

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
جامعة مولاي الطاهر، سعيدة
Université MOULAY Tahar, Saida



N° d'Ordre

كلية العلوم
Faculté des Sciences
قسم البيولوجيا
Département de Biologie
Filière
Sciences biologiques
Spécialité : Microbiologie Appliquée
Mini-projet

Optimisation des conditions de culture pour la production d'enzyme alpha amylase à partir des souches lactiques

Présenté par :

- Mille : BOUZIDI Zineb
- Mille : BRAHIM BRAHMI Khadidja

Soutenu le :

25 Juin 2023

Devant le jury composé de :

Examineur	Mme. BOUKABENE fouzia Kheira	MCB Université SAIDA
Examineur	Mme . HAMMOU Bakhta	MAA Université SAIDA
Rapporteur	Mme. CHAHROUR Wassila	MCB Université SAIDA

Année universitaire 2022/2023

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

جامعة مولاي الطاهر، سعيدة

Université MOULAY Tahar, Saida



N° d'Ordre

كلية العلوم

Faculté des Sciences

قسم البيولوجيا

Département de Biologie

Filière

Sciences biologiques

Spécialité : Microbiologie Appliquée

Mini-projet

Optimisation des conditions de culture pour la production d'enzyme alpha amylase à partir des souches lactiques

Présenté par :

- Mille : BRAHIM BRAHMI Khadidja
- Mille : BOUZIDI Zineb

Soutenu le :

25 Juin 2023

Devant le jury composé de :

Examinateur

Mme. BOUKABENE fouzia Kheira

MCB Université SAIDA

Examinateur

Mme . HAMMOU Bakhta

MAA Université SAIDA

Rapporteur

Mme. CHAHROUR Wassila

MCB Université SAIDA

Année universitaire 2022/2023

Dédicace

Je dédie ce modeste travail :

À mes chers parents, pour tous leurs sacrifices, leur tendresse, leur soutien Et leurs prières tout au long de mes études, que Dieu leur procure bonne santé et longue

Vie... je vous aime.

À mon cher frère, Khelifa pour leur appui et leur encouragement.

À mes chères sœurs, Rekia et Fatima pour leurs encouragements Permanents,

et leur soutien moral.

Une spéciale dédicace à ma magnifique et merveilleuse binôme qui compte

énormément pour moi « Khadidja ».

Zineb

Dédicace

Je dédie ce modeste travail :

À Mes chers parents, qu'ils trouvent ici le Témoignage de ma profonde gratitude pour leur amour, leur Encouragement et leur soutien tout au long de mes études,

que DIEU les bénisse.

À mes chères sœurs et mes chers frères Maghnia et Ali, et surtout

à Soufiane ; tu es le meilleur frère qui existe, je te souhaite un Avenir plein de joie, de réussite et de bonheur.

À mon cher fils Fayçal, de m'avoir donné la force pour survivre, ainsi que L'audace pour dépasser toutes les difficultés.

À mes chères nièces Malek, Israe, Saadoud .

À mon bras droit Mehdi Zoheir pour leurs encouragements Permanents,

et leur soutien moral.

À tous mes amis pour votre Soutien et affection. Puissiez-vous trouver dans ce travail le témoin De mon affection et estime.

À tous ceux que j'aime surtout ma binôme Zineb .

khadidja

Remerciements

Nous remercions Dieu le tout puissant de nous avoir donné la santé et de nous avoir guidé, aidé Et donné la foi et le courage pour accomplir ce travail.

Nous adressons mes remerciements aux personnes qui nous avons aidées dans la réalisation de ce Travail qu'il a été réalisé au Laboratoire de Microbiologie appliquée, Faculté Des Sciences Biologiques Université Docteur Moulay Taher , Saida.

En premier lieu nous tendons à exprimer mes sincères remerciements à mon encadreur Madame Chahrour W, pour ses conseils judicieux et ses dirigés tout au long de ce travail, la qualité de son encadrement exceptionnel, sa rigueur, sa précieuse assistance et surtout sa patience à mon égard, ses encouragements et son suivi, ce travail n'aurait pu aboutir.

Un grand merci également à Mme BOUKAABANE et Mme HAMOU.

Le remerciement également à tous les membres du laboratoire du département de la biologie l'Université Docteur Moulay Taher , Saida .

Toute notre gratitude et mes remerciements les plus sincères à mes chers enseignants du Département de la biologie qui ont participé le long de ces années à ma formation.

Notre remercier en outre tous ceux qui ayant soutenu et pris part, tant moralement Que financièrement de près ou de loin.

Je remercie mes collègues « Aouicha , Kholoud , Karima , Dalila , Majda , Ahlem , Nassima , Mehdi , Oussama , Youness , Aymen »

MERCI.

Liste des abréviations

% : pourcentage

μ : vitesse de croissance

ACJE : Aliment de complément pour les jeunes enfants

Bf : *bifidobacterium*

BL/LAB : Bactéries Lactiques/Lactic Acid Bacteria

C° : Degré Celsius

Co₂ : dioxyde de carbone

DO : Densité optique

Eps : exo-polysaccharide

G : génération

GRAS : Generally Recognized as safe

H : heure

Lb : *Lactobacillus*

Lc : *Lactococcus*

Ln : *Leuconostoc*

P : *Pediococcus*

Min : minute

MI : millilitre

MRS : Man, Rogosa et Sharpe

MRSA : Mrs Amidon

MRS-BCP : Milieu MRS additionné de pourpre de bromocrésol

MRS_G : MRS Glucose

MRS_{GA} : Mrs Glucose/Amidon

N : nombre

Nm : Nanomètre

P : pseudomonas

pH : Potentiel hydrogène

S : seconde

Sp : espèce

Ssp : sous-espèce

St : *Streptococcus*

T° : Température

V : volume

α : alpha

NSLAB : Non Starter Lactic Acid Bacteria

Asp : Aspartate

A LAB : Amylolytic bacterial lactic acid

Liste des tableaux

Tableau 1: Des exemples des alpha amylases microbiennes --- **Erreur ! Signet non défini.**

Tableau 2: Paramètres cinétiques et constantes d'inhibition des α -amylases de *Lb.fermentum* (FERMENTA), *Lb.manihotivorans* (MANIHOA) et *Lb.plantarum* (PLANTAA)----- **Erreur ! Signet non défini.**

Tableau 3: Examen macroscopique et microscopiques des souches lactiques étudiées.----- **Erreur ! Signet non défini.**

Tableau 4: Résultats des caractères physiologiques et biochimiques des 2 souches (7'p , 10'p). **Erreur ! Signet non défini.**

Liste des figures

- Figure 1 :Transformation enzymatique de l'amidon en sirop de glucose de maltose et de fructose **Erreur ! Signet non défini.**
- Figure 2:aspect macroscopique de la souche 8 isolée à partir des légume sur milieu MRS à 30°C pendant 72h. **Erreur ! Signet non défini.**
- Figure 3:Observation microscopique des souches revivifiées. **Erreur ! Signet non défini.**
- Figure 4 : Mise en évidence des Activités amylolytiques les 21 souches**Erreur ! Signet non défini.**
- Figure 5:La croissance bactérienne exprimée en DO dans le milieu MRS GLUCOSE..... **Erreur ! Signet non défini.**
- Figure 6:La croissance bactérienne exprimée en DO dans le milieu MRS AMIDON **Erreur ! Signet non défini.**
- Figure 7:la croissance bactérienne exprimée en DO dans le milieu MRS GLUCOSE₅₀/AMIDON₅₀ **Erreur ! Signet non défini.**
- Figure 8:la croissance bactérienne exprimée en DO dans le milieu MRS GLUCOSE₂₀/AMIDON₈₀. Pour les souches **Erreur ! Signet non défini.**
- Figure 9:la croissance bactérienne exprimé en DO dans le milieu MRS AMIDON 3% AU PH =8 **Erreur ! Signet non défini.**
- Figure 10:la croissance bactérienne exprimée en DO dans le milieu MRS AMIDON 3% AU PH =5..... **Erreur ! Signet non défini.**
- Figure 11 :Structure de l'amylose (Malumbaet al., 2011)..... **Erreur ! Signet non défini.**
- Figure 12:Structure de l'amylopectine (Parada, 2012) **Erreur ! Signet non défini.**
- Figure 13:La courbe de la DO au fonction de la concentration (g/ml . 10⁻²)**Erreur ! Signet non défini.**

Résumé

Notre étude est basée sur la sélection et l'optimisation des conditions de culture pour la production d'alpha-amylase à partir des souches lactiques. D'où on a utilisé 10 souches lactiques productrices de cet enzyme. Les souches ont été isolées à partir de : blé , l'ensilage de sorgho , légumes fermentés . Après la purification, on distingue que certaines souches n'étaient pas pures. Ensuite, sélectionner des souches lactiques ayant une meilleure activité amylolytiques qu'elles sont: *Lactobacillus plantarum* 7 et *Lactobacillus* 10. Ces dernières souches ont été thermorésistantes et thermophiles, peuvent croître dans un intervalle de pH (4.5 / 9.6), elles sont capables d'hydrolyser l'arginine. La souche *Lactobacillus* 7_p a été homofermentaire autrement *Lactobacillus* 10_p est hétérofermentaire. La cinétique de croissance et de production en MRS contenant l'amidon comme seule source de carbone. Les résultats montrent une variation dans le nombre des souches en fonction du temps.

La suite de cette cinétique confirme que 7_p, 10_p ayant une forte production d'alpha-amylase dans le milieu **MRS** _{A5} , la souche 7_p présente une valeur max 0,026h⁻¹ ; et la souche 10_p présente une valeur minimale par rapport à 7_p c'était 0,019h⁻¹ .

Mots clés: souches lactiques, alpha-amylase, l'optimisation des conditions de culture, la cinétique, activité amylolytique.

Abstract

Our study is based on the selection and optimization of culture conditions for the production of alpha-amylase from lactic acid strains. Hence we used 10 lactic acid strains producing this enzyme. The strains were isolated from: wheat, sorghum silage, fermented vegetables. After purification, we distinguish that some strains were not pure. Then, select lactic strains with better amyolytic activity than they are: *Lactobacillus plantarum* 7 and *Lactobacillus* 10. These latter strains have been heat-resistant and thermophilic, can grow in a pH range (4.5 / 9.6), they are capable of hydrolysis of arginine. The *Lactobacillus* 7'p strain has been homofermented otherwise *Lactobacillus* 10'p is heterofermentative. The results show a variation in the number of strains as a function of time.

The monitoring of this kinetics confirms that 7'p, 10'p having a high production of alpha-amylase in the MRS A5 medium, the 7'p strain has a max value 0.026h-1; and the 10'P strain has a minimum value compared to 7'P 0.019H-1.

