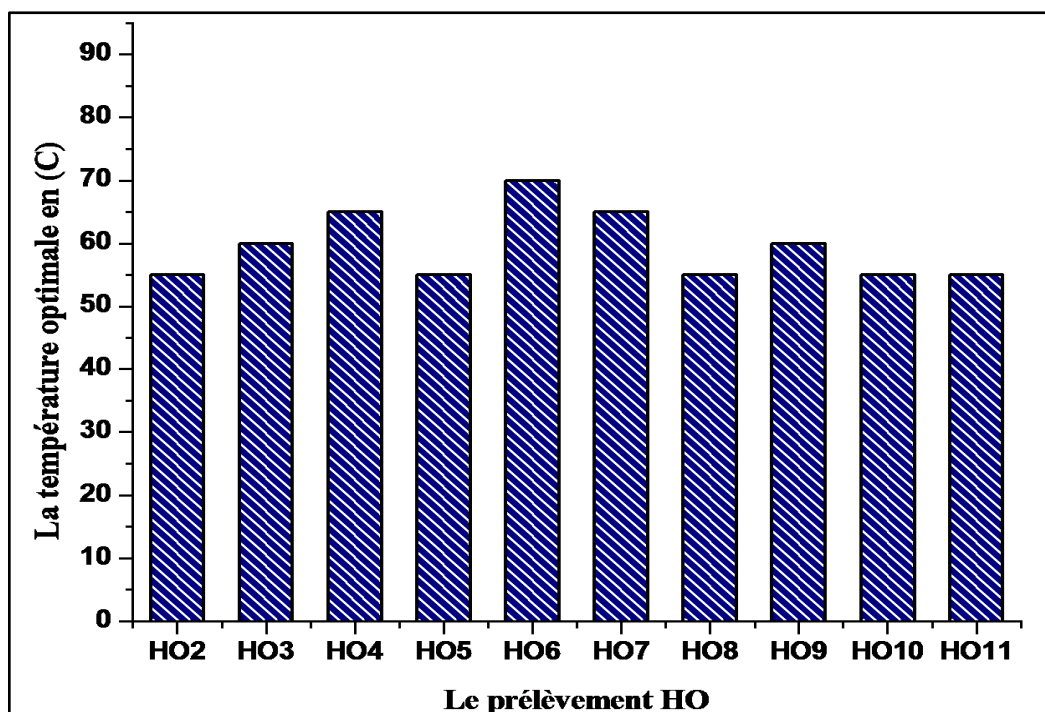


Figure 45 : Illustration des températures optimales des amylases des souches isolées à partir du prélèvement HO.

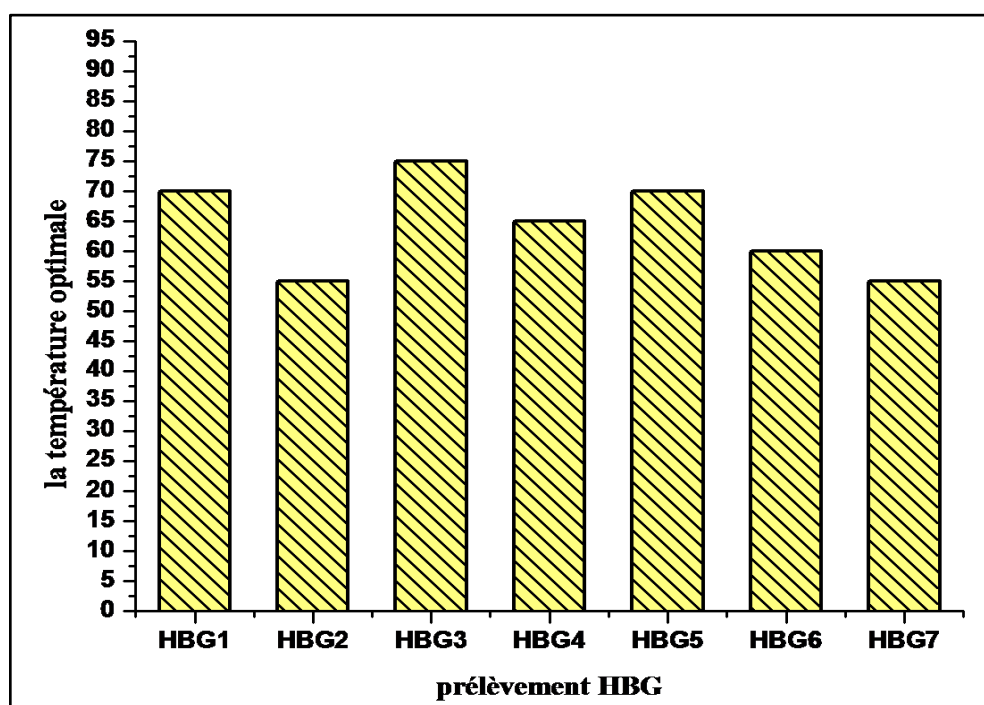


Figure 46 : Illustration des températures optimales des amylases des souches isolées à partir du prélèvement HBG.

Sur la base des résultats obtenus lors de l'étude de l'influence de la température sur l'activité des amylases produites par les souches isolées des sources thermales, les optima de température ont été déterminé pour chaque enzyme, ainsi quatre souches ont fait preuve d'une thermostabilité élevée. Il s'agit de la souche HC2 avec une température optimale de 85°C, la souche HBH2 avec une température optimale de 80 °C de même pour la souche HBH5et HBH6 avec une température optimale de 75 °C. L'évolution de l'activité amylolytique et la stabilité en fonction de la température des amylases thermostable retenues sont représenté dans la figure 47. Ces dernières sont maintenues pour l'identification moléculaire et l'analyse phylogénétique.

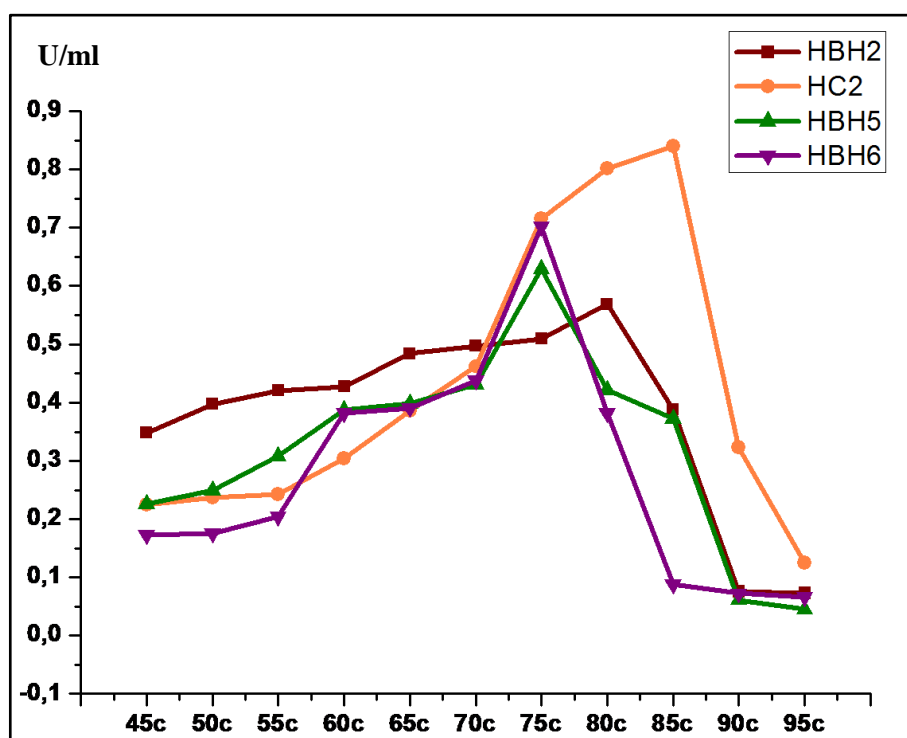


Figure 47: L'impact de la température sur l'activité des amylases chez les souches sélectionnées productrices de l'amylase.

Dans le but d'étudier l'influence du pH sur les activités amylolytiques, les souches isolées, sélectionnées productrices sont inoculées dans un milieu de culture de production à différentes valeurs de pH, incubées à une température de 30°C. Les résultats obtenus ont montré que la valeur du pH affecte considérablement l'activité des amylases et varie d'une souche à une autre (**Figure 48**).

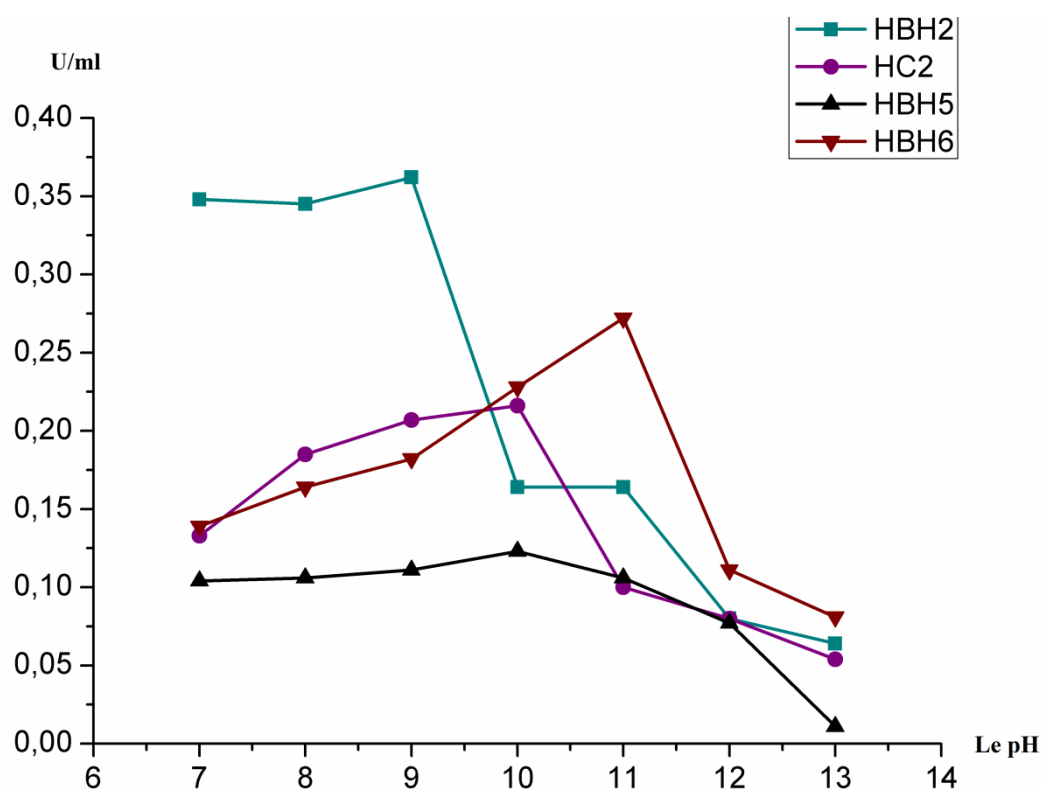


Figure 48 : L'influence du pH sur l'activité des amylases des souches sélectionnées productrices des amylases.

La souche HBH2, HC2 et HBH5 ont manifesté des activités amylolytiques maximale à une valeur de pH de (9,10, 10) respectivement. Par ailleurs, la souche HBH6 a présenté une activité amylolytique optimale à une valeur de pH de 11.

4.5. Identification génétique des souches sélectionnées

Les souches isolées, sélectionnées productrices des amylases, caractérisées par des températures optimales élevées (HC2, HBH2, HBH5 et HBH6) sont retenues pour une éventuelle identification moléculaire. A cet effet, la région d'ADN, codant de la sous unité ribosomale 16S rRNA est amplifiée par la technique de la PCR. Les fragments amplifiés obtenus sont séparés selon leur poids moléculaire par électrophorèse sur gel d'agarose. Les résultats de la comparaison des fragments d'ADN amplifiés avec le marqueur de taille a montré que la taille de ces fragments avoisine les 1500 pb (**Figure 49**).

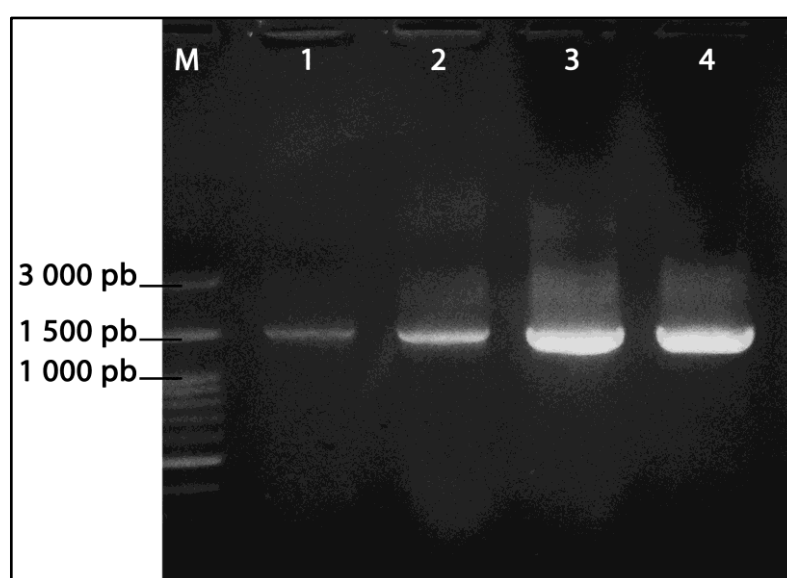


Figure 49:L'électrophorèse sur gel d'agarose des fragments ADN amplifiés, codant le gène de 16s rRNA des souches HBH2, HBH5, HBH6, HC2.

Puits M : le marqueur de taille 3kb,

Puits 1 : ADN amplifié codant le gène de 16s rRNA de la souche HBH2,

Puits 2: ADN amplifié codant le gène de 16s rRNA de la souche HBH5,

puits 3 : ADN amplifié codant le gène de 16s rRNA des souches HBH6,

puits 4: ADN amplifié codant le gène de 16s rRNA de la souche HC-2.

1.3. Le séquençage, la correction et assemblage des gènes amplifiés

L'identification moléculaire des souches sélectionnées productrices de l'amylase est basée sur l'amplification des régions d'ADN codante pour la sous unité ribosomale 16s et le séquençage. Les séquences de la région d'ADN codante pour la sous unité ribosomale 16s brutes obtenus sont corrigées, assemblées afin d'obtenir un consensus. Les séquences consensus de la souche sélectionnée HC2 sont illustrées dans la **Figure 50**.

Les séquences consensus des souches caractérisées, identifiées sont publiées dans la base de données Genbank afin d’avoir des numéros d’accessions. La comparaison avec la totalité des séquences nucléotidique indexées dans la base de données NCBI, a permis d’établir l’identité des souches sélectionnées et l’indication du degré d’homologie. Les numéros d’accession, l’identité et le degré d’homologie des souches sélectionnées sont illustrés dans le **tableau 9**.

```
TCTCCGGGCGGCCCTCTAATAACACTGCAAAGTGTGAGGCGGCCAAGAAAGGGGAGCTTTTCTCCC
CCTGGGTTTAGGGCGCGGGATCGGGTGGAGATAAAACCGGGGGGTAACCTCCCCTTGAAAGAAT
GGGGGAAAACCTCCGGGAAACCCGGGGCCTATATCCCGGGATGGCTTTTTTGAAACCCGCAAG
GTTCAAACATAAAAAGGGGGCTTTCCGGGCTACCCATTTACCAGATGGACCCGCGGGGCATTTAGC
TTAGTTGGTGAGGTAACGGGTTACCCAAGGCAAACGATGCGTAGCCGACCTTGAGAGGGTGATTC
GGCCCACTGGGATTGAGACACGGCCCAGATTCCTACGGGAGGCAGCCGTAGGGAATTTCCG
CAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGTTTTCCGGATCGTAAAGCTC
TGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGTTCCGAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTAACAGAAAGC
CACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGG
GCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTCCCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGGAGGG
TCATTGGAAACTGGGGAACCTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAAT
GCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGA
GCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCT
AAGTGTTAGGGGTTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTA
CGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTT
AATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAATCCTAGAGATAGGACGT
CCCCTTCGGGGGCGAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGG
TTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACTCTAAGGTGA
CTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGC
TACACACGTGCTACAATGGACAGAACAAAGGGCAGCGAAACCGCGAGGTTAAGCCAATCCCACAA
ATCTGTTCTCAGTTCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCG
GATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTT
TGAACACCCGAAGTCGGTGAGGAACCCTTATGAGCCAGCCTC
```

Figure 50 : La composition en paires de bases de la séquence consensus du gène codant la sous unité ribosomale 16s de la souche HC.

Tableau 9: Présentation des numéros d'accèsion, le pourcentage de similarité et l'identité des souches sélectionnées productrices de l'amylase.

La souche	Numéro d'accèsion	L'identité de la souche	La similarité
HBH2	KP779643	<i>B. subtilis</i>	98%
HBH5	KP835199	<i>B. licheniformis</i>	98%
HBH6	KP835200	<i>B. sp.H-46</i>	97%
HC2	KP835201	<i>B. sp. hswX58</i>	97%

4.6. Analyse et construction de l'arbre phylogénétique

Cette étape constitue une analyse purement bioinformatique. Grace à l'utilisation du logiciel d'alignements multiples des séquences consensus des souches sélectionnées productrice d'amylase thermostables avec les espèces apparentées de la famille des Bacillaceae dotées d'un pourcentage de d'homologie élevé. L'arbre phylogénétique est construit à l'aide du programme MEGA 6 par l'utilisation de la méthode de Neighbor-joining, basée essentiellement sur la substitution des paires de base et permet le calcul de la distance évolutive entre les taxons (**Figure 51**).

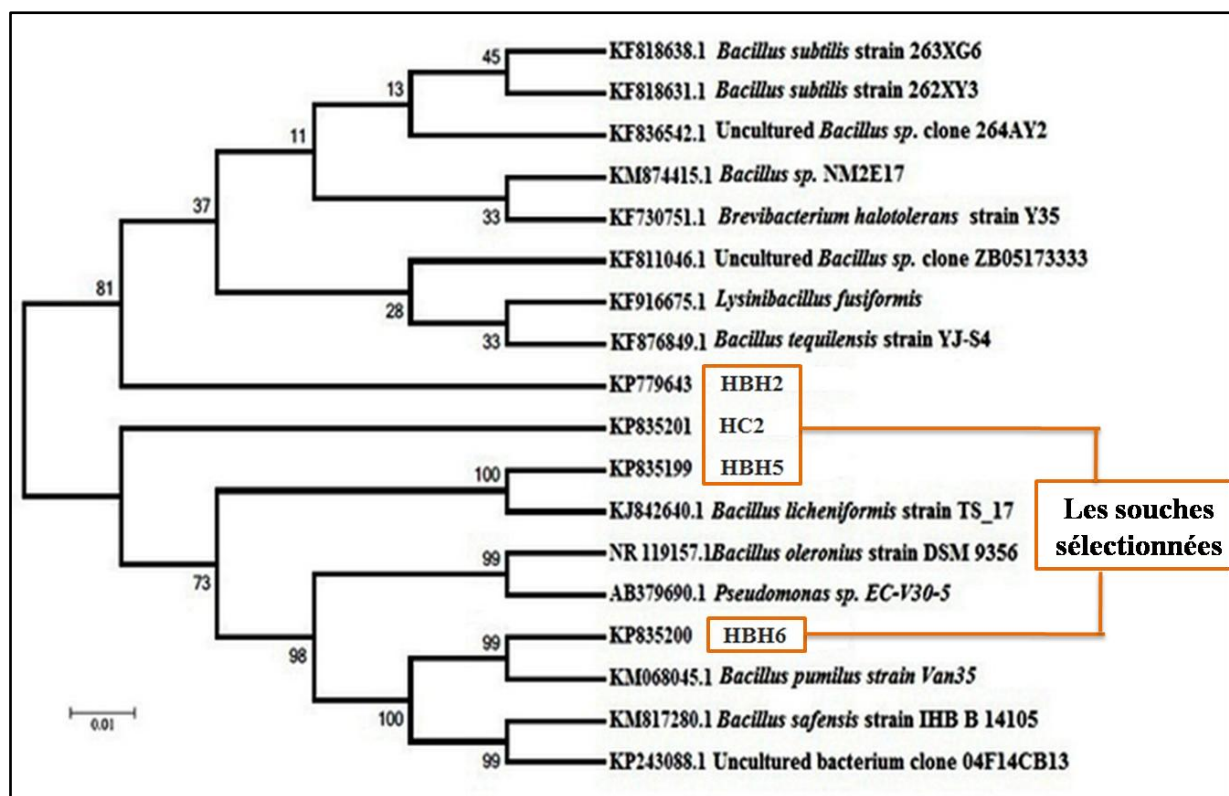


Figure 51:Arbre phylogénétique présentant la distance évolutive entre les souches sélectionnées et d'autres taxons en utilisant la méthode la barre indique 0.01 substitutions par position de nucléotide.

4.7. Optimisation des paramètres de la production des amylases

4.7.1. Optimisation de la source d'azote

Dans le but d'explorer la source d'azote adéquate impliquée dans la production des amylases chez *B. subtilis* MK7, différentes sources d'azote telles que le peptone, caséine, gélatine, urée et le sulfate d'ammonium ($\text{NH}_4^+\text{SO}_4^-$) ont été utilisées. Les résultats obtenus ont montré qu'une production maximale d'amylase de 0,0056 U/ml) est observée chez *B. subtilis* ML-4, lors de l'utilisation de la gélatine comme seule source d'azote (**Figure 52**). A cet effet, la gélatine est retenue comme source d'azote pour la préparation des milieux de cultures approprié pour la production de l'amylase chez la souche MK7.

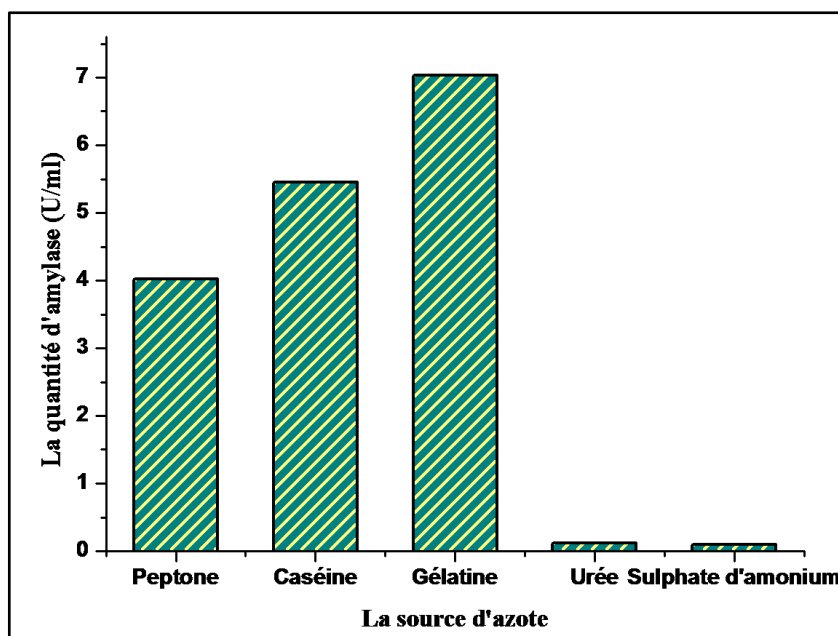


Figure 52: Effet de la source d'azote sur la quantité d'amylase produite chez la souche MK7.

4.7.2. Optimisation de la concentration d'amidon

Dans le but de déterminer la concentration optimale d'amidon destinée pour la production des amylases chez la souche ML-4, des milieux de culture à différentes concentrations d'amidon sont inoculés, incubés à une température de 30°C.

Les résultats ont montré qu'une production maximale d'amylase de 0,0056 U/ml) est obtenus chez *B. subtilis* MK7, lors de l'utilisation d'une concentration d'amidon de 0,5% avec un rendement de (4.656 U/ml) (**Figure 53**). A cet effet, cette concentration est retenue pour la préparation des milieux de culture destinés pour une excellente production de l'amylase chez la souche MK7.

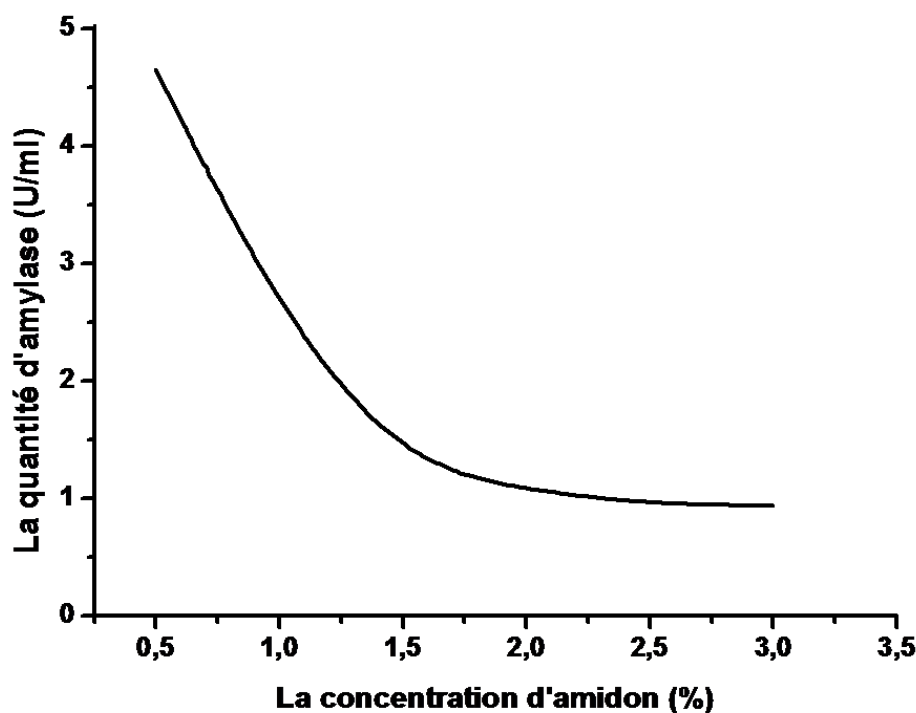


Figure 53: Effet de la concentration d'amidon sur la quantité d'amylase produite chez la souche MK7

4.7.3. Optimisation de l'inoculum

Dans le but d'augmenter la quantité d'amylase produite dans le surnageant de la souche ML-4, inoculé dans des milieux de culture de production, différentes concentrations d'inoculum ont été utilisés.

Les résultats ont montré qu'une production maximale d'amylase de 0,0056 U/ml) est obtenue chez *B. subtilis* MK7, lors de l'utilisation d'une concentration d'inoculum de 1,5% avec un rendement de $(9,276 \pm 0,0028 \text{ U/ml})$ (**Figure 54**).

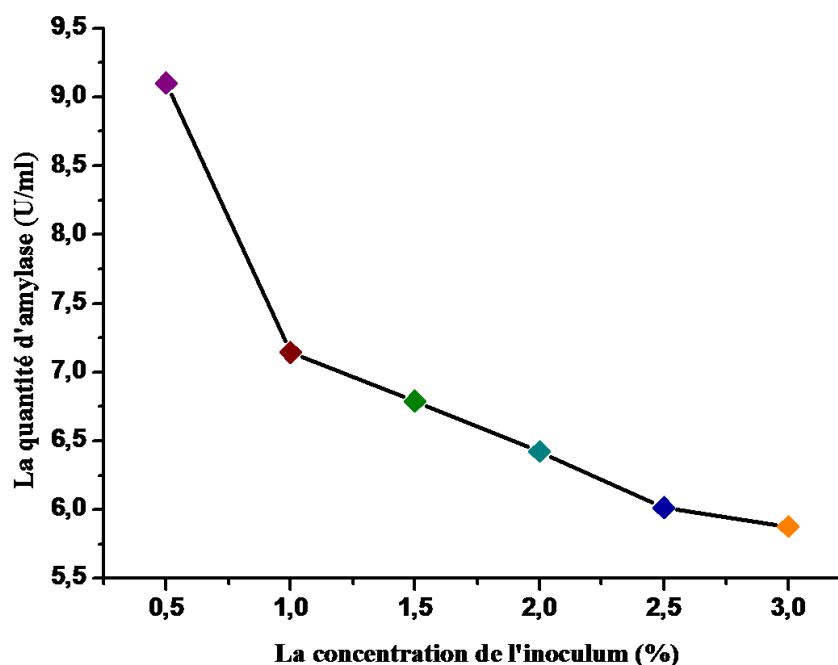


Figure 54 : Effet de la concentration d'inoculum sur la quantité d'amylase produite chez la souche MK7.

4.7.4. L'impact de quelques sels minéraux sur la production d'amylase chez la souche MK7

L'effet des sels minéraux sur la production la production d'amylase chez la souche MK7 est mise en évidence par l'inoculation de cette souche dans des milieux de culture de production contenant différents minéraux tels que le zinc, le calcium, le fer, le Chrome et le magnésium. Les résultats ont montré qu'une production maximale d'amylase de $(11,74 \pm 0,0036 \text{ U/ml})$ est obtenue chez *B. subtilis* MK7, lors de l'inoculation de cette souche dans un milieu contenant le calcium (**Figure 55**).L'utilisation du magnésium a manifesté un stimulateur de la production d'amylase. Cependant, le chrome le zinc et le fer ont manifesté un effet répresseur sur la production de l'amylase.

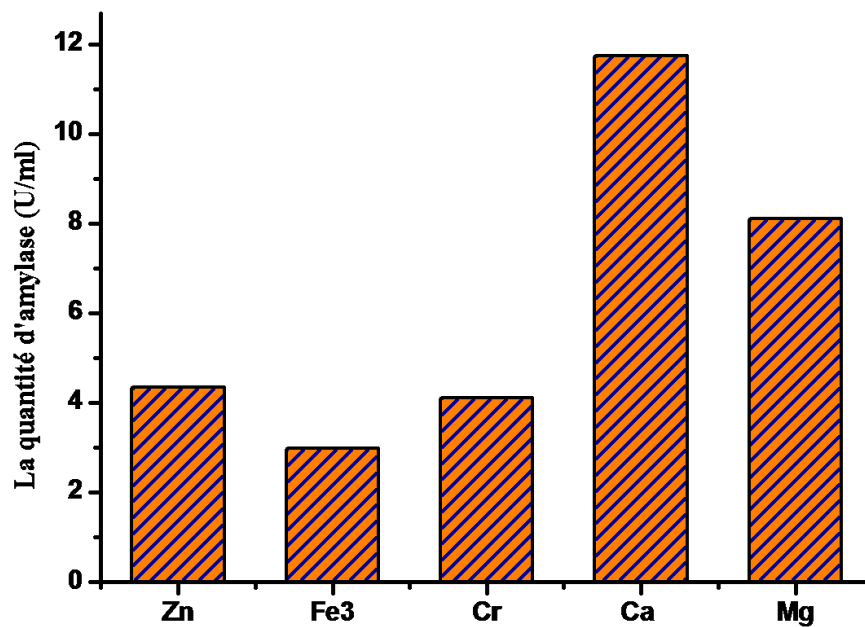


Figure 55 : l'effet de quelques sels minéraux sur la production d'amylase chez la souche MK7.

Discussion

Cette présente étude a pour but l'isolement d'une large gamme de bactéries productrices d'amylase appartenant au genre *Bacillus* à partir de différentes niches écologiques et des sources thermales au niveau du territoire National.

Vu l'indisponibilité des milieux de culture sélectifs pour l'isolement de *Bacillus*, le choc thermique constitue une stratégie de base pour la sélection des bactéries sporulées qui permet l'élimination des formes végétatives et les formes sporulées (formes de résistance) se développent dans les conditions favorables (Lynn et al., 1999). Le milieu de culture utilisé pour l'isolement et la sélection des souches productrices de l'amylase est le Starch agar (Aneja., 2003).

Le criblage primaire des bactéries productrices d'amylase appartenant au genre *Bacillus* sur le milieu de culture Starch agar a permis l'isolement de 100 souches dotées d'une activité amylolytique. Un nombre de 54 souches est isolé à partir des sites de prélèvement de catégorie (A) et un totale de 46 souches à partir des sites de prélèvement de la catégorie (B).

L'étude phénotypique et l'identification préliminaire des souches sélectionnées productrices de l'amylase basée essentiellement sur la présence de six critères tels que l'aspect macroscopique des colonies (forme R : routh), la forme bacillaire avec une coloration de Gram positive, la présence des spores, la réaction positive du catalase et le type respiratoire ont révélé leur appartenance au genre *Bacillus* (Tableau 6) (Emanuel et al., 2009). Ensuite, les souches isolées, sélectionnées productrices de l'amylase sont purifiées par repiquages successifs et conservées (Gallagher et Wiley, 2008).

Cette constatation se concorde avec les travaux réalisés par Godfrey et ses collaborateurs(1996). Les colonies observées présentent majoritairement un aspect microscopique typique du genre *Bacillus* (Emanuel et al., 2009).

L'étude de la thermostabilité de l'activité enzymatique des souches isolées, sélectionnées productrices des amylases a montré que les souches (HC2, HBH2, HBH5 et HBH6) ont manifesté des températures optimales de production de (85, 80, 75, 75°C) respectivement. A cet effet, ces quatre souches sélectionnées productrices d'amylases thermostables ont fait l'objet d'une identification génétique

par le séquençage des gènes codants la sous unité 16s rRNA et la construction de l'arbre phylogénétique de ses isolats.

En effet, cette stratégie a fait preuve d'une grande efficacité. En observant les boîtes de Pétri lors du screening, un nombre important de colonies de *Bacillus*. ce constat est en accord avec les résultats de **(Hamilton et al., 1999)**, qui rapportent un pourcentage allant à 95% de réussite du choc thermique comme stratégie d'isolement du genre *Bacillus*.

L'ensemencement de la souche MK7 par strie sur la surface de la gélose contenant l'amidon, a permis la formation de la zone d'hydrolyse d'un diamètre de 44 mm avec un index d'activité amylolytique de 2,93. Les résultats obtenus ont largement excédé les valeurs rapportées par **(Lamabam et al., 2010)**.

Dans un second temps, le screening secondaire est appuyé sur la mesure de l'activité de dextrinisation sur milieu de culture milieu liquide par la méthode DNSA. L'activité amylolytique est évaluée par mesure du taux des sucres réducteurs des souches sélectionnées productrices des amylases à partir des surnageant des cultures en batch, incubées à une température de 30°C, avec agitation à une vitesse de 75 rpm pendant 72 heures **(Gupta et al., 2003 et Lamabam et al., 2010)**.

La souche dotée d'une activité amylolytique maximale de 1,537 U/ml) est MK7. Les résultats obtenus ont largement dépassées les valeurs de (0.400 U/ml), rapportées par **(Jahir et al., 2011 ; Lamabam et al., 2010)**

La souche Mk7 a manifesté une excellente activité amylolytique par rapport aux autres souches sélectionnées productrices des amylases. A cet effet, Cette souche est retenue pour une éventuelle identification à l'échelle de l'espèce par la galerie biochimique API 20 E (Biomerieux, France). L'utilisation du Bacterial Identification Program a permis l'identification de la souche MK7 comme étant *Bacillus subtilis* avec un score d'identification égale à 0,99949.

Les microorganismes thermophiles, caractérisés par leur adaptation à se développer des conditions extrêmes de croissance et représentent une source d'enzymes thermoactives et thermostables très intéressantes **(Niehaus et al., 1999 et Monteiro et al., 2010)**. Cette étude a touché particulièrement l'influence de la température sur l'activité des amylases isolées à partir des sources thermales.

Les résultats obtenus ont montré que les températures optimales de croissance varient considérablement d'une souche à une autre, accompagnée avec une importante thermorésistance des souches (HC2, HBH2, HBH5, HBH6) avec des températures optimales de (85, 80, 75, 75°C) respectivement.

Les résultats obtenus des températures optimales ont excédé considérablement, la valeur de 70°C, suggérées **Burhan** et ses collaborateurs (2007).

La résistance à la température demeure l'un des principaux paramètres recherchés par les acteurs de l'industries des enzymes, notamment les amylases (**Hashemi et al., 2010**). En outre, ce critère de choix a considérablement encouragé les chercheurs à isoler des microorganismes, capables de produire des enzymes d'un grand intérêt industriels (**Shukla et Brett, 2013**).

A cet effet, de nombreux travaux fructueux, témoignant de l'existence d'une large diversité microbienne et la présence d'alternatives prometteuses pour une véritable solution aux nombreux processus industriels (**Chi et al., 2009**).

Des travaux antérieurs réalisés par (**Ashis et al., 2009**) ont caractérisé l' α -amylase, enzyme thermostable élaborée par *Bacillus subtilis* et très adaptée pour l'industrie des détergents. Par ailleurs, les travaux de (**Chaari et al., 2013 et Hashemi et al., 2010**) ont procédé le screening de quelques souches de *Bacillus*, capables de produire des amylases thermorésistantes, appropriées à l'utilisation dans les processus de dégradation de l'amidon lors de la production du sirop d'une haute teneur en glucose.

Dans ce présent travail, le screening des souches productrices des amylases a permis la sélection de quatre souches thermo-résistantes à une température de 85°C chez la souche HC2, appartenant au genre *Bacillus*.

L'évaluation du comportement des amylases des quatre souches sélectionnées productrices des amylases vis-à-vis les températures testées, a révélé que la température affecte fortement l'activité de cette enzyme.

Cependant, la thermostabilité n'engendre pas un fondement solide pour l'attribution et le jugement que les amylases thermostable soient préférables pour l'application dans des secteurs industriels (**Natasa et al., 2011**).

A cet effet, ce travail est complétée par l'étude la résistance de ces enzymes thermostables aux différentes valeurs du pH des milieux de culture utilisées, afin de déterminer le domaine d'application adéquat.

De nombreux travaux ont été consacrés sur l'étude de l'impact de la valeur du pH des milieux de culture sur l'activité des amylases chez les souches sélectionnées productrices.

Arikan et ses collaborateurs (2008) ont isolées des souches bactériennes appartenant au genre de *Bacillus* productrices des amylases thermostables à des valeurs de pH optimale de 9. Par ailleurs, (**Ghorbel** et ses collaborateurs(2009) ont rapporté sur l'isolement d'une souche de *Bacillus cohnii*, produisant une amylase thermostable et active à des valeurs de pH très alcalines.

Les résultats obtenus à l'issu de l'étude de l'influence du pH sur l'activité des amylases des souches sélectionnées productrices des amylases thermostables, ont montré que le pH a affecte considérablement l'activité amylolytique.

Les résultats obtenus sur les tests effectués de l'influence des valeurs du pH des milieux de culture sur l'activité amylolytique chez les souches sélectionnées productrices ont révélé que les valeurs optimales du pH des amylases, ont varié considérablement d'une souche à une autre, avec des valeurs respectives de (9, 10, 10) chez les souches (HBH2, HC2 et HBH5) et de 11 chez la souche HBH6. Des travaux antérieurs réalisés par **Lamabam** et ses collaborateurs (2010) ont rapporté sur des activités des amylases optimales à une valeur de pH de 8 chez la souche de *Bacillus subtilis* MA9.

L'importance des souches sélectionnées productrices des amylases réside dans leur thermostabilité considérable et la stabilité à des valeurs de pH très alcalines.

Ces caractéristiques appréciables constituent une piste prometteuse pour la mise en application de telles auxiliaires dans de nombreux processus industriels telles la production des détergents, car cette industrie exige l'utilisation des amylases thermostables à des températures très élevées et à des valeurs de pH alcalines (**Monteiro et al., 2010**).

En tenant compte sur l'importance du potentiel écologique et des ressources naturelles disponibles sur le territoire Algérien, une première pierre pour l'édifice d'une autosuffisance en termes de marché des enzymes doit être mise en place pour la production des enzymes à grande échelle.

Vue l'importance biotechnologique des quatre souches sélectionnées productrices des amylases, ces dernières ont été retenues pour l'identification génétique et l'analyse phylogénétique. A cet effet, toute manipulation réussie en biologie moléculaire doit tenir en compte, le bon choix de la technique d'extraction de l'ADN, car cette étape reste déterminante et indispensable pour la fourniture des ADN de bonne qualité (**Ahaotu et al., 2013**).

De nos jours il existe d'une large gamme de kits disponible sur le marché et la présence d'une grande diversité de techniques laborieuses ont permis l'extraction de l'ADN génomique et plasmatique. Cependant, le facteur temps et coût de la manipulation limitent leurs applications (**Rowland, 2003**).

La pertinence de la technique (Boiling DNA extraction) a été démontrée, notamment pour se qui concerne la qualité du génome extrait. En outre, la rapidité de sa mise en évidence et son faible coût, ont fait de méthode, une technique de choix appliquée dans les laboratoires de recherche en biologie moléculaire (**Queipo et al., 2007**).

Le séquençage du gène codant la sous-unité 16S RNA offre un outil de choix pour l'identification génétique des bactéries, car cette région persiste très stable et à l'abri des mutations (**Emanuel et al., 2009**). De nombreuses études ont accordé une importance spéciale à l'identification génétique des bactéries (**Adley et al., 2009 et Wu et al., 2006**).

Avec l'accumulation des données indispensables sur ce gène et leur publication dans les banques de données, la notion des amorces universelles de la région 16S RNA est engendrée.

Dans ce présent travail, le choix des amorces universelles 27f et 1492r est opté, car lors de la réalisation des analyses bioinformatiques et les simulations in Silico, il semble que ces amorces s'hybrident avec la majorité des membres du règne bactérien (**Arzu et al., 2011**).

Après l'amplification des gènes codant la sous unité 16s RNA par la technique PCR et l'analyse des amplifias par électrophorèse sur gel d'agarose à une concentration de 1,5%, l'alignement précis des gènes amplifiés avec le marqueur de taille d'un poids moléculaire de 1500bp, a montré la concordance des résultats avec les travaux réalisés par (**Arzu et al., 2011 ; Adley et al.,2009 et Wu et al., 2006**).

En effet, cette catégorie de gènes se caractérisent par un fragment d'ADN d'une taille située entre 1400-1550bp (**Emanuel et al., 2009**).

Le séquençage d'ADN a révolutionné la biologie. Désormais, il est possible à l'heure actuel de lire le langage crypté par cette miraculeuse molécule ainsi on a vu émerger de nouvelles disciplines et techniques modernes qui s'inscrivent sous le volet de la biologie moléculaire (**Rowland, 2003**).

Le séquençage des gènes amplifiés a révèle des informations cruciales à propos des quatre souches sélectionnées productrices d'amylases thermostable et résistante à des pH alcalins.

Dans un premier temps, une attention particulière est portée sur l'identité des souches sélectionnées. La comparaison des séquences nucléotidiques acquises avec la totalité des gènes séquencés et publiés dans la base de données NCBI, a montré que la totalité des souches sélectionnées appartiennent au genre *Bacillus*.

Dans un second temps, l'analyse bioinformatique des données issues du séquençage a indiqué un taux de similitude de 98% de la souche HBH2 avec *Bacillus subtilis*. De même, la souche HBH5 a présenté un taux de similitude de 98% avec *Bacillus licheniformis*. Cependant le degré d'homologie de la souche HBH6 est équitable à 97% avec la souche de *Bacillus sp.H-46*. Finalement, la souche HC2 semble avoir un taux de similitude de 97% *B. sp. hswX58*.

Après une analyse fine des séquences brutes et l'assemblage et la correction des données. Les séquences ont été publiées dans la base de données NCBI.

Le séquençage des gènes codant la sous unité 16s RNA peut servir à la mise en œuvre d'une étude phylogénétique, dont l'objectif principal se rattache forcément à la distance évolutive entre les différentes espèces bactériennes et la divergence des séquences nucléotidiques, qui se reflète sur le phénotype (**David et al., 2009**). La réalisation de l'arbre phylogénétique est fortement liée au type de gène à amplifier.

Dans ce présent travail, les séquences nucléotidiques forment un groupe dit «Cluster », c'est pourquoi la méthode de Neighbor joining est choisie pour le calcul de distances évolutives séparant les séquences homologues. Cette approche s'appuie sur le principe, lorsque les deux séquences homologues sont différentes, la distance évolutive est grande.

A l'opposé, lorsque les séquences sont divergées, les deux séquences homologues sont proches, plus la distance évolutive qui les sépare est faible (**Primrose et al., 2003**).

La physiologie de la production des amylases chez les bactéries semble être à l'évidence très complexe, dans la mesure où elle est influencée par une large panoplie de paramètres physicochimiques (**Gangdharan et al., 2008**).

La température, le pH, la composition du milieu de culture, la concentration du substrat et la concentration de l'inoculum et les éléments minéraux sont largement investigués durant le processus de la production des amylases (**Gupta et al., 2003**).

L'identification de la souche MK7, sélectionnées productrices de l'amylase comme étant *Bacillus subtilis*, choisie parmi l'ensemble des autres souches isolées, a conduit l'optimisation d'un nombre importants de paramètres impliqués dans la production de cette enzyme tels que la source d'azote, la concentration d'amidon, la concentration de l'inoculum, l'impact de quelques éléments minéraux sur l'activité amylolytique.

L'optimisation de la concentration de la concentration d'amidon utilisée est mise en évidence, lors de l'utilisation d'un milieu de culture contenant la gélatine comme source d'azote, en présence de différentes concentrations d'amidon (0,5, 1, 1,5, 2%), inoculé avec la biomasse de *Bacillus subtilis* MK7, incubé à un intervalle de temps de 72 heures. La lecture des résultats ont montré que l'activité amylolytique maximale de (4.656 U/mL) est obtenue lors de l'utilisation d'une concentration d'amidon de 0,5% comme source de carbone. Des travaux antérieurs réalisés par **Iqram** et ses collaborateurs (**2003**) ont rapporté qu'une production maximale d'amylase est obtenue en présence d'une concentration d'amidon de 1,25%. Cette divergence de production peut être expliquée par la dissemblance de souches utilisées *Bacillus lecheniformis*. Autant plus, l' α -amylase est une enzyme

inductible et généralement induite en présence d'amidon et ses dérivés hydrolysés (**Morkeberg et al., 1995**). En outre, la production d'amylase est également soumise à une répression catabolique par la présence du glucose et d'autres sucres, (**Gupta et al., 2003**). Par ailleurs, La présence d'une concentration élevée d'amidon dans le milieu de culture réprime d'une façon inversement proportionnelle la production de l'amylase.

L'optimisation de la source d'azote utilisée des cultures en batch est lancée en présence d'une concentration optimale d'amidon de 0.5% et l'ajout de différentes sources d'azote dans le milieu de culture telles que la peptone, la gélatine, la caséine, l'urée, et le sulfate d'ammonium, incubé à une température de 30°C pendant 72 heures. La lecture des résultats ont montré que l'activité amylolytique maximale de (7,036 U/ml) est obtenue lors de l'utilisation la gélatine comme source d'azote. **Gupta** et ces collaborateurs (**2003**) ont rapporté que les sources d'azote organique et complexe sont favorables à la production amylolytiques.

A l'opposé, l'utilisation des sources d'azotes minérales telles que l'urée et Sulphate d'ammonium ont réduit considérablement la production de l'amylase chez *Bacillus subtilis* MK-7. Cependant, **Dercova et ses** collaborateurs (**1999**) ont rapporté un apport favorable de la supplémentation du sulfate d'ammonium comme source d'azote sur la production de l'amylase chez *Bacillus subtilis*.

Par contre, la gélatine est retenue comme source d'azote dans la préparation milieu de culture approprié à la production de l'amylase chez *Bacillus subtilis*

L'optimisation de la concentration de la biomasse inoculée est mise en évidence, lors de l'utilisation d'un milieu de culture contenant la gélatine comme source d'azote, en présence d'une concentration de 0,5% d'amidon comme source de carbone, inoculé avec une biomasse de 0.5% de *Bacillus subtilis* MK7 de (0,5, 1, 1,5, 2%) respectivement, incubé à un intervalle de temps de 72 heures. La lecture des résultats obtenus ont montré que l'activité amylolytique maximale de (9,102 U/mL) est obtenue en présence d'une concentration de la biomasse d'inoculum de 0,5%. La production d'amylase est inversement liée à l'augmentation de la concentration d'inoculum, ceci peut être expliqué par la biomasse bactérienne présente dans l'inoculum utilisé. Les résultats obtenus se concordent avec les travaux publiés par **Thais** et ses collaborateurs (**2011**).

La présence de certains sels minéraux dans le milieu de culture de production joue un rôle indispensable dans l'activation des enzymes impliquées dans la régulation des gènes et la synthèse de l'ADN. A cet effet, la régulation génétique de la synthèse des enzymes semble être considérablement affectée par certains minéraux (**Gupta et al., 2003**).

Le dernier des paramètres optimisés, demeure l'impact de sels minéraux sur la production de l'amylase chez la souche de *Bacillus subtilis* MK7. Dans un milieu de culture contenant la gélatine comme source d'azote, l'amidon comme source de carbone à une concentration de 0.5%, inoculé avec une biomasse de 0.5% de *Bacillus subtilis* MK7, en présence des quelques sels minéraux tels que le calcium (CaCl_2), le magnésium (MgCl_2), le fer (FeCl_3), le zinc (Zn SO_4) et le Chrome (Cr_2O_3), incubé à une température de 30°C. La lecture des résultats obtenus ont montré que l'activité amylolytique (11,746 U/mL) est considérablement stimulée en présence du calcium. Des travaux antérieurs réalisés par (**Syed et al., 2009 ; Lamabam et al., 2010**) ont rapporté que l'ajout du magnésium dans le milieu de culture optimisé a amélioré la production de l'amylase. A l'opposé, l'ajout du fer (FeCl_3), le zinc (Zn SO_4) et le Chrome (Cr_2O_3) ont réduit l'activité amylolytique de la souche de *Bacillus subtilis* MK7.

Conclusion

Les amylases suscitent un intérêt majeur grâce à leur utilisation potentielle dans de nombreux secteurs industriels. Ces enzymes sont d'une grande importance en biotechnologie et trouvent des applications dans de nombreux domaines tels que l'agroalimentaire, médicale, détergeant, textile...etc. Grâce à leur diversité d'exploitation, cette classe d'enzyme contribue avec un apport de 30% du marché mondial de la commercialisation des enzymes industrielles.

Les principaux objectifs tracés pour la réalisation de cette thèse sont : l'isolement des bactéries appartenant au genre de *Bacillus*, dotées d'une excellente activité amylolytique, l'optimisation des différents paramètres impliqués dans la production de cette enzyme.

Dans un second, l'étude de l'influence de la température sur l'activité amylolytique, afin de sélectionner des souches productrices des amylases hautement thermostables et la réalisation d'une identification génétique, l'analyse phylogénétique des souches performantes.

Les objectifs tracés sont atteints avec succès car le criblage primaire a permis l'isolement de 100 souches bactériennes appartenant au genre *Bacillus*, témoignant d'une bonne activité amylolytique, avec une production maximale (1,537 U/ml), chez la souche MK7, identifiée comme étant *Bacillus subtilis*.

Après optimisation de quelques paramètres impliqués dans la production, la production des amylases a augmenté considérablement avec un facteur de six, accompagnée avec une quantité d'enzyme de 11,746 U/ml dans le milieu de culture optimisé, contenant 5g/l d'amidon, 5g/l gélatine, 0.2 g/l CaCl₂ avec une concentration de la biomasse inoculée de 0,5%.

L'étude de la thermostabilité des amylases a contribué à l'émergence de quatre souches sélectionnées productrices des amylases hautement thermo-résistantes, avec des températures optimales de (85, 80, 75, 75°C) chez les souches (HBH1, HBH2 HBH5 et HBH6) respectivement.

Les souches sélectionnées productrices des amylases ont été identifiées génétiquement par le séquençage du gène codant la sous unité 16S rRNA comme

étant : *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus sp.H-46*, *Bacillus sp. HswX58* pour les souches (HBH2, HBH5, *HBH6* et HC2) respectivement.

En perspectives, ce travail peut être affiné par le séquençage des régions d'ADN qui code la production des amylases pour une éventuelle caractérisation afin de mieux connaître leurs propriétés physicochimiques. Le clonage des fragments d'ADN, codant la production des amylases dans des vecteurs d'expression, contenant un promoteur très puissant. Purification des amylases surexprimées par les différentes méthodes de chromatographie et caractérisation des métalloprotéines. Caractérisation de sites de fixation du substrat et le site de la spécificité par des mutations dirigées.

Références bibliographiques

- Adeyanju M.M., Agboola F.K., Omfuvbe B.O., Oyefuga O.H., Adebayo O. (2007).** A Thermostable Extracellular α -amylase from *Bacillus licheniformis* Isolated from Cassava Steep Water. *Biotechnology*. 6:473–480.
- Adley C., Khalil A., Camila M., Kamila O., Vijayalakshmi V. (2009).** Design of specific DNA primers to detect the *Bacillus cereus* group species. *IEEE Sensors Applications Symposium*. 9:17-19.
- Ahaotu A., Anyogu C., Njoku B., Odu B., Sutherland C., Ouoba L. (2013).** Molecular identification and safety of *Bacillus* species involved in the fermentation of African oil beans (*Pentaclethra macrophylla* Benth) for production of Ugba. *International Journal of Food Microbiology*. 162:95-104.
- Ahlawat S., Dhiman S. S., Battan B., Mandhan R. P., Sharma J. (2009).** Pectinase production by *Bacillus subtilis* and its potential application in biopreparation of cotton and micropoly fabric. *Process Biochemistry*. 44, 521-526.
- Aneja K. R. (2010).** Experiments in Microbiology Plant Pathology and Biotechnology, New Age International (P) Ltd., Publishers, New Delhi, Fourth Edition.
- Aneja. K. R. (2003).** Experiments in Microbiology, Plant Pathology and Biotechnology. New Age International. 371-377. 81, 224-1494.
- Arikan B. (2008).** Highly thermostable, thermophilic, alkaline, SDS and chelating resistant amylase from thermophilic *Bacillus* isolate A3-15. *Bioresource Technology* 99, 3071-3076.
- Arzu C. C., Nilgun T., Birgul O., Cumhuri C. (2011).** The genetic diversity of genus *Bacillus* and the related genera revealed by 16S rRNA gene sequences and ARDRA analysis isolated from geothermal regions of Turkey. *Braz J Microbiol*. 309-324.
- Asgher M., Asad M.J., Rahman S.U., Legge R.L. (2007).** A thermostable amylase from a moderately thermophilic *Bacillus subtilis* strain for starch processing *Journal of Food Engineering*. 79:950-955.

-
- Ash C., Farrow J.A. E., Wallbanks S., Collins M.(1991).** Phylogenetic heterogeneity of the genus *Bacillus* revealed by comparative analysis of small subunit- ribosomal RNA sequences. *Letters in Applied Microbiology* 13, 202-206.
- Ashis K., Mukherjee M. B., Sudhir R. K.(2009).**Influence of different components of fermentable substrates on induction of extracellular alpha amylase synthesis by *Bacillus subtilis* DM-03 in solid state fermentation and exploration of feasibility for inclusion of alpha amylase in laundry detergent formulations. *Biochem Eng.*, 43, 149-156.
- Bano S., Shah A., Qader U., Afsheen A., Muhammad N. Syed A. A.(2011).** Purification and Characterization of Novel α -Amylase from *Bacillus subtilis* KIBGE HAS. *AAPS PharmSci. Tech.* 12, 11-9586-1.
- Bavykin S. G., Lysov Y. P., Zakhariyev V.(2004).** Use of 16S rRNA, 23S rRNA, and gyrB gene sequence analysis to determine phylogenetic relationships of *Bacillus cereus* group microorganisms. *J. Clin. Microbiol.*, 42:3711-3730.
- Behal A., Singh J., Sharama M. K., Pur P., Batra N. (2006).** Characterisation of Alkaline α -Amylase from *Bacillus sp* AB 04. *International Journal of Agriculture & Biology.* 8-1:80-83.
- Berry D.R., Paterson A.(1990).** Enzymes in food industry . In Suckling C.J. *Enzymes chemistry impact and application.* Ed. Chapman H. London. P. 306-351.
- Brenner D.J., Staley J. T., Krieg N. R. (2001).** Classification of prokaryotic organisms and the concept of bacterial speciation. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd ed., Eds. G.M. Garrity, 27-31.
- Caballero B., Trugo L. C., Finglas P. M.(2003).** Food Sciences and Nutrition, 2ed, Academic press London., 2070-2077.
- Castro P. M. L., Hayter P. M., Ison A. P., Bull A. T.(1992).** Application of statistical design to the optimization of culture medium for recombinant interferon-gamma production by Chinese hamster ovary cells. *Appl Microbiol Biotechnol* 38:84-90.

-
- Chaari F., Fatma B., Monia B., Sameh M., Semia E. C., Raoudha E.G. (2012).** Potential application of two thermostable lichenases from a newly isolated *Bacillus licheniformis* UEB CF: Purification and characterization. *Process Biochemistry*.47-3,509-516.
- Chi Z., Chi Z., Liu G., Wang F., Ju L., Zhang T. (2009).** *Saccharomycopsis fibuligera* and its applications in biotechnology. *Biotechnol Adv.*27, 423-431.
- Chiba S. (1988).** Amyloglycosidase. In: Handbook of Amylases and related enzymes (The Amylase Research Society of Japan, ed. Pergamum Press, Oxford, U.K. 104-116.
- Coronado M. J., Vargas C., Hofemeister J., Ventosa A., Nieto J. J.(2000).** Production and biochemical characterization of an α -amylase from the moderate halophile *Halomonas meridiana* . *FEMS Microbiol Lett.*, 183:67-71.
- Coolbear T., Daniel R. M., Morgan H. W. (1992).** The enzymes from extreme *thermophils*: bacterial sources, thermostabilities and industrial relevance. *Advanced Biochemistry and Engineering Biotechnology*. (45): 57-97.
- David E., Jason S.,David H. (2009).** *BioinformaticsTools and Applications*.Springer New York.978-0-387-92737-4.
- Dercova K., Augustin J., Krajcova D.(1992).**Cell growth and α -amylase production characteristics of *Bacillus subtilis* .*Folia Microbiol.* 37:17-23.
- Dhanya D., Swetha S., Kesavan M. N., Ashok P.(2006).** Solid culturing of *Bacillus amyloliquefaciens* for alpha amylase production.*Food Technol biotechnol.* 44:269-274.
- Dina J., Anneke S., Kerstin S., Garabed A. (2012).** A highly thermoactive and salt-tolerant α -amylase isolated from a pilot-plant biogas reactor. *Appl Microbiol Biotechnol* .97:2971-2978
- Driks A.(2004).** The *Bacillus* spore coat, *Phytopathology*, 94:1249-1251. Emanuel Goldman Lorrence H. Green. *Practical Handbook of Microbiology*.CRC press.USA978-0-8493-9365-5.
- Emanuel G., Lorrence H. G.(2009).***Practical handbook of microbiology*.CRC press. USA. 13: 978-0-8493-9365-5.
- Fergus G., Priest F.(2000).***EnzymesextracellularEncyclopedia of microbiology*.San Diego C.A: Academic Press2: 210-221.

Fogarty W. M., Kelly C.T. (1980). Amylase, amyloglucosidase and related glucanases. In Rose (A.H.) Ed. Economic microbiology, microbial enzymes and bioconversion. London: Academic Press. 115-170. 268.

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

French D., Enas N., Danial M. (1975). Chemistry and biochemistry of starch In. MTP International review of science biochemistry of carbohydrates serie 1,5 Butterworth Park Press. 309-321

Fritze, D. (2004). Taxonomy and systematics of the aerobic endospore forming bacteria: *Bacillus* and related genera. In Bacterial Spore Formers: Probiotics and Emerging Application, Eds. E. Ricca, A.O. Henriques, and S.M. Cutting,. Norfolk, U.K.: Horizon Bioscience. 17-34.

Gallagher S., Wiley E. (2008). Current Protocols Essential Laboratory Techniques. New York: John Wiley & Sons, Inc. 978-0-470-08993-4.

Gangadharan D., Sivaramakrishnan S., Nampoothiri K. M. (2008). Response surface methodology for the optimization of alpha amylase production by *Bacillus amyloliquefaciens*. Bioresour Technol, 99, 4597-4602.

Garrity G., Staley J., Boone D., Brenner D., De Vos P., Goodfellow M. (2004). Bergey's Manual Of Systematic Bacteriology. Second Edition. East Lansing, MI, USA: Springer.

Ghorbel R. E., Maktouf S., Ben Massoud E., Bejar S., Chaabouni S.E. (2009). New Thermostable Amylase from *Bacillus cohnii* US147 with a Broad pH Applicability. Applied Biochemistry and Biotechnology. 157: 50-60.

Graber M., Combes D. (1989). Microbial α -amylases: Enzyme and Microbiol Technology. 2:663-687.

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

Gurtler V., Mayall B.C. (2001). Genomic approaches to typing, taxonomy and evolution of bacterial isolates. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 51:3-16.

Hamilton L. M., Kelly C. T., Fogarty W. M. (1999). Purification and properties of the raw starch degrading α -amylase of *Bacillus sp.* IMD434. *Biotechnol Lett* 21:111-5.

Hashemi M., Razavi S. H., Shojao S. A. (2010). Development of a solid-state fermentation process for production of an alpha amylase with potentially interesting properties. *Biosci. Bioeng.*, 110, 333-337.

Hema A., Trivedi U. B., Patel K. C. (2006). Glucoamylase production by solid state fermentation using rice flake manufacturing waste products as substrate, *Bioresour. Technol.* 97(10): 1161-1166.

Hillier P., Wase D. A. J., Emery A. N., Solomons G. L. (1997). Instability of amylase production and morphological variation in continuous culture of *Bacillus amyloliquefaciens* is associated with plasmid loss. *Process Biochem* 32:51-9.

Hmidet N., El Hadj A. N., Haddar A., Kanoun S., Alya S., Nasri M. (2009). Alkaline proteases and thermostable α -amylase co-produced by *Bacillus licheniformis* NH1: Characterization and potential application as detergent additive. *Biochemical Engineering Journal* 47, 71-79.

Hsueh P.R., Teng L.J., Yang P.C., Pan H.L., Ho S.W., Luh K.T. (1999). Nosocomial pseudoepidemic caused by *Bacillus cereus* traced to contaminated ethyl alcohol from a liquor factory. *J. Clin. Microbiol.*, 37, 2280-2284.

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

Indian Standard (1982). Colorimetric determination of alpha-amylase activity in cereals and cereal products. IS 10524. Indian Standards Institution, New Delhi.

International Organization for Standardization. (1974). International standard ISO 3093, approved The Secretariat: Magyar Szabványügyi Hivatal, 1450, Budapest 9, Pf 24, Hungary.

-
- Ito S.T., Kobayashi K., Ara K., Ozaki S., Kawai S., Halada Y.(1998).**Alkaline detergent enzymes from alkaliphiles: enzymatic properties, genetics and structures. *In: Behal A., Singh J., Sharama M.K., Pur P and Batra N. Characterisation of Alkaline -Amylase from *Bacillus sp* AB 04. International Journal of Agriculture & Biology., 08-01:80-83.*
- Jahir A. K., Ruchika P. (2011).**A study on partial purification and characterization of extracellular amylases from *Bacillus subtilis*.*Pelagia Research Library. 2 (3):509-519.*
- Janecek S., Kuchtova A. (2012).** In silico identification of catalytic residues and domain fold of the family GH119 sharing the catalytic machinery with the α -amylase family GH57. *FEBS Lett.*586,3360-3366.
- Kelly C.T., Bolton D. J., FogartyW.M. (1997).**Bi-phasic production of α -amylase of *Bacillus flavothermus* in batch fermentation *Biotechnology. 19-7:675-677.*
- Kikani B. A., Singh S. P. (2011).**Single step purification and characterization of a thermostable and calcium independent α -amylase from *Bacillus amyloliquifaciens* TSWK1-1 isolated from Tulsi Shyam hot spring reservoir, Gujarat (India). *Internal Journal Biological Macromolecules. 48:676-681.*
- Kulp K. (1993).**Enzymes as dough improvers. *In: Kamel BS, Stauffer CE, editors. Advances in baking technology.*New York: Blackie Academic and Professional, VCH Publishers.152-78.
- Kunamneni A., Kuttanpillai S. K., Suren S. (2005).**Response surface methodological approach to optimize the nutritional parameters for enhanced production of alpha-amylase in solid state fermentation by *Thermomyces lanuginosus*. *Afr. J. Biotechnol. 4,708-716.*
- Leuchs, E. F. (1947).**Quoted from Sumner, J. B. & Somes, G. F. *Chemistry and Methods of Enzymes*, 103-105.
- Lonsane B. K., Ramesh M. V. (1990).**Production of bacterial thermostable α -amylase by solid state fermentation: a potential tool for achieving economy in enzyme production and starch hydrolysis. *In: Advances in applied microbiology, vol. 35. San Diego: California Academic Press:1-56.*

-
- Maki K. C., Pelkman C. L., Finocchiaro E.T., Kelley K., M., Lawless A. L., Schild A. L., Rains T. M.(2012).**"Resistant Starch from High-Amylose Maize Increases Insulin Sensitivity in Overweight and Obese Men". *Journal of Nutrition* 142 (4): 717-23.
- Maktouf S.(2013).** Activités amylase et lichenase d'une nouvelle souche de *Bacillus* Production sur milieu solide et caractérisation. Thèse, université de Toulouse.171-177.
- Malhotra, N. S. M., Satyanarayana T. (2002).** Production and partial characterization of thermostable and calcium-independent alpha-amylase of an extreme thermophile *Bacillus thermooleovorans* NP54. *Letter of Applied Microbiology*. 31(5):378-384.
- Martin M.T., Plou F.J., Alcade M., Ballasteros A. (2003).** Immobilization on Eupergit C of cyclodextrin glucosyltransferase (CGTase) and properties of immobilized biocatalyst, *J. Mol. Catal.*21:299-308.
- Mercier C. (1985).** Les Enzymes amylolytiques In mouranche A.Coste C. *Hydrolases et dépolymérase*s. Edition Gauthier-Villars, 110-140.
- Milner J.A., Martin D.J., Smith A. (1997).** Two-stage inoculate for the production of alpha-amylase by *Bacillus amyloliquefaciens*. *Enzyme and Microbial Technology*. (21):382-386.
- Mishra S., Noronha S. B., Kumar G. K. S.(2005).** Increase in enzyme productivity by induced oxidative stress in *Bacillus subtilis* cultures and analysis of its mechanism using microarray data. *Process Biochem.*40:1863-1870.
- Mitidieri S., Souza M., Schrank A. H.,Vainstein M.H. (2006).** Enzymatic detergent formulation containing amylase from *Aspergillus niger*: a comparative study with commercial detergent formulations. *Bioresour Technol.* 97, 1217-1224.
- Morkeberg R., Carlsen M., Neilsen J.(1995).** Induction and repression of alpha-amylase production in batch and continuous cultures of *Aspergillus oryzae*. *Microbiology*. 141:2449-54.
- Muhammad S., Aqeel A., Saleem S., Shakeel AK. (2005).** A survey of amylolytic bacteria and fungi from native environmental samples. *Pakistan*. 37(1): 155-161.

-
- Mukherjee A. K., Borah M. Raí S.K. (2009).** Study of the influence of different components of fermentable substrates on induction of extracellular α -amylase synthesis by *Bacillus subtilis* DM-03 in solidstate fermentation and exploration of feasibility for inclusion of α -amylase in laundry detergent formulations. *Biochem. Eng. J.* 43, 149–156.
- Muralikrishna G., Nirmala M. (2005).** Cereal α -amylases an overview. *Carbohydrate Polymers.* 60, 163-173.
- Nadirman H., Yoshiyuki O. (2006).** Mechanism of Hydrolysis of the Treated Starch Granules by Raw Starch Digesting Amylase from *Penicillium brunneum*, *Journal Starch Starke.* 7: 25-28.
- Natasa B., Ruizb J., López S., Z. Vujci C. (2011).** Production and properties of the highly efficient raw starch digesting -amylase from a *Bacillus licheniformis* ATCC 9945a. *Biochem. Eng J.* 53: 203-209.
- Nazina T. N., Tourova T. P., Poltarau A.B.(2001).** Taxonomic study of aerobic thermophilic bacilli: descriptions of *Geobacillus subterraneus* gen. nov., sp. nov. and *Geobacillus uzenensis* sp. nov. from petroleum reservoirs and transfer of *Bacillus stearotherophilus*, *Bacillus thermocatenulatus*, *Bacillus thermoleovorans*, *Bacillus kaustophilus*, *Bacillus thermoglucosidasius* and *Bacillus thermodenitrificans* to *Geobacillus* as the new combinations *G. stearotherophilus*, *G. thermocatenulatus*, *G. thermoleovorans*, *G.kaustophilus*, *G. thermoglucosidasius* and *G. thermodenitrificans*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.* 51, 433-446.
- Nielsen J. E., Borchert T.V.,(1994).** Protein engineering of bacterial alpha-amylases. *Biochim Biophys Acta.* 1543, 253-274.
- Nielsen P., Rainey F., Outtrup H., Priest F. G., Fritze D. (1994).** Comparative 16S rDNA sequence analysis of some alkaliphilic bacilli and the establishment of a sixth rRNA group within the genus *Bacillus*. *FEMS Microbiology Letters.* 117, 61-66.
- Oyeleke S. B., Auta S. H., Egwim E. C.(2010).** Production and characterization of amylase produced by *Bacillus megaterium* isolated from a local yam peel dumpsite in Minna, Niger State. *J Microbiol Antimicrob.* 2(7): 88-92.

-
- Rani G., Paresh G., Harapriya M., Vineet K. G., Bhavna C.(2003).** Microbial α -amylases: a biotechnological perspective. *Process Biochemistry* 38, 1599-1616.
- Riva O.N., Sorokulova I.B., Smirnov P. (2001).** Simplified technique for identification of the aerobic spore-forming bacteria by phenotype *.Int. J..Syst..Evol..Microbiol.*51, 1361-1371.
- Octavio L. F., Daniel J.R., Francislete R. M., Carlos Bloch J.R., Carlos P. S., Maria F. G. (2000).** Activity of wheat α -amylase inhibitors towards birched α -amylases and structural explanation of observed specificities. *Eur. J. Biochem.* 2(67):66-73.
- Öner E.T.(2006).** Optimization of ethanol production from starch by an amyolytic nuclear petite *Saccharomyces cerevisiae* strain. *Yeast.*23, 849-856.
- Pandey A., Nigam P., Soccol C. R., Soccol V. T., Singh D., Mohan R. (2000).** Advances in microbial amylases. *Biotechnol Appl Biochem.* 31:135-52.
- 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):6876-6881.
- Payan F.(2004).** Structural basis for the inhibition of mammalian and insect alpha-amylases by plant protein inhibitors. *Biochim Biophys Acta.*1696, 171-180.
- Percheron F., Perlès R., Foglietti M. J. (1981).** Abrégé de biochimie générale. Masson. Paris. 2-225-68277-1. 290.
- Primrose S. B., Twyman R. M., Old R. W.(2003).** Principles of gene manipulation. Blackwell science USA. pp 120-126. 632-05954-0.
- Priest FG.(2000).** Enzymes, extracellular, *Encyclopedia of microbiology.* San Diego CA: Academic Press, 2, 210-221.
- Prakash O., Jaiswal N.(2009).** alpha-Amylase: An Ideal Representative of Thermostable Enzymes. *Appl Biochem Biotechnol.* 162(7):2123-4.
- Puspasari F., Radjasa O.K., Noer A.S., Nurachman Z., Syah Y.M., Van der Maarel M., Dijkhuizen L., Janeček Š., Natalia D.(2012).** Raw starch degrading α -amylase from *Bacillus aquimaris* MKSC 6.2: isolation and expression of the gene, bioinformatics and biochemical characterization of the recombinant enzyme. *Applied Microbiology.* 10-11, 25.

-
- Queipo, Maria I., Juan De Dios C., Manuel M., Maria J. B., Pilar M. (2007).** Preparation of Bacterial DNA Template by Boiling and Effect of Immunoglobulin G as an Inhibitor in Real-Time PCR for Serum Samples from Patients with Brucellosis. *Clin Vaccine Immunology*. 15-2.293-296.
- Reddy N. S., Nimmagadda A., Sambasiva Rao K.R.S.(2003).** An overview of the microbial alpha-amylase family. *Afr. J. Biotechnol*, 2, 645-648.
- René S. (1982).** Biotechnologie. Technique et documentation-Lavoisier. Paris. 2-85206-140-6.267.
- Riva O.N., Sorokolova I.B., Smirnov. (2001).** Simplified technique for identification of the aerobic spore-forming bacteria by phenotype. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51, 1361-1371.
- Roa U.M. Satyanarayana T.(2003).** Statistical optimisation of a high maltose-forming, hyperthermostable and Ca²⁺ independent alpha-amylase production by an extreme thermophile *Geobacillus thermoleovorans* using response surface methodology. *In: Behal A., Singh J., Sharama M.K., Pur P and Batra N. Characterisation of Alkaline-Amylase from Bacillus sp AB 04. International Journal of Agriculture & Biology.*,08(1):80-83.
- Rowland H. Davis. (2003).** The Microbial Models of Molecular Biology. Oxford university press. 19-515436-3.
- Sarabia L.A., Ortiz M.C. (2009).** Response surface methodology in T.R.E.W.B. Brown S editors, *Comprehensive Chemometrics: Chemical and Biochemical Data Analysis*: Elsevier ; 1.12.
- Schallmeyer M. A., Singh Ward O.P. (2004).** Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. *Can. J. Microbiol.*, 50:1-17.
- Shafiei M., Abed-Ali Z., Mohammad A.(2010).** Purification and biochemical characterization of a novel SDS and surfactant stable, raw starch digesting, and halophilic alpha-amylase from a moderately *Halophilic bacterium, Nesterenkonia sp.* strain F. *Process Biochemistry* 45:694-699.
- Shukla Pratyosh. Pletschke, Brett I. (2013).** Advances in Enzyme Biotechnology. Springer India, 147-165

-
- Soni S. K., Kaur A., Gupta J. K. (2003).** A solid state fermentation based bacterial α - amylase and fungal glucoamylase system and its suitability for the hydrolysis of wheat starch. *Process Biochem*,39:185-192.
- Sun J., Wang H.(2011).** Cloning and expression of a thermostable β -1,3-1,4-
glucanase from *Bacillus amyloliquefaciens* ATCC 23350. *Annals of Microbiology*,01-08.
- Suman S., Ramesh K. (2010).** Production of a thermostable extracellular amylase from thermophilic *Bacillus* species. *J Pharm Sci Res.*2:149-154.
- Tester R.F.,Karkalas, J., Qi X. (2004).**Starch-composition, fine structure and architecture.*J. Cereal Sci.*39, 151-165.
- Thais S. D. M., Anuj K. C., Ricardo D. B., Sílvia S. D. (2011).** Effect of Dissolved Oxygen and Inoculum Concentration on Xylose Reductase Production from *Candida guilliermondii* Using Sugarcane Bagasse Hemicellulosic Hydrolysate. *Food and Nutrition Sciences*, 2, 235-240.
- Van der Maarel M.J.E.C., Van der Veen B., Uitdehaag J.C.M., Leemhuis H., Dijkhuizen L. (2002).** Properties and applications of starch converting enzymes of α -amylase family. *J. Biotechnol.*,94:137-155.
- Warner J. B., Warner B., Krom P., Christian M., Wil N. K., Juke S. L. (2000).** Catabolite Repression and Induction of the Mg^{2+} -Citrate Transporter CitM of *Bacillus subtilis*. *Journal Of Bacteriology*,**182.21.6099**.
- Whitcomb D.C., Lowe M.E.(2007).** Human pancreatic digestive enzymes.*Dig Dis Sci* 52, 1-17.
- Windish W. W., Mhatre N. S. (1965).** **Microbial amylases.** In: Wayne WU, editor. *Advances in applied microbiology*, vol. 7. New York: Academic Press,:273-304.
- Wisdomkofi A. A., Terlabie N. N., Esther S. D. (2006).** Screening of 42 *Bacillus* isolates for ability to ferment soybeans into dawadawa. *International journal of microbiology*. 106, 343-347.
- Wu X.Y., Mark J., Walkerb M. H., James C. (2006).** Development of a group-specific PCR combined with ARDRA for the identification of *Bacillus* species of environmental significance. *Journal of Microbiological Methods*. 64,107-119.

XU D.,Coté J.C. (2003).Phylogenetic relationships between *Bacillus* species and related genera inferred from comparison of 3' end 16S rDNA and 5' end 16S-23S ITS nucleotide sequences. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 53, 695-7.

Travaux réalisés dans le cadre de la thèse

Publication

- **Tifrit Abdelkrim, Moueddene Nasreddine , Bachir Meriem, . Drici Amine, Sebahia Mohammed, Abbouni Bouziane.** Production and optimization of α -amylase by *Bacillus* strains isolated from the soils of the North West of Algeria. *Der Pharmacia Lettre*, (2015), 7 (6):72-80.
- **Tifrit Abdelkrim, Abbouni Bouziane, Drici Amine, Sebahia Mohammed.** Screening and characterization of *Bacillus* strains producing highly thermostable amylase from various hot springs of Algeria. Submitted manuscript (2015)

Séminaire colloques et journées scientifiques

- 1^{ier} Séminaire National Biologie et Santé « 1^{ier} SNBS ». SCREENING AND CHARACTERIZATION OF BACILLUS STRAINS PRODUCING HIGHLY THERMOSTABLE AMYLASE FROM HOT SPRINGS OF ALGERIA . université Djillali Liabes de Sidi Bel Abbes (2015).
- Journée scientifiques « recherché scientifique au service du développement local » COMPARATIVE STUDY OF THE PRODUCTION OF BACTERIAL AMYLASE FROM *BACILLUS* STRAINS ISOLATED IN THE WEST OF ALGERIA. Université Hassiba Benbouali de Chlef. (2015).
- 1ere journée scientifique sur les sciences de la nature et de la vie. COMPARATIVE STUDY OF THE PRODUCTION OF BACTERIAL AMYLASE FROM *BACILLUS* STRAINS ISOLATED IN THE WEST OF ALGERIA. Université Djillali Liabes de Sidi Bel Abbes (2014)
- 4th international workshop on industrial Biotechnology. COMPARATIVE STUDY OF THE PRODUCTION OF BACTERIAL AMYLASE FROM *BACILLUS* STRAINS ISOLATED IN THE WEST OF ALGERIA. Université de Tlemcen (2014).
- Séminaire International sur les sciences alimentaire. COMPARATIVE STUDY OF THE PRODUCTION OF BACTERIAL AMYLASE FROM *BACILLUS* STRAINS ISOLATED IN THE WEST OF ALGERIA. Université de Constantine (2014).

Annexe A

❖ **Gélose nutritive :**

Composition par litre :

- Extrait de viande 1g
- Extrait de levure 2g
- Peptone 5g
- Chlorure de sodium 5g
- Agar 15g
- pH = 7,4

❖ **Milieu VF (Viande-Foie)**

Composition par litre:

- Base viande foie 30,0g
- Glucose 2,0g
- Agar 6,0g
- pH = 7,0

❖ **Bouillon Cœur-cervelle (*Brain Heart Infusion Broth = BHIB*)**

Composition par litre

- Cerveille de veau, Infusion à partir de 200 g.....7.7g
- Coeur de boeuf, Infusion à partir de 250 g.....9.8g
- Protéose Peptone.....10.0g
- Dextrose..... 2.0g
- Chlorure de sodium..... 5.0g
- Phosphate Di-sodique..... 2.5g
- pH 7.4 ± 0.2 à 37°C

Annexe B

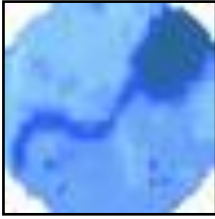
Principe

La galerie API 20E compte 20 microtubes contenant des substrats sous forme déshydratée. Les tests sont inoculés avec une suspension bactérienne qui reconstitue les milieux. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanées ou révélés par l'addition de réactifs. La lecture de ces réactions se fait à l'aide du Tableau de lecture et l'identification est obtenue à l'aide du tableau d'identification.

Technique :

- **Préparation de la galerie :** Réunir fond et couvercle d'une boîte d'incubation et répartir de l'eau dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide, ensuite Déposer stérilement la galerie dans la boîte d'incubation.
- **Préparation de l'inoculum :** Faire une suspension bactérienne, dans une ampoule de Suspension Medium ou dans un tube d'eau distillée stérile, d'opacité légère avec une seule colonie prélevée sur un milieu gélosé.
- **Inoculation de la galerie :**
 - ✓ Remplir les tubes et les cupules des tests : CIT, VP, GEL avec la suspension bactérienne.
 - ✓ Remplir uniquement les tubes des autres tests.
 - ✓ Créer une anaérobiose dans les tests : ADH, LDC, ODC, URE, H₂S en remplissant leur cupule d'huile de paraffine.
 - ✓ Refermer l boîte d'incubation et la placer à 35-37°C pendant 18 à 24 heures.
- **Lecture :** Après incubation, la lecture de la galerie doit se faire en se référant au Tableau de Lecture.

Annexe C



Probabilistic Identification of Bacteria for Windows

- **Désignation du logiciel :** Probabilistic Identification of Bacteria for Windows
- **Abréviation :** PIBWin
- **La version :** 0.2
- **Référence:** Bryant TN. PIBWin - software for probabilistic identification. *Journal of Applied Microbiology*. 2004;97(6):1326-7.
- **Le programme a trois fonctions principales:**
 - ✓ L'identification des isolats inconnus
 - ✓ la sélection des tests supplémentaires pour distinguer les souches dont l'identification n'est pas atteinte
 - ✓ le stockage et la récupération des résultats

Le programme est conçu pour utiliser des matrices d'identification probabilistes qui ont soit publiés dans la littérature ou créés par l'utilisateur. Les matrices qui sont fournis avec PIBWin ont été prises à partir de la littérature. Ces matrices ont été publiées eux et les utilisateurs doivent se référer à ces publications pour plus de détails sur les méthodes utilisées lors de tests sur les isolats.

Annexe D

Désignation	Numéro d'accension
<i>Bacillus sp.</i> HBH1-2 16S ribosomal RNA gene	KP779643
Lieu d'isolement	Poids moléculaire
Source thermale de Hammam Bouhdjar	1412 bp
<p>GTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCT GCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGCTTGTGTTGAACCGCATGGTTCA AACATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAC GGCTACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCC CAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAACTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCG TGAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGTTTGAATAGGGCG GTACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAACCCAGGGCTAATACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTG GCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTCCCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCC CCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGGAACCTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGAATTCACAG TGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAACGTA CGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAG TGCTAAGTGTTTAGGGGTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGT ACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATT CGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAATCCTAGAGATAGGACGTCCCCTTC GGGGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCA ACGAACGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTCAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAAC CGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACTTGCTACAATGG ACAGAACAAAGGCAGCGAAACCCCGAGGTTAAGAATCCACAAATCTGTTCTCATTTTCGGATCCCAATC TCGAATCCACTGCGTGAAACTTGAATCGTAGTAATCCCGATTAAACATGGCCCGGTAGAAACTTTCCC GGGGCCTTTAAAACCCGCCGTCACACCACAAGATTTTTGACCCCCGAAACCTGGGAGGGACCTTTTTAG AGACCCCCCCC</p>	

Annexe D

Désignation	Numéro d'accension
<i>Bacillus licheniformis</i> strain HBH3-1 16S ribosomal RNA gene	KP835199
Lieu d'isolement	Poids moléculaire
Source thermale de Hammam Bouhdjar	1418 bp
<p>TGCAGTCGAGCGGACCGACGGGAGCTTGCTCCCTTAGGTCAGCGGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTA ACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGCTTGATTGAACCGCATGG TTCAATTATAAAAGGTGGCTTTTTAGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAG GTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACA CGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACG CCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAACCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGTTTCAATA GGGCGGTACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGT AGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAA AGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATT CCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTA ACTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACG ATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTTTTCCGCCCTTTAGTGCTGCAGCAAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGG GAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTT AATTGCAAGCAACGCGAAGAACCCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAACCCTAGAGATAGGGCTTCCC CTTCGGGGGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCC CGCAACGAACGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTGAGTTGGGCACTCTAAAGGTGACTGCCCGGTG ACAAACCGGAAGGAAGGGTGGGGATGACGTCAAATCACCATGCCCTTATGACCTGGGCTCACCACGTGC TACAATGGGCAAAAACAAAGGGCACCAAACCCCGAAGGTAAGCCAATCCCCAAAATCTGTTCCAGTTC GGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTG AATACGTTCCCGGCCTTGTACACACCCGCCGTCACACCTCGAGAGTTTGTAAACCCGAAGTCGTAGAG GTAACCTTTGGAGCCAGC</p>	

Annexe D

Désignation	Numéro d'accension
<i>Bacillus sp.</i> HBH 3-2 16S ribosomal RNA gene	KP835200
Lieu d'isolement	Poids moléculaire
Source thermale de Hammam Bouhdjar	1405 bp
<p>TGATTTAGGGGGGACAAAAAGGGAGCTTTCTCCCCGGAGTTAGGGGTGATCGGGGGAGTACCACGGGGGA AACCCGCCTGTAGACTGGGGATAATTCCGGGAAACCGGAGCTATACCCGGATATTTCCCTGAACCCCATG GTTCAAAGGTGAAAGACGGTTTTTGGTTGTAATTTAAAGATGGGCCCCCGCGCCTTAGCTAGTTGGTGGG GTAATGGTTACCAAGGGGAGGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATTGGCCACACTGGGACTGAGACA CGGCCAGATTCTACGGGAGCCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACG CCGCGTGAGTGATGAAGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCGGAGAGTAACT GCTCGCACCTTGACGGTACCTAACCCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTA GGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAA GCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTC CACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAA CTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGA TGAGTGCTAAGTGTTAGGGGGTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGG AGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTTA ATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAACCCTAGAGATAGGGCTTTCCC TTCCGGGACAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCC GCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTGAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACA AACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAA TGGACAGAACAAGGGCTGCAAGACCGCAAGGTTTAGCCAATCCCATAAATCTGTTCTCAGTTCGGATCG CAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACG TTCCCGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGCAACACCCGAAGTCGGTGAGGTAACC TTTAT</p>	

Annexe D

Désignation	Numéro d'accension
<i>Bacillus subtilis</i> strain HC-2 16S ribosomal RNA gene	KP835201
Lieu d'isolement	Poids moléculaire
Source thermale de Hammam Chiguer	1440 bp
<p>TCTCCGGGCGGCCCTCTAATAACACTGCAGTGAGGCGGCCAAGAGGGGAGCTTTCCCCCTGGGTTTAGCG GCGGACGGGTGAGTAAAACGGGGGTAACTCCCTGAAAGAATGGGAAAACCTCCGGAAACCGGGCCTAT ACCGGGAGCTTTTTTTGAACCGCAAGGTTCAAAACTAAAAGGGGGCTTTGGCTACCCATTCCAGATGGACC CGCGGGGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGGTTACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGT GATCGGCCACACTGGGATTGAGACACGGCCCAGATTCCTACGGGAGGCAGCCGTAGGGAATTTTCCGCAA TGGACGAAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTA GGGAAGAACAAGTACCGTTTCGAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTA CGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCA GGCGGTTCCCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGGAACCT GAGTGCAGAAGAGGAGAGTGAATTCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGT GGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGAT ACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTAGGGGGTTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGC TAACGCATTAAGCACTCCGCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCC GCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCCTTACCAGGTCTTGACATCCTCT GACAATCCTAGAGATAGGACGTCCCCCTTCGGGGCAGAGTGACAGGTGGTGATGGTTGTCGTCAGCTCG TGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTAGTTGG GCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTA TGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACAGAACAAAGGGCAGCGAAACCGCGAGGTTAAGCCAATCC CACAAATCTGTTCTCAGTTCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCG CGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTG AACACCCGAAGTCGGTGAGGAACCTTATGAGCCAGCCTC</p>	



Scholars Research Library

Der Pharmacia Lettre, 2015, 7 (6):72-80
(<http://scholarsresearchlibrary.com/archive.html>)



Production and optimization of α -amylase by *Bacillus* strains isolated from the soils of the North West of Algeria

A. Tifrit¹, N. Moueddene², M. Bachir², M. A. Drici², M. Sebahia² and B. Abbouni^{1*}

Laboratory for Molecular Microbiology Proteomics and Health, Department of Biology, Faculty of Natural Science and The Life, University of Djillali Liabès of Sidi Bel Abbés, Algeria
Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Hassiba Ben Bouali-Chlef, Algeria.

ABSTRACT

The study was focused on the isolation of the amylase producing bacteria belonging to the genus *Bacillus* and the optimization of several parameters such as cultural conditions and the nutritional requirements implicated in the production process. For the isolation of the amylase producing bacteria, six samples of soils and water were collected from the main geographic zones in North West of Algeria such as the river of Mekerra, Lake of Sidi Mohamed Benali, wastewater treatment plant of Sidi Bel abbes, field of potato in Ain Temouchent and the factory in Maghnia, where starchy wastes are submitted to natural fermentation. Fifty four bacterial strains of the genus *Bacillus* were isolated and selection of strains that produced most amount of amylase was determined on the basis of two criteria: the diameter of the zone of hydrolysis in solid medium and reducing sugar (DNS method in liquid medium). Furthermore, the most efficient strain was identified by the using of the API system as *B. subtilis* with a yield of 1,537 U/mL. Maximum production of amylase was obtained after optimization of the following parameters: starch concentration, nitrogen source, concentration of the inoculum and metal ions effect. Productivity was increased 6 times: $11,746 \pm 0,0028$ U/mL in the optimized medium with the following composition: starch 5 g/L, gelatin 5 g/L, CaCl_2 : 0.2 g/L and 0.5 % v/v of inoculum.

Key words: North West Algeria, α -amylase, *Bacillus* sp, Optimization, optimum activity.

INTRODUCTION

The northwest Algeria region is characterized by a multitude of landforms such as sea, mountains, plains, forest, rivers and a Mediterranean climate, which offer to this geographical location a rich biodiversity and remains unexplored microbiologically. Therefore, it is of interest to characterize the microbial population present in the soils and the water of the North West Algeria.

The α -amylase is class of enzyme (E.C.3.2.1.1), which was responsible for hydrolysis of internal α -1,4-glycosidic linkages in starch in low molecular weight products such as glucose, maltose [1, 2].

Furthermore, amylases are used for hydrolysis of starch in food industry and for removing of starch sizing in textile industry [3, 4].

Industrial amylases productions cover about approximately 25% of the world enzyme market such as sugar, textile, paper, brewing, detergents, and the pharmaceuticals [5-10].

α -amylase has obtained from several sources, such as plants, animals and microorganisms [11]. The employed microorganisms for amylases production constitute a major advantages due their economical bulk production capacity and their easy purification [12].

Furthermore, amylases have been produced by several fungi, yeast, bacteria and actinomycetes but members of the genus *Bacillus* are heterogeneous and very versatile in their adaptability to the environmental conditions.

The great diversity within the genus of *Bacillus* species and the availability of the range of genetic tools for their manipulation hold out the promise in the future for the production of many new products [13].

Early, a partial purification of α -amylase from various *Bacillus species* such as *B. megaterium*, *B. subtilis* and *B. licheniformis* SPT 27 has been achieved [14, 15, 16]. The physicochemical parameters, such as the composition of the growth medium, pH of the medium, phosphate concentration, inoculums age, temperature, aeration, carbon source and nitrogen source implicated for α -amylase production has been thoroughly investigated [2]. Therefore, the objectives of the study were the isolation and the selection of the high producer α -amylase strains belonging to the genus *Bacillus* from the soils of the North West of Algeria and the optimization of the cultural conditions such as and the nutritional requirements.

MATERIALS AND METHODS

Sample collection

In order to increase the isolation of the amylase producing bacteria, six samples of soils and water were collected from the main geographic zones in North West of Algeria such as the river of Mekerra, Lake of Sidi Mohamed Benali, wastewater treatment plant of Sidi Bel abbes), field of potato in Ain Temouchent and the factory in Maghnia, where starchy wastes are submitted to natural fermentation.

For this purpose, 50 g of soils were especially collected at the places where the degradation of starchy material was remarkable and visible and a volume of 50 mL water from the above described sources of sampling. After that, the samples of soils and water were introduced in sterile polyethylene bag, transported, brought at the laboratory and kept at 4 °C.

Isolation of bacterial strains from soil sample

In order to isolate a producer of α -amylase strains belonging to the genus *Bacillus*, one gram of the soil sample was weighed and introduced into 9 mL of sterile distilled water and then subjected to heat shock 10 min at 80 °C [17].

Serial dilution of 10^{-5} of 1 mL of the mixture was introduced into a sterile Petri dish and inoculated on starch agar plate and incubated at 37 °C for 72 hours [18].

Different bacterial strains obtained as typical colonies were sub-cultured and thereafter purified several times on fresh starch agar plate. The isolated pure strains were screened for the production of extracellular α -amylase production using starch agar as described by [19, 20].

The pure cultures were streaked at the center of the sterile starch agar plates and the plates were incubated at 37 °C for 24 hours. After incubation, 1% iodine solution was over-layered on the agar plates and observation was made to note the substrate utilized zone around the colony [21]. The strain that formed the largest zone of hydrolysis was taken for further study. The selected α -amylase producing MK-7 strain colonies belonging to the genus *Bacillus* manifested a positive hydrolysis zone has been preliminary identified by the test of the Gram staining and the presence of spores with a positive catalase [22].

Inoculum preparation

In order to prepare fresh pre-culture, the test isolates was inoculated in nutrient broth, incubated at 37 °C on a rotary shaker for 24 hours. After that, the main culture was inoculated into sterile starch medium with a volume of 10 % of 24 hours old fresh pre-culture and incubated at 37 °C on a rotary shaker at 75 rpm for 72 hours.

The 24 hours old culture was maintained as stock cultures in starch agar slants and stored at 4 °C for regular subculturing. Whereas, the fresh over night culture was used as inoculum for further growth study and enzyme the production. The used media had the following composition (in g/L): 10 g starch, 10 g of nutrient broth, 15 g agar, served as inoculation media for all the experiments.

α -amylase activity assay

The α -amylase activity was assayed according to the protocol described by Bernfeld, [22].

A volume of 2 mL of supernatant harvested by centrifugation at 4.000 g for 15 min from 72 hours bacterial growth culture. A volume of 0.5 mL of supernatant was added to 0.5 mL soluble starch (1% w/v) in 0.1 M phosphate buffer

(pH 6.4). The reaction mixture was incubated in a water bath at 40 °C for 30 min. A blank consisting of 0.5 ml soluble starch (1%, w:v) in 0.1 M phosphate buffer (pH 6.4) was also incubated in a water bath at the same temperature and time with the other test tubes.

The reaction was stopped by adding 1 mL of DNS reagent in each test tube and then immersing the tubes in a boiling water bath for 5 min after which they were allowed to cool and 5 mL of distilled water was added and the reducing sugars liberated were estimated by the 3, 5 dinitrosalicylic acid (DNS) method [19]. The absorbance for all the test tubes was measured at 540 nm with spectrophotometer. An enzyme unit is defined as the amount of enzyme releasing 1 mg of glucose equivalents from the substrate per min at 40 °C [23].

Identification of the efficient strain

The fresh isolates were morphologically and phenotypically characterized using different biochemical tests: Gram reaction, catalase and oxidase production, indole and urease production, gelatin liquefaction, hydrolytic activities, ability to use different compounds such as various carbon and nitrogen sources. The phenotypic identification of the isolates indicated their appearance to the genus of *Bacillus*. Furthermore, the selected α -amylase producing MK-7 strain was identified at the species level by the using of API 50CHB system according to the manufacturer's instructions described by Biomerieux, France.

Optimization of the production medium and culture conditions

The selected α -amylase producing MK-7 strain was retained for the optimization of various process parameters to maximize the α -amylase yield. For this purpose, the starch concentration, the nitrogen source, the inoculum concentration and a different metal salts on α -amylase activity were investigated.

Effect of the starch amount on α -amylase activity

The appropriate amount of starch concentration on α -amylase production was studied by incubating of the optimized culture medium, inoculated with the selected α -amylase producing MK-7 strain, agitated at 75 rpm for 72 hours at 37 °C, in the presence of the following concentration of starch (0.5, 1, 1.5, 2, and 2.5 %). The α -amylase activity was measured by DNS method and the optimum concentration of starch was used for the optimization of further parameters.

Effect of the nitrogen source on α -amylase production

In order to explore the effect of the nitrogen source on enzyme production, the selected α -amylase producing MK-7 strain was inoculated in the optimized culture medium in the presence of several of nitrogen sources such as: urea, ammonium sulphate, gelatin, pepton and casein and incubated at 75 rpm for 72 hours at 37 °C. Amylase production was measured by DNSA method and the optimum of the nitrogen source was used for the optimization of further parameters.

The effect of the inoculum concentration

The influence of the inoculum concentration on the α -amylase production was studied by incubating of the optimized culture medium, inoculated with the selected α -amylase producing MK-7 strain, agitated at 75 rpm for 72 hours at 37 °C, in the presence of the following of the inoculums concentration (0.5, 1, 1.5, 2% w/v). The α -amylase production was measured by DNS method and the optimum of the inoculums concentration was used for the optimization of further parameters.

Effect of different metal salts on α -amylase activity

The effect of different metal salts on the α -amylase production was studied by incubating the optimized culture medium, inoculated with the selected α -amylase producing MK-7 strain, agitated at 75 rpm for 72 hours at 37 °C, in the presence of the corresponding metal salts, namely, calcium chloride, magnesium sulphate, ferric chloride, zinc sulphate, sodium chloride, potassium chloride, each at a concentration of 1-5 mM was mixed with the moistening agent individually [24]. After incubation, α -amylase was extracted and assayed for its activity.

RESULTS

Six samples of soils and water were collected from the main geographic zones in North West of Algeria such as the river of Mekerra, Lake of Sidi Mohamed Benali, wastewater treatment plant of Sidi Bel abbes), field of potato in Ain Temouchent and the factory in Maghnia, where starchy wastes are submitted to natural fermentation.

Totally, fifty four bacterial isolates belonging to *Bacillus* species were screened for α -amylase production on starch agar medium. Colonies with highest clear zone on the plate agar medium by the addition of 1% iodine solution reagent were selected as potential α -amylase producing strains. Among the isolated strains, 21 α -amylase positive

strains were selected by exposing the agar plates to 1% iodine solution. Based on differences in enzyme production by clear zone on the plates, the highest α -amylase producer was selected for further investigation.

The morphological study, the microscopic observation and biochemical characterization revealed the presence of *B. subtilis* (STEP-5, MK 7, SMM-6), *B. macerans* (SMM-9), *B. megaterium* (MK-5 and TMP-2), *B. amyloliquefaciens* (STEP-3 and SMM-4) and *B. licheniformis* (SW-6 and LAK-4). All the isolated *Bacillus* were gram positive, rod-shaped, aerobic, catalase positive and spore forming as described in by Barkeley [13] and Bergey's manual of determinative bacteriology (Table 1).

The obtained results from phenotypic identification indicated that selected α -amylase producing isolates was aerobic, Gram positive, rod shaped and spore forming. According to the biochemical results they belong to the genus *Bacillus*.

The α -amylase activity of *Bacillus* isolates according to their obtained hydrolysis halos is presented in (Table 1), which *B. subtilis* (A16) had the highest halo (3.1 mm), *B. macerans* (A6) and *B. coagulans* (A9) had the smallest (0.3 mm). Since the distinction between selected α -amylase producing strains lies in the soil and water origin, taxonomic characterization of isolates lead to explain that the amyolytic variation between the strains was not critical for species variability on the same microorganisms. Similar observations were made by [19] from α -amylase halos produced by different yeast strains isolated from starchy soil.

Table 1 : Illustration of α -amylase activity of the isolates strains belonging to the genus of *Bacillus*

Isolate code	Probable strains	Diameter of zone hydrolysis of α -amylase activity (mm)
STEP-3	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	36
STEP-5	<i>Bacillus subtilis</i>	33
STEP-7	<i>Bacillus sp.</i>	35
STEP-9	<i>Bacillus sp.</i>	37
MK-5	<i>Bacillus megaterium</i>	31
MK-6	<i>Bacillus sp.</i>	36
MK-7	<i>Bacillus subtilis</i>	44
MK-8	<i>Bacillus sp.</i>	31
MW-5	<i>Bacillus sp.</i>	35
MW-6	<i>Bacillus licheniformis</i>	36
MW-9	<i>Bacillus sp.</i>	35
MW-10	<i>Bacillus sp.</i>	44
SMM-4	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	33
SMM-6	<i>Bacillus subtilis</i>	44
SMM-8	<i>Bacillus sp.</i>	41
SMM-9	<i>Bacillus macerans</i>	39
LAK-4	<i>Bacillus licheniformis</i>	35
LAK-5	<i>Bacillus sp.</i>	37
LAK-8	<i>Bacillus sp.</i>	37
TMP-2	<i>Bacillus megaterium</i>	33
TMP-4	<i>Bacillus sp.</i>	38

Identification of the selected α -amylase producing MK-7 strain

The use of the phenotypic character for identification of the selected α -amylase producing MK-7 strain such as Gram positive, rod-shaped, positive catalase, spore formers and hydrolyzes of starch indicated that the isolates belong to the genus *Bacillus* (Figure 1, Figure 2). Furthermore, the selected α -amylase producing producer MK-7 strain was identified at the species level by the using of API 50CHB system as *B. subtilis*.

Optimization of the production medium and culture conditions

Optimizing the starch concentration

The obtained results of the influence of starch concentration on amylase production by the selected α -amylase producing MK-7 strain indicated that the maximum α -amylase yield 4.656 U/mL was obtained by the using concentration of starch of 0.5% (Figure 3). After that, amylase production was decreased considerably by further used increasing starch concentration and reached yield of 1.25 U/mL



Figure 1: Microscopic observation 100 × of the selected 24 hours old α -amylase producing strain MK-7, showing rod shape, Gram positive and spore forming. Bars = 10µm



Figure 2: Streaks across the starch agar plate and the apparition of a clear zone around by the selected 72 hours old α -amylase producing MK-7 strain incubated at 37 °C for 72 hours

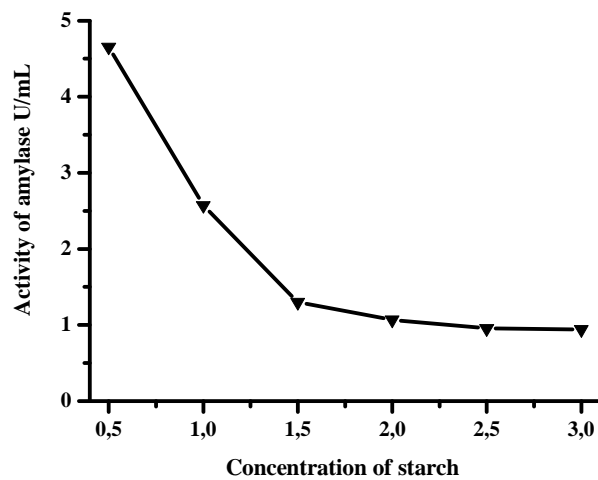


Figure 3: The optimization of the starch concentration for α -amylase production in the optimized culture medium by the selected α -amylase producing MK-7 strain incubated at 37 °C and agitated at 75 rpm for 72 hours

Optimization of the nitrogen source

A further study for the optimization of nitrogen source for α -amylase production of the selected α -amylase producing MK-7 strain has been investigated. The obtained results manifested that the highest α -amylase yield 7,036, 5.45 U/mL was obtained by the using of the gelatin and casein as nitrogen source respectively Whereas, the use of others nitrogen source such as urea and ammonium sulphate has decreased considerably the amount of amylase production (Figure 4).

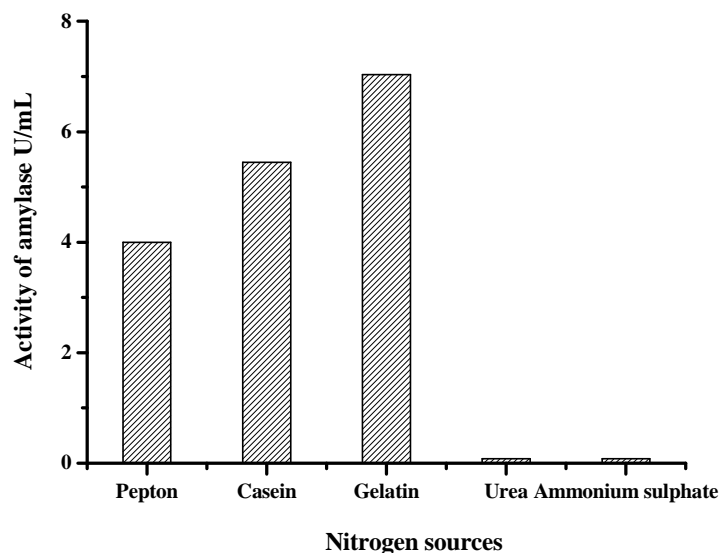


Figure 4: The optimization of the nitrogen source for α -amylase production in the optimized culture medium by the selected α -amylase producing MK-7 strain, incubated at 37 °C and agitated at 75 rpm for 72 hours

The effect of inoculum concentration

The obtained results of the influence of inoculation concentration on α -amylase production by the selected α -amylase producing MK-7 strain indicated that the maximum α -amylase yield 9,102 U/mL was obtained by the using concentration of inoculums of 0.5% (Figure 5). After that, amylase production has decreased considerably by the using of the increasing concentration inoculums and reached yield of 5.25 U/mL in the presence of 3 %.

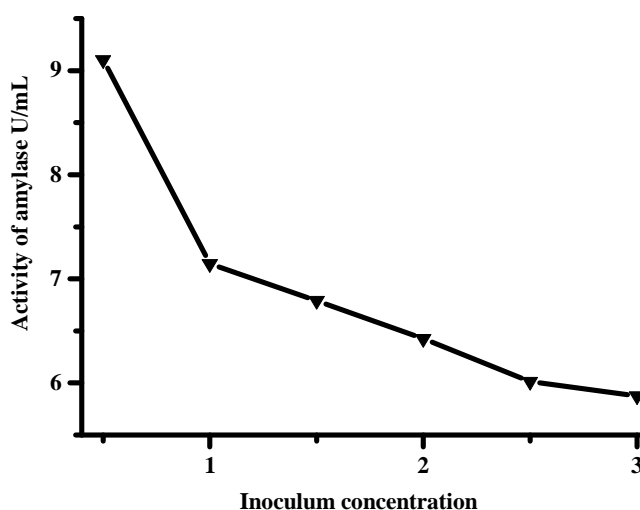


Figure 5: The effect of the inoculums concentration on α -amylase production in the optimized culture medium by the selected α -amylase producing MK-7 strain incubated at 37 °C and agitated at 75 rpm for 72 hours

The effect of metal ions on enzyme activity

The illustrated results in Figure 6 indicated that the inoculation of the selected α -amylase producing MK-7 stain, in the presence of metals ions (Zn^{2+} , Fe^{3+} , Cr^{3+} , Fe^{3+}) has reduced the enzyme accumulation in the optimized culture medium. Whereas, the presence of Mg^{2+} and Ca^{2+} in the optimized culture medium has increased considerably the yield of α -amylase activity 8,102 U/mL and 11,746 U/mL respectively.

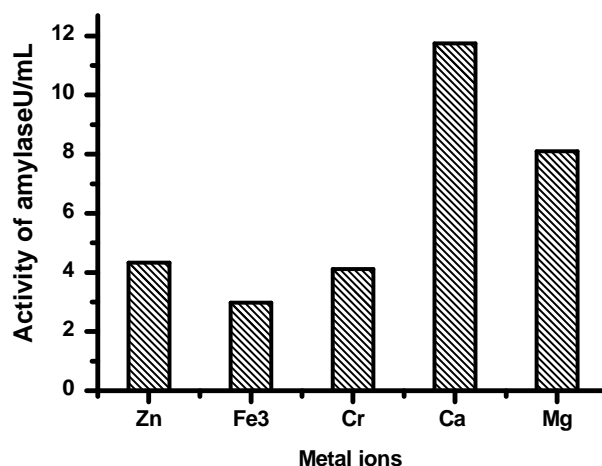


Figure 6: The effect of the metal ions on α -amylase production in the optimized culture medium by the selected α -amylase producing MK-7 strain incubated at 37 °C and agitated at 75 rpm for 72 hours

DISCUSSION

In order to isolate of α -amylase producer strains belonging to the genus *Bacillus*, the screening of the strains α -amylase producer strains *Bacillus* strain was carried out on starch agar medium, according to the protocol described by [23, 25].

Furthermore, the heat shock method was used as isolation strategy for the elimination of the vegetative cells and the enhancing the growth of spore-forming bacteria according to the protocol described by Lynn [17].

Fifty four bacterial isolates belonging to *Bacillus* species were screened for α -amylase production on starch agar medium. Based on the criteria selection of α -amylase producer strains, two further selective steps such as a streak cross the Petri plates and DNS method were required.

The selected α -amylase producing MK-7 strain manifested a clear zone of hydrolysis of starch with a diameter of 49 mm and yield of 1.537 U/mL. The selected α -amylase producing MK-7 strain was identified as *B. subtilis* according to the reference of Bergey's Manual of Determinative Bacteriology [26] and by the using of the API system, therefore, this stain was retained for the optimization of further parameters implicated for α -amylase production. The α -amylase production has been thoroughly investigated, which was affected by several physicochemical factors. The most notable among these are the composition of the growth medium [2], Where the relationship between the starch concentrations present in the used optimized culture medium. The maximum α -amylase yields 4.656 U/mL was produced by *B. subtilis* MK-7 with a concentration of starch at 0.5% (w/v). Furthermore, a few α -amylase yields were obtained by the using of high concentration of starch. The obtained results is similar with the reported α -amylase production by *Bacillus* sp. IMD 370 described by Kalishwaralal and Kelly [27, 28, 29] by the using of starch concentration of 1%.

During the optimization of the nitrogen source for α -amylase production by *B. subtilis* MK-7, by the using of the organic nitrogen source as peptone, casein and gelatin and the mineral source such as ammonium sulphate and urea as been added in the optimized culture medium. The adding of the gelatin in the optimized culture medium has yielded the highest level of α -amylase production 7.036 U/mL, which has increased the productivity of α -amylase around 151%. Therefore, the gelatin was retained as appropriated source of nitrogen.

In early study, Gupta and their co-workers [2] has reported that the use of the organic nitrogen source such as yeast extract, peptone and casein was preferred of α -amylase production. Furthermore, the optimization of further parameters showed that the α -amylase production was mainly affected by inoculum concentration, which the maximum yield of α -amylase 9.102 U/mL was produced by *B. subtilis* MK-7 in the presence of inoculums concentration at 0.5% (v:v). After that, the α -amylase production was decreased in the presence of high inoculum concentration.

The study of the effects of different metal ions (Zn^{2+} , Cr^{3+} , Pb^{2+} , Fe^{3+} , Ca^{2+} and Mg^{2+}) on α -amylase production by the selected α -amylase producing MK-7 strain indicated that the adding of the calcium in the optimized culture medium has enhanced the yield of α -amylase 11.746 U/mL. A similar yield has been reported by Syed [10].

Furthermore, calcium ions are known to be the stabilizer and activator of α -amylase production and it has been reported that the Ca^{+2} were required for α -amylase activity.

Mamo and Gassesse [7] reported that a concentration of 0.1 g/L CaCl_2 was optimum for amylase production by *Bacillus sp. WN 11*, whereas Qader *et al.* [30] reported that in case of *Bacillus sp. AS-1*, 0.2 g/L CaCl_2 was optimum for the maximum production of α -amylase.

In the present study, the selected α -amylase producing MK-7 strain required calcium for enzyme production. This suggests that selected α -amylase producing MK-7 strain is calcium dependent metalloenzyme and possesses high affinity for calcium ions [2].

Furthermore, the adding of magnesium in the inoculated optimized culture medium has manifested not a particular effect on α -amylase production. Whereas, the presence of the following metals ions: Fe^{2+} , Cr^{2+} and Zn^{2+} in the inoculated optimized culture medium have inhibited the α -amylase production. A similar result has been reported by Wanga and Asoodeh [31, 32].

CONCLUSION

Amylases are among the most important used enzymes in the industrial processes. With the advent of new frontiers in the biotechnology, the spectrum of α -amylase has a large application in the industrial application and therefore, it is of interest to search for new sources for the production of enzyme.

Newly, the isolated *B. subtilis* strain presented as excellent candidate producer for α -amylase in the optimized culture medium with the following composition: starch 5 g/L, gelatin 5 g/L CaCl_2 , 0.2 g/L and 0.5% of inoculum size (v/v), with a maximum enzyme yield of 11.747 U/mL, which increase the yield of the α -amylase yields by 6 folds.

Furthermore, the obtained results indicated the existence of other interesting bacterial strains with important potential for α -amylase activity. Therefore, further studies characterization of the enzyme such as purification of the α -amylase and characterization of metal containing protein will require.

ACKNOWLEDGMENT

I would like to express my sincere thank to the Ministry of Higher Education and Scientific Research of Algeria for the financial support and Prof. Dr. Mouffok BENALI and Dr. BENINE Mohamed Lamine.

REFERENCES

- [1] G Rajagopalan ; C Krishnan. *Bioresource Technology*, **2008**, 99, 3044-3050.
- [2] R Gupta ; P Gigras ; H Mohapatra ; VK Goswami ; B Chauhan. *Process Biochemistry*, **2003**, . 38, 1599-1616.
- [3] N Gligorijevici ; N Stevanovici, N Loncari ; R Baosici ; Z Vujcici, ; N Bozic. *Journal of the Serbian Chemical Society*, **2014**, 79 (4) 411–420.
- [4] CA Burtis ; ER Ashwood. *Tietz Textbook of Clinical Chemistry* (3rd edn). W.B. Saunders Company, California, **1999**, 689-698.
- [5] P Monteiro de Souza ; PDO Magalhães. *Brazilian Journal of Microbiology*, **2010**, 41(4): 850–861.
- [6] K Kiran ; T Chandra. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **2008**, 77:1023–1031.
- [7] G Mamo ; BA Gashe ; A Gessesse. *Journal of Applied Microbiology*, **1999**, 86: 557-560.
- [8] A Pandey ; P Nigam ; C R Soccol ; VT Soccol ; D. Sing ; R Mohan. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, **2000**, 31, 135–152.
- [9] N Oudjeriouat ; Y Moreau M. Santimone ; B Svensson ; G Marchis-Mouren ; V Desseaux. *European Journal of Biochemistry* , **2003**, 270: 3871-3879.
- [10] DG Syed ; D Agasar ; A Pandey. *Current Microbiology*, **2009**, 57: 638-642.
- [11] K Kathiresan ; S. Manivannan. *African Journal of Microbiology*, **2006**, 5(10): 829-832.
- [12] R Vidyalakshmi ; R Paranthaman ; J Indhumathi. *World. Journal of Chemistry*, **2009**, 4 (1): 89-91.
- [13] R Barkeley ; M Heyndrickx ; L Niall ; P De Vos. Applications and systematics of *Bacillus* and relatives. Blackwell Publishing company, **2002**.
- [14] SB Oyeleke, H Auta ; HC Egwim. *Journal of Microbiology and Antimicrobials*, **2010**, (7): 88-92.
- [15] N Riaz ; IU Haq ; MA Qadeer. *International Journal of Agricultural and Biological Engineering*, **2003**, 5 (3): 23- 28.
- [16] PVD Aiyer. *African Journal of Biotechnology*, **2004**, 3 (10): 519-522.
- [17] M Lynn. *Process Biochemistry*, **1998**, 35 (1999) 27–31.

- [18] JA Khan ; P Ruchika. A study on partial purification and characterization of extracellular amylases from *Bacillus subtilis*. Pelagia Research Library, **2011**, 2 (3): 509-519.
- [19] TF Bertrand ; T Fredric ; N Robert. Production and partial characterization of a thermostable amylase from *Ascomycetes* yeast strain isolated from starchy soil. McGraw-Hill Inc., New York, **2004**, 53-55.
- [20] MI Abou Dohara ; AK El-Sayed ; AA El-Fallal ; NF Omar. *Polish Journal of Microbiology*, **2011**, 60: 65- 71.
- [21] SD Lamabam ; K Polashree ; SR Joshi. *African Journal of Microbiology Research* , **2010**, 4(23), pp. 2534-2542, 4.
- [22] P Bernfeld. *Enzymology*, **1955**, 1, 149–158.
- [23] A Ahmed ; Alkando, IH Moawia. *Journal of Bacteriology Research*, **2011**, 3(8) :129-137.
- [24] A Sharma, S ; Adhikari ; T Satyanarayana. *World Journal Of Microbiology and Biotechnology*, **2007**, 26:483-490.
- [25] kAA Wisdom ; NN Terlabie ; ES Dawson. *International Journal of Microbiology*, **2006**, (106): 343-347.
- [26] JG Holt ; NR Krieg ; PHA Sneath ; JT Staley ; ST Williams. Bergeys Manual of Determinative Bacteriology, **2000**, Ninth edition. Lippincott Williams, Wilkins, Philadelphia, USA.
- [27] K Kalishwaralal ; S Gopalram ; R Vaidyanathan ; V Deepak ; S Pandian; S Gurunathan. *Colloids and Surfaces B : Biointerfaces*, **2010**, 77(2): 174-180.
- [28] MA McTigue ; CT Kelly ; EM Doyle ; WM Fogarty. *Biotechnology Letters*, **1994**, 16:569–74.
- [29] CT Kelly ; MA McTigue ; WM Fogarty. *Applied Environmental Microbiology*, **1995**, 15:446–8.
- [30] SAU Qader ; S Bano ; A Aman ; N Syed ; A Azhar. *Turkish Journal of Biochemistry*, **2006**, 31: 135-140.
- [31] SL Wanga ; BYC Liang, TWB Lianga *Process Biochemistry*, **2011**, 46:745–750.
- [32] A Asoodeh ; J Chamanic ; M Lagzian. *International Journal of Biological Macromolecules*, **2010**, 46 (3): 289-297.