

UNIVERSITE KASDI MERBAH OUARGLA

Faculté des sciences de la nature et de la vie

Département des sciences biologiques



Mémoire En vue de l'obtention du diplôme de

MASTER ACADEMIQUE

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Microbiologie Appliquée

Thème

**Essai de caractérisation d'exoenzymes
produites par une bactérie alcali-halotolérante
extrême**

Présenté par : M^{elle} DJAFFALI Aicha

Soutenu publiquement le : 21.06.2022

Devant le jury :

M^{me} MIMOUNI Yamina	M.C.A	Présidente	U.K.M. Ouargla
Mr. MOSBAH Said	M.C.A	Examineur	U.K.M.Ouargla
M^{me} KHALLEF Sakina	M.C.A	Encadreur	U.K.M.Ouargla

Année Universitaire : 2021/2022

Remerciements

Je tiens d'abord à remercier Allah notre créateur qui a donné la force pour réussir dans mes études et faire aboutir ce travail.

J'adresse tout d'abord mes sincères remerciements à Mme KHALLEF Sakina, Maitre de conférences A, à l'université KASDI Merbah -Ouargla, d'avoir accepté de m'encadrer et de m'avoir impliqué dans cette thématique; pour sa présence indéfectible tout au long de la réalisation de cette étude; pour ses directives et conseils; sans lesquels ce travail n'aurait pas vu le jour.

Je présente mes sincères remerciements également aux membres du jury: M^{me} MIMOUNI Yamina, Maitre de conférences A, à l'université KASDI Merbah, pour l'intérêt qu'elle a porté à ce travail; en acceptant de présider ce jury; ainsi qu'à Mr MOSBAH Said, Maitre de conférences A, à l'université KASDI Merbah, d'avoir accepté de siéger à ce jury et d'examiner ce travail.

Je remercie également tous les enseignants de département de Sciences Biologiques, Spécialité Microbiologie appliquée- Université KASDI MERBAH-Ouargla.

Merci à toute personne qui a contribué de près ou de loin à l'élaboration de ce travail.

AICHA



Dédicaces

Aucun dédicace, aucun mot ne pourrait exprimer mon respect ma considération et mes profonds sentiments envers eux je pris mon Dieu de les bénir de veiller sur eux, j'espère qu'ils seront toujours fiers de moi.

*A la mémoire de A, toi Ma chère maman «BOUHALA
Nasima»*

*A la mémoire de a mon cher père « DJAFFALI Tayeb »
A celle qui m'a tant bercé, tant donné et tant enseigné, toi qui m'a guidé dans le droit
chemin, toi qui m'appris que rien n'est impossible...mon chère père, ma chère, qui dieu
pitié de toi*

«MAMINE Mohammed » ; ma autre maman «ATTIA Fatiha;».

A Mes chères sœurs : Manal, Lyna ,Zineb

A Mes chers frères : Lazher, Mohammed, Oussama.

Au reste de ma famille «DJAFFALI», la famille «BOUHALA».

*A Mes amies surtout Badis, Abdelhak , Maria, Amine, Rayen,
Daliya,*

*Pour tous les bons moments que nous avons partagés; mes
binômes au Labo Badis, Lamia, Rahma, Hakko
M. Rouabeh.K ; M.Bouzegag Ismail et Mme Makkak.F qui m'ont
beaucoup aidé*

*A toute la promotion master II 2021/2022. Option Microbiologique Appliqué,
Département des Sciences Biologiques, Faculté des Sciences de la Nature et de la vie,
Université kasdi Merbah Ouargla.*

Liste des abréviations

- Br : milieu de culture Brown
- pH: potentiel d'Hydrogène
- rpm / min : rotation par minute
- C-5 *Alkalibacillus haloalkaliphilus C-5*
- SC: Surnageant de Culture
- CMC : CarboxyMéthyl Cellulose
- Na Cl : Chlorure de sodium
- KCl : Chlorure de potassium
- ° C : Température en degré Celsius
- µl : microlitre
- TCA : acide Trichloracétique
- S +p Surnageant de Culture +Pepsine
- mg milligramme

Listes des figures

Figure 1 :(A) : <i>B. thuringiensis</i> phase sporulée avec présence de spores (spo) et cristaux de toxine Cry (cry) dans des cellules. (C) : <i>B. cereus</i> ATCC 14579 en phase végétative formant des chainettes..	16
Figure 2: Classification des protéases .	20
Figure 3: Transformation enzymatique de l'amidon en sirop de glucose de maltose et de fructose .	25
Figure 4 : Protocole de la recherche des activités exo enzymatiques	33
Figure 5 :Schéma du test de sensibilité à une enzyme protéolytique par la méthode de diffusion des puits.....	34
Figure 6: Aspect macroscopique de la souche <i>A. haloalkaliphilus</i> C-5 sur milieu solide et culture sur milieu (Br) liquide	68
Figure 7 : Activité caséolytique observée aux différentes températures	38
Figure 8: Activité de la gélatinase observée aux différentes températures	39
Figure 9: Activité amylolytique observée aux différentes températures	39
Figure 10 : Activité estérasique observée aux différentes températures	40
Figure 11:Activité cellulolytique observée aux différentes températures	42
Figure 12: Activité caséolytique observée aux différentes concentrations de sel.....	43
Figure 13: Activité de la gélatinase observée aux différentes concentrations de sel.....	43
Figure 14: Activité amylolytique observée aux différentes concentrations de sel	44
Figure 15: Activité estérasique observée aux différentes concentrations de sel	45
Figure 16 : Activité cellulolytique observée aux différentes concentrations de sel.....	46
Figure 17: Activité caséolytique observée aux différents pH	48
Figure 18: Activité de la gélatine observée aux différents pH	48
Figure 19 :Activité amylolytique observée aux différents pH	49
Figure 20: Activité estérasique observée aux différents pH	49
Figure 21: Activité cellulolytique observée aux différents pH.....	50
Figure 22 : Résultats du test de sensibilité à une enzyme protéolytique.....	51

Liste des tableaux

Tableau 1: Applications industrielles des enzymes de <i>Bacillus</i> spp	21
Tableau 2: Microorganismes producteurs de protéases aux propriétés intéressantes	22
Tableau 3 : Quelques caractéristique morphologiques et physiologiques de la souche halophile	30
Tableau 4 : Paramètres et intervalles expérimentés	31
Tableau 5 : Influence de la température sur les activités exo enzymatiques de l'<i>Alkalibacillus</i>	37
Tableau 6: Influence de la salinité sur les activités exoenzymatiques de l'<i>Alkalobacillus</i>	42
Tableau 7: Effet du pH sur des activités exoenzymatiques de l'<i>Alkalibacillus</i>	47

Listes des annexes

Annexe 1.....	65
Annexe 2.....	66
Annexe 3.....	68

Table des matières

Remerciements

Dédicaces

Listes des figures

Liste des tableaux

liste des annexes

Introduction 11

Chapitre I

Revue bibliographique

I.1 Généralités sur les *Bacillus* 15

I.1.1 Caractères généraux et classification..... 15

I.1.2 Ecologie du genre *Bacillus* 16

I.1.3 Description du genre *Alkalibacillus* 18

I.2. Usages des enzymes en biotechnologie..... 19

I.2.1 Les protéases 19

1.2.2 Les amylases 24

I.2.3 Les lipases et estérases..... 26

I.2.4 Les cellulases 26

Chapitre II

Matériel et méthodes

II.1 Matériel biologique :..... 29

II.1.1 Description de la souche productrice 29

II.2 Réactivation de la souche 30

II.3 Pré culture 30

II.4 Variation de l'activité exoenzymatiques de l'halobactérie en fonction de la teneur du milieu en sel..... 31

II.4.1.1 Détermination de l'activité protéolytique..... 31

II.4.1.1.a Hydrolyse de la caséine	31
II.4.1.1.b Hydrolyse de la gélatine	32
II.4.1.2 Détermination de l'activité amylolytique	32
II.4.1.3 Détermination de l'activité estérasique	32
II.4.1.4 Détermination de l'activité cellulolytique	32
II.5 Test de sensibilité aux enzymes protéolytiques	34
 <i>Chapitre III Résultats et discussion</i>	
III.1 Revivification de la souche	36
III.2 Résultats des variations du pouvoir lytique exoenzymatiques de l'halobactérie	36
III.2.1 Effet de la température sur les activités exoenzymatiques de l'halobactérie	36
III.2.1.1 Variation de l'activité caséolytique	37
III.2.1.2 Variation de l'activité de la gélatinase	38
III.2.1.3 Variation de l'activité amylolytique	39
III.2.1.4 Variation de l'activité estérasique	40
III.2.1.5 Variation de l'activité cellulolytique	40
III.2.2 Variation des activités exoenzymatiques de l'halobactérie en fonction de la teneur du milieu en sel	42
III.2.2.1 Variation de l'activité caséolytique	42
III.2.2.2 Variation de l'activité de la gélatinase	43
III.2.2.3 Variation de l'activité amylolytique	44
III.2.2.4 Variation de l'activité estérasique	44
III.2.2.5 Variation de l'activité cellulolytique	45
III.2.3 Variation des activités exoenzymatiques de l'halobactérie en fonction du pH	47

III.2.3.1 Variation de l'activité caséolytique	48
III.2.3.2 Variation de l'activité de la gélatinase	48
III.2.3.3 Variation de l'activité amylolytique	49
III.2.3.4 Variation de l'activité estérasique	49
III.2.3.5 Variation de l'activité cellulolytique	50
III.2.4 Résultats du test de sensibilité a une enzyme protéolytique	50
III.2.5 Discussion	52
Conclusion et perspectives	55
<i>Références bibliographiques</i>	57
Annexes	64

Introduction

Les enzymes sont des protéines constitutives de tous les êtres vivants. Utilisées depuis des siècles sans le savoir (dans les produits laitiers avec la présure issue de la caillotte du veau) (**Spinnler, 2013**); elles ont un pouvoir catalytique et une spécificité au substrat/réaction élevés. Des virus aux humains; la puissance catalytique des enzymes facilite les processus vitaux dans pratiquement toutes les formes de vie (**Copeland, 2004**).

Les microorganismes ont fourni, et continuent de fournir, un nombre impressionnant de biocatalyseurs de ce genre avec une large gamme d'applications dans plusieurs industries telles que l'alimentation humaine et animale, l'industrie des détergents et les produits pharmaceutiques (**Brahmachari et al., 2017**).

Les enzymes industrielles sont d'origine végétale, animale ou microbienne (Meunier, 1999). Les enzymes produites par voie microbienne restent la source la plus importante des enzymes industrielles; car elles possèdent une large variété catalytique, un rendement élève, une grande facilité de manipulation génétique et une croissance rapide des microorganismes sur des milieux économiques (**Kirk et al., 2002**).

260 enzymes différentes sont commercialement disponibles dans l'Union Européenne, dont environ 91% sont obtenues par fermentation (58% à partir de champignons, 5% à partir de levures et 27% à partir de bactéries) et 9% par extraction (3% à partir de plantes et 6 % d'animaux) (**Fraatz et al., 2014**).

Au niveau industriel, la classe d'enzyme la plus importante est celle des hydrolases. Au cours des dernières décennies, des recherches considérables ont été entreprises sur les hydrolases extracellulaires produites par une grande variété des microorganismes (**Gupta et al., 2003**).

Une place de choix est allouée aux enzymes industrielles produites par les bactéries du genre *Bacillus*. Elles sont les plus utilisées dans la fermentation microbienne, environ 2/3 des enzymes industrielles sont produites par des espèces de ce genre (**Schallmey et al., 2004**).

L'importance attribuée à ce genre bactérien sur le plan biotechnologique ; vient du fait qu'en moyenne, 4 à 5% du génome des *Bacillus subtilis* sont dédiés à la synthèse de métabolites secondaires (**Stein; 2005**). Le génome de la souche *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 est impliqué dans la production de métabolites secondaires incluant des bactériocines, des peptides antimicrobiennes, des lipopeptides, polykétides et sidérophore (**Chan et al., 2009; Rückert et al., 2011**).

La souche de *Bacillus amyloliquefaciens* V656 produit 2 types de chitinases hautement inhibitrices de *Fusarium oxysporum* (Wang *et al.*, 2004).

Outre la production d'antibiotiques, les *Bacillus* sont également capables de produire diverses enzymes à forte activité lytique très actives dans la dégradation des parois cellulaires fongiques comme la *chitinase* et la *b-1,3-glucanase* (Leelasuphakul *et al.*, 2006; Das *et al.*, 2010).

Les protéases produites par *Bacillus licheniformis*, utilisées majoritairement dans les détergents, occupent une part importante du marché mondial

Cependant, pour de nombreux industriels, les problèmes de la thermostabilité enzymatique ainsi que la sensibilité des enzymes aux conditions physicochimiques (pH, sel, solvants,...) rencontrés en milieu industriel, constituent un réel enjeu économique et environnemental.

L'*Alkalibacillus haloalkaliphilus* C-5. est une bactérie extrême halotolérante; isolée d'Ouargla en 2018 par Khallef *et al.*; cette halobactérie a montré lors des travaux effectués précédemment; sa capacité inouïe à dégrader les caséines; la gélatine; l'amidon; la cellulose et le tween 80.

Vu la panoplie d'hydrolases dont dispose cette halobactérie; il était intéressant de continuer sur la lancée et de déterminer des plages d'activités lytiques exoenzymatiques de cette halobactérie; sous les conditions opératoires, de température, de pH et de salinité.

Scindé en trois parties; le premier chapitre du document est une synthèse bibliographique sur la spécificité du genre *Bacillus* et son écologie; avec un aperçu sur les intérêts de son usage en biotechnologiques.

Le deuxième chapitre consacré aux méthodes appliquées pour la mise en évidence des activités lytiques de cette souche. Le troisième chapitre est consacré aux résultats obtenus; les comparer aux données d'autres recherches et conclure par les perspectives envisagées.

Chapitre I

Revue bibliographique

I.1 Généralités sur les *Bacillus*

Des formes bactériennes exceptionnellement résistantes à la chaleur ont été mises en évidence pour la première fois au cours des recherches de John Tyndall (1820-1893); la découverte de l'endospore bactérienne revient à Ferdinand Cohnen 1872; qu'établie genre *Bacillus*.

Ce genre appartient à la famille des *bacillaceae*, ordre des *bacillales*, classe des *bacilli*, phylum des *firmicutes*. La famille des *bacillaceae* réunit 62 genres bactériens; avec près de 457 espèces identifiées; le genre *Bacillus* étant le plus grand comptant 226 espèces (Mandic *et al.*, 2017).

I.1.1 Caractères généraux et classification

Les bactéries qui produisent des endospores résistantes à la chaleur sont classées en plusieurs genres de la famille *Bacillaceae*. À l'exception des bactéries anaérobies, formant des endospores, le genre *Bacillus* est le plus connu de cette famille, qui inclut également les *Sporosarcina* et les *Sporolactobacillus* (Berkeley et Goodfellow., 1981).

Le genre *Bacillus* regroupe de bactéries à Gram positif; en forme de bâtonnets droits ou légèrement incurvés, aux extrémités arrondies, à l'exception des membres du *Bacillus cereus* qui possèdent des extrémités carrées. De taille variable (de 0.5-2.5 x 1.2-10 μ), leur GC% est de 32 à 69; ces bactéries se présentent isolées, en paires ou en chainettes et forment des endospores (critère important sur le plan taxonomique du genre *Bacillus*); le plus souvent mobiles, à flagelles péritriches, (*Bacillus anthracis* et *Bacillus mycoides* sont immobiles. Elles sont aérobies, parfois facultatifs, et catalase positif (Prescott *et al.*, 2003).

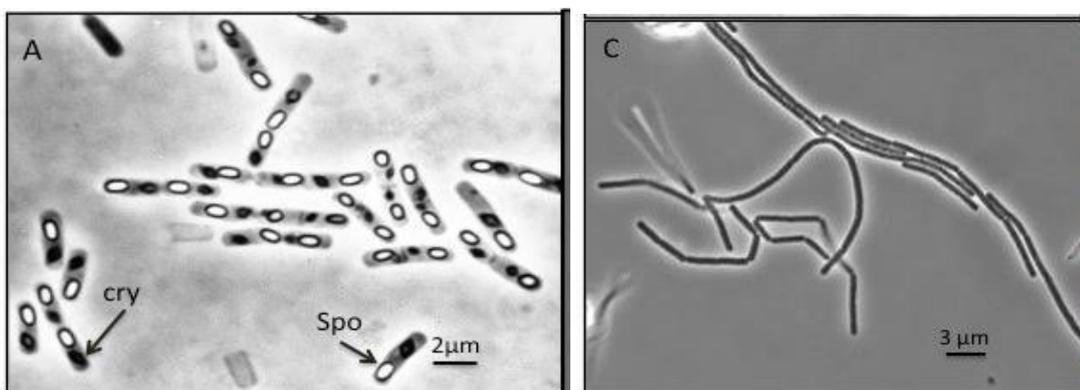


Figure 1 :(A) : *B. thuringiensis* phase sporulée avec présence de spores (spo) et cristaux de toxine Cry (cry) dans des cellules. (C) : *B. cereus* ATCC 14579 en phase végétative formant des chainettes. (Images en microscope de contraste de phase objectifs 100 X. Service Histopathologie Institut Pasteur France) (**Consentino, 2019**).

La classification basée sur la morphologie et la position de la spore est couramment la plus utilisée ; répartissant le genre *Bacillus* en 03 groupes (**Gordon et al., 1973 ; Bron et al., 1999**) :

Groupe I : constitué de bacilles à Gram positif présentant une spore centrale ou terminale, sphérique ou ovoïde ne déformant pas la cellule. Ce groupe est divisé en 02 sous-groupes ;

- Le groupe A constitué de bacilles d'un diamètre supérieur à 1 µm regroupant *B. anthracis*, *B. cereus*, *B. megaterium*, *B. mycoides*, *B. thuringiensis*, *B. pseudomycoïdes* et *B. weihenstephanensis* ;

- Le groupe B rassemblant les bacilles d'un diamètre inférieur à 1 µm : *B. coagulans*, *B. firmus*, *B. licheniformis*, *B. subtilis* et *B. pumilus*.

Groupe II : constitué des espèces à Gram variable présentant une spore ovoïde, centrale ou terminale, déformante : *B. circulans*, *B. stearothermophilus*

Groupe III : constitué de bacilles à Gram variable et présentant une spore sphérique, déformante, terminale ou subterminale : *B. fusiformis*, *B. globisporus*

Des approches moléculaires basées sur l'hybridation ADN-ADN (**Priest et al., 1981**) et la composition d'ADN, (**Fahmy et al., 1985**) ont aussi été utilisées. Finalement l'analyse du gène de l'ARNr 16Sa séparé les espèces du genre *Bacillus* en neuf (9) groupes phylogénétiques distincts (**Wang W. et Sun, M. 2009**). Le genre *Bacillus* était le plus représenté sur les bases de données génomiques avec plus de 108 séquences du génome complet disponibles (**Maughan et Van der Auwer., 2011**).

I.1.2 Ecologie du genre *Bacillus*

Ubiquiste dans la nature, les bactéries du genre *Bacillus* sont des germes fréquemment isolés à partir des niches écologiques très variées (des sols, plantes, eaux douces, eaux de mers.). Le sol constitue l'habitat principal de ce genre bactérien où ils sont impliqués dans le cycle du carbone et de l'azote (**Goldman et Green., 2009**).

Elles sont chimio-organotrophes ou chimio-lithotrophes, certaines espèces sont prototrophes et d'autres auxotrophes exigent des facteurs de croissance (De Vos *et al.*, 2009).

Les espèces du genre de *Bacillus* possèdent une diversité physiologique et métabolique importante. En effet; leur capacité à former des endospores leur permet de résister à différents stress environnementaux tels que la chaleur, la dessiccation, les UV et les radiations, la digestion enzymatique ou encore les produits chimiques (Nicholson, W.L., 2002). Cette caractéristique importante leur permet également de survivre dans des environnements extrêmes comme les déserts, l'antarctique et les habitats hypersalins (Awais *et al.*, 2007); d'où une diversité d'espèce a été isolée; telle que les bacilles :

- **Acidophiles** : *B. acidocaldarius*, *B. coagulans*
- **Alcalophiles** : *B. alkalophilus*
- **Halophiles** : *B. pasteurii*, *B. pantothenicus*
- **Psychrophiles** : *B. insolitus*, *B. marinus*, *B. megaterium*.
- **Thermophiles**: *B. schlegelii*, *B. stearothermophilus*
- **Dénitrifiants** : *B. azotoformans*, *B. cereus*, *B. licheniformis*
- **Fixateurs de l'azote** : *B. macerans*, et *B. polymyxa*
- **Producteurs des antibiotiques** : *B. brevis* (gramicidine, tyrocidine), *B. cereus* (cerexine), *B. pumilus* (pumulin), *B. subtilis* (difficidine, subtiline, mycobacilline) (Todar, 2003).

La majorité de ces espèces ne sont pas pathogènes à l'exception de *Bacillus anthracis* et *Bacillus cereus* (Rooney *et al.*, 2009); néanmoins dans le domaine industriel (industries agro-alimentaires, industries du médicament, production de matériel stérile à usage unique); le phénomène l'adhésion des spores et leur résistance est posé. En effet, certaines espèces de *Bacillus* produisent des spores dont la surface est hydrophobe ce qui leur permet d'adhérer fortement à divers matériaux et de résister aux procédés de nettoyage. C'est le cas notamment des spores de *Bacillus cereus* qui s'attachent très bien aux surfaces en acier inoxydable et qui posent de graves problèmes dans les industries alimentaires (Logan *et al.*, 1999).

Certes la résistance des spores constitue un problème majeur en médecine; cependant; les *Bacillus* producteurs d'antibiotiques offrent une gamme complète d'activité antimicrobienne : la bacitracine, pumiline, la terosporine etc., sont efficaces contre les bactéries à Gram positifs; la colistine et la polymyxine sont efficaces contre les Gram négatives; la difficidine a un large spectre. La mycobacilline et la zwittermicine sont antifongiques (Todar, 2003).

I.1.3 Description du genre *Alkalibacillus*

Alkalibacillus (Al.ka.li.bacillus. N.L. n. alkali; L. bâtonnet de bacille; N.L. masc. *Alkalibacillus* Bacillus vivant sous conditions alcalines). Les cellules sont des tiges formant des spores à Gram variable. Catalase positive, uréase négative. Des endospores terminales sphériques.

Strictement aérobie et halophile; les cellules sont motiles au moyen de flagelle péritriche. La teneur en ADN G + C est de 38- 41 % mole (CLHP). Phylogénétiquement, le genre appartient à la famille des *Bacillaceae*. Les espèces types du genre est *Alkalibacillus haloalkaliphilus* (= DSM 5271T) (Jeon *et al.*, 2005).

▪ Description de l'espèce *Alkalibacillus haloalkaliphilus*

Alkalibacillus haloalkaliphilus : Gram est négative. Catalase- et oxydase-positive. Nitrate non réduit en nitrite. Les cellules ont une largeur de 0,3-0,5 µm et 3-8 µm de long. Sur agar nutritif alcalin complété avec 5-10 % (p/v) de NaCl, les colonies sont blanc crème. Dans la présence de 20 % (p/v) de NaCl, les colonies sont légèrement jaunâtres.

Ne pousse pas (ou ne pousse que très mal) sur bouillon nutritif ou sur gélose nutritive sans NaCl. Mésophile. Alcaline; une bonne croissance se produit à pH 9. La souche type, WN13T, a été isolé de boue alcaline et très saline de Wadi Natrun, Égypte (Jeon *et al.*, 2005).

I.2 Usages des enzymes en biotechnologie

Intérêts biotechnologiques des *Bacillus*: Le genre *Bacillus* est un genre bactérien présentant un intérêt crucial en biotechnologie ; la biochimie et la physiologie des espèces du genre *Bacillus* ont été largement étudiées. Ces microorganismes possèdent de bons systèmes d'exportation de protéines et peuvent produire certaines enzymes extracellulaires (amylases, xylanase ou protéases par exemple) à des concentrations de l'ordre de 20 à 25 g/l. (Tableau 1). Ces performances placent les *Bacillus* parmi les plus importants producteurs industriels d'enzymes alimentaires, de vitamines, et des antibiotiques (Schallmey *et al.*, 2004).

I.2.1 Les protéases

Les protéases représentent un groupe important et diversifié d'enzymes hydrolytiques qui sont classées selon leur site d'action. Également appelée enzyme protéolytique, protéinase, ou peptidase, des enzymes cassent les longues molécules de chaîne des protéines en fragments plus courts (peptides) et finalement dans leurs composants « acides aminés ». Les protéases sont présentes chez les bactéries, les archées, certains types d'algues et certains Eucaryotes. Elles sont subdivisées en deux grands groupes, soit les exopeptidases et les endopeptidases (Fig.2), selon leur site d'action.

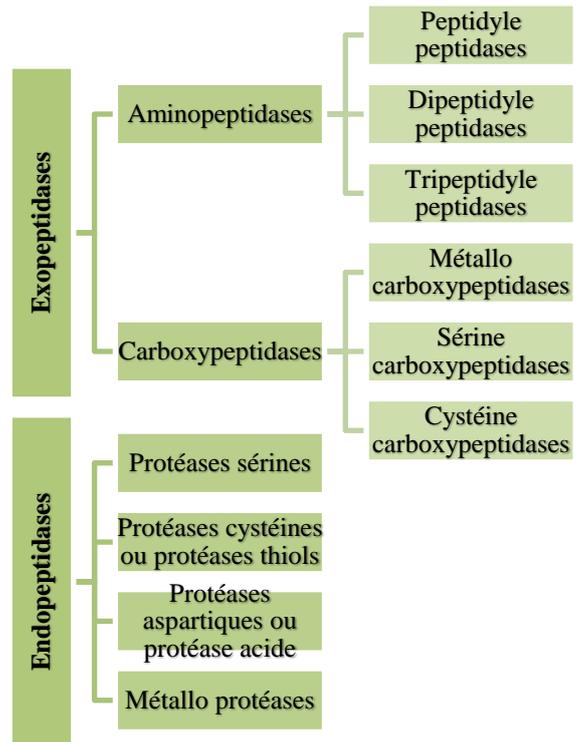


Figure 2: Classification des protéases (Rao *et al.*, 1998).

Tableau 1: Applications industrielles des enzymes de *Bacillus* spp (Schallmeyer *et al.*, 2004)

Tableau 2. Application industrielle de *Bacillus* spp. enzymes.

Industrie (%) [*]	<i>Bacillus</i> spp. majeur enzymes	<i>Bacillus</i> spp.	Commentaire	Enzymes de l'autre
Détergent (37)	Protéases alcalines	<i>B. clausi</i> , <i>B. amyloliquefaciens</i> , <i>B. halodurans</i>	Les protéases du bacille dominant le marché, en particulier l'écurie fortement d'alcali enzyme de <i>B. clausii</i>	Lipases fongiques et cellulases
	Amylase alcaline	<i>B. licheniforme</i> , <i>B. halmapale</i>	Élimination des taches d'amidon	
Amidon de maïs (13)	at-Amylase	<i>B. licheniforme</i> ,		Glucoamylase fongique Glucose isomérase de <i>Streptomyces</i>
	Pullulanase	<i>G. stearothermophilus</i> ¹		
Vêtements de sport (6)	Glucose isomérase	<i>B. acidipulludyticus</i> , <i>B. deramificans</i>		
	Amylase Lyases pectates, amylase alcaline, mannanase	<i>B. halodurans</i> <i>Bacillus</i> sp.	Désencollage ; Épilation des peaux, détachant	Cellulases fongiques Oxydases
Produits laitiers (14)	Aucun	Présures de veau et (ou) de veau		
Cuisson au four (9)	Amylase			
Boissons alcoolisées (8)	Amylase	<i>B. licheniforme</i> , <i>G. stearothermophilus</i> ¹ , <i>B. amyloliquefaciens</i>		La plupart des enzymes fongiques
	B-glucanase	<i>B. subtilis</i>		

¹Les enzymes d'alimentation animale représentent 5% et les enzymes diverses 7%.

^{*} *Geobacillus stearothermophilus*, anciennement *B. stearothermophilus*.

Les exopeptidases clivent la liaison peptidique proximale à la terminaison amine ou l'extrémité carboxyl-terminale du substrat, où comme les endopeptidases clivent la liaison peptidique éloignée des extrémités du substrat basé sur le groupe fonctionnel présent sur le site actif.

Les bactéries du genre *Bacillus* sont parmi les microorganismes qui produisent des protéases intra et extracellulaires (Tableau 2), qui sont l'une des classes d'enzymes les plus intensivement étudiées et largement appliquées dans les processus industriels (Gupta *et al.*, 2002).

Tableau 2: Microorganismes producteurs de protéases aux propriétés intéressantes (Schallmey *et al.*, 2004).

Souches bactériennes	Caractéristiques de la protéase	Référence
<i>Nocardiopsis sp.</i>	Protéase très stable en présence de surfactants et d'agents blanchissants	Moreira <i>et al.</i> (2002)
<i>Bacillus sp.</i>	Protéase hautement thermostable avec pic d'activité à 90°C	Kaur <i>et al.</i> (2001)
<i>Bacillus horikoshii</i>	Nouvelle protéase alcaline	Joo <i>et al.</i> (2002)
<i>Bacillus sp.</i>	Protéase très stable en présence d'agents blanchissants	Gupta <i>et al.</i> (1999)
<i>Bacillus brevis</i>	Nouvelle protéase alcaline thermostable	Banerjee <i>et al.</i> (1999)
<i>Bacillus sphaericus</i>	Nouvelle protéase stable en présence de chlorine	Singh <i>et al.</i> (1999)
<i>Bacillus licheniformis</i>	Nouvelle souche qui produit des kératinases	Manczinger <i>et al.</i> (2003)
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	Nouvelle protéase alcaline thermostable	Rahman <i>et al.</i> (1994)
<i>Bacillus mojavenis</i>	Protéase alcaline stable en présence d'agents blanchissants.	Beg <i>et al.</i> (2002)
<i>Bacillus subtilis</i> K2	Capacité du microorganisme de croître dans des effluents de tannerie et protéase efficace pour le traitement des peaux	Hameed <i>et al.</i> (1999)
<i>Tetrahymena thermophila</i>	Protozoaire produisant des protéases extracellulaires	Coninck <i>et al.</i> (2000)
<i>Bacillus clausii</i>	Microorganisme capable de croître dans des conditions hautement alcalines	Denizci <i>et al.</i> (2004)

▪ **Utilisation dans l'industrie alimentaire**

Les protéases sont utilisées au stade du brassage et du traitement général des céréales afin d'augmenter l'extrait filtrable et la teneur en azote alpha-aminé du moût.

Les protéases aspartiques acides sont utilisées comme enzymes de coagulation du lait dans la fabrication du fromage en raison de leur capacité caractéristique à coaguler les protéines du lait pour former des caillés avec la libération associée de lactosérum. Il existe trois types d'enzymes de coagulation du lait : la présure animale, la présure microbienne et la présure de veau génétiquement modifiée (chymosine) (**Ward et al., 1985**).

▪ **Industrie du cuir**

Les protéases microbiennes alcalines sont en effet très prisées dans l'industrie du cuir (**Takami et al. 1992 ; Brandelli et al., 2010**). L'application accrue de protéases alcalines dans les industries émergentes du cuir est due à l'activité élasolytique et kératinytique; propriétés influentes très efficaces dans les industries de transformation du cuir. Ainsi; leurs utilisations pertinentes dans les phases de la préparation des peaux; l'extinction des pigments indésirables par des mesures enzymatiques aide à nettoyer les peaux.

▪ **Industrie des détergents**

Les protéases sont l'un des ingrédients standard de toutes sortes de détergents, allant de ceux utilisés pour le blanchiment domestique aux réactifs utilisés pour le nettoyage des lentilles de contact ou des prothèses dentaires. L'utilisation de protéases dans les détergents à lessive représente environ 25% des ventes mondiales totales d'enzymes. La préparation du premier détergent enzymatique, « Burnus », remonte à 1913; il se composait de carbonate de sodium et d'un extrait pancréatique brut. Le premier détergent contenant l'enzyme bactérienne a été introduit en 1956 sous le nom commercial BIO-40. En 1960, Novo Industrie A/S a introduit l'alcalase, produit par *Bacillus licheniformis*; sous le nom commercial était BIOTEX (**Rao et al., 1998**).

▪ **Industrie pharmaceutique**

La grande diversité et la spécificité des protéases sont utilisées à grand avantage dans le développement d'agents thérapeutiques efficaces.

L'administration orale de protéases d'*Aspergillus oryzae* (**Luizym et Nortase**) utilisée comme aide digestive pour corriger certains syndromes de déficit enzymatique lytique. La collagénase clostridiale ou subtilisine; utilisée en combinaison avec des antibiotiques à large spectre dans le traitement des brûlures et des blessures. Une asparaginase isolée d'*E.coli*

utilisée pour éliminer l'asparagine de la circulation sanguine dans les diverses formes de leucémie lymphocytaire.

On a constaté que la protéase alcaline de *Conidiobolus coronatus* pouvait remplacer la trypsine dans les cultures de cellules animales (**Chiplonkar et al., 1985**)

1.2.2. Les amylases

Les amylases (EC 3.2.1.1) sont des enzymes hydrolysantes de l'amidon (**Reddy et al., 2003**). Les amylases microbiennes sont produites par des microorganismes tels que les bactéries, les archées, les champignons et les algues pour hydrolyser l'amidon. Produites pour la première fois en 1894 par le scientifique japonais Jokichi Takamine aux (USA), à partir d'une source fongique et ont été utilisés comme aide pharmaceutique pour le traitement des troubles digestifs (**Rao et al., 2007**).

Il existe trois types d'amylase : alpha amylase (endo-1,4- α -D glucohydrolase), bêta-amylase (β -1,4-glucon malt hydrolase) et glucoamylase (amyloglucosidase)

Chacune des trois types d'amylases à une façon unique d'agir sur l'amidon. Par exemple, l'alpha amylase (étant une endo amylase) fend ou brise les liens α -1,4-glicosidiques dans l'amidon à l'intérieur pour donner du glucose, du maltose ou des dextrans. La bêta-amylase, sous forme d'exoamylase, fend les liaisons glycolytiques en retirant deux unités de glucose à la fois, produisant ainsi du maltose (**Abe et al., 1988 ; Gupta et al., 2003**). En revanche, la glucoamylase fend les liens α -1,4 et α -1,6-glicosidiques pour produire du glucose, du maltose et des dextrans limites (**Rao et al., 2007**).

L'usage industriel de l'amylase est diversifié; d'où l'intérêt porté à cette enzyme dans divers secteurs

- **Industrie du pain et de la boulangerie**

Depuis des centaines d'années l'industrie de la boulangerie utilise ce pour fabriquer une grande variété de produits de haute qualité. Les enzymes comme le malt et les a-amylases microbiennes sont largement utilisées dans l'industrie de la boulangerie pour donner à ces produits un volume plus élevé une chapelure plus douce et une meilleure couleur (**Hamer et al., 1995**).

- **Liquéfaction et saccharification de l'amidon**

Le principal marché pour les a-amylases réside dans la production d'hydrolysats d'amidon (Fig.3) tels que le glucose et le fructose.

L'amidon est transformé en sirops de maïs à haute teneur en fructose (HFCS). En raison de leur propriété édulcorante élevée, ceux-ci sont utilisés en quantités énormes dans l'industrie des boissons comme édulcorants pour les boissons gazeuses (Pandey *et al.*, 2000). Le procédé nécessite l'utilisation d'une α -amylase hyper thermostable pour la liquéfaction de l'amidon.

▪ Industrie des détergents

Les α -amylases sont utilisées dans les détergents à lessive en poudre depuis 1975. De nos jours, 90 % de tous les détergents liquides contiennent de l' α -amylase.

La demande de α -amylases pour les détergents pour lave-vaisselle automatique augmente. La sensibilité au calcium et la stabilité est sévèrement compromise dans un environnement pauvre en calcium est une des limites d'une amylase dans les détergents (Kotwitz *et al.*, 1994).

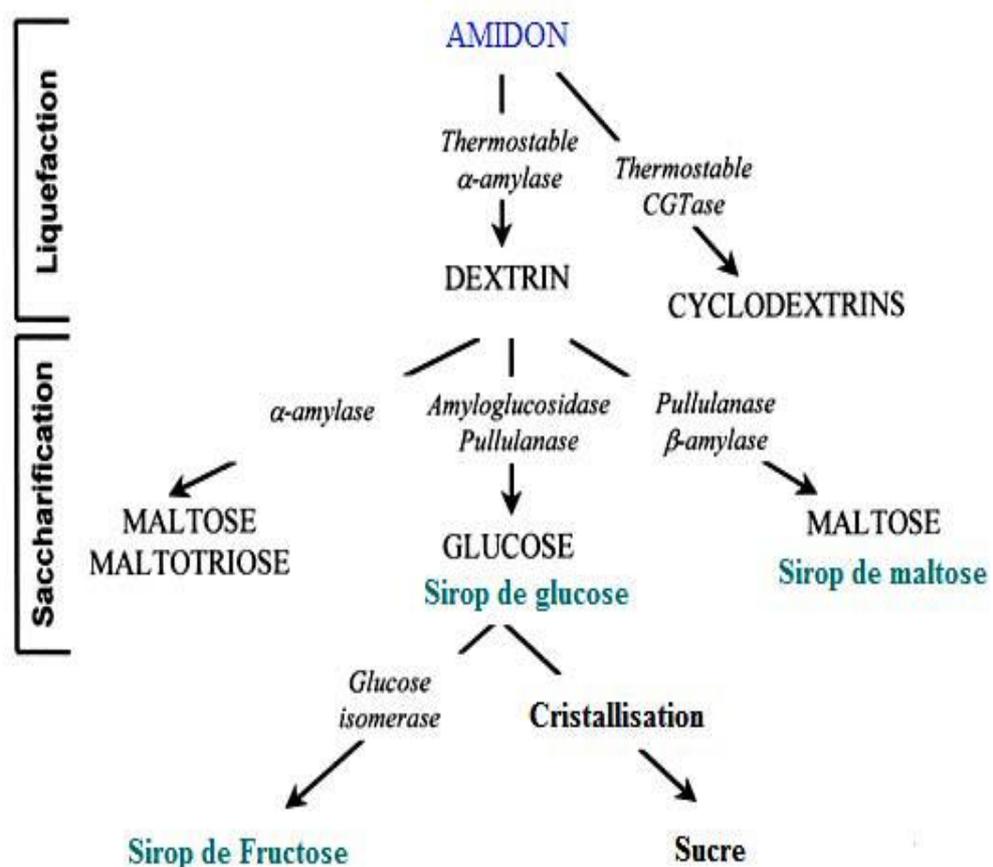


Figure 3: Transformation enzymatique de l'amidon en sirop de glucose de maltose et de fructose (Maktouf, 2013).

I.2.3 Les lipases et estérases

Les estérases (EC 3.1.1.X) constituent un groupe diversifié d'hydrolases qui catalysent le clivage et la formation de liaisons ester; sont largement répandus chez les animaux, les plantes et les micro-organismes. Ces enzymes présentent une forte spécificité régio- et stéréo, ce qui en fait des biocatalyseurs attrayants dans la production de composés optiquement purs en synthèse chimique fine.

Deux grandes classes d'hydrolases sont de la plus haute importance :

- Les lipases (EC 3.1.1.1, hydrolases de triacylglycérol).
- Les estérases « vrais » (EC 3.1.1.3, hydrolases d'esters carboxyliques).

Les estérases peuvent être employées dans les réactions où la chimio- ou la régio-lectivité. L'exemple est l'utilisation d'estérases carboxyliques dans la libération d'acide férulique à partir de polysaccharides de la paroi cellulaire des plantes tels que la pectine ou le xylane. Dans les xylanes, l'acide férulique est attaché aux résidus d'arabinose, qui sont liés à la colonne vertébrale du xylane (**Flaconnier et al., 1994**). Dans les pectines, l'acide férulique peut être lié au galactose ou à l'arabinose dans les chaînes latérales. L'acide férulique ainsi obtenu peut être converti enzymatiquement en vanilline (**Gasson et al., 1998**), un composé aromatique majeur. Des estérases de feruloyl ont été isolées d'un large éventail de micro-organismes (**Lesage-Meessen et al., 1996**).

Des germes comme *Aspergillus niger* et utilise dans cette procédure (**Garcia et al., 2002**)

I.2.4 Les cellulases

Les cellulases dégradent la cellulose en glucose. La cellulase comprend trois enzymes: la β -1,4-endoglucanase, la cellobiohydrolase et la β -glucosidase.

Les cellulases microbiennes sont produites par des bactéries et des champignons en particulier; *Aspergillus niger*, *Aspergillus nidulans* et *Aspergillus oryzae* (**Sibel Uzun et al., 2019**).

L'intérêt industriel dans l'usage de la cellulase est diversifié; on cite certains secteurs qui font appel à cette enzyme.

▪ Industrie du textile

L'industrie textile est l'une des plus importantes au monde; les fabricants toujours à la recherche d'approches respectueuses de l'environnement pour donner à leurs produits un

aspect unique; ont recours aux cellulases; qui sont le troisième groupe d'enzymes en importance utilisé à de nombreuses fins dans cette industrie.

Les applications majeures de cette enzyme sont le traitement au mouillé des textiles, la biostonification des tissus en denim, la biopolisation des fibres textiles, l'adoucissement des vêtements et l'élimination de l'excès de colorant des tissus. Les cellulases fongiques de *Trichoderma reesei* sont les principales enzymes appliquées dans l'industrie du textile. En outre, les actinomycètes des genres *Streptomyces* et *Thermobifida* et d'autres genres de bactéries, comme *Pseudomonas* et *Sphingomonas*, sont sources d'enzymes utilisées pour la décoloration et la dégradation des teintures textiles (Xia *et al.*, 1999).

▪ Industrie du papier et de la pâte à papier

Un des plus grands secteurs industriels au monde; selon le Fonds mondial pour la nature (WWF), l'industrie des pâtes et papiers, qui comprend des produits comme le papier de bureau et de catalogue, le papier glacé, les tissus et les emballages à base de papier, utilise plus de 40 % de tout le bois industriel commercialisé à l'échelle mondiale (Shah *et al.*, 2013).

Les papiers et les pâtes sont des ressources renouvelables, par conséquent, le recyclage et la réutilisation sont deux concepts liés à cette industrie; d'où le recours aux cellulases microbiennes. À partir des années 1980, les applications s'étendent à de nombreux domaines. Tels que; le dégivrage, la réduction en pâte, la biorestoration des déchets industriels, le blanchiment et l'amélioration des fibres peuvent être prises (Ejaz *et al.*, 2021).

L'un des germes utilisés dans l'industriel du papier *Aspergillus niger* et *Trichoderma reesei*

▪ Industrie de détergent

L'application d'enzymes dans la fabrication d'agents de lavage enzymatiques ou les détergents biologiques remontent aux années 1960. Selon les rapports de marché, en 2014, l'industrie des détergents était le plus grand marché pour les enzymes, avec environ 25 à 30 % des ventes totales.

La tendance dans cette industrie est d'utiliser des enzymes alcalines en grandes quantités. Par exemple, la protéase, la cellulase, l' α -amylase, la lipase et la mannanase qui sont largement utilisées dans les détergents pour lessive (Zhang *et al.*, 2013).

Chapitre II

Matériel et méthodes

Ce travail a été réalisé au niveau du laboratoire de l'école normale des enseignants Ouargla, du laboratoire de recherche Bioressources Sahariennes et du centre de recherche et d'analyse physico-chimique (CRAPC) Ouargla.

Notre étude est une suite de celle menée en 2019, qui a mis l'accent sur la présence d'un potentiel exo enzymatique variée dans le surnageant de culture d'une halobactérie.

L'objectif du présent travail est la détermination des intervalles température; pH et salinité des activités catalytiques dont est dotée cette halobactérie.

L'ensemble du matériel et appareillage utilisé lors de cette recherche est porté en annexe 1.

II.1 Matériel biologique

II.1.1 Description de la souche productrice

La souche utilisée dans notre étude a été isolée des dépressions salées à Ouargla, séquencées au niveau du laboratoire d'Optique et Biosciences (LOB) Paris-France par **Khalef et al. (2018)**. Il s'agit de *l'Alkalibacillus haloalkaliphilus* C-5 ; appartenant à la famille des *Halobacteriaceae*. Le genre *Alkalibacillus* a été proposé par Jeon et al. (2005), basé sur une reclassification de *Bacillus haloalkaliphilus* (**Fritze, 1996**). Le tableau ci-dessous, rapporte quelques propriétés de l'isolat.

Tableau 3 : Quelques caractéristique morphologiques et physiologiques de la souche halophile (Khallef, 2019)

Caractéristiques	A. <i>haloalkaliphilusC-5</i>
Morphologies	Bacille
Gram	+
Mobilité	+
Pigmentation	Beige
Na Cl intervalle (%) (p /v)	0-25
Na Cl optimale (%) (p /v)	10-15
Intervalle T°C	10-45
Température Optimal °C	37
Intervalle pH	7-9.5
pH Optimal	9.5

II.2 Revivification de la souche

Le milieu de culture Brown (Br) est utilisé pour la revivification de la souche; ce milieu répond aux exigences nutritionnelles des micro-organismes halophiles par sa concentration en NaCl, supplémenté de KCl et d'acides aminés. Ce milieu est préparé et ajusté à pH neutre (7,2) ; puis autoclavé ; sa composition est donnée en annexe 2.

La souche purifiée est incubée 48h à 37°C; un inoculum de celle-ci estensemencé par stries à la surface du milieu, qui sera remis 7 jours à l'étuve à 37°C.

II.3 Pré culture

50ml du milieu (Br) liquide à 20% de NaCl (le même milieu ayant servi à leur revivification, sans addition d'agar) sont inoculés avec le contenu d'une boîte Pétri de la culture de *l'A.haloalkaliphilus C-5*; le tout introduit dans une Erlenmeyer de 250ml. L'incubation durera 7 jours à 37°C, sous une agitation de 150 trs/min (Yang *et al.*, 1992).

La recherche des hydrolases se fera dans le surnageant de culture (SC) récupéré. L'annexe 3 regroupe toutes ces étapes

II.4 Variation de l'activité exoenzymatiques de l'halobactérie en fonction de la teneur du milieu en sel

La production d'hydrolases est recherchée qualitativement sur milieu (Br) solide modifié par réduction de la quantité d'extrait de levure à 0,3 g/L (milieu de base) par rajout de polymère test (Oren *et al.*, 1997).

5µl du surnageant de culture (SC), sont déposés en spots, à la surface des milieux supplémentés des différents polymères. Trois essais sont réalisés pour chaque substrat testé. Pour tous les tests effectués; les milieux seront incubés 7 jours.

Pour la détermination des intervalles des activités exoenzymatiques de notre souche; la préparation des milieux à différentes teneurs en NaCl; tout comme les milieux ajustés aux différents pH; ou soumis à différentes températures d'incubation, a suivi les intervalles mentionnés sur le tableau ci- dessous.

Tableau 4 : Paramètres et intervalles expérimentés

Intervalles de salinité														
NaCl%	0	5	10	12	15	20	22.5	25	27.5	30				
Intervalle de pH														
pH	5	5.5	6	6.5	7	8	9	9.5	10	10.5	11	11.5		
Intervalle des T° d'incubation														
Température °C	10	12	15	17	20	25	30	35	40	45	46	48	50	60

II.4.1.1 Détermination de l'activité protéolytique

II.4.1.1.a Hydrolyse de la caséine

Le milieu de base est supplémenté par 1% (p/v) de caséine. Après ensemencement par la méthode des spots; la présence de cette activité est détectée par un halo autour des spots indiquant une hydrolyse de la caséine (Roxana *et al.*, 2009).

II.4.1.1.b Hydrolyse de la gélatine

Les produits d'extraction sont déposés en spots sur le milieu de base supplémenté de 2% (p/v) de gélatine. Après incubation; l'hydrolyse est révélée par addition de 1 à 2ml du réactif TCA (10%) en surface afin de mieux observer les zones claires, qui indiquent la production d'une gélatinase (**Kim et Hoppe, 1986**).

II.4.1.2 Détermination de l'activité amylolytique

La présence d'une amylase extracellulaire est déterminée par addition de 1% (p/v) d'amidon soluble. Le surnageant de culture est déposé en spots à la surface du milieu. Retirées de l'étuve; les boîtes sont inondées avec une solution de Lugol. L'hydrolyse de l'amidon se manifeste par l'apparition d'une zone claire autour de spots, inversement, les zones contenant l'amidon se colorent en brun (**Amoozegaret al., 2003**).

II.4.1.3 Détermination de l'activité estérasique

Le milieu additionné de 1% de Tween 80 est préconisé pour la recherche d'estérase (**Gonzalez et al., 1978**). L'ensemencement du surnageant (SC) est effectué par la méthode des spots, le développement d'un précipité autour des spots renseigne de la présence d'une activité estérasique.

II.4.1.4 Détermination de l'activité cellulolytique

La présence d'une cellulase est examinée sur milieu contenant 1% (p/v) de Carboxyle Méthyl Cellulose (CMC). Après 7 jours d'incubation, les boîtes sont pulvérisées avec une solution de Lugol. L'apparition de zones claires autour des spots au bout de 10 à 12 minutes signifie un résultat positif.

La figure 4, résume l'ensemble des étapes entreprises pour cette recherche.

La culture sur milieux liquide de la souche C-5 pendant 7 jours sous agitation 150 trs/ min

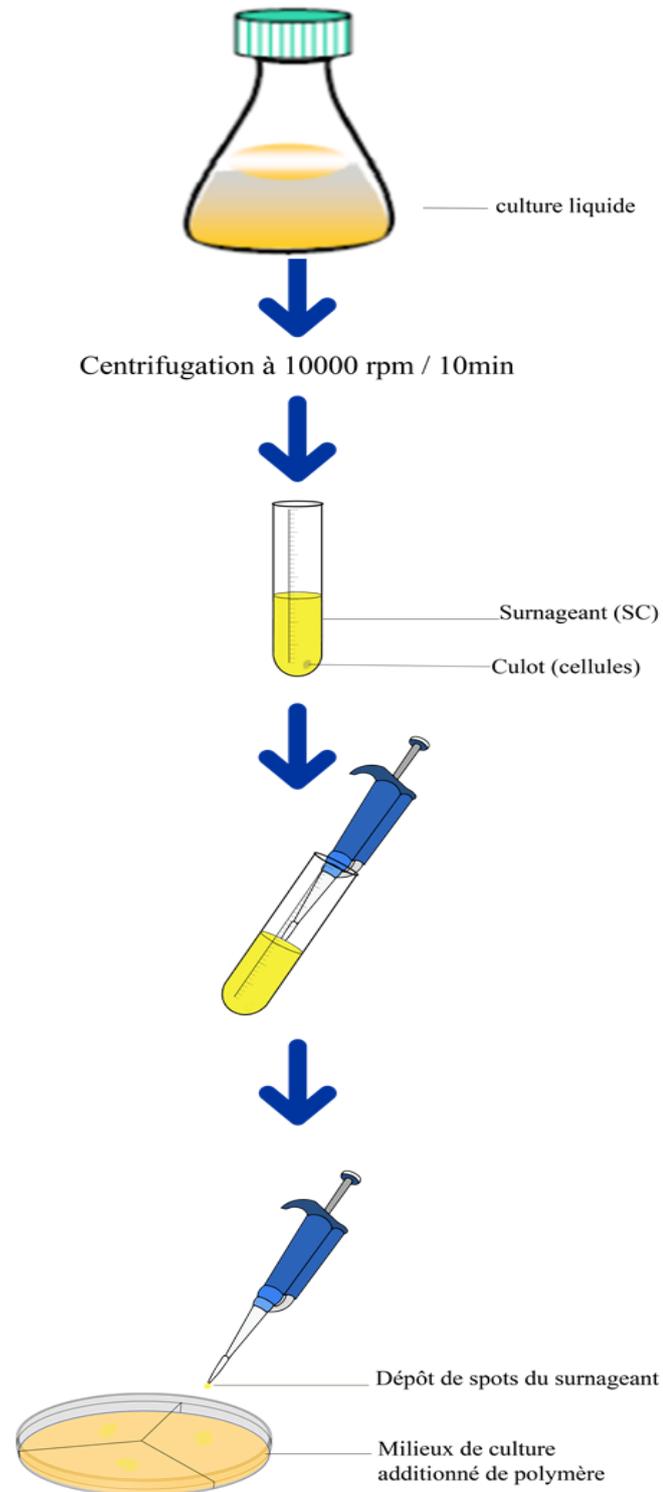


Figure 4 : Protocole de la recherche des activités exo enzymatiques

II.5 Test de sensibilité aux enzymes protéolytiques

La trypsine et la pepsine, deux enzymes protéolytiques utilisées à une concentration de 1mg/ml pour tester la résistance des exoenzymes dévoilées par la souche halophile.

La trypsine et la pepsine ont des sites de coupures différents; la première coupe la chaîne d'acides aminés au niveau d'un acide aminé basique (Lysine et arginine); et la deuxième coupe au niveau des acides aminés neutres (**Florimont ,2012**); le test a été réalisé uniquement avec la pepsine.

Préparation de l'enzyme protéolytique

La solution de pepsine est préparée à l'aide d'une solution HCl (0,02M, pH 2) dans laquelle 20 mg de l'enzyme pesée avec une balance de précision sont dissouts dans un volume de 10 ml de la solution; puis filtrée avec un filtre de 0,22 μm et conservée à +4°C (**Benkerroum et al., 2000**).

Technique

Un mélange de 1ml du surnageant de culture avec 1 ml de la solution pepsine est préparée. Les milieux (Br) additionnés des différents polymères sont préparés coulés et laisser solidifier. Deux puits sont réalisés à la surface des milieux (Br); et sont chargés avec 50ul de (SC) et (SC Pepsine) comme représenté par la figure ci-dessous.

L'incubation se prolongera plusieurs jours à 37°C. La lecture est faite par la mesure de la dimension de la zone formée autour des puits.

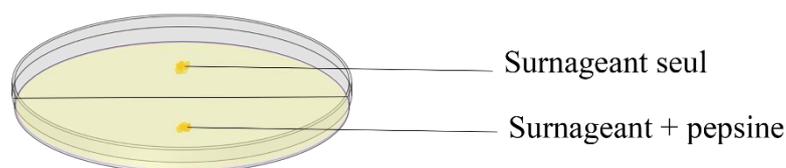


Figure 5 :Schéma du test de sensibilité à une enzyme protéolytique par la méthode de diffusion des puits

Chapitre III

Résultats et discussion

III.1 Revivification de la souche

La souche réactivée puis revivifiée sur milieu solide à 20% de NaCl; donne des colonies beiges crémeuses à contour régulier. Quant au le milieu (Br) liquide soumis à une incubation de 7 jours à 37°C sous agitation; il laisse apparaitre une coloration en beige témoignant d'une bonne croissance de l'isolat. Les figures justifiant cette croissance sont portées en annexe 3.

III.2 Résultats des variations du pouvoir lytique exoenzymatiques de l'halobactérie

III.2.1 Effet de la température sur les activités exoenzymatiques de l'halobactérie

La méthode des spots appliquée sur milieu (Br) supplémenté par différents substrats, révèle effectivement des résultats positifs, justifiés par la présence d'un halo observé à l'œil nu ou après l'ajout d'un révélateur spécifique.

La souche montre un large éventail d'activités exoenzymatiques aux intervalles de températures testées; résumés sur le tableau ci-dessous.

Tableau 5 : Influence de la température sur les activités exo enzymatiques de l'*Alkalibacillus*

Température	Caséine	Gélatine	Amidon	Tween 80	CMC
10°C	+++	---	+++	---	+++
12°C	+++	+++	+++	+++	+++
15°C	+++	+++	+++	+++	+++
20°C	+++	+++	+++	+++	+++
25°C	+++	+++	+++	+++	+++
30°C	+++	+++	+++	+++	+++
35°C	+++	+++	+++	+++	+++
40°C	+++	+++	+++	+++	+++
45°C	+++	+++	+++	+++	+++
46°C	---	---	---	---	---
48°C	---	---	---	---	---
50°C	---	---	---	---	---
60°C	---	---	---	---	---

Présence de zone de lyse: Résultat positif (+)

Absence de zone de lyse : Résultat négatif (-)

(+++): Résultat positif (trois répétitions)

(---): Résultat négatif (trois répétitions)

Le pouvoir lytique de la souche est effectivement remarqué sur les différents polymères additionnés aux milieux; cependant l'intensité de ce pouvoir lytique varie sous l'effet des températures appliquées.

III.2.1.1 Variation de l'activité caséolytique

L'activité de la caséinase est relevée entre 12°C à 45°C, avec des zones de lyses claires pigmentées en beige précisément entre 30°-40°C, intervalle optimale retenue pour cette enzyme.

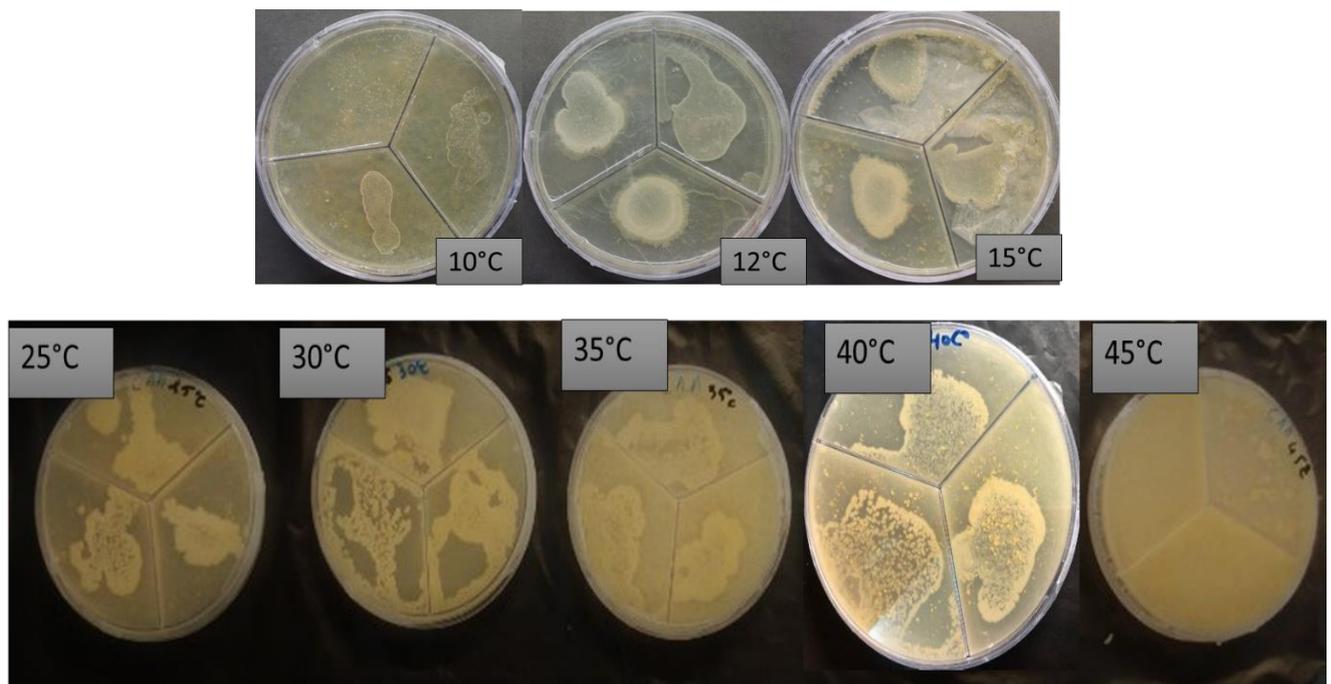
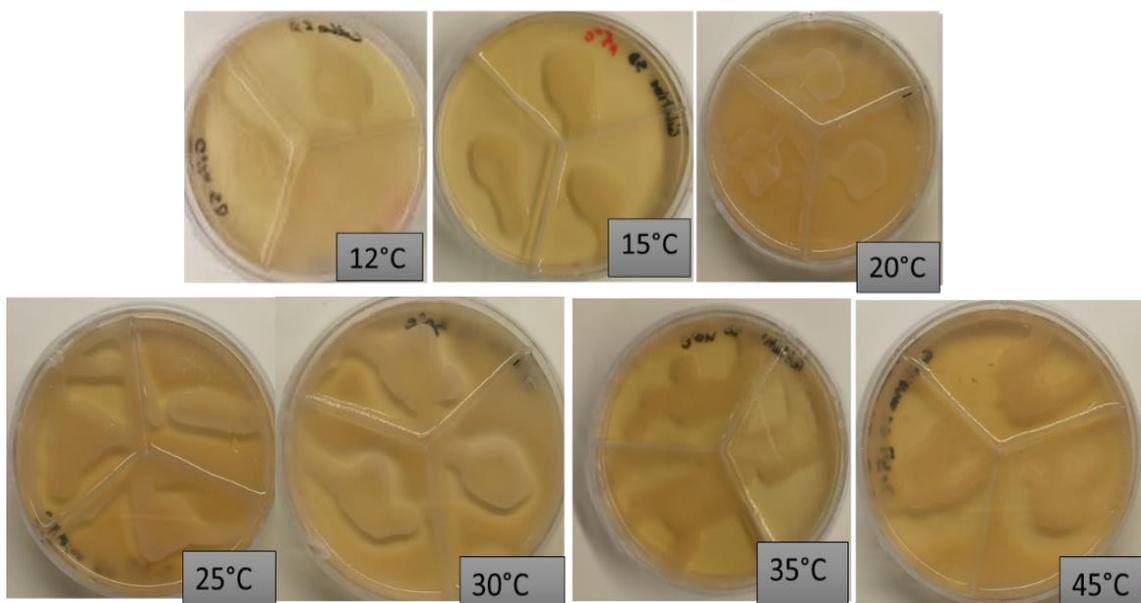


Figure 6 : Activité caséolytique observée aux différentes températures

III.2.1.2 Variation de l'activité de la gélatinase

Un début d'activité sur milieu à la gélatine s'observe en zone psychrotrophe 15°C (Fig.8) et s'étend jusqu'à 45°C température maximale; ceci reflète une tolérance de l'exo enzyme aux températures modérément élevées.



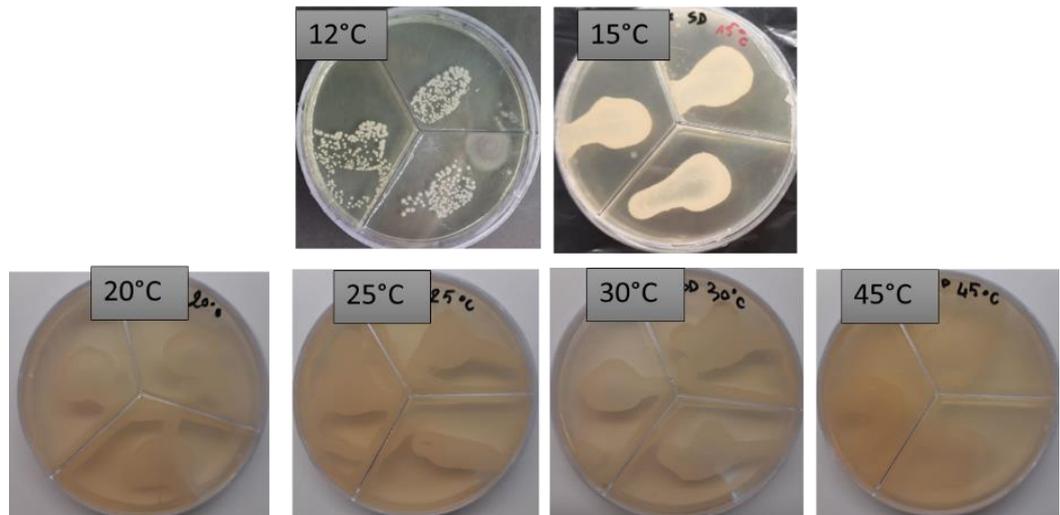


Figure 7: Activité de la gélatinase observée aux différentes températures
(avant et après addition de TCA).

III.2.1.3 Variation de l'activité amylolytique

Incubé au froid positif (10°C); une activité de l'amylase est perçue sur milieu à l'amidon. Cette activité s'intensifie entre 25°C à 40°C et se dissipe au-delà de 45°C (Fig.9)

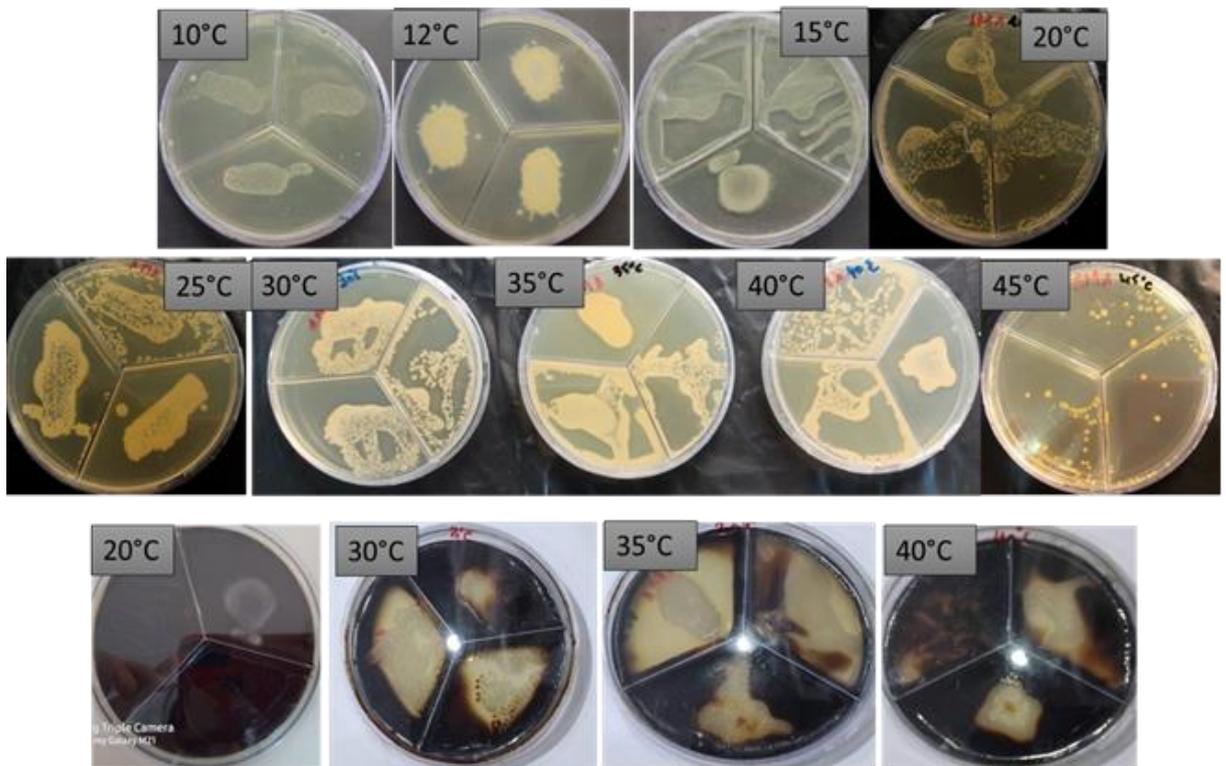


Figure 8: Activité amylolytique observée aux différentes températures
(avant et après addition du lugol)

III.2.1.4 Variation de l'activité estérasique

Tout comme pour la caséinase; la gélatinase et l'amylase; l'estérase s'active en zone de psychrotrophie (12°C); optimale entre 25-40°C (Fig.10); et perd progressivement de son pouvoir lytique au environ de 45°C seuil maximale, le même retenu pour l'ensemble des hydrolases de cette halobactérie.

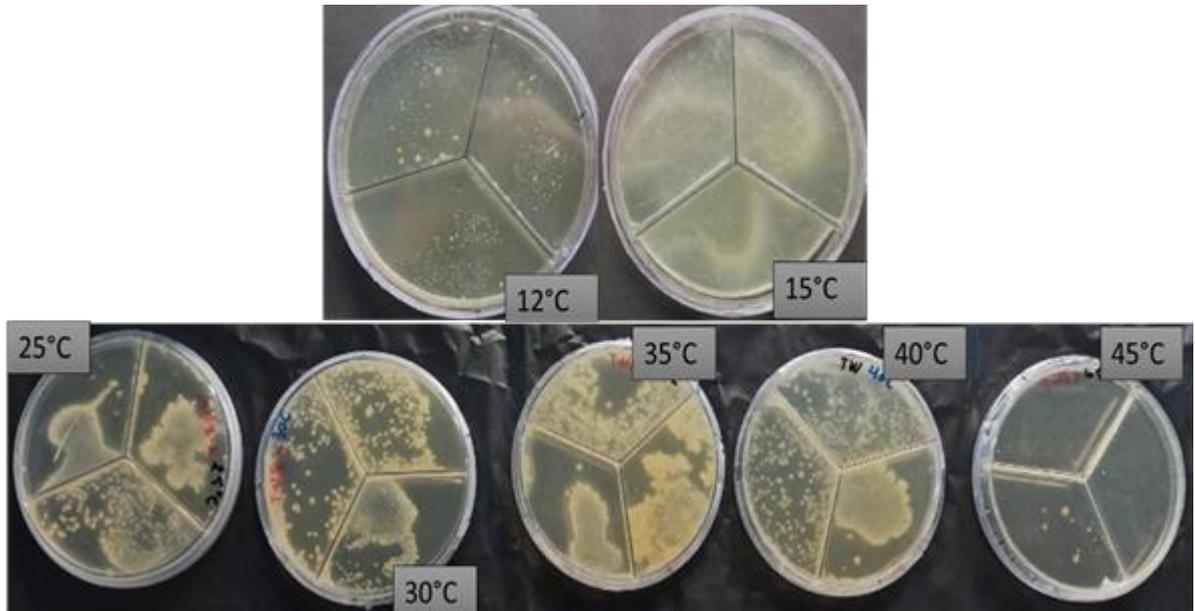


Figure 9 : Activité estérasique observée aux différentes températures

III.2.1.5 Variation de l'activité cellulolytique

L'intervalle (10-40°C) semble le plus propice pour que la cellulase exerce son pouvoir lytique; avec un optimum entre (25-40°C).

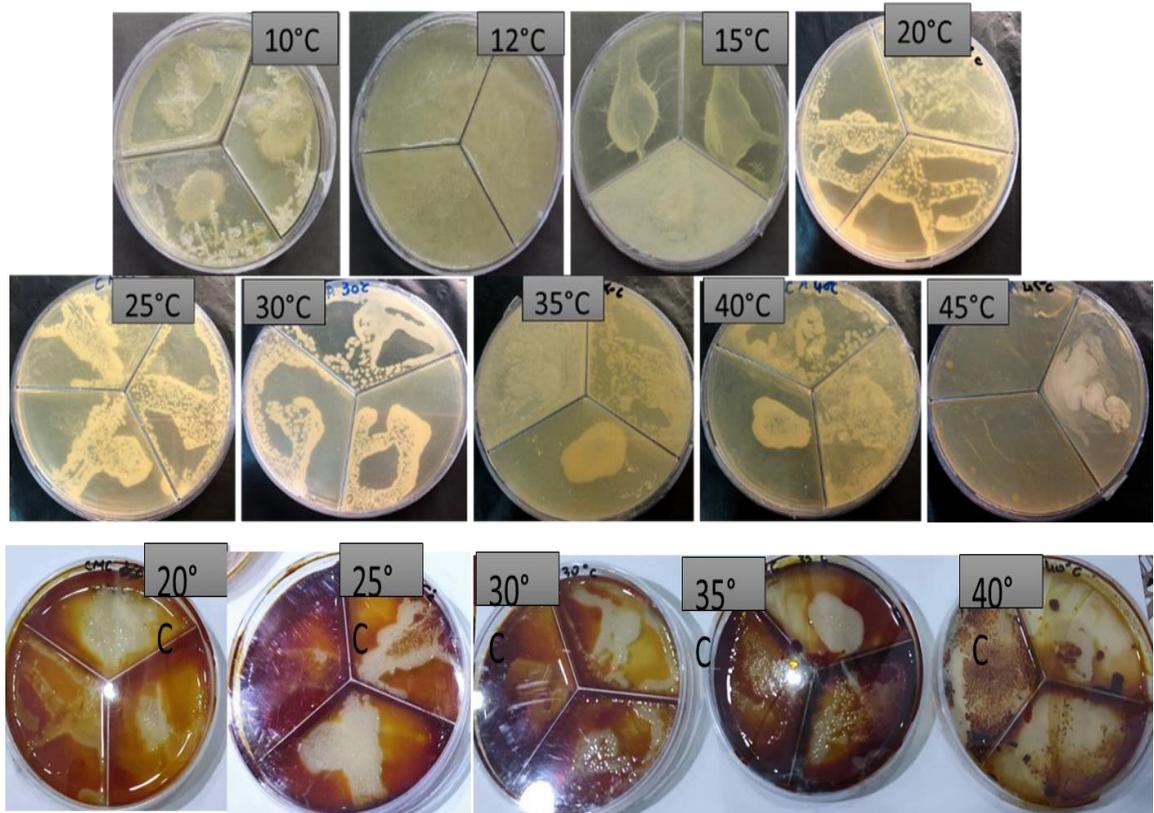


Figure 10:Activité cellulolytique observée aux différentes températures
(Avant et après addition du Lugol)

III.2.2 Variation des activités exoenzymatiques de l'halobactérie en fonction de la teneur du milieu en sel

Les résultats portés sur le tableau 6; soulignent la capacité de la souche halotolérante extrême à s'adapter aux conditions variables du milieu; capacité due à la particularité de ses hydrolases actives en absence tout comme en présence de concentrations de plus en plus croissantes en sel (0-30%NaCl).

Tableau 6: Influence de la salinité sur les activités exoenzymatiques de *l'Alkalibacillus*

Salinité %	Caséine	Gélatine	Amidon	Tween80	CMC
0	+++	+++	+++	+++	+++
5	+++	+++	+++	+++	+++
10	+++	+++	+++	+++	+++
12	+++	+++	+++	+++	+++
15	+++	+++	+++	+++	+++
20	+++	+++	+++	+++	+++
22.5	+++	+++	+++	+++	+++
25	+++	+++	+++	+++	+++
27.5	+++	- - -	+++	- - -	+ - -
30	+++	- - -	+ + +	- - -	- - -

Présence de zone de lyse: Résultat positif (+)

Absence de zone de lyse : Résultat négatif (-)

(+++): Résultat positif (trois répétitions)

(---): Résultat négatif (trois répétitions)

III.2.2.1 Variation de l'activité caséolytique

Enzyme clé dans l'activité lytique des bactéries; la caséinase de l'*A.haloalkaliphilus* n'est nullement affectée par l'absence de sel et montre un pouvoir dégradant sur un large intervalle (0-30%) de NaCl (Fig.12).

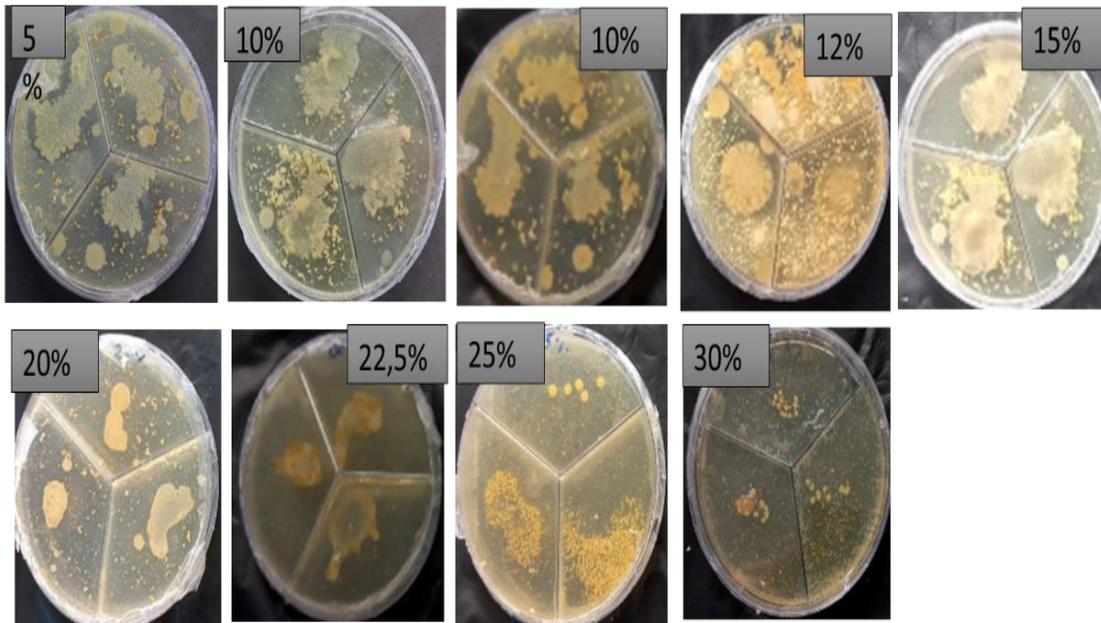


Figure 11: Activité caséolytique observée aux différentes concentrations de sel

III.2.2.2 Variation de l'activité de la gélatinase

Dotée d'une activité remarquable; la gélatinase se manifeste sur des milieux dépourvus de sel et persiste sur milieux à 30% avec un optimum entre 10-20% de NaCl.

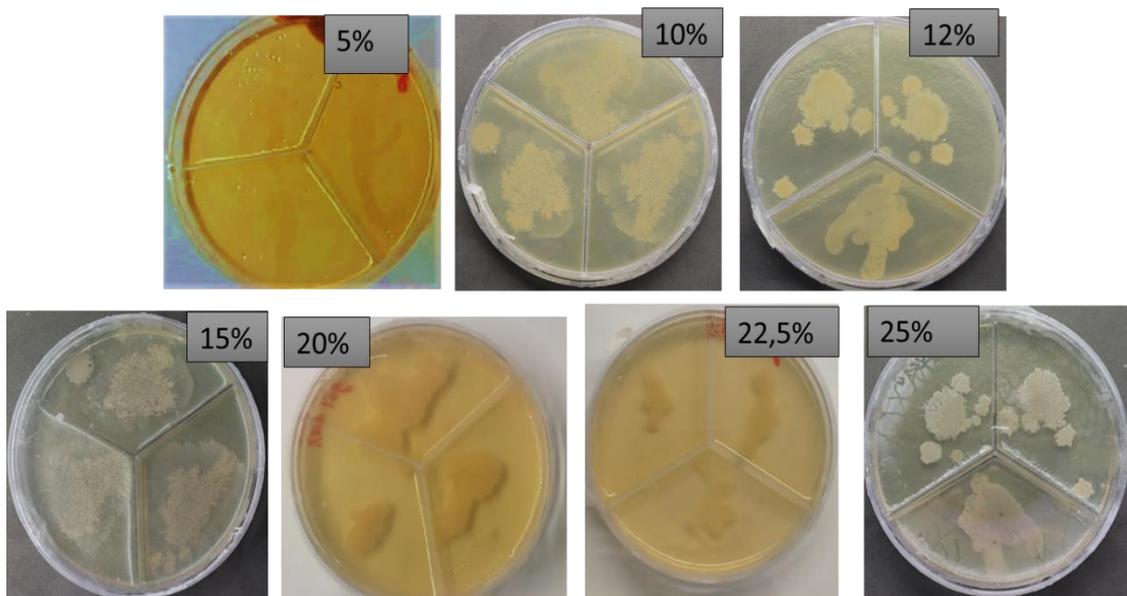


Figure 12: Activité de la gélatinase aux différentes concentrations de sel

III.2.2.3 Variation de l'activité amylolytique

L'amylase dresse le même profil que les exoenzymes précédemment citées ; son pouvoir lytique va de 0-27.5 0% de NaCl; ce qui est exceptionnel (Fig.14). L'addition du révélateur laisse apparaître les zones de lyse de l'amidon clair (autour des spots); comparés au reste du milieu contenant l'amidon; qui reste sombre.

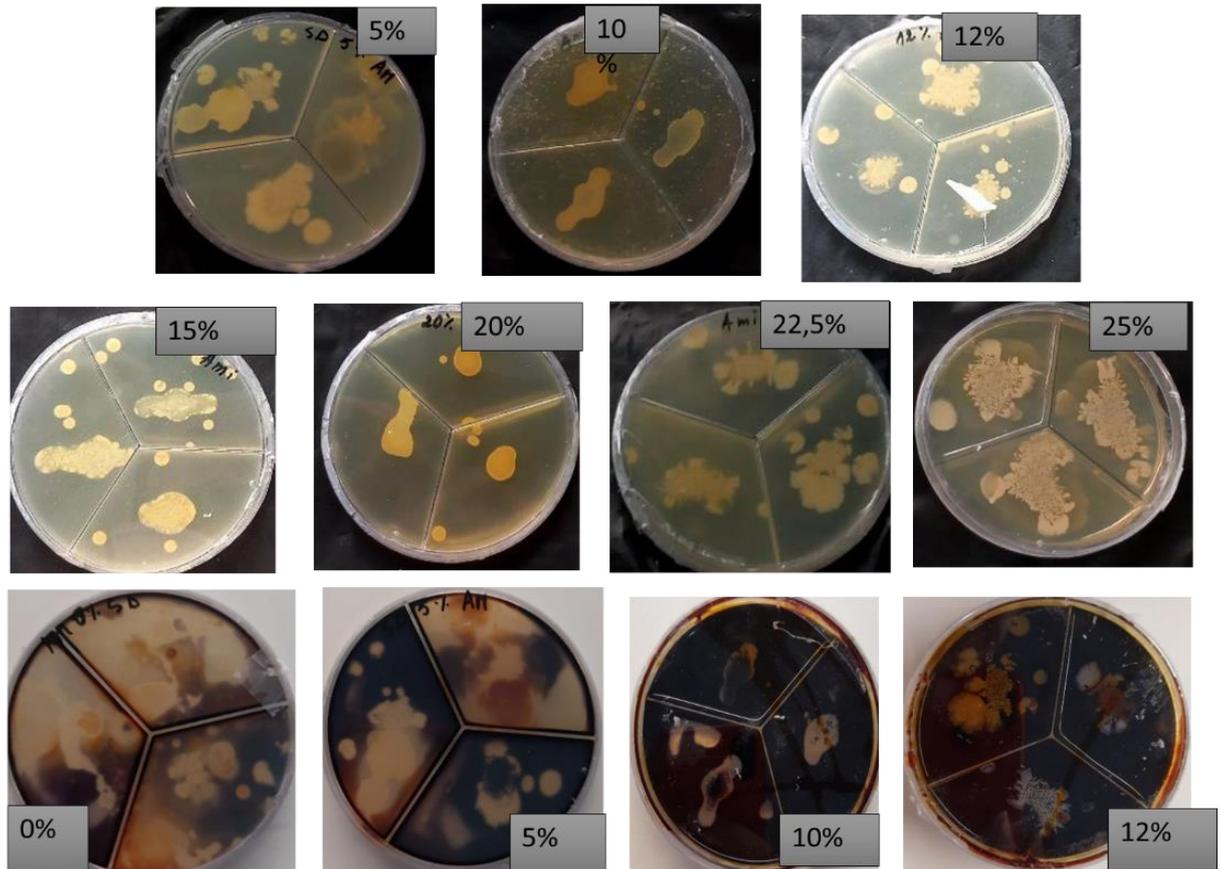


Figure 13: Activité amylolytique aux différentes concentrations de sel

III.2.2.4 Variation de l'activité estérasique

A l'instar de la caséinase; l'estérase reste active au dépit des variations importantes de sel sur milieu; notant une limite maximale à 27% de NaCl.

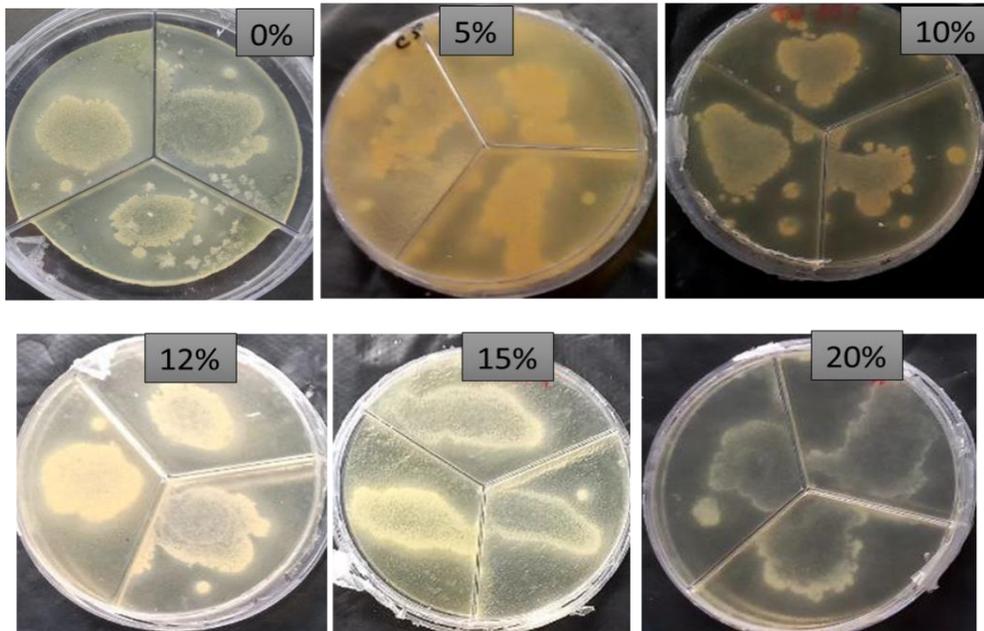
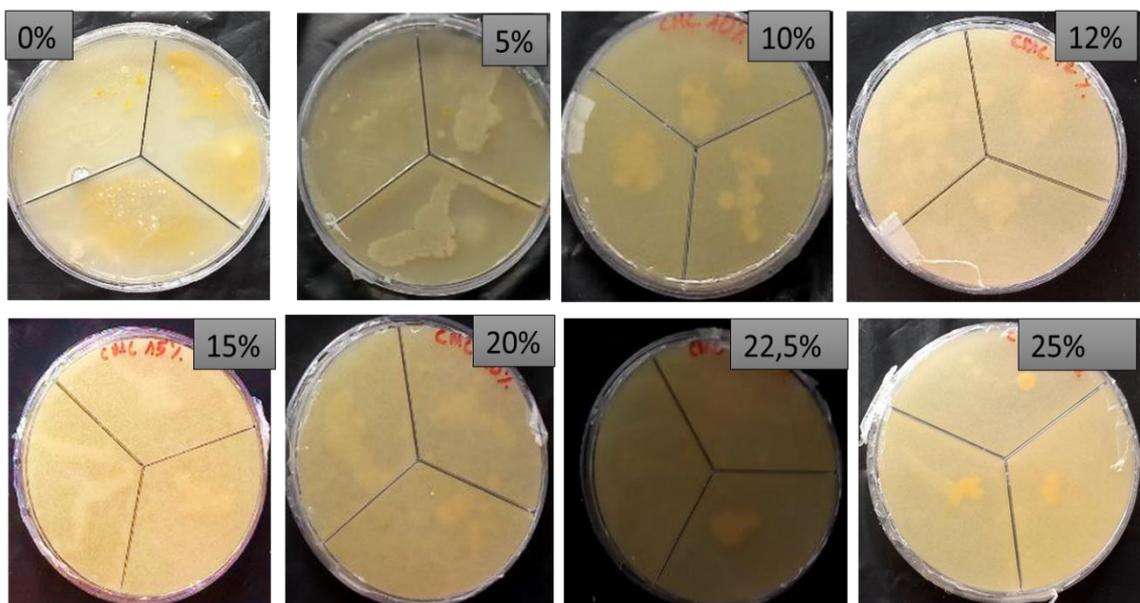


Figure 14: Activité estérasique observée aux différentes concentrations de sel

III.2.2.5 Variation de l'activité cellulolytique

La cellulase agit dans le même intervalle salin que l'amylase (0-27.5%) de NaCl; son activité maximale observée sur milieux de 10-20% de NaCl.



Après adition du révélateur

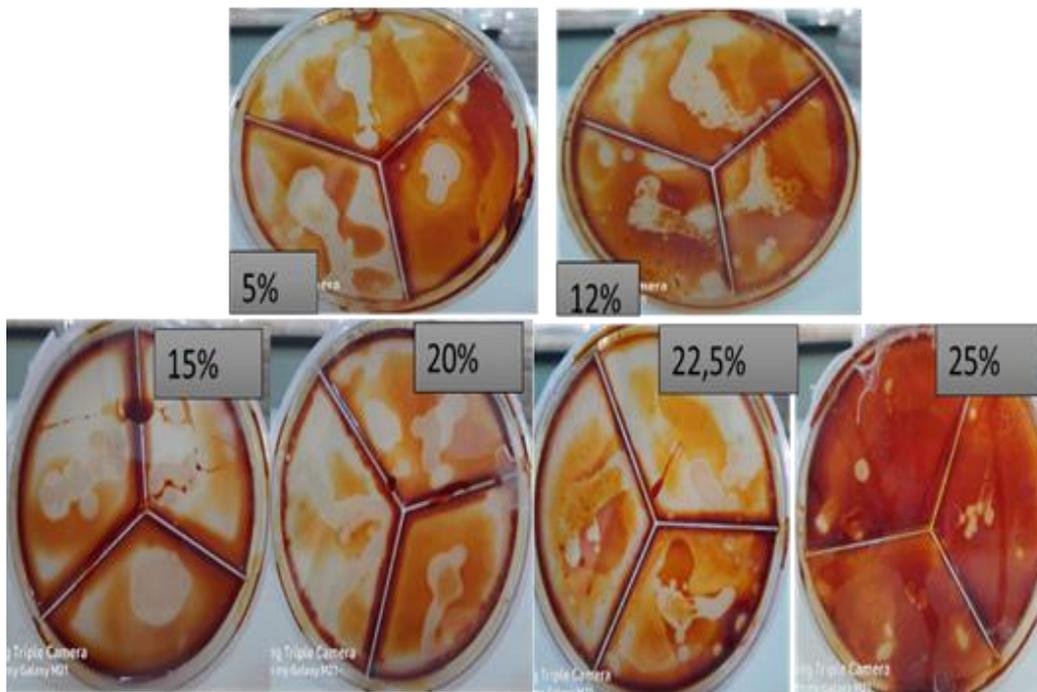


Figure 15 : Activité cellulolytique observée aux différentes concentrations de sel

III.2.3 Variation des activités exoenzymatiques de l'halobactérie en fonction du pH

Un des facteurs influents et limitant dans le déroulement des réactions enzymatiques est le pH. La détermination de l'intervalle pH sur milieu solide a présenté quelques inconvénients; néanmoins les résultats obtenus; l'ensemble des activités lytiques ne s'observe pas au pH inférieur à 5; et poursuivent sur milieux jusqu'aux pH alcalins.

Tableau 7: Effet du pH sur des activités exoenzymatiques de *l'Alkalibacillus*

PH	Caséine	Gélatine	Amidon	Tween 80	CMC
5	+++	+++	+++	+++	+++
5.5	+++	+++	+++	+++	+++
6	+++	+++	+++	+++	+++
6.5	+++	+++	+++	+++	+++
9.5	+++	- - -	+++	- - -	- - -
10	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -
10.5	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -
11	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -
11.5	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -
12	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -

Présence de zone de lyse: Résultat positif (+)

Absence de zone de lyse : Résultat négatif (-)

(+++): Résultat positif (trois répétitions)

(---): Résultat négatif (trois répétitions)

Les pH 7-8.5 adoptés lors des préparations des milieux pour revivification de la souche; pour une culture optimale.

III.2.3.1 Variation de l'activité caséolytique

Observée dans une plage de pH 5- 9.5; la caséolyse ne s'observe plus sur milieux aux pH plus élevés.

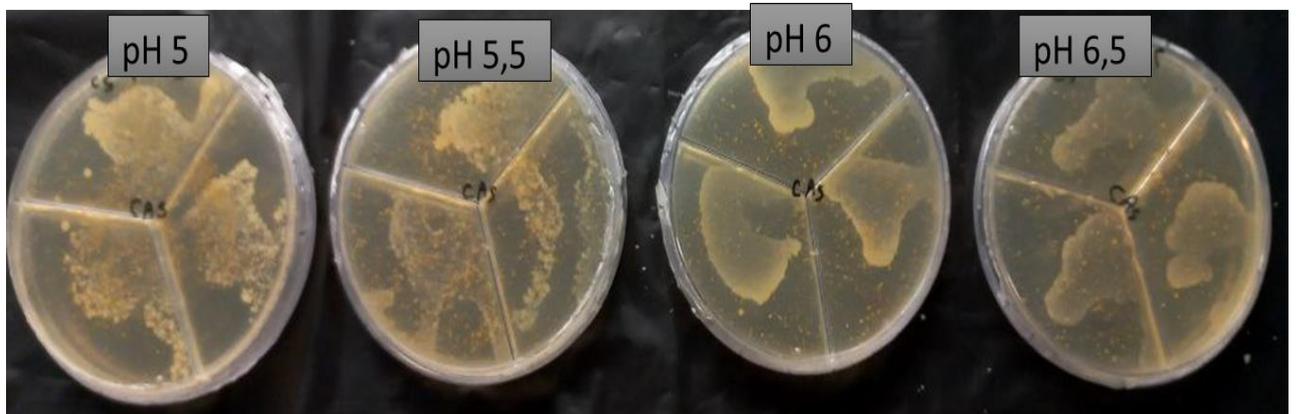


Figure 16: Activité caséolytique observée aux différents pH

III.2.3.2 Variation de l'activité de la gélatinase

La figure ci-dessus; montre une activité de la gélatinase dans un intervalle très réduit pH 5-6.5. A noter que cette activité a bien été observée au cours des tests température et salinité, sur milieux à pH 7.5-8.

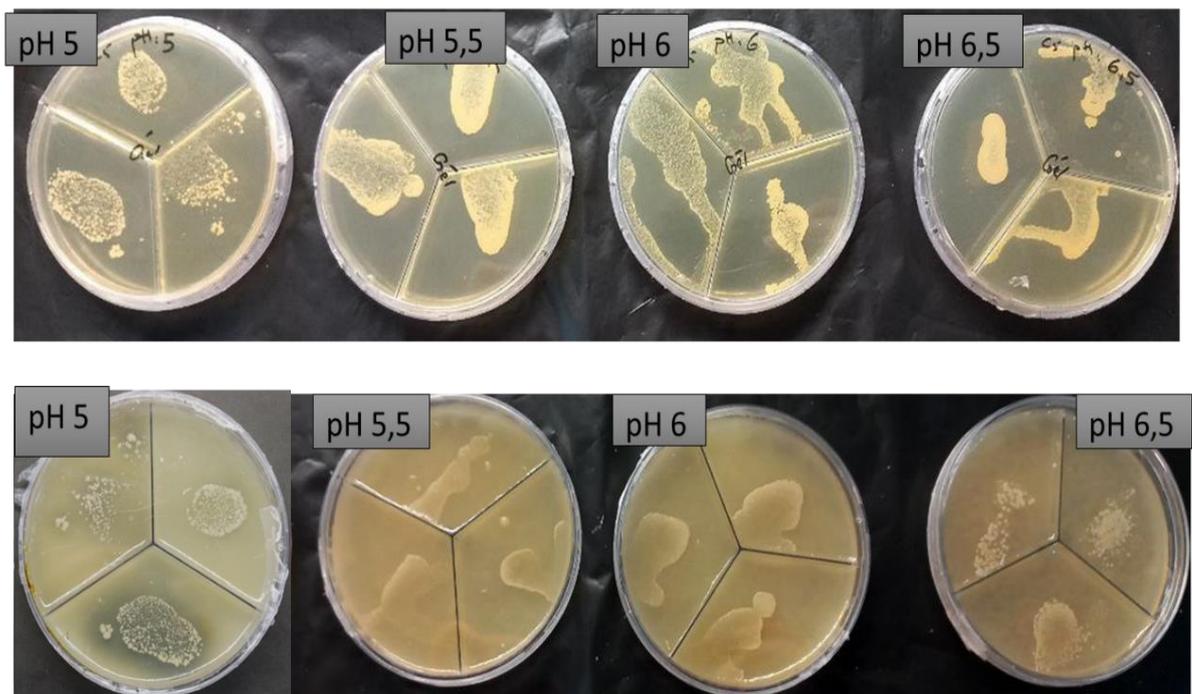


Figure 17: Activité de la gélatine observée aux différents pH

(avant et apres adistion de TCA)

III.2.3.3 Variation de l'activité amylolytique

Une dégradation de l'amidon se déroule sur une plage de pH de 5 à 9.5, plus large comparé aux autres activités exoenzymatiques; ce qui confère à la souche des possibilités d'adaptation aux variations des milieux.

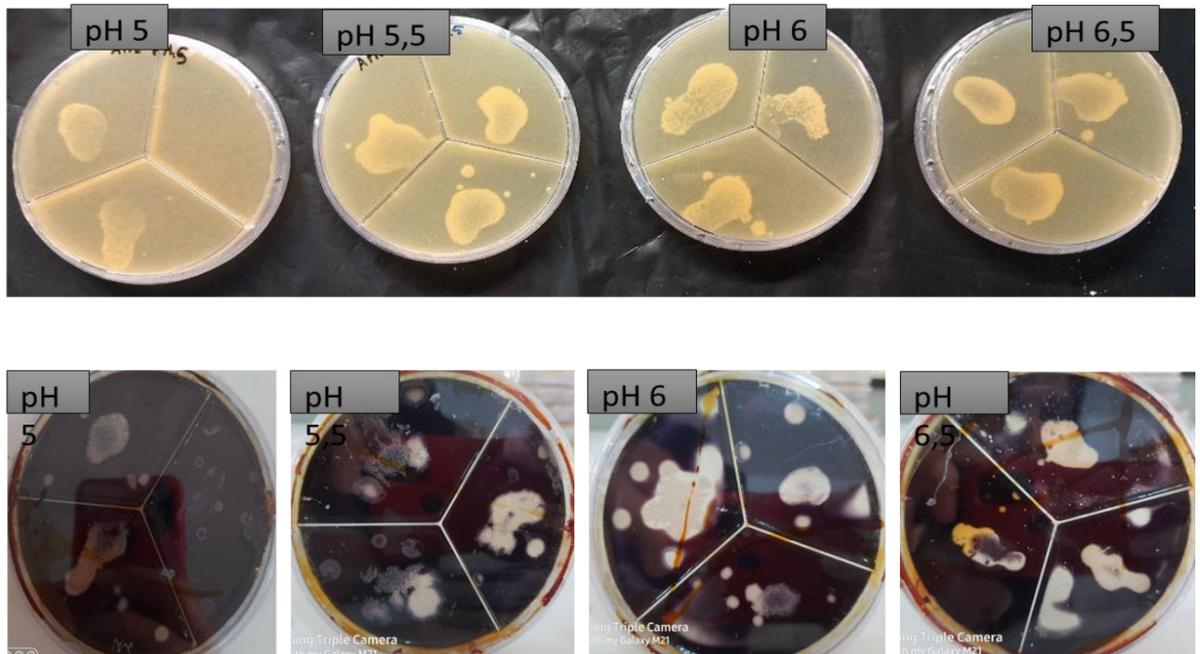


Figure 18 : Activité amylolytique observée aux différents pH

(avant et après adistion de Lugol)

III.2.3.4 Variation de l'activité estérasique

La capacité de l'halobactérie à hydrolyser le Tween 80 s'observe sur un intervalle de pH restreint (5-7.5)

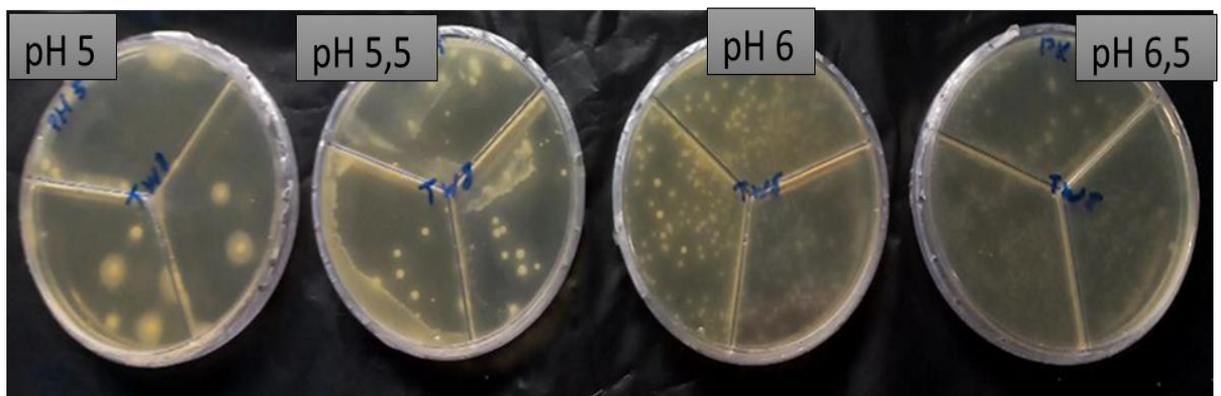


Figure 19: Activité estérasique observée aux différents pH

III.2.3.5 Variation de l'activité cellulolytique

La cellulase semble s'aligner aux profils des exoenzymes déjà évoquées; avec un seuil minimal à pH 5.

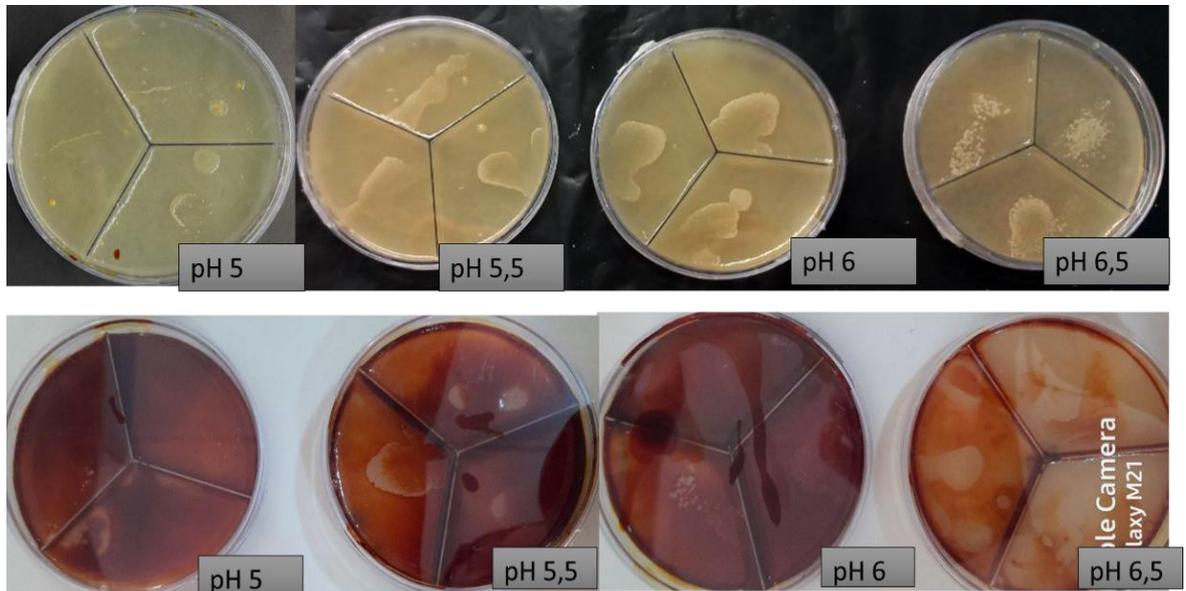
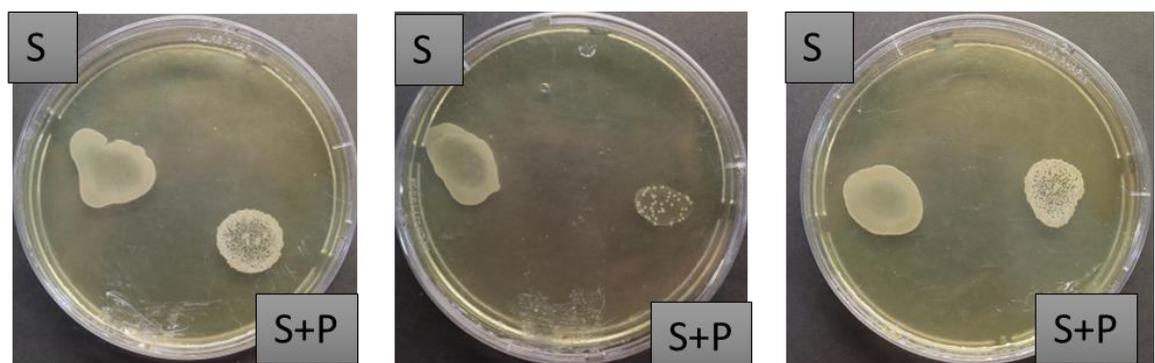


Figure 20: Activité cellulolytique observée aux différents pH

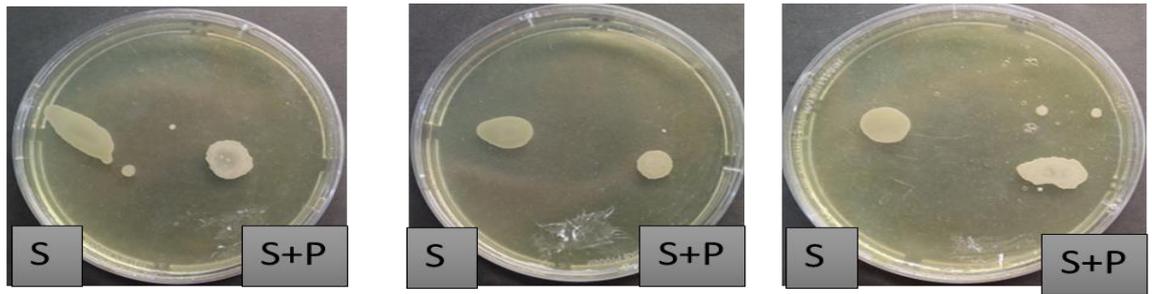
(avant et après adistion de Lugol)

III.2.4 Résultats du test de sensibilité a une enzyme protéolytique

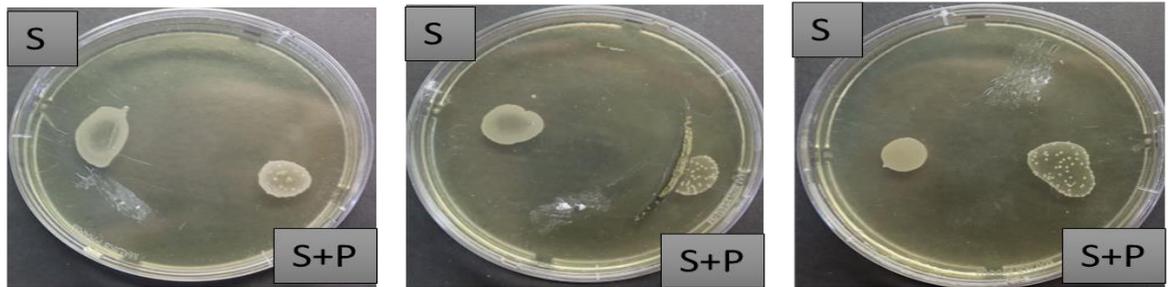
La présence d'une zone de lyse autour des spots (SC+Pepsine) sur l'ensemble des milieux supplémentés des différents polymères (Fig.22) Signifie la persistance de l'activité lytique de chacune de ces exoenzymes; (intensité réduite sur milieu à la caséine). Ceci peut être expliqué par le fait que la pepsine n'est pas placée dans son milieu réactionnel; vu la teneur des milieux en sel nécessaire pour l'activité des holoenzymes.



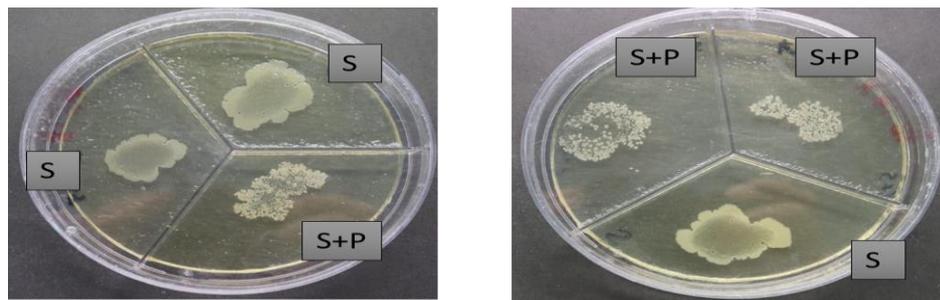
a. Milieu à la caséine



b. Milieu à la gélatine



c. Milieu à l'amidon



d. Milieu au Tween 80



e. Milieu à la CMC

Figure 21 : Résultats du test de sensibilité à une enzyme protéolytique

III.2.5 Discussion

L'étude menée sur la souche extrême halotolérante; *l'Alkalibacillus haloalkaliphilus* C-5; avait pour objectif la détermination des intervalles conditionnant ses activités hydrolytiques, en termes de température, de pH et de salinité.

Pour rappel ; toutes les espèces de Bacillus sporulent, un caractère obligatoire qui leur permet de survivre et de résister à différents stress environnementaux tels que la chaleur, la dessiccation, les UV et les radiations, la digestion enzymatique ou encore les produits chimiques (Nicholson, 2002). Les espèces de ce genre sont les plus dominantes pour la production d'enzyme ; comme les protéases intra et extracellulaires, qui sont l'une des classes d'enzymes les plus intensivement étudiées (Gupta et al., 2002).

Nous nous intéressons ici au profil exoenzymatiques de *l'A.haloalkaliphilus* C-5; dotée d'un pouvoir dégradant allant contre la caséine, la gélatine, la cellulose, l'amidon et le tween 80.

En termes d'intervalle d'activité de ses hydrolases; nos résultats rapportent une caséinase dont les plages de températures vont de 12°C-45°C. Cette activité est présente en dépit des variations importantes de taux de salinité allant de 0% jusqu'à 30%; ce qui est absolument remarquable avec un optimum 15-20%. Cette caséolyse est perçue sur une large gamme de pH (5- 9.5).

La gélatinase affiche le même profil salin (0% à 30%) de NaCl; l'optimum perçu entre 10-20%); sur un intervalle de température de 12°C à 45°C et pH (5-7.5).

Opérationnelle entre 0 et 27.5% de NaCl; l'amylase marque un optimum (15-22.5%). La gamme de température permettant cette activité est pratiquement celle retenue pour les autres hydrolases (10 et 45°C) ; sur un intervalle de pH allant de 5 à 9.5.

La cellulase dresse le même profil salin que l'amylase; avec un optimum de 10-20 % de NaCl; et une plage de température entre 15°C et 45°C; un pH 5- 6.5 relevé dans nos conditions opératoires.

Une estérase active entre 12 et 45°C. Son intervalle salin rejoint celui de la cellulase et de l'amylase (0-27.5% NaCl). La dégradation du tween 80 est visible à pH 5-6.5 elle notons que ces hydrolases marquent leur maximum d'activités entre 20°C et 40°C.

Il en ressort que ce potentiel enzymatique diversifié; suit le profil halotolérant extrême de la bactérie qui cultive entre 0 et au-delà de 20% de NaCl; tel que définie par Tiquila et al. (2006). Cette activité lytique s'étend de la psychrotrophie à une légère thermophile (45°C T°

maximale pour l'ensemble des exoenzymes). Quant aux intervalles de pH; la méthodologie appliquée (sur milieu solide) a montré des limites.

On se référant aux données bibliographiques; on trouve que les enzymes des bactéries halotolérantes et halophiles sont souvent stables et restent actives sur un large intervalle de pH, aux fortes salinités (jusqu'à 30% p/v) et à des températures au-dessus de 50°C (**Prakash et al., 2009 in Khallef et al., 2019**).

Certaines études ont rapporté la diversité du bagage exoenzymatiques chez des halobactéries. En effet; les souches isolées au niveau du bassin de saumure de Sfax-Tunisie ; étaient productrices d'hydrolases. 60% des isolats produisaient des phosphatases, 15% des protéases, 12,5% des amylases et d'ADNases de manière égale. 20% des isolats manifestaient deux activités hydrolytiques, alors que 5% des souches étaient capables de produire trois activités hydrolytiques (**Baati et al., 2010; in Khallef et al., 2019**).

Nos résultats s'accordent en partie avec les résultats avancés par d'autres travaux. Ainsi, le *Bacillus luteus* H11, isolé à partir d'une chaux sodée alcaline; libérait une protéase remarquablement stable en présence de 29% de NaCl. La protéase était active dans une large gamme de valeurs de pH (5-13) et de températures (30-60°C), avec un pH optimal de 10,5 et une température de 45 °C (**Kalwasińska et al., 2018**).

En 2016; Thebti *et al.* décrivaient une bactérie *Geobacillus toebii* LBT 77; produisant une protéase dont le pH, la température et le NaCl optimaux étaient de 13, 95 °C et 30 % de NaCl, respectivement.

De même; *Virgibacillus halodenitrificans* RSK CAS1; une bactérie associée à l'ascidie marine, montre une activité protéasique optimale à 50°C, à pH 9 et à 25 % de NaCl (**Sathishkumar et al., 2015**).

Quant aux amylases ; les travaux de recherche menées en 2012 en Chine, on aboutit à l'isolement de la souche halophile *Salimicrobium halophilum* LY20, reconnue pour son activité amyliasique optimale à 70 °C, à pH 10,0 et à 10 % de NaCl (**LI, Xin et al., 2012**).

Une α -amylase très stable sur les plages de température de (30 à 90 °C), de pH (6,0 à 12,0) et de concentration de NaCl (0 à 20 %); a été caractérisée; libérée par la bactérie halophile *Thalassobacillus sp.* LY18; isolée en Chine (**LI, Xin et al., 2012a**).

De même; la souche isolée d'un lac salé en Iran, et identifié comme *Halorubrum xinjiangense*, s'avère pourvue d'une amylase thermostable haloalcaliphile extracellulaire active à 23% de NaCl, à 70°C et à pH 8,5 (**Moshfegh et al., 2013**).

Les exemples se succèdent avec une cellulase halo alcaline extracellulaire thermostable libérée par *Bacillus halodurans* CAS 1. La température optimale, le pH et le NaCl pour l'activité enzymatique ont été déterminé à 60 °C, 9,0 et 30 %. Cette hydrolase conserverait 80 % de son activité à 80 °C, 12 et 35 % respectivement (**Annamalai et al., 2013**).

Isolée d'un échantillon de sol *Bacillus vallismortis* RG-07, est une bactérie productrice de cellulase; dont la température et le pH optimaux pour l'activité enzymatique ont été déterminés à 65 °C et 7,0 (**LI, Xin et al., 2012b**).

Un autre exemple de cellulase décrite chez *Bacillus licheniformis*, très active et stable sur de larges températures (37 °C à 100 °C), pH (3 à 11) et concentration de NaCl (1 à 7 %) avec un optimum à 80 °C, pH 7.0 et 7 % NaCl (**Aygan et al., 2008**).

Toutes ces études viennent confirmer l'importance et les particularités des hydrolases des halobactéries.

Conclusion et perspectives

Conclusion et perspectives

L'étude menée sur la souche halotolérante extrême, *A. haloalkaliphilus* C-5; visant à déterminer son potentiel exoenzymes a débuté en 2019.

En reconduisant cette étude, notre objectif était de voir l'effet de trois principaux facteurs: température; pH et salinité; sur les activités lytiques exoenzymatiques de cette souche; dont les capacités à dégrader l'amidon, la gélatine, la caséine, la CMC et tween 80; ont bien été mises en évidence.

Nos résultats s'alignent aux données bibliographiques qui soulignent que les exoenzymes des d'halobactéries ont une stabilité thermique et demeurent actives sur un large intervalle de salinité et parfois de pH.

L'exceptionnelle faculté de cette espèce d'*Alkalibacillus* à proliférer sur milieux chargés en sel ou encore totalement dépourvus de sel, est alloué à ses hydrolases qui demeurent actives aussi bien à 0% qu'à 27.5% de NaCl; avec une protéase fonctionnelle à 30% de NaCl; teneurs en sel qui frôlent la saturation.

Ces exoenzymes restent actives sur une plage de température de 10°C à 45°C; avec un optimum entre 20-40°C. Cet arsenal exoenzymatiques varié est très prisé pour diverses applications de la biotechnologie.

Vu la spécificité physiologique et métabolique de cette halobactérie, certains tests n'étaient pas très pertinents; telle que la détermination des pH en milieu solide ou encore le test de digestion enzymatique; qui sont à reconduire suivant des approches plus appropriées. Cette spécificité est à prendre en considération également pour la prolongation des délais d'incubation, lors de l'application des divers protocoles.

En raison de l'indisponibilité de moyens et de techniques de pointe, certaines manipulations ont été entravées et restent en perspectives; telles que la purification et la caractérisation de ces hydrolysats.

*Références
bibliographiques*

Références bibliographiques

- Abe, J., Bergman, F. W., Obata, K., and Hikuri, S. (1988). Production of Raw Starch Digesting Amylase by *Aspergillus k-27*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 27: 447-450.
- Amoozegar, M. A., Malekzadeh, F., & Malik, K. A. (2003). Production of amylase by newly isolated moderate halophile, *Halobacillus* sp. strain MA-2. *Journal of microbiological methods*, 52(3), 353-359.
- Annamalai, N., Rajeswari, M. V., Elayaraja, S., & Balasubramanian, T. (2013). Thermostable, haloalkaline cellulase from *Bacillus halodurans* CAS 1 by conversion of lignocellulosic wastes. *Carbohydrate polymers*, 94(1), 409-415.
- Awais M., Aamer A. S., Abdul H. and Fariha H. (2007). Isolation, identification and optimization of bacitracin produced by *bacillus* sp. *Pak. J. Bot.*, 39(4): 1303-1312.
- Benkerroum, N., Oubel, H., Zahar, M., Dlia, S. & Filali-Maltouf, A. (2000). Isolation of a bacteriocin-producing *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* and application to control *Listeria monocytogenes* in Moroccan jben. *Journal of Applied Microbiology*, 89, 960-968
- Berkeley C. W & Goodfellowm. (1981). *The Aerobic Endospore-forming Bacteria: Classification and Identification*. London & New York: Academic Press.
- Brahmachari, G, Demain, AL. and Adrio, JL. (2017). *Biotechnology of Microbial Enzymes : Production, Biocatalysis and Industrial Applications*. Academic Press. 632 pages.
- Brandelli, A., Daroit, D. J., and Riffel, A. (2010). Biochemical features of microbial keratinases and their production and applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 85, 1735–1750.
- Bron, S., Meima, R., van Dijn, J. M., Wipat, A., & Harwood, C. R. (1999). Molecular biology and genetics of *Bacillus* species. In *The manual of industrial microbiology and biotechnology* (pp. 392-416). ASM Press.
- Chan, Y.-K. *et al.* (2009). Identification of lipopeptide antibiotics of a *Bacillus subtilis* isolate and their control of *Fusarium graminearum* diseases in maize and wheat. *BioControl* 54, 567

Références bibliographiques

- Chiplonkar, J. M., Gangodkar, S. V., Wagh, U. V., Ghadge, G. D., Rele, M. V., & Srinivasan, M. C. (1985). Applications of alkaline protease from *Conidiobolus* in animal cell culture. *Biotechnology letters*, 7(9), 665-668.
- Copeland, R. A. (2004). *Enzymes: a practical introduction to structure, mechanism, and data analysis*, John Wiley & Sons
- Dahl M. K. (1999). *Bacillus*. In: Encyclopedia of Food Microbiology. Eds. Robison E. K, Batt C. A. and Patel P. D. Volume 1. *Academic Press*. UK. 113-158.
- Das, S. N. et al. (2010). Plant Growth-Promoting Chitinolytic *Paenibacillus elgii* Responds Positively to Tobacco Root Exudates. *J Plant Growth Regul* 29, 409–418
- Ludwig, W., Schleifer, K. H., & Whitman, W. B. (2009). Revised road map to the phylum Firmicutes. *Bergey's manual of systematic bacteriology*, 2(3), 1-8.
- Logan, N. A., & De Vos, P. (2009). Genus *Bacillus* in: *Bergeys manual of systematic bacteriology*, vol. 3.
- Ejaz, U., Sohail, M., & Ghanemi, A. (2021). Cellulases: from bioactivity to a variety of industrial applications. *Biomimetics*, 6(3), 44.
- Fahmy f, Flossdorj f, & Claus d. (1985). The DNA base composition of type strains of the genus *Bacillus*. *Systematic and Applied Microbiology* 6, 60- 65
- Falconnier, B., Lapierre, C., Lesage-Meessen, L., Yonnet, G., Brunerie, P., Colonna-Ceccaldi, B., ... & Asther, M. (1994). Vanillin as a product of ferulic acid biotransformation by the white-rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus* I-937: Identification of metabolic pathways. *Journal of biotechnology*, 37(2), 123-132.
- Fraatz, MA, Rühl, M. and Zorn, H. (2014). Food and Feed Enzymes. In: *Biotechnology of Food and Feed Additives*, 229-256. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg.
- Garcia, O., Torres, A. L., Colom, J. F., Pastor, F. I. J., Diaz, P., & Vidal, T. (2002). Effect of cellulase-assisted refining on the properties of dried and never-dried eucalyptus pulp. *Cellulose*, 9(2), 115-125.
- Garrity M, Bell J, Lilburn T. (2004). *Bergey's Manual of systematic Bacteriology*. Ed Doi. pp 172- 178.
- Gasson M.J. et al. (1998) Metabolism of ferulic acid to vanillin. *J. Biol. Chem.* 273, 4163–4170.

Références bibliographiques

- Goldman et Green, (2009) In Boukhalifa. F; Ouargla S & Yous M. (2017). Optimisation par la méthodologie de surface de réponse de l'activité enzymatique à partir des épiluchures de pomme de terre. Mémoire de Fin de Cycle En vue de l'obtention du diplôme Master
- Gonzalez C., Gutierrez C., Ramirez C. (1978). Halobacterium vallismortis sp. nov. An amylolytic and carbohydrate-metabolizing, extremely halophilic bacterium. *Can J Microbiol* 24: 710–715.
- Gupta, R., Beg, Q.K., Lorenz, P., (2002). Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 59, 15–32
- Hamer, R. J. (1995). Enzymes in the baking industry. In *Enzymes in food processing* (pp. 190-222). Springer, Boston, MA.
- Jeon, Che Ok, et al. Reclassification of *Bacillus haloalkaliphilus* Fritze 1996 as *Alkalibacillus haloalkaliphilus* gen. Nov., comb. nov. and the description of *Alkalibacillus salilacus* sp. nov., a novel halophilic bacterium isolated from a Salt Lake in China. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2005, 55.5: 1891-1896.
- Kalwasińska, A., Jankiewicz, U., Felföldi, T., Burkowska-But, A., & Brzezinska, M. S. (2018). Alkaline and halophilic protease production by *Bacillus luteus* H11 and its potential industrial applications. *Food Technology and Biotechnology*, 56(4), 553.
- Khallef, S. (2019). Etude de la flore halophile cultivable des zones humides d'Ouargla. Algérie. These de Doctorat en Sciences Biologiques. Option Microbiologie Appliquée. Univ. Mouloud Mammeri. Tizi-Ouzou
- Kim, S.J., and Hoppe, H.G. (1986). Microbial extracellular enzyme detection on agar plates by means of methylumbelliferyl-substrates. In: Gerbam Deuxieme Colloque International de Bacteriologie Marine, Actes de Colloque. Remer, Brest. 175-181.
- Kirk O., Borchert T.V and Fuglsang C.C (2002). Industrial enzyme applications. *Current Opinion in Biotechnology*
- Kottwitz, B., Upadek, H., & Carrer, G. (1994). Application and benefits of enzymes in detergents. *Chimica oggi*, 12(11-12), 21-24.
- Leelasuphakul, W., Sivanunsakul, P. & Phongpaichit, S. (2006). Purification, characterization and synergistic activity of β -1,3-glucanase and antibiotic extract from

Références bibliographiques

- an antagonistic *Bacillus subtilis* NSRS 89-24 against rice blast and sheath blight. *Enzyme and Microbial Technology* 38, 990–997
- Lesage-Meessen G. Delattre M. Haon M. Thibault J.-F. Colonna-Ceccaldi B. Brunerie P. Asther M. (1996) A two-step conversion process for vanillin production from ferulic acid combining *Aspergillus niger* and *Pycnoporus cinnabarinus*. *J. Biotechnol.* 50, 107–113.
 - Li, X., & Yu, H. Y. (2012). Purification and characterization of novel organic-solvent-tolerant β -amylase and serine protease from a newly isolated *Salimicrobium halophilum* strain LY20. *FEMS microbiology letters*, 329(2), 204-211....b
 - Maktouf S. (2013). Activités amylase et lichenased'une nouvelle souche de *Bacillus* Production sur milieu solide et caractérisation. Thèse de Doctorat. Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse (INSA Toulouse)
 - Mandic-Mulec, I., Stefanic, P., & van Elsas, J. D. (2015). Ecology of bacillaceae. *Microbiology Spectrum*, 3(2), 3-2.
 - Maughan H. and Van der Auwera G. (2011). *Bacillus* taxonomy in the genomic era finds phenotypes to be essential though often misleading. *Infection, Genetics and Evolution*. 11; 789–797
 - Nicholson, W. L., 2002. Roles of *Bacillus* endospores in the environment. *Cellular and Molecular Life Science*. 59, 410-416.
 - Oren A., Ventosa A., Grant W. D. (1997). Proposed Minimal Standards for Description of New Taxa in the Order Halobacteriales. *Int J Syst Bacteriol* 47 : 233-238.
 - Pandey, A., Nigam, P., Soccol, C. R., Soccol, V. T., Singh, D., & Mohan, R. (2000). Advances in microbial amylases. *Biotechnology and applied biochemistry*, 31(2), 135-152.
 - Prescott, L. M., Harley, J. P., and Klein, D. A. (2005). Metabolism: Energy, Enzymes, and Regulation. In *Microbiology* (6th ed) (pp 156-159, 171-172). New York: McGraw Hill.
 - Prescott, L.M., Harley, J.P. and Klein, D.A. (2003). *Microbiologie*. Edition De boeck Ed. 2ième edition française, 525-526PP.

Références bibliographiques

- Priest F. G. (1981). DNA homology in the genus *Bacillus*. In *The Aerobic Endospore-forming Bacteria: Classification and Identification*. Edited by R. C. W. Berkeley & M. Goodfellow. Academic Press. London, PP 33-57.
- Priest F. G. (1993). Systematics and ecology of *Bacillus*. In: Sonenshein A.L., Hoch J. A., Losick R. (Eds.), *Bacillus subtilis and Other Gram-Positive Bacteria Biochemistry, Physiology and Molecular Genetics*. *American Society for Microbiology*, Washington, D.C., 3–16.
- Rao, D. M., Swamy, A. V. N., and Siva Rhama Krishna, G. (2007). Bioprocess Technology Strategies, Production, and Purification of Amylases: An Overview. *The Internet Journal of Genomics and Proteomics*, 2(2): 30-34
- Rao, M. B., and V. V. Deshpande (1998). Proteases and their applications in biotechnology. In A. Varna (ed.), *Microbes: for health, wealth and sustainable environment*, in press. Malhotra.
- Reddy, N. S., Nimmagadda, A., and SambasivaRoa, K. R. S. (2003). An Overview of the Microbial Alpha-amylase Family. *African Journal of Biotechnology*, 2(12): 645-648.
- Roxana C, Simona M, Gabriella A P, Lucia D, Masahiro K and Mădălin E. (2009), Extracellular hydrolytic enzymes of halophilic bacteria isolated from a subterranean rock salt crystal. *Romanian Biotechnological Letters* Vol. 14, No. 5, 2009, pp. 4658-4664.
- Rückert, C., Blom, J., Chen, X., Reva, O. & Borriss, R. (2011). Genome sequence of *B. amyloliquefaciens* type strain DSM7(T) reveals differences to plant-associated *B. amyloliquefaciens* FZB42. *J. Biotechnol.* 155, 78–
- Schallmeyer M, Singh A, and Owen P. (2004). Ward Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. *Can. J. Microbiol.* 50 : 1–17
- Shah, S. R. (2013). Chemistry and applications of cellulase in textile wet processing. *Research Journal of Engineering Sciences*, 2(7), 1-5.
- Sibel Uzuner, Deniz Cekmecelioglu (2019): Enzymes in the Beverage Industry. *Enzymes in Food Biotechnology* 35.
- Sigurgisladottir S., Konraosdottir M., Jonsson A., Kristjansson J.K., Matthiasson E. (1993). Lipase activity of thermophilic bacteria from icelandic hot springs. Volume 15, Number 4, 361-366.

Références bibliographiques

- Spinnler H.E (2013). Enzymes d'intérêt pour la fabrication d'aliments. <https://www.researchgate.net/publication/319668714>
- Stein, T. (2005). *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. *Mol. Microbiol.* 56, 845–857
- Takami, H., Nakamura, S., Aono, R., & Horikoshi, K. (1992). Degradation of human hair by a thermostable alkaline protease from alkaliphilic *Bacillus* sp. no. AH-101. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 56(10), 1667-1669.
- Tiqulan, S.M., Davis, D., Hadid, H., Kasparian, I., Shim, S.S. and Murray, K.S. (2006). Halophilic and halotolerant bacteria from river waters and shallow groundwater along the rouge river of Southern Michigan, *Enviroment Technology*, 28, 297-307
- Wang, J., Liu, J., Wang, X., Yao, J. & Yu, Z. (2004). Application of electrospray ionization mass spectrometry in rapid typing of fengycin homologues produced by *Bacillus subtilis*. *Lett. Appl. Microbiol.* 39, 98–102
- Wang, W. et Sun, M. 2009. Phylogenetic relationships between *Bacillus* species and related genera inferred from 16S rDNA sequences. *Brazilian Journal of Microbiology*, 40: 505-521.
- Ward OP (1985). Proteolytic Enzymes. In: Moo-Young M (ed.) *Comprehensive Biotechnology*, vol. 3, pp. 789–818. London: Pergamon.
- Xia, L., & Cen, P. (1999). Cellulase production by solid state fermentation on lignocellulosic waste from the xylose industry. *Process Biochemistry*, 34(9), 909-912.
- Yang R., Johnson M.C. and Ray B. (1992). Novel Method to Extract Large Amounts of Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. American Society for Microbiology 58 (10) : 3355 - 3359.
- Zhang, Z. J., Chen, Y. Z., Hu, H. R., & Sang, Y. Z. (2013). The beatability-aiding effect of *Aspergillus niger* crude cellulase on bleached simao pine kraft pulp and its mechanism of action. *BioResources*, 8(4), 5861-5870.

Annexes

Annexe 1

Appareillage	Instruments	Réactifs utilisés
Autoclave	Portoirs	Lugol
Bain marie	Tubes à essai	Réactif TCA
Centrifugeuse 10000rpm	Boîtes Pétri	
Etuve	Erlen Mayer	
Four Pasteur	Béchers	
Vortex	Pipettes graduées	
Plaques chauffantes agitatrices	Eprouvette graduée	
Balance	Flacons	
pH mètre	Pipettes Pasteur	
Becs benzène	Micropipettes	
Réfrigérateur	Spatule	
Incubateur agitateur	Coupelle	

Annexe 2

Milieux de culture

➤ **Milieu de Brown :**

- NaCl.....250g
- KCl.....2g
- Mg SO₄.....20g
- Citrate Tri-Sodique.....3g
- Extrait de levure5g
- Agar.....20g
- Eau distillé1000ml

PH= 7,2, autoclave à 121°C / 20 min.

N.B : Les mêmes ingrédients servent à la préparation du milieu Brown liquide sans l'addition d'agar.

PH= 7,2, autoclave à 121°C / 20 min.

Milieux pour la recherche des activités lytiques	Composition des milieux
Protéase	<ul style="list-style-type: none"> • Milieu Br.....100ml • Caséine1g
Gélatinase	<ul style="list-style-type: none"> • Milieu Br.....100ml • Gélatine0.8g
Amylase	<ul style="list-style-type: none"> • Milieu Br.....100ml • Amidon1g
Estérase	<ul style="list-style-type: none"> • Milieu Br.....100ml • Tween 801ml
Cellulase	<ul style="list-style-type: none"> • Milieu Br.....100ml • CMC.....1g
pH= 7,2, autoclaver à 121°C / 20 min	

Tween 80

Le polysorbate 80 est dérivé du sorbitan polyéthoxylé et de l'acide oléique . Les groupes hydrophiles de ce composé sont des polyéthers également appelés groupes polyoxyéthylène, qui sont des polymères d' oxyde d'éthylène . Dans la nomenclature des polysorbates, la désignation numérique qui suit polysorbate fait référence au groupe lipophile , en l'occurrence l'acide oléique. en anglais : *Tween 80*

Les noms chimiques complets du polysorbate 80 sont :

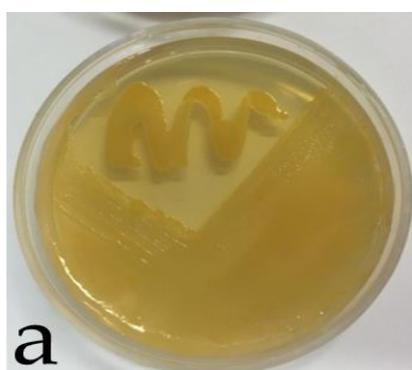
- Monooléate de polyoxyéthylène (20) sorbitane
- (x)-sorbitan mono-9-octadécénoate poly(oxy-1,2-éthanediyle)
- Formule brute : $C_{64}H_{124}O_{26}$

La composition de la solution TCA :

- TCA.....163,39g
- Eau distillé stérile.....1L

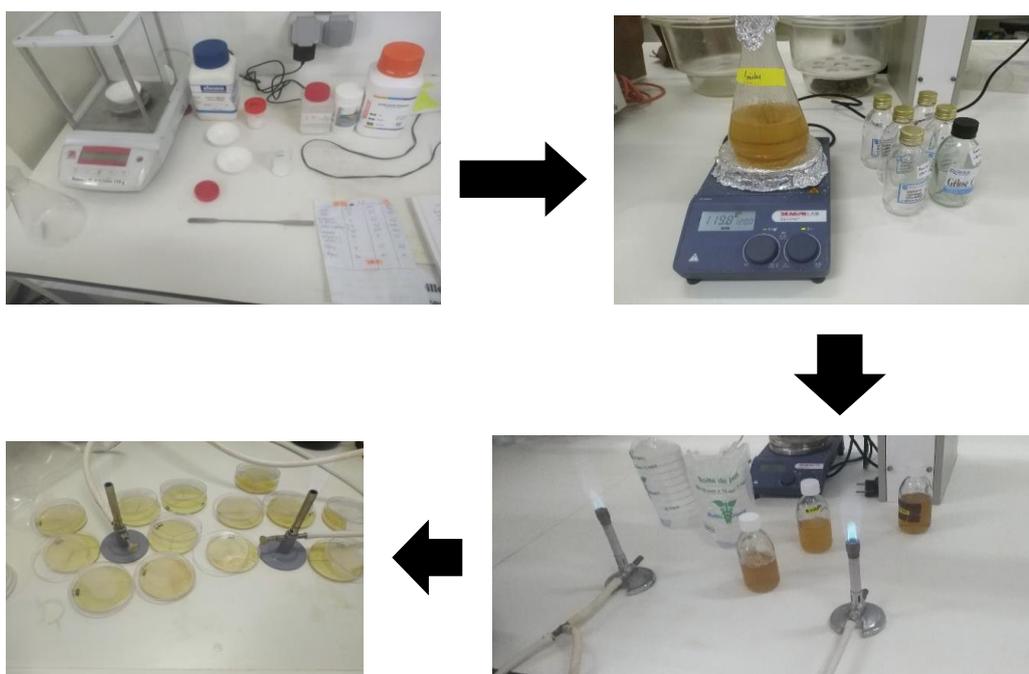
Annexe 3

Revivification de la souche

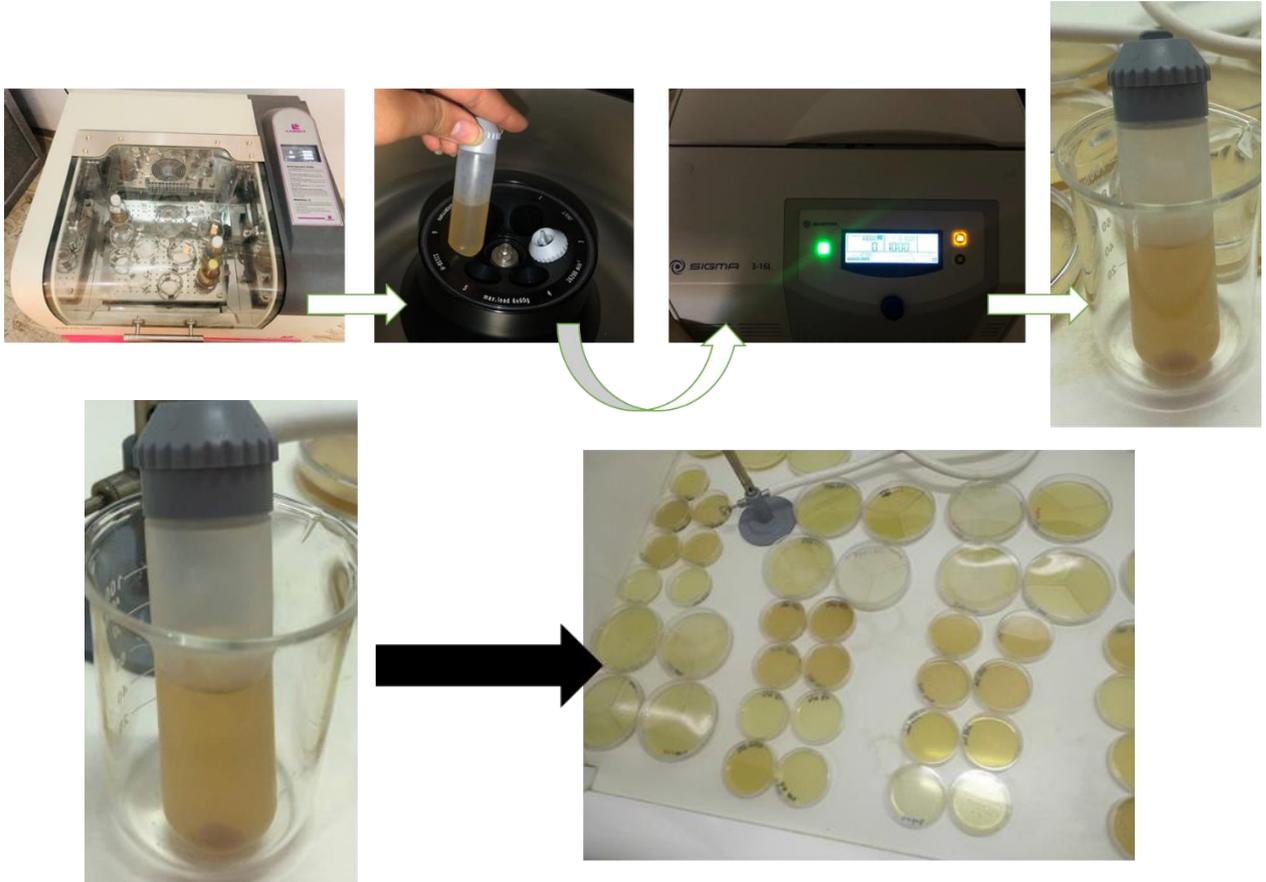


Aspect macroscopique de la souche *A. haloalkaliphilus* C-5 sur milieu solide (a) et culture sur milieu (Br) liquide (b).

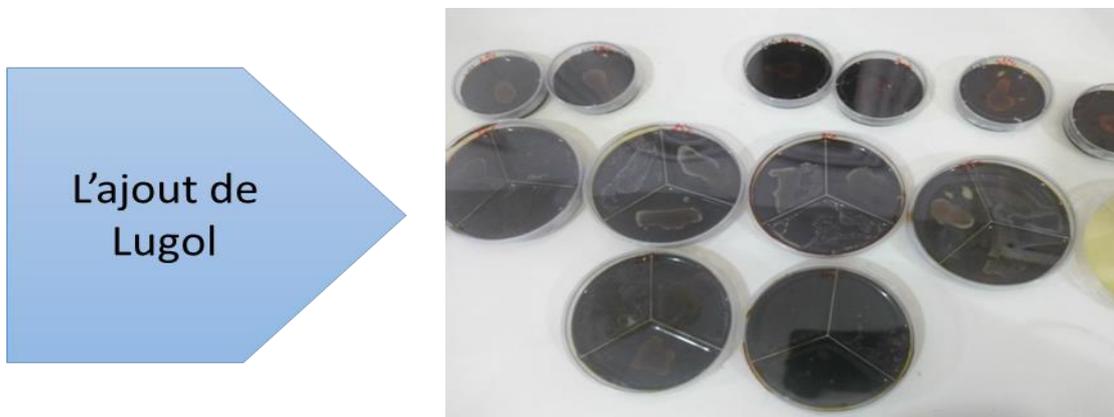
La préparation des milieux de culture solide, liquide et addition des substrats à tester



Centrifugeuse 10000rpm de milieu liquide après l'incubation de 7 jour sous agitation
150 tes/min



- Dépôt du surnageant de culture (SC) par la méthode des spots de sur les milieux additionnés des différents polymères à tester (Amidon CMC, Tween 80, caséine, Gélatine)
- Trois essais sont réalisés pour chaque substrat testé.
- Adition de révélateur pour le CMC, Amidon



Résumé

Les espèces du genre de *Bacillus* possèdent une diversité physiologique et métabolique importante et l'habileté à survivre dans des habitats extrêmes. Elles sont connues pour produire des molécules qui ont diverses applications industrielles.

Le but de cette étude est de voir les variations des activités lytiques exo enzymatique de la bactérie halotolérante extrême isolée d'Ouargla ; l'*Alkalibacillus haloalkaliphilus* C-5 ; sous l'effet des trois principaux facteurs : température ; pH et salinité.

Les résultats montrent que l'ensemble des hydrolases dont est doté cette souche à savoir : caséinase ; gélatinase ; amylase ; cellulase et estérase ; est active dans une large gamme de salinité (0 à 27% de NaCl), avec une caséinase opérationnelle à 30% de NaCl. Ces exo enzymes montrent une stabilité sur des plages de températures (10 à 45°C) ; des optimums entre 20-40°C ; sur un intervalle de pH (5 à 8.5).

Cette combinaison d'hydrolases extracellulaires est un potentiel prometteur pour diverses applications en biotechnologie.

Mots clés : Bacillus, extrême halotolérante, *Alkalibacillus*, activité exoenzymatiques, biotechnologie.

Abstract

Species of the genus *Bacillus* have important physiological and metabolic diversity and the ability to survive in extreme habitats. They are known to produce molecules that have various industrial applications.

The purpose of this study is to see the variations in exoenzymatic lytic activities of the isolated extreme halotolerant bacterium of Ouargla; *Alkalibacillus haloalkaliphilus* C-5; under the effect of the three main factors: temperature, pH and salinity.

The results show that all the hydrolases with which this strain is endowed are: caseinase; gelatinase; amylase; cellulase and esterase; is active in a wide range of salinity (0 to 27% NaCl), with an operational casein 30% NaCl. These exoenzymes show stability over temperature ranges (10-45°C); optimums between 20-40°C; over a pH range (5-8.5). This combination of extracellular hydrolases is a potential promoter for various applications in biotechnology.

Keywords: Bacillus, extreme halotolerant, *Alkalibacillus*, exoenzymatic activity, biotechnology.

ملخص

تمتلك البكتيريا من نوع عصويات فسيولوجيا واستقلاب متعدد والقدرة على البقاء في الوسائط المتطرفة. من المعروف أنها تنتج جزئيات لها استعمالات صناعية مختلفة.

الغرض من هذه الدراسة هو معاينة الاختلافات في الأنشطة التحليلية الإنزيمية الخارجية لبكتيريا شديدة التحمل مستخرجة من منطقة ورقلة؛ ***Alkalibacillus haloalkaliphilus C-5*** تحت تأثير ثلاثة عوامل رئيسية: درجة الحرارة ؛ معامل الحموضة والملوحة.

وتبين النتائج أن جميع الهيدرولايزات التي تمتاز بها هذه السلالة: كازيناز ؛ الجيلاتيناز ؛ والأميلاز ؛ والسيلولاز والإستراز ؛ تنشط في مجال واسع من الملوحة 0 إلى 27%، مع كازيناز نشط من 0 إلى 30% وتظهر هذه الأنزيمات الخارجية استقرارا على نطاقات درجات الحرارة (10-45 درجة مئوية) ؛ الأمثل بين 20-40 درجة مئوية ؛ على نطاق معدل الهدروجين (5-8.5).

هذا المزيج من الهيدرولايزات خارج الخلية هو محفز محتمل لتطبيقات مختلفة في التكنولوجيا الحيوية.

الكلمات الرئيسية: عصوية، شديدة تحمل للملوحة، ***Alkalibacillus***، نشاط إنزيمي خارجي، التكنولوجيا الحيوية.