Keywords: lactic acid strains, alpha-amylase, optimization of culture conditions, kinetics, amyolytic activity.

ملخص

تعتمد دراستنا على اختيار وتحسين ظروف الاستزراع لإنتاج ألفا الأميليز من سلالات حمض اللاكتيك. ومن ثم استخدمنا 10 سلالات من حمض اللاكتيك تنتج هذا الإنزيم. تم عزل السلالات من: القمح ، سيلاج الذرة الرفيعة ، الخضروات المخمرة. بعد التنقية ، نميز أن بعض السلالات لم تكن نقية. بعد ذلك ، حدد سلالات اللاكتيك ذات النشاط النشواني الأفضل مما هي عليه كلا من (Lactobacillus 7 plantarum و Lactobacillus 10).

كانت هذه السلالات الأخيرة مقاومة للحرارة ومحببة للحرارة ، ويمكن أن تنمو في نطاق الأس الهيدروجيني (4.5 / 9.6) ، فهي قادرة على التحلل المائي للأرجينين. تم تجانس سلالة

Lactobacillus

المحتوي على SRM غير متجانسة. حركية نمو وإنتاج Lactobacillus 10'p وإلا فإن 7'p كمصدر وحيد للكربون... تظهر النتائج تباينا في عدد السلالات كدالة للوقت النشا

MRS A5 لها إنتاج عال من ألفا الأميليز في وسط 10'p ، 10'p تؤكد مراقبة هذه الحركية أن 7'P لها قيمة دنيا مقارنة ب سلالة 10' h-1 0.026 هي لها قيمة قصوى ل 10'p ، سلالة 7 0.019H-1.

الكلمات المفتاحية: سلالات حمض اللبنيك ، ألفا الأميليز ، تحسين ظروف الثقافة ، الحركية ، نشاط الأميلوليتيك.

Table des matières

I. Introduction :.....	2
II.1. Définition des bactéries lactiques	5
II.2. Aptitudes technologiques des bactéries lactiques :.....	5
II.2.1. Pouvoir acidifiant	5
II.2.2. Aptitude protéolytique.....	6
II.2.3. Aptitude lipolytique	6
II.2.4. Aptitude aromatisant	7
II.2.5. Aptitude texturant	7
II.2.6. Activité antimicrobienne.....	7
II.2.7. Activité probiotique.....	8
II.3. Le Genre de <i>Lactobacillus</i>	9
II.4. Les bactéries lactiques amylolytiques.....	12
II.4.1. Les voies de dégradation d'amidon.....	13
II.4.1.1. Alpha -amylase bactérienne.....	13
II.4.1.2. Alpha -amylase fongique	14
II.5. Les particularités des α -amylases des bactéries lactiques amylolytiques :.....	15
II.6. Domaines d'application des bactéries lactiques amylolytiques.....	16
II.7. Applications industrielles d' α -amylase	17
II.7.1. Détergents.....	17
II.7.2. Liquefaction de l'amidon et la saccharification	17
II.7.3. Désencollage des textiles :.....	18
II.7.4. Panifications :.....	18
II.7.5. Industries des boissons :	19
II.7.6. Domaine pharmaceutique	19
II.7.7. Pâtes et papiers :	19
II.7.8. Production d'alcool carburant :.....	19
III.1. Souches bactérienne	22
III.2. Purification :.....	22
III.3. Pré-identification des isolats.....	23
III.3.1. Test morphologique	23

III.3.1.1. Examen macroscopique.....	23
III.3.1.2. Examen microscopique.....	23
III.3.2. Test biochimique	23
III.3.2.1. Recherche de la catalase	23
III.3.2.2. Test Hydrolyse de l'arginine :.....	24
III.3.3. Tests physiologiques :	24
III.4. Activité amylolytique	25
III.5. Conservation des isolats	25
III.6. Cinétique de croissance et de production d'alpha amylase	26
III.6.1. Mesure de la croissance	27
III.6.2. Dosage de l'amidon résiduel	27
IV.1. Revivification et purification des souches lactiques.....	30
IV.1.1. Examen macroscopique.....	30
IV.1.2. Examen microscopique	32
IV.1.3. Test de Catalase	32
IV.2. Pré-identification des isolats.....	32
IV.3. Résultats d'étude de l'activité amylolytique	33
IV.4. Cinétique de croissance des souches à différents paramètres :	34
Dans le présent travail, nous avons testé que deux souches lactiques amylolytiques appartenant au genre Lactobacillus, en suivant la croissance dans différents milieux : MRS, MRS _A , MRS _{AG50} , MRS _{AG80} ; MRS _{A5} et MRS _{A8} en fonction du temps.	
IV.4.1. Cinétique de croissance sur milieu MRS _G :.....	34
IV.4.2. Cinétique de croissance sur milieu MRS _A :	35
IV.4.3. Cinétique de croissance sur milieu MRS _{A/G} (50/50) :	36
IV.4.4. Cinétique de croissance sur milieu MRS _{A/G} (20/80) :	37
IV.4.5. Cinétique de croissance sur milieu MRS _{A 3%} PH=8 :.....	38
IV.4.6. Cinétique de croissance sur milieu MRS _{A 3%} PH=5 :.....	39
VII.1. Annexe 1	50

PARTIE I. INTRODUCTION

Introduction

Les amylases sont l'une des principales enzymes utilisées dans l'industrie. Ces enzymes hydrolysent les molécules d'amidon en polymères composés d'unités de glucose. Les amylases ont une application potentielle dans un grand nombre de processus industriels tels que les industries alimentaires, de fermentation et pharmaceutiques (Souza et Magalhaes, 2010).

Les α -amylases peuvent être obtenues à partir des plantes, d'animaux et des micro-organismes. Cependant, les enzymes provenant de sources fongiques et bactériennes ont dominés les applications dans les secteurs industriels (Nwokoro, Anthonia, 2015).

La production d' α -amylase est essentielle pour la conversion des amidons en oligosaccharides. L'amidon est un constituant important de l'alimentation humaine et un produit de stockage majeur de nombreuses cultures économiquement importantes telles que le blé, le riz, le maïs, le tapioca et les pommes de terre.

Les A LAB représentent un groupe d'acide lactique des bactéries qui peuvent utiliser l'amidon comme seule source de carbone le dégradant en divers produits finaux (principalement de l'acide lactique) par fermentation directe en une seule étape (Petrova, Petrov, 2012) ; Ces bactéries appartiennent principalement aux genres *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Carnobacterium* et *Weissella* (Bhanwar, Ganguli, 2014).

L'objectif de ce travail est :

1. La sélection des souches lactiques productrices d' α -amylase.
2. l'étude des conditions de culture favorables pour la production d' α -amylase à partir des souches lactiques.

Ce manuscrit comprend deux parties. La première partie concerne l'étude bibliographique, d'où on fait un rappel sur les généralités des

bactéries lactiques, puis des études sur les bactéries lactique amylolytiques et les α -amylases.

La deuxième partie expérimentale renferme les techniques et les méthodes ainsi que les résultats et leur discussion.

PARTIE II. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

II.1. Définition des bactéries lactiques

Orla-Jensen (1919) a défini les bactéries lactiques comme un groupe de micro-organismes vivants, procaryotes, très hétérogènes au niveau morphologique, caractérisées par une production prolifique d'acide lactique, et agrégées en une structure unique. Appartient à la "famille des *lactobacilles*". Elles sont répandues dans la nature, en particulier dans le sol et le lait (Leveau et Bouix, 1993).

Plus généralement, les bactéries lactiques se trouvent partout où les produits de dégradation des protéines, les concentrations de vitamines sont élevées, les niveaux d'oxygène sont faibles, et surtout les glucides sont élevés. Elles jouent un rôle important dans le développement de nombreux aliments tels que les produits laitiers, car Elles sont également utilisées dans le marinage des légumes, la pâtisserie, la vinification, le poisson, la viande et la charcuterie. Elles contribuent également à améliorer la texture et la saveur des aliments et la production de composés aromatiques. Elles protègent également le lait, par exemple par l'acide lactique pour abaisser le pH ; mais aussi en produisant des bactériocines pour empêcher la prolifération de bactéries nocives (BENREGUIEG , 2015).

II.2. Aptitudes technologiques des bactéries lactiques :

Les bactéries lactiques sont utilisées depuis longtemps pour préserver la fraîcheur de nombreux aliments et jouent un rôle important dans la fabrication de fromages et de produits fermentés (Diop, 2009). D'où on observe plusieurs aptitudes technologiques grâce aux :

II.2.1. Pouvoir acidifiant

L'acidification est la propriété métabolique la plus recherchée des bactéries lactiques utilisées dans l'industrie alimentaire. Il se manifeste par la fermentation des glucides en acide lactique lors de la croissance bactérienne (MONNET et *al.*, 2008). Les conséquences des propriétés physico-chimiques et microbiologiques peuvent être présentées de la manière suivante :

- L'accumulation d'acide lactique contribue à la saveur des aliments fermentés.
- Abaissez progressivement le pH du milieu de culture et de la matrice alimentaire.
- Limite le risque de développement de la flore pathogène et d'altération du produit final.
- Déstabilisation des micelles de caséines , coagulation des laits et participation à la synérèse .

II.2.2. Aptitude protéolytique

L'activité protéolytique est une propriété très importante qui fait des bactéries lactiques le seul agent d'affinage microbien pour la plupart des fromages (MAHI, 2010), de nombreuses protéases sont synthétisées par les bactéries lactiques et peuvent être des aminopeptidases, des dipeptidases ou des tripeptidases, localisées au niveau de la membrane plasmique ou niveaux cytoplasmiques (BENNAMA, 2012).

II.2.3. Aptitude lipolytique

Les propriétés lipolytiques des bactéries lactiques sont généralement faibles, autrement les *Lactococcus* sont considérés comme les plus lipolytique que *Streptococcus thermophilus* et les *Lactobacillus*. Cependant, ils peuvent présenter un intérêt pour certaines applications fromagères (BEAL et al., 2008).

D'une manière générale, on distingue les estérases qui hydrolysent préférentiellement les esters formés à partir d'acides gras à chaîne courte (C2-C8) et les lipases actives sur des substrats émulsionnés contenant des acides gras à longue chaîne (>C8), qui interviennent dans les monoglycérides, l'hydrolyse des diglycérides et triglycérides (SERHAN et al., 2009).

II.2.4. Aptitude aromatisant

La production de composés aromatiques est associée à une activité microbienne et plusieurs bactéries lactiques sont capables de les synthétiser, notamment le citrate.

Divers composés, tels que le diacétyle, l'acétoïne, l'acétate, sont les principaux composants de l'arôme des produits laitiers fermentés. Le diacétyle est le principal composé qui contribue à la saveur de nombreux produits laitiers issus du métabolisme du citrate par différentes espèces de bactéries lactiques. D'autres travaux ont montré que certaines bactéries lactiques ont la capacité de convertir les acides aminés en molécules aromatiques (HAMMI, 2016 ; BELKHEIR, 2017).

II.2.5. Aptitude texturant

La capacité des bactéries lactiques à synthétiser des exo polysaccharides (EPS) joue un rôle important pour la consistance et la rhéologie des produits transformés. Les *Lb. delbrueckii ssp. bulgaricus* et *Streptococcus thermophilus* produisant des EPS sont utilisés dans la fabrication des yaourts, ceci afin d'améliorer la texture, éviter la synérèse et augmenter la viscosité des produits finis. L'utilisation des EPS produits par la souche *Lc. Lactis ssp. cremoris* est très prometteuse pour la structure et la viscosité des produits laitiers fermentés (LEROY et DE VUYST, 2004 ; HO et al., 2007).

II.2.6. Activité antimicrobienne

Les bactéries lactiques produisent une variété de composés antimicrobiens qui sont utilisés dans la fermentation et la bioconservation des aliments (Labiouiet al., 2005).

Les acides organiques, comme l'acide lactique, l'acide acétique ou l'acide propionique, élaborés lors de la fermentation des glucides, peuvent inhiber des levures, des moisissures et des bactéries. Le peroxyde d'hydrogène produit par les bactéries lactiques s'accumule dans l'environnement et peut inhiber certains microorganismes. Les bactéries lactiques hétérofermentaires synthétisent du dioxyde de carbone comme métabolite secondaire. Son

accumulation dans le milieu extérieur crée une anaérobiose qui s'avère toxique pour certains microorganismes aérobies présents dans l'aliment. Le diacétyle peut inhiber la croissance des bactéries à Gram négatif, des levures et moisissures (Alakomi et *al.*, 2000 ; Ammor et *al.*, 2006).

Les bactériocines produites par les bactéries lactiques sont des substances antimicrobiennes de poids moléculaire variable. Elles ont une activité inhibitrice dirigée contre les bactéries proches de la souche productrice et leur spectre d'action est généralement étroit. Les plus connues sont : lanisine, la diplococcine, l'acidophiline et la bulgaricane (Ogunbanwo et *al.*, 2003 ; Dortu et Thonart, 2009). La plupart des bactériocines produites par les bactéries lactiques partagent le même mode d'action, basé sur la formation de pores dans la membrane de la bactérie cible (De Vuyst et Leroy, 2007 ; Kumari et *al.*, 2009).

II.2.7. Activité probiotique

Grâce à leurs propriétés nutritionnelles et thérapeutiques utilisées par les industries agroalimentaires et pharmaceutiques, les probiotiques sont parfois utilisés comme Compléments dans des produits comme les yaourts ou bien dans des préparations Pharmaceutiques sous forme de gélules exemple *Lb. acidophilus* ; *Lb. amylovorus* ; *Lb. crispatus* ; *Bf. Lactis* ; *Bf. Longum* ; *Bf. Adolescentis* ; *Lc. Lactis* ; *Ln. Mesenteroides* ; *P. acidilactici*.

Parmi les principaux rôles bénéfiques, Makhoulfi (2012) cite :

1. Le traitement des diarrhées : les souches probiotiques *Lb. Acidophilus* et *Lb. Casei*, qu'on retrouve entre autre dans le lait fermenté, ont fait l'objet d'études montrant leur efficacité contre la diarrhée associée à la prise d'antibiotiques en milieu hospitalier (Penner et *al.*, 2005).
2. Le traitement gastrique : des travaux prometteurs sur l'amélioration des traitements gastriques sont en cours sur la conjonction des probiotiques aux antibiotiques en vue de limiter les infections à *Helicobacter pylori*, une bactérie impliquée dans la survenue et les récurrences des gastrites et ulcères gastroduodénaux. Les études sur ce

traitement se poursuivent car son efficacité reste à démontrer (Reid et al., 2003).

Les applications des probiotiques se sont énormément étendues ces dernières années, tant Dans le domaine agroalimentaire que médical.

II.3. Le Genre de *Lactobacillus*

Le genre *Lactobacillus* est très hétérogène (le pourcentage en G+C varie de 33 % à 55%). Il contient 140 espèces et 27 sous-espèces, mais sa classification évolue régulièrement.

Les *lactobacilles* sont des bacilles Gram positifs, non mobiles, non sporulants, se développant dans des conditions microaérophiles à strictement anaérobies , bien que certains travaux aient révélé la présence d'une catalase chez certaines souches de *Lactobacillus delbrueckii sub sp. bulgaricus*, les lactobacilles ne présentent généralement pas d'activité catalasique ; les lactobacilles se répartissent en trois groupes selon leur profil fermentaire, d'après la classification de Kandler et Weiss (1986) :

- Les lactobacilles du groupe I (LBI) sont des bactéries homofermentaires strictes, ne fermentant que des hexoses. Les espèces de ce groupe fréquemment rencontrées dans les produits laitiers sont : *L. delbrueckii sub sp. lactis*, *L. delbrueckii sub sp. delbrueckii*, *L. delbrueckii subsp. bulgaricus*, *L. acidophilus* et *L. helveticus*. Dans ce groupe, les écarts de contenu G+C sont élevés (33 à 53%).
- Les lactobacilles du groupe II (LBII), lactobacilles hétérofermentaires facultatifs sont des bactéries qui fermentent les hexoses et produisent presque exclusivement de l'acide lactique, Ils peuvent également fermenter les pentoses après induction d'une phosphocétolase et produire de l'acide lactique et de l'acide acétique, ce groupe rassemble entre autres *L. plantarum*, *L. pentosus*, *L. rhamnosus*, *L. casei* et *L. paracasei*. Les contenus en G+C sont compris entre 35 et 47% (berguigue ; 2015).

- Les lactobacilles du groupe III (LBIII) sont hétérofermentaires stricts. L'utilisation des sucres suit la voie des pentoses phosphate et conduit à la formation de lactate, d'acétate ou d'éthanol et de CO₂ , Les contenus en G+C sont très variables : de 33% à 53%(Salou et al., 1994 ; Miranda et al., 1997).

Les séquences complètes du génome ont été établies pour 6 souches de Lactobacillus appartenant aux espèces *L.acidophilus*, *L.bulgaricus*, *L.johnsonii*, *L.sakei*, *L.salivarius* et *L.plantarum*, Ce séquençage clarifiera probablement la classification de ce groupe (Dellaglio et al., 2004).

Les lactobacilles sont les bactéries lactiques les plus ubiquitaires (Desmazeaud, 1992).

Ils sont capables de coloniser des habitats très variés, pourvu que ces derniers répondent à leurs exigences de croissance, plus importantes que celles des lactocoques. Ainsi, les éléments indispensables à leur croissance sont certains acides aminés, des macro-éléments (magnésium et potassium), ainsi que certains micro-éléments comme la niacine et le panthothénate de calcium.

Si l'on retrouve les lactobacilles dans le lait, l'habitat de la majorité des lactobacilles (en particulier ceux du groupe I) est le tractus digestif et les organes génitaux des animaux (Bernardeau et al., 2006).

Les lactobacilles du groupe II se retrouvent préférentiellement sur les végétaux (Dellaglio et al., 1994).

Certains d'entre eux constituent la flore majoritaire des ensilages (*L. plantarum*, *L. pentosus*, *L. paracasei*). Les niveaux de lactobacilles retrouvés dans les laits crus sont assez faibles pour les laits de vache et de chèvre. Ils se situent entre 10 et 100 ufc.ml⁻¹ (Desmasures et al., 1997 ; Michel et al., 2005).

Dans la majorité des cas, les lactobacilles du groupe II font partie de la microflore adventice désignée sous le terme de NSLAB (Non Starter Lactic Acid Bacteria). Apportés par le lait cru, ils peuvent s'implanter et se développer dans les fromages avec une forte capacité invasive. Les

lactobacilles du groupe I, notamment *L. delbrueckii sub sp. bulgaricus*, *L. delbrueckii sub sp. Lactis* et *L. helveticus*, entrent dans la composition de levains pour la fabrication de fromages de type pâtes pressées cuites. *L. paracasei sub sp. paracasei*, *L. rhamnosus*, *L. plantarum* ou *L. curvatus* peuvent également être utilisés comme compléments de ferments (Bernardeau et al., 2006).

Les lactobacilles sont de bons producteurs d'acide lactique et parfois de substances antibactériennes. Ils contribuent grandement à l'équilibre des microflore. En effet, ils ont un rôle inhibiteur vis-à-vis du développement de microorganismes pathogènes (Klaenhammer, 1993).

Certains lactobacilles du groupe III peuvent être à l'origine d'altérations, telles que le gonflement des fromages dû à la production de gaz, *L. bif fermentans* étant parfois mis en cause. D'autres défauts peuvent être attribués à la présence de *Lactobacillus*. La racémisation du L-lactate en D-lactate par certains lactobacilles peut entraîner l'apparition de cristaux blancs de lactate de calcium amers. L'apparition d'éraillures, voire des laminures peut également être liée à la production de gaz par les lactobacilles hétérofermentaires (groupes II et III) (benrguigue ; 2015).

II.4. Les bactéries lactiques amylolytiques

Sherman (1937) a été le premier à décrire les bactéries qui transforment l'amidon en acide lactique. Ces bactéries sont connues sous le nom de bactéries lactiques amylolytiques (A LAB).

En général, les bactéries lactiques dégradant l'amidon sont présentes dans l'ordre de 10 % de la population totale (Johansson et al., 1995), une proportion qui ne peut être ignorée ; Les α -amylases produites par *Bacillus* et les champignons ont été largement étudiées (Takasaki et al., 1994 ; Carlsen et al., 1995 ; Mmkeberg et al., 1995 ; Pedersen et al., 2000 ; Sarikaya et al., 2000 ; Sumitani et al., 2000).

Plusieurs α -amylases produites par des souches de bactéries lactiques dégradant l'amidon, telles que celles de *Lb. amylovorus* et *Lb. amylophilus*, ont été purifiées et caractérisées (Imam et al., 1991 ; Castillo-Pompeyo et al., 1993 ; Sanoja et al., 2001), *Lb. plantarum* A6 (Giraud, 1993 ; Giraud et al., 1994 ; Rodriguez-Sanoja, 2001), *Lb. manihotivorus* (Morion-Guyot et al., 1998 ; Aguilar et al., 2000 ; Rodriguez-Sanoja, 2001).

Ben Oma et autres (2000) ont montré que *Lb. manihotivorus* est l'espèce dominante parmi les souches de *Lb* qui ne dégradent pas l'amidon.

La première espèce, *Lactobacillus manihotivorus* (Morion-Guyot et al., 1998), *Lb. plantarum* isolé à partir de racines de manioc fermentées (Nwankwo et al., 1989) ou du riz fermenté aux Philippines (Olympia et al., 1995), *Leuconostoc.sp* isolé de poisson et d'ensilage de blé en Suède (Lindgren et Refai, 1984), *Lb. fermentum*OgiE1 a été isolé à partir de pâte d'orge fermentée du Bénin (Auati et al., 1998).

II.4.1. Les voies de dégradation d'amidon

Selon l'étude de Lim et Oslan (2021), le mécanisme de l' α -amylase catalyse les liaisons endo-hydrolyse de son substrat tel que l'amidon, et trois résidus des acides aminés interviennent :

Le glutamate catalyse l'attaque nucléophile du C1.

deux Aspartate, le première Asp joue un rôle de nucléophile et aussi il maintient l'acide glutamique en protonation correct pour l'activité, et le deuxième Asp se lie aux 2^{ème} et 3^{ème} groupe hydroxyle (OH-2, OH-3) du substrat via des liaisons d'hydrogène, déformant le substrat.

Le mécanisme se déroule en deux étapes :

- Fixation de substrat dans le site actif induit l'acide Glu pour donner un proton à la liaison glycosidique de l'oxygène au centre anomérique, successive avec l'attaque de l'acide aminé Asp nucléophile sur le C1 du sucre et réduit leur extrémité de substrat
- Régénération de l'état initiale et libération d'autre substrat après la formation de la liaison covalente de la molécule de l'eau et départ de glycone (HCO) et pénètre dans le site actif et attaque la liaison covalente entre le glucose, Asp et le C1 du sucre.

II.4.1.1. Alpha -amylase bactérienne

Ce type d'enzyme est obtenu principalement par fermentation de Bacillacées (Milner Et *al.*, 1997). Historiquement la première enzyme a été produite à partir de souches de *Bacillus amyloliquefaciens*, *B. Licheniformis* (Bousseboua, 2002) ou *B. Subtilis* (Mctigue *etal.*, 1995).

Cependant d'autres espèces, produisant également cette enzyme telle que *Thermobifidafusca* (Chao-Hsun Yang et Wen-Hsiung Liu, 2004), *Streptomyce ssp.* (SamratChakrabortya et *al.*, 2009).

De nombreuses amylases aux 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 \rightarrow 4) (Nadirman et al.,2006).

II.4.1.2. Alpha -amylase fongique

La production industrielle d'enzymes à partir des microorganismes fongiques existe depuis longtemps du fait que la première production de l'alpha-amylase a été réussie Par Takamine en 1894. Les producteurs principaux de l'alpha-amylase sont les Moisissures des genres *Aspergillus* et *Rhizopus*. En plus des moisissures, Les levures participent également à la production de l'alpha- amylase (Bouix et Leveau, 1999) .

Exemples des alpha amylases microbiennes : (Tableau 1)

Enzymes microbiennes	Références
Bactéries <i>Bacillus licheniformis</i> <i>Bacillus steorothermophilus</i> <i>Bacillscirculans</i> <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	(Kandraet al., 2002). (Dauteret al., 1999). (Dey et al., 2002). (Uiger et çurakoglu ,2001).
Levure <i>Saccharmycescerevisae</i> <i>Canadida</i> <i>Pichia</i> <i>Endomycopsis</i> <i>Lipomyces</i>	(Ruohonenet al., 1991 ; Wang et Kuo, 2001). (Bouix et Leveau, 1999)
Moisissure <i>Aspergillus oryzae</i> <i>Aspergillus niger</i> <i>Rhizopusoryzae</i> <i>Rhizopussp.</i> <i>Penicillium griseoroseum</i>	(Aggeret al.,1998). (Botton et al., 1990). (Lucio et al., 1996 ; Cuveillier, 1999). (Soccol et al., 1994 ; Cuveillier, 1991). (Ray, 2001).

II.5. Les particularités des α -amylases des bactéries lactiques amylolytiques :

Les enzymes impliquées dans l'hydrolyse de l'amidon sont variées et se distinguent selon leur mode d'action (endo ou exo) et selon qu'elles hydrolysent les liaisons α -1 \rightarrow 4 ou α -1 \rightarrow 6, leurs produits d'hydrolyse et leur configuration. Différents enzymes amylolytiques ont été mises en évidence chez les BLA, comme la glucoamylase, l' α -glucosidase, l'amylopullulanase et l' α -amylase.

Une caractéristique majeure des α -amylases des BLA est que leur poids moléculaire est environ deux fois supérieur à celui des α -amylases bactériennes, telles que celles produites par *Bacillus* dont le poids moléculaire se situe dans une fourchette de 50 à 60 kDa (Vihinen et Mantsiila, 1989). Ainsi, le poids moléculaire des α -amylases des BLA est par exemple de 99,5 kDa pour *Lb. plantarum* A6, 140 kDa pour *Lb. amylovorus*, 100 kDa pour *Lb. amylophilus*, et de 135 kDa pour *Lb. manihotivorans* LMG 18010T (Aguilar et al., 2000; Giraud et Cuny, 1997; Pompeyo et al., 1993).

La comparaison des cinétiques d'hydrolyse de l'amylose par les α -amylases de *Lactobacillus fermentum* Ogi E1, *Lactobacillus plantarum* A6 et *Lactobacillus manihotivorans* montre que celle produite par *Lactobacillus plantarum* A6 présente une meilleure aptitude à hydrolyser l'amidon que celles des deux autres bactéries (Talamond et al., 2002). Les auteurs ont montré également que le type d'inhibition de l' α -amylase de *Lb. fermentum* Ogi E1 par l'acarbose (inhibiteur pseudotétracosaccharidique) se différencie des amylases des autres espèces. (Tableau 2)

Enzyme	k_{cat} (s^{-1})	K_m (nM)	k_{cat}/K_m ($s^{-1} M^{-1}$) $\times 10^{-9}$	K_{11}^a (μM)	L_{11}^a (μM)	Type of inhibition
FERMENTA	130 \pm 3	130 \pm 11	1	5.27 \pm 2.41	1.73 \pm 0.15	Mixed non-competitive
MANIHOA	225 \pm 5	70 \pm 6	3.2	ns	1.52 \pm 0.09	Uncompetitive
PLANTAA	706 \pm 15	56 \pm 5	12.6	ns	1.93 \pm 0.12	Uncompetitive

^a K_{11} , L_{11} are dissociation constants of the inhibitor containing complexes EI and ESI, respectively. Amylose was substrate.

Tableau 2 : Paramètres cinétiques et constantes d'inhibition des α -amylases de *Lb. fermentum* (FERMENTA), *Lb. manihotivorans* (MANIHOA) et *Lb. plantarum* (PLANTAA)

II.6. Domaines d'application des bactéries lactiques amylolytiques

Les bouillies fermentées préparées à partir de pâtes ou de farines fermentées de céréales ou de manioc sont fréquemment utilisées en alimentation complémentaire à l'allaitement maternel du jeune enfant. La valeur nutritionnelle d'une bouillie infantile dépend, entre autre, de l'énergie disponible dans un volume donné d'aliment et de la biodisponibilité en macro et micro-nutriments.

Telles que préparées traditionnellement dans les pays en développement, les bouillies infantiles utilisées comme aliment de complément du jeune enfant (ACJE) n'ont pas une densité énergétique suffisante pour satisfaire aux besoins du jeune enfant.

Pour accroître la densité énergétique des ACJE, il faut augmenter la quantité de matière sèche, par exemple la farine, dans un même volume de bouillie, ce qui conduit après cuisson à un aliment de consistance semi-solide, inadéquate pour le jeune enfant. Pour rendre la consistance acceptable (liquide à semi-liquide), il faut donc appliquer un traitement enzymatique utilisant les α -amylases pour hydrolyser partiellement les amidons.

En général des α -amylases commerciales ou du malt sont utilisées pour réaliser cette opération. Récemment, Nguyen et *al.* (2007b) ont montré qu'il était possible de produire une bouillie infantile à base d'un mélange de farines de riz et de soja par un procédé biotechnologique impliquant l'utilisation de *Lb. plantarum*A6. Ceci concerne une voie novatrice pour produire de nouveaux aliments de compléments. Néanmoins, pour les aliments fermentés traditionnels comme le ben-saalga, les bactéries amylolytiques naturellement présentent lors de la transformation (Tou et *al.*, 2006; Tou et *al.*, 2007b).

Les bactéries lactiques amylolytiques peut fermenter plusieurs types des matières premières d'amylacés, tell que le maïs (Nakamura, 1981), la pomme

de terre (Chatterjee et *al*, 1997),ou de manioc (Giraud et *al*, 1994) et de différents substrats amylacés (Vishnu et *al* , 2000 et 2002 ; Naveena et *al*, 2003 et 2005 a, b , c).

Elles sont également impliquées dans les aliments fermentés à base de céréales tels que du pain Européenne, aigue de siegle , le pain salé d'Asie , Aigre bouillies , la production de boisson non alcoolisées, elles sont utilisées pour la production d'acide lactique dans la fermentation de l'amidon. (Chahrour,2014).

II.7. Applications industrielles d'α-amylase

La demande d'enzymes dans différentes activités industrielles a favorisé le Développement de technologie de purification surtout si elles sont simples, peu couteuses, Rapides et propres. L'α-amylase est l'une des enzymes les plus demandées pour les applications Industrielles.

La dépolymérisation de l'amidon par les amylases est à la base de plusieurs procédés tels que la production de sirops de glucose, la fabrication du pain et le brassage. Elles sont également utilisées comme additif dans les savons, les détergents et les aliments pour Animaux, ainsi que dans le traitement du papier, des textiles (Nair &Bhat, 2020; Porfirif et *al.*, 2016).

II.7.1. Détergents

Les amylases sont le deuxième type d'enzyme utilisé pour former des détergents enzymatiques, et environ 90 % de tous les détergents liquides contiennent ces enzymes. L'alpha-amylase est utilisée dans les détergents pour décomposer les résidus féculents tels que les pommes de terre, les sauces et le chocolat. En fait, l'élimination de l'amidon de la surface de la pâte est également importante pour les avantages éclaircissants (Roy et *al.*, 2012).

II.7.2. Liquefaction de l'amidon et la saccharification

Les enzymes amylolytiques sont très utilisées pour la production d'hydrolysats d'amidon, en particulier de sirops à haute teneur en fructose très utilisés comme édulcorants dans les boissons gazeuses. Le processus

comprend deux étapes enzymatiques : la liquéfaction et la saccharification. Il exploite toute une panoplie d'enzymes qui, utilisées seules ou en synergie, donnent un ensemble varié de produits (Buléon et *al.*, 1990). (Figure 1)

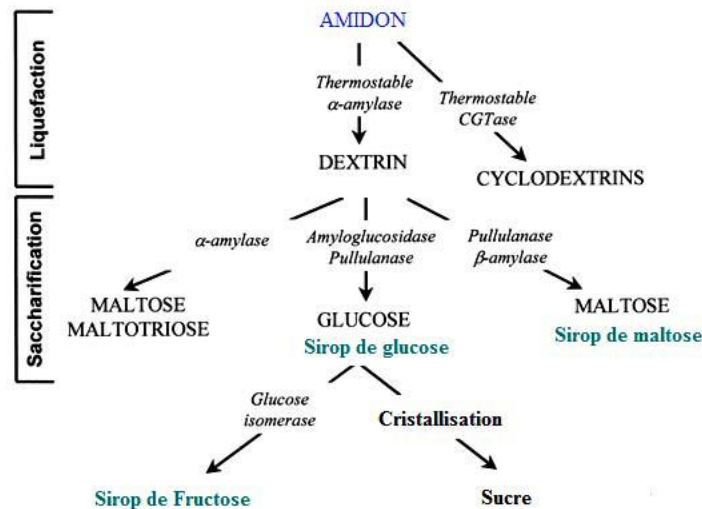


Figure 1 : Transformation enzymatique de l'amidon en sirop de glucose de maltose et de fructose

II.7.3. Désencollage des textiles :

L'amidon est un agent d'encollage préféré car il est facilement disponible, moins coûteux. La couche de l'amidon est soumise à une hydrolyse dans le procédé de désencollage où l' α -amylase est utilisée pour cliver des particules d'amidon au hasard en composants solubles dans l'eau qui peuvent être éliminés par lavage. L'enzyme agit spécifiquement sur les molécules d'amidon seul, en laissant les fibres non affectés (Ahlawat et *al.*, 2009)

II.7.4. Panifications :

L' α -amylase a des propriétés fonctionnelles liées à la qualité du pain, et l'utilisation de l' α -amylase améliore les paramètres texturaux du pain de blé et améliore les propriétés rhéologiques de la pâte. La baisse de qualité du pain due au vieillissement met en évidence le rôle anti-âge des enzymes. Il a été rapporté que l'ajout d' α -amylase réduit ce processus dans le pain (SadeghianMotahar et *al.*, 2021).

II.7.5. Industries des boissons :

Les alpha-amylases d'origine microbienne (fongique) sont impliquées dans la production de boissons gazeuses sucrées et de jus de fruits (Laiche, 2019).

II.7.6. Domaine pharmaceutique

Les α -amylases sont utilisées comme :

1. Agents anti-inflammatoires

Des aides pour le traitement des troubles digestifs (Mobini-Dehkordi et Javan, 2012), tels que : les dyspepsies et les fermentations intestinales (Nouadri, 2011).

2. Traitement de diabète et de l'obésité (Niélsou et *al*, 2001).

II.7.7. Pâtes et papiers :

Dans l'industrie des pâtes et papiers, les alpha-amylases d'origine bactérienne sont utilisées pour liquéfier les colles d'amidon couramment utilisées. La liquéfaction de l'amidon sert à préparer des sauces de couchage renfermant en suspension des matières minérales finement divisées. L'opération du couchage permet d'éliminer les irrégularités superficielles de la feuille de papier qui vient d'être formée, tout en substituant une microporosité artificielle à sa macroporosité naturelle. Pour le carton ondulé, on utilise des colles d'amidon pour les joints de colle qui permet de fixer la cannelure sur la couverture (Aviron-Violet et *al.*, 1982). De plus, les enzymes améliorent la consistance des pâtes et le blanchissement de ces dernières (Remi SAUREL, Dr. Nadia OULAHAL ; 2013).

II.7.8. Production d'alcool carburant :

L'éthanol est le biocarburant liquide le plus utilisé. L'amidon est le substrat le plus couramment utilisé pour la production d'éthanol en raison du faible coût et de la disponibilité immédiate des matières premières dans la plupart des régions du monde.

Cette fabrication nécessite de dissoudre l'amidon puis de le soumettre à deux étapes enzymatiques pour obtenir des sucres fermentescibles. La bioconversion de l'amidon en éthanol consiste en la saccharification par liquéfaction, qui convertit l'amidon en sucre à l'aide de micro-organismes et d'enzymes dégradant l'amidon tels que l' α -amylase, et la fermentation, qui convertit le sucre en éthanol à l'aide de micro-organismes fermentant l'éthanol tels que la levure. *Saccharomyces cerevisiae*. La production d'éthanol par fermentation de levure joue un rôle important dans l'économie brésilienne. Pour obtenir une nouvelle souche de levure capable de produire de l'éthanol directement à partir d'amidon sans avoir besoin d'un processus de saccharification séparé, une fusion de protoplastes entre les levures dégradant l'amidon *Saccharomyces fibuligera* et *S. cerevisiae* a été réalisée. Parmi les bactéries, les α -amylases obtenues à partir de bactéries tolérantes à la chaleur telles que *Bacillus licheniformis*, ou à partir de souches modifiées d'*Escherichia coli* et de *Bacillus subtilis*, sont utilisées dans la première étape d'hydrolyse des suspensions d'amidon. (de Souza & de Oliveira Magalhaes, 2010)

PARTIE III. MATERIEL ET METHODES

Matériels et méthodes

Notre étude a été réalisée au niveau du laboratoire pédagogique, département de Science Biologique de l'Université Docteur Moulay Taher « Saida ».

Il consiste à Sélectionné et optimisé les conditions de culture pour la production d'alpha-amylase à partir des souches lactiques.

III.1. Souches bactérienne

Au cours de cette étude, nous avons utilisé Dix souches de bactéries lactiques productrice d'alpha amylase fournis par Mme Chahrour w, Melle Mentifa I, *Lactobacillus plantarum* codée 7 ,D1, 10', AB :

Lactobacillus plantarum 7, a été isolé du ensilage de Sorgho , qui sont génétiquement identifiées par le séquençage du gène d'ARNr 16S.

Les isolats 11 , 2 , 8, AB , 10 ont été isolé à partir de légume fermenté ; et les isolats X, 9, 4 ont été isolé à partir de Blé fermenté, ces huit isolats ont été considéré comme des souches présomptif Bactéries lactique puisque ils été Gram positif et Catalase Négatif.

Toutes Les souches ont été maintenues sous forme de stocks congelées (-20°C) dans le Milieu Lait écrémé additionné de 30% de glycérol. La revivification des souches a été réalisée par repiquages dans de bouillon MRS et incubées à 30°C pendant 24h.

III.2. Purification :

La purification des souches isolées a été réalisée par repiquages successifs sur gélose MRS par la méthode des stries. L'incubation a été réalisée à 30°C pendant 48h (Kacem et Karam, 2006, Cheriguene et *al.*, 2007).

La pureté des souches est révélée par la présence sur gélose de colonies homogènes ayant le même aspect, la même couleur, la même taille et la même forme (Guiraud, 2004).

La coloration de Gram a été faite pour confirmer la pureté des souches.

Les souches à Gram + et catalase - sont retenues pour la suite de l'étude.

III.3. Pré-identification des isolats

III.3.1. Test morphologique

III.3.1.1. Examen macroscopique

Cette étude est basée sur l'observation visuelle de la culture des isolats sur milieu MRS solide et liquide ; pour caractériser la forme, la taille, la couleur, le contour, et la position des colonies sur milieu MRS solide (en profondeur, en milieu ou à la surface) BADIS et *al.*, (2004) et le trouble dans le milieu liquide.

En effet, les colonies des lactobacillus dépendent généralement au critère morphologique suivant : Un diamètre compris entre 0.5 et 1 mm, lisses, d'une forme circulaire, blanche, grisâtre (HOLZAPFEL et *al.*, 2009 ; SÄDE, 2011) et a contour régulier (BADIS et *al.*, 2005; BADIS et *al.*, 2004)

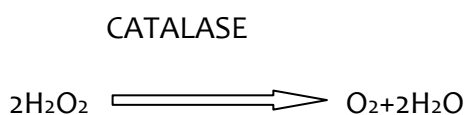
III.3.1.2. Examen microscopique

La coloration de Gram permet de déterminer le type de ces bactéries et la morphologie des cellules (LARPENT, 1990). Elle consiste à distinguer entre deux types différents des bactéries par rapport leurs constituants de la paroi bactérienne, c'est une étape très importante dans l'identification du genre (BADIS et *al.* 2004), elle est effectuée sur des colonies ont des caractères morphologiques des souches lactiques.

III.3.2. Test biochimique

III.3.2.1. Recherche de la catalase

L'objectif de ce test est de faciliter la distinction entre les bactéries lactiques à catalase négative des autres souches non lactiques. La catalase est une enzyme respiratoire qui permet la dégradation du peroxyde d'hydrogène en eau et oxygène :



La recherche de la catalase se fait par la mise en contacte d'une colonie bien isolée avec une goutte d'eau oxygéné (sur une lame). La réaction positive se traduit par un dégagement immédiat de bulles de gaz et le contraire est négatif (MARCHAL et *al.*, 1991). Seules les bactéries à catalase négatif sont retenues.

III.3.2.2. Test Hydrolyse de l'arginine :

la recherche de l'arginine di-hydrolase a été recherchée sur milieu M16 BCP (annexe 2).

L'hydrolyse de l'arginine par les souches peut acidifier le milieu, les colonies donnant ainsi une coloration jaunâtre du milieu grâce à la présence d'indicateur de pH (BCP). D'autres bactéries lactiques sont capable d'utiliser l'arginine et ré-alcalinisent le milieu, leur colonies apparaissent blanchâtres sur fond violet (Thomas, 1973).

III.3.3. Tests physiologiques :

Tests physiologiques, ce test a été réalisé juste pour les deux souches *Lactobacillus plantarum* 7 et *lactobacillus* 10, ces souches ont été sélectionnées pour subir le suivie cinétique.

a) Croissance à différentes températures

Ce test est important de point de vue taxonomique, car il permet de distinguer les bactéries lactiques mésophiles des bactéries lactiques thermotolérant, il a été réalisé après inoculation du bouillon MRS par des cultures fraîches, les cultures ont été incubés à différentes températures 45°C.

La croissance est révélée par un trouble du milieu après 24 à 48 heures en comparaison avec un témoin non ensemencé (Guiraud et Galzy, 1980).

b) Croissance en présence de différentes concentrations de NaCl

Des tubes stériles contenant le bouillon MRS à 6.5% et 9.64 % de NaCl ont été ensemencés avec une pré-culture de 18h, l'incubation a été faite à 30°C pendant 24 heures à 48h (Guiraud et Galzy, 1980).

La croissance de ces bactéries se manifeste par un trouble du milieu en comparaison avec un tube témoin non ensemencé.

c) La thermorésistance des bactéries :

se fait après exposition des isolats au bain-marie à 63.5°C pendant 30 min puis ré-incubée à 30°C/24h à 48h (Guiraud., 2003).

d) Croissance à pH 4 et 9,6

Ce test a été réalisé sur bouillon MRS, dont le pH est ajusté à 4 et 9,6, et cela en ensemencant un tube contenant 7ml du bouillon MRS à pH voulue avec une colonie prise de la gélose MRS. La croissance se traduit par un trouble du milieu après 24 à 48 heures à 30°C (Guiraud et Galzy, 1980).

III.4. Activité amylolytique

À partir des pré-cultures de 18h, les souches ont été ensemencées par touche sur le milieu MRS Amidon (Brabet et al, 1996), puis incubées à 30 °C pendant 48h.

L'activité amyolasique a été révélée par la présence d'une zone claire autour des colonies (Thapa et al, 2006)

III.5. Conservation des isolats

Pour assurer une bonne continuité du travail, les souches doivent être conservées dans des conditions adéquates.

La conservation d'une souche pure a comme but de maintenir ces souches pures à conserver viable, Les souches présumées comme LAB (Gram positif et catalase négative) sont conservées à court terme (courte durée) sur la gélose MRS; après ensemencement et croissance à la température optimale, les cultures sont maintenues à 4°C et le renouvellement des souches se fait par repiquage toutes les quatre semaines sur bouillon MRS.

A partir des cultures jeunes (18-48 h) sur milieu liquide, les cellules sont récupérées par centrifugation à 4000 t/min pendant 10 min. Une fois le surnageant éliminé, on ajoute le milieu de culture de conservation sur le culot. Le milieu de conservation contient du lait écrémé, 0,2% d'extrait de levure et 30% de glycérol. Les cultures sont conservées en suspension dense et en tubes eppendorf à -20°C. En cas de besoin, les cultures sont repiquées dans le lait écrémé à 0,5% d'extrait de levure, avant utilisation (Saidi et al., 2004).

III.6. Cinétique de croissance et de production d'alpha amylase

Deux souches (*Lactobacillus plantarum* 7 et *Lactobacillus* 10) ont été sélectionnées à partir de dix souches productrice d'alpha amylase afin d'étudier la cinétique de croissance dans différents milieux :

1. Le milieu MRSA : ce milieu contient 3% d'amidon comme la seule source de carbone, avec un Ph =6,2
2. Le milieu MRS d'où la seule source de carbone est 3% de Glucose (Témoin)
3. Le milieu MRS AG : c'est un milieu qui contient deux sucres de carbone,
 - MRS AG50 : pour ce milieu le Glucose et l'amidon sont présent en quantité égale, avec un pH =6,2
 - MRS AG80/20 : pour ce milieu le Glucose et l'amidon sont présent en quantité inégale, de ce fait ; ce milieu est composé de 80% d'amidon et 20% de Glucose. Avec un pH =6,2
4. Le milieu MRS A5 et MRS A8 ces deux milieux sont composé de MRS A mais à différents pH .
 - MRS A5 = MRS A avec un pH 5 et MRS A8 = MRS A avec un pH8
 - La composition de chaque milieu est détaillée dans l'annexe 2

Les deux souches choisies ont étéensemencées tous d'abord sur MRS liquide et incubée à 30°C pendant 18 h, ensuite 1 ml a été inoculé dans des flacons contenant 100 mL de (MRS, MRS A, MRS AG50, MRS AG80/20, MRS A5 et MRS A8) incubé à 30 °C pendant 18 h.

Cette préculture a été additionnée à raison de 1% à un flacon contenant 100 mL de milieu déjà cité.

La croissance a été estimée par la mesure de la densité optique à 600 nm. La DO a été mesurée chaque Trois heures pendant 54h.

III.6.1. Mesure de la croissance

La croissance a été estimée par la mesure de la densité optique à 600 nm.

La caractérisation de la croissance bactérienne est réalisée par la détermination du taux de croissance moyen (μ) dans la phase exponentielle. Le taux de croissance représente le nombre de division bactérienne par heure, il correspond à la pente de la phase exponentielle de croissance de la courbe log N. Les taux de croissance sont calculés selon l'équation de Monod :

$N = N_0 2^{\mu t}$ ou N est la densité bactérienne. Les taux de croissance sont alors calculés en choisissant deux points dans la phase exponentielle et leurs points correspondants du temps (Widdel, 2007), en appliquant l'équation suivante :

$$\mu = (\ln A_{600} \text{ finale} - \ln A_{600} \text{ initiale}) / (t_2 - t_1)$$

Tandis que, le temps de génération, le temps nécessaire au doublement de la population (en minutes), a été déterminé en appliquant l'équation suivante :

$$G = 1/\mu$$

Les vitesses spécifiques de chaque paramètre ont été estimées par régression linéaire dans la phase exponentielle et le calcul de la pente représente la vitesse appropriée.

III.6.2. Dosage de l'amidon résiduel

Avant le dosage de l'amidon une gamme étalonne a été effectuée ; en utilisant une solution d'amidon et une solution de Lugol diluer de 1/9.

Pour la détermination de l'amidon résiduel, 1 ml de la culture a été ajoutée à 2,4 ml d'une solution d'iode et sa densité optique a été lue à 620 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (Fossi et Tavea , 2013).

PARTIE IV. RESULTATS ET DISCUSSION

IV.1. Revivification et purification des souches lactiques

Suite à la revivification des dix souches lactiques sur bouillon MRS à 30°C pendant 48 heures, il apparaît un trouble dans les tubes. La purification de ces souches a été réalisée sur MRS gélosée et confirmée par une observation macroscopique et appréciée par le test de catalase et une coloration de Gram.

Aux cours de purification, nous avons constaté que certain souches n'été pas pure, cel été réveillé par l'apparition des nouveaux caractères macroscopique, microscopique ou bien aux niveaux de test de Catalase; donc ce cas-là aux cours de la purification on a essayé de prendre tous types de colonies possibles.

De ce fait le nombre des souches est devenus D_{1G},D_{1P} , Z',7'P ,7'G ,AB_P, AB_G, 4_G, 10'_P,10'_G,9_P, 9_G, K_P,K_G, 11_G,11_P,8, X, aux lieux de dix souches.

IV.1.1. Examen macroscopique

L'observation à l'œil nu des cultures sur gélose MRS a révélé des colonies visibles, de tailles similaires de forme ronde avec une couleur blanchâtre et de petite taille (environ 2 mm de diamètre), (voir le tableau 3 et figure 2) :

Tableau 3 : Examen macroscopique et microscopiques des souches lactiques étudiées.

Les souches	Gram	forme	catalase	Mise en evidence
D _{1G}	+	COQUE	-	-
D _{1P}	+	BACILLE	-	-
Z'	+	COQUE	-	-
8	+	COQUE	-	-
4 _G	+	COQUE	-	-
AB _G	+	BACILLE	-	-

ABP	+	BACILLE	-	++
10G	+	COQUE PETIT	-	-
10P	+	COCOBACILLE	-	+++
9P	+	Coque	-	-
9G	+	Coque	-	-
KP	+	Coque	-	-
KG	+	coque	-	-
11G	+	Coque	-	-
11P	+	Coque	-	-
7'G	+	Coque	-	+++
7'P	+	Coque	-	+++
X	+	Grand bacille	+	++++

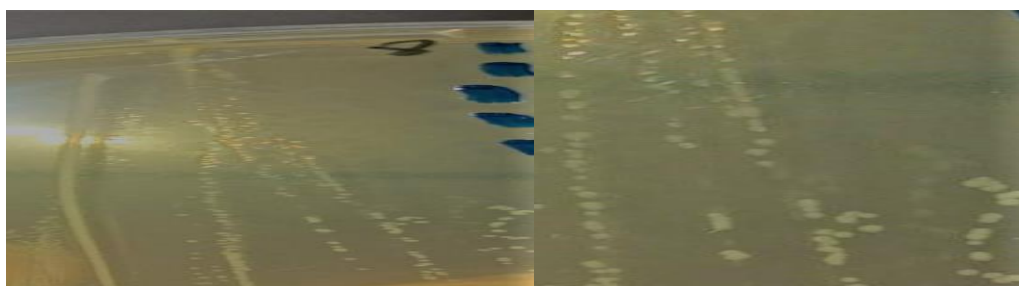


Figure 2 : aspect macroscopique de la souche 8 isolée à partir des légumes sur milieu MRS à 30°C pendant 72h.

IV.1.2. Examen microscopique

La caractérisation microscopique basée sur la coloration de Gram a donnée une coloration Gram positif, des bactéries de forme cocci, et bâtonnets pour les Lactobacilles (voir figure 3). Cette description confirme les résultats données par Carr et *al.*, 2002.

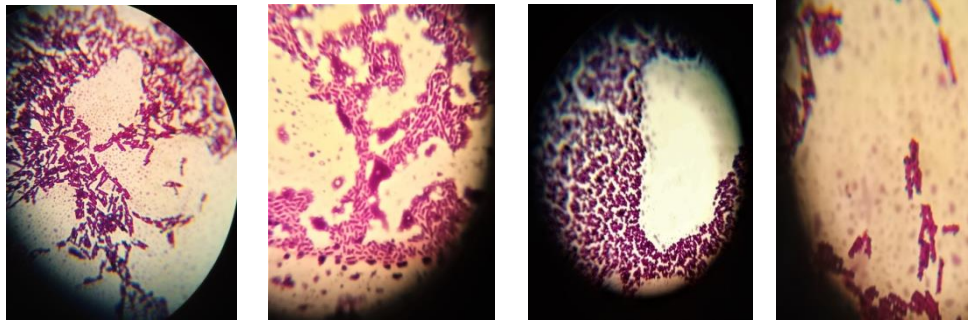


Figure 3 : Observation microscopique des souches revivifiées

IV.1.3. Test de Catalase

Le test catalase est considéré comme un test d'orientation, donc toutes les bactéries lactiques ayant un catalase négatif; tous les isolats ont été Catalase négatif sauf l'isolat « X » a été catalase positif (tableau 3).

IV.2. Pré-identification des isolats

Cette étape a été réalisée sur 02 souches 10'_p, 7'_p qui ont été bacille Gram positive, catalase négative et homofermentaire, donc susceptible d'être des lactobacilles.

Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau 4, d'après le tableau les deux souches de Lactobacillus 7'_p et 10'_p ont été thermorésistantes et thermophiles; peuvent croître dans un intervalle de pH (4.5/9.6) et on peut les considérer comme halophiles puisque peuvent croître à un milieu hyper salé (MRS à 6.5% de NaCl)

La souche Lactobacillus 7'_p a été une souche homofermentaire autrement Lactobacillus 10'_p produit le Co₂ à partir de glucose d'où le type fermentaire est hétérofermentaire, toutes les souches sont capables d'hydrolyse l'arginine .

Tableau 4 : Résultats des caractères physiologiques et biochimiques des 2 souches (7'p , 10'p).

isolats	Type Fermentaire (Co2/glucose)	MRS _{PH=9.} 6 à 45C°	MRS _{PH=4.} 5 à 45C°	Thermorésistante	Hydrolyse Arginine	forme	Gram	Catalase
7'p	Homorofermentation	+	+	+	Jaunâtre	b acille	+	-
10'p	Homorofermentation	+	+	+	Jaunâtre	Cocco- bacille	+	-

IV.3. Résultats d'étude de l'activité amylolytique

À partir des pré-cultures de 18h, les souches ont été ensemencées par touche sur le milieu MRS Amidon (Brabet et al, 1996), puis incubées à 30 °C.

Après incubation de 48h sur milieu MRS ou l'amidon représente la seule source d'énergie. On a observé une croissance lente des spots.

La révélation de l'activité amylolytique a été détectée par l'ajout direct de la solution Lugol (Annexe 2), après un moment donné.

L'activité amylolytique a été révélée par la présence d'une zone claire autour des colonies (figure 4).

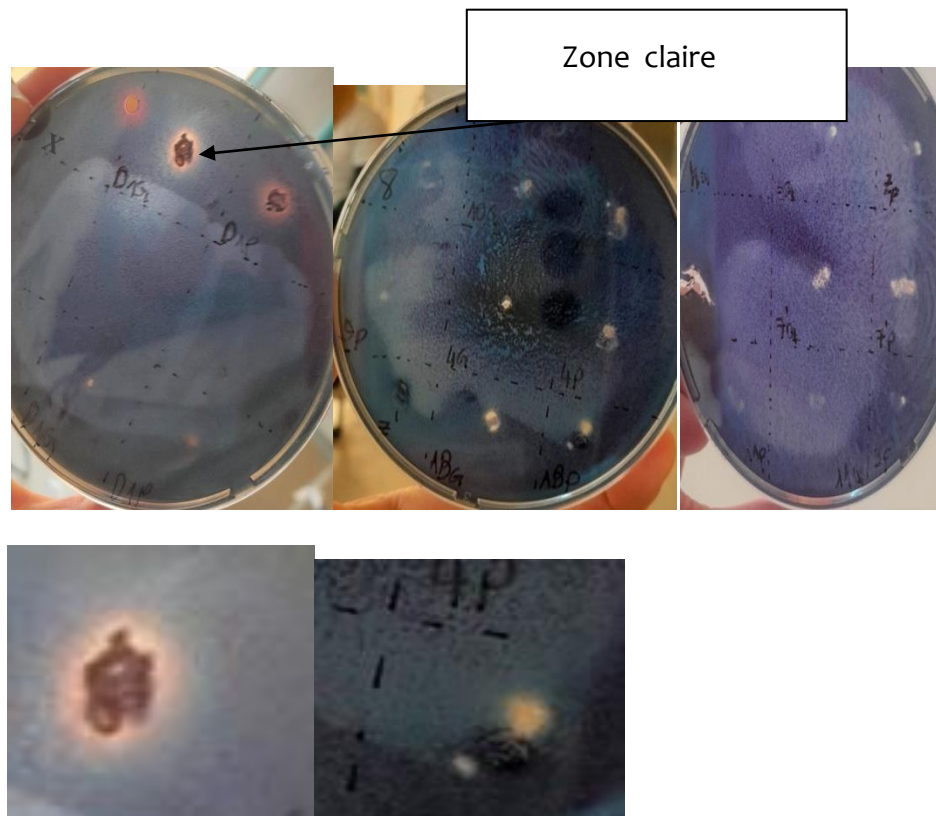


Figure 4 : Mise en évidence des Activités amylolytiques les 21 souches.

IV.4. Cinétique de croissance des souches à différents paramètres :

Dans le présent travail, nous avons testé que deux souches lactiques amylolytiques appartenant au genre *Lactobacillus*, en suivant la croissance dans différents milieux : MRS, MRS_A, MRS_{AG50}, MRS_{AG80}; MRS_{A5} et MRS_{A8} en fonction du temps.

Les résultats obtenus sont résumés dans les figures suivantes : 5, 6, 7, 8, 9, 10 .

Ce test est appliqué sur les souches lactiques 7'p /10'p, à chaque point d'observation choisis (1h , 3h , 6h , 9h.....72h) ; la croissance bactérienne a été suivie par la mesure de la densité optique à 600 nm à l'aide d'un spectrophotomètre .

IV.4.1. Cinétique de croissance sur milieu MRS_G :

L'analyse de croissance des courbes fournit des valeurs de taux de croissances variables entre les 2 souches : la souche 7' p présente une valeur max 0.095 h^{-1} , avec un temps de génération de 437.77 min , et la souche 10'p présente une valeur minimale par rapport à la souche 7' p avec $\mu = 0.051 \text{ h}^{-1}$ et $G = 804.36 \text{ min}$ (figure 5).

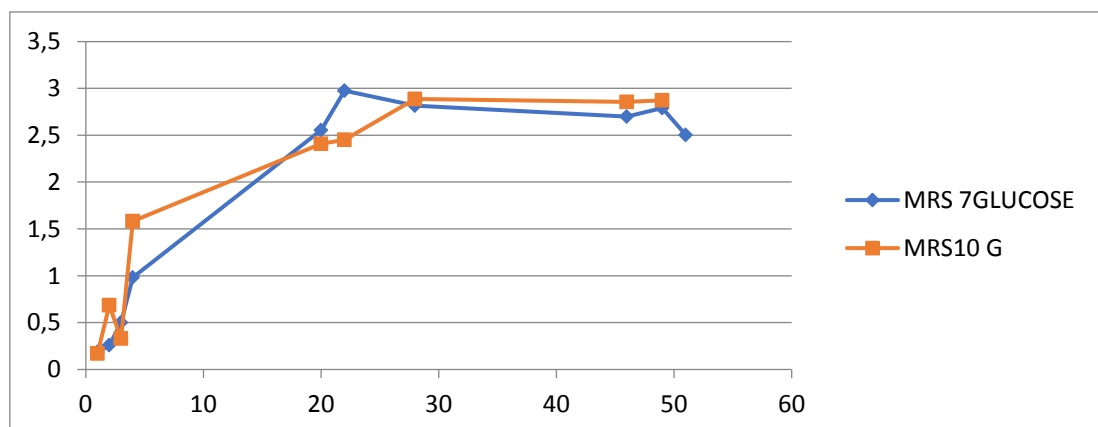


Figure 5 : La croissance bactérienne exprimée en DO dans le milieu MRS GLUCOSE

IV.4.2. Cinétique de croissance sur milieu MRS_A:

l'analyse de croissance des courbes fournit des valeurs de taux de croissances variables entre les 2 souches : la souche 10'p présente une valeur max $8,04 \times 10^{-3} \text{ h}^{-1}$ avec un temps de génération de 5172,74 min ; et la souche 7'p présente une valeur minimale par rapport à la souche 10' p avec $\mu = 2,53 \times 10^{-3} \text{ h}^{-1}$ et $G = 16438 \text{ min}$ (figure 6).

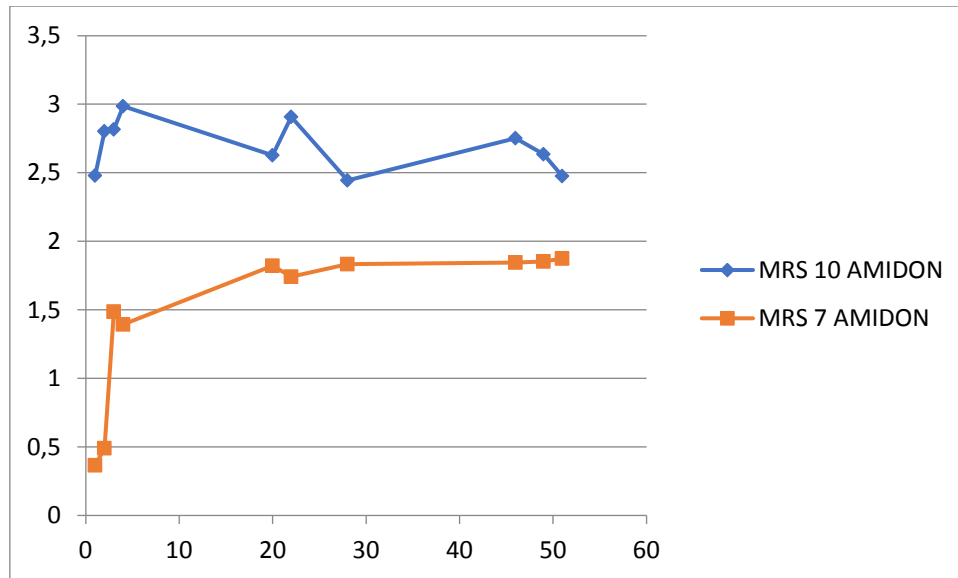


Figure 6 : La croissance bactérienne exprimée en DO dans le milieu MRS AMIDON

IV.4.3. Cinétique de croissance sur milieu MRS_{A/G} (50/50) :

l'analyse de croissance des courbes fournit des valeurs de taux de croissances variables entre les deux souches : la souche 7'p présente une valeur max 0.024 h^{-1} avec un temps de génération de 1695.49 min ; et la souche 10'p présente une valeur minimale par rapport à 7'p avec $\mu=0.020 \text{ h}^{-1}$ et $G= 2021.99 \text{ min}$ (figure 7).

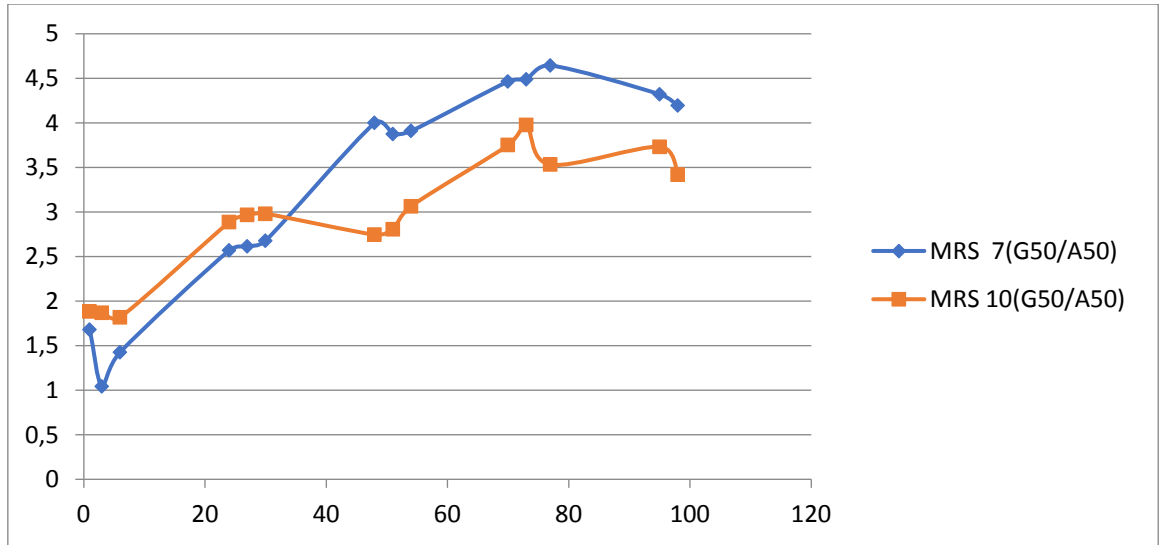


Figure 7 : la croissance bactérienne exprimée en DO dans le milieu MRS GLUCOSE₅₀/AMIDON₅₀ .

IV.4.4. Cinétique de croissance sur milieu MRS_{A/G (20/80)} :

l'analyse de croissance des courbes fournit des valeurs de taux de croissances variables entre les deux souches : la souche 7'p présente une valeur max $8.61 \times 10^{-3} \text{ h}^{-1}$ avec un temps de génération de 4830.29 min ; et la souche 10'p présente une valeur minimale par rapport à 7'p avec $\mu = 4.37 \times 10^{-3} \text{ h}^{-1}$ et $G = 9516.89 \text{ min}$ (figure 8).

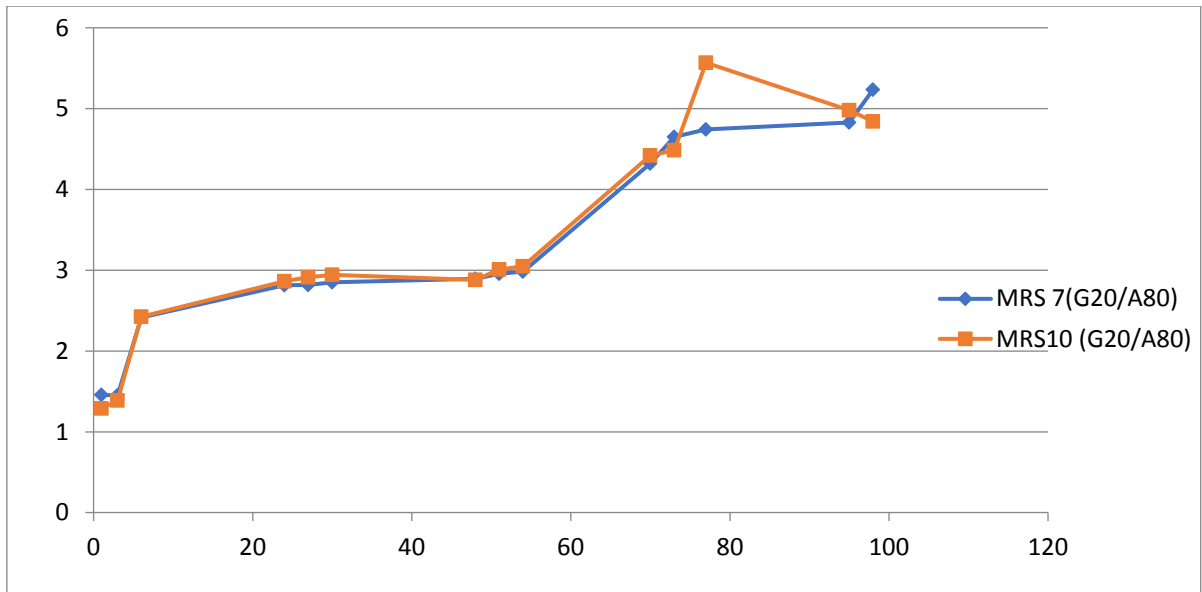


Figure 8 : la croissance bactérienne exprimée en DO dans le milieu MRS GLUCOSE₂₀/AMIDON₈₀.

IV.4.5. Cinétique de croissance sur milieu $MRS_{A3\%}$ PH=8 :

l'analyse de croissance des courbes fournit des valeurs de taux de croissances variables entre les deux souches : la souche 7'p présente une valeur max 0.022 h^{-1} avec un temps de génération de 1822 min ; et la souche 10'p présente une valeur minimale par rapport à 7'p avec $\mu = 0.021 \text{ h}^{-1}$ et $G = 1963.2 \text{ min}$ (figure 9).

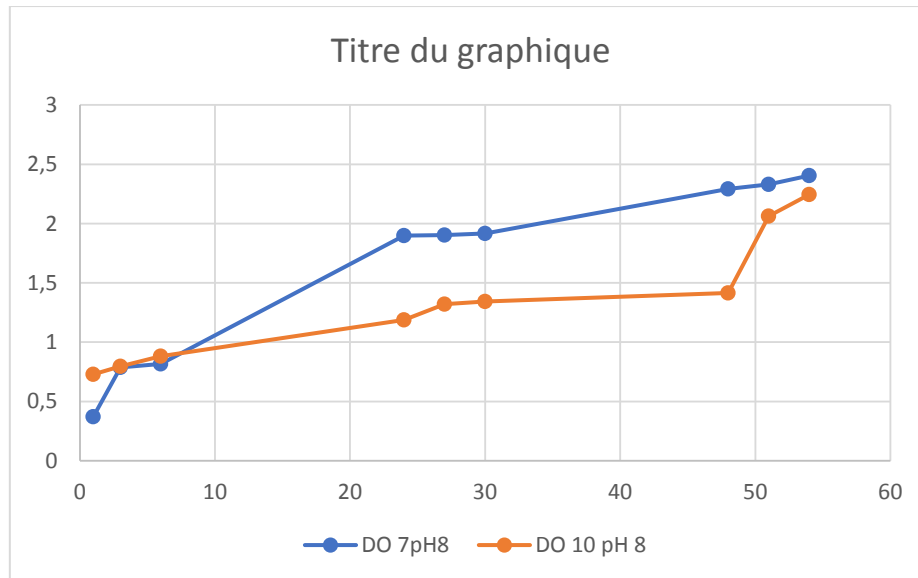


Figure 9 : la croissance bactérienne exprimée en DO dans le milieu MRS AMIDON 3% AU PH =8

IV.4.6. Cinétique de croissance sur milieu MRS_A 3% PH=5 :

l'analyse de croissance des courbes fournit des valeurs de taux de croissances variables entre souches : la souche 7'p présente une valeur max 0.026 h^{-1} avec un temps de génération de 1599.57 min ; et la souche 10'p présente une valeur minimale par rapport à 7'p avec $\mu = 0.019 \text{ h}^{-1}$ et $G = 2188.8 \text{ min}$ (figure 10).

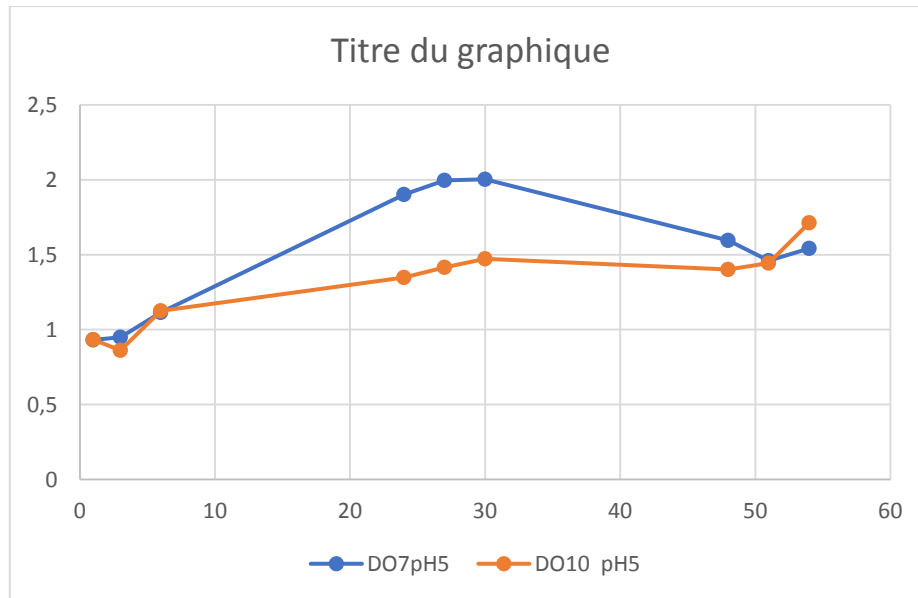


Figure 10 : la croissance bactérienne exprimée en DO dans le milieu MRS AMIDON 3% AU PH =5

Dans ce présent travail, nous avons essayé d'étudier le comportement des bactéries lactiques productrices d'alpha amylase en fonction des paramètres chimiques et physiologiques.

La première étape de cette étude consiste à réactiver des souches déjà isolé à partir de blé et légume fermenté, puis re-testé l'activité amylasique.

En basant sur des caractères phénotypiquement les isolats appartenant au genre : Lactobacillus.

Dans ce présent travail, nous avons essayé d'étudier le comportement des bactéries lactiques productrices d'alpha amylase en fonction des paramètres chimiques et physiologiques.

La première étape de cette étude consiste à réactiver des souches déjà isolé à partir de blé et légume fermenté, puis re-testé l'activité amylasique.

En basant sur des caractères phénotypiquement les isolats appartenant au genre : *Lactobacillus*.

Les souches de *Lactobacillus plantarum* 7, *Lactobacillus* 10 possèdent une activité amylolytique importante par rapport aux autres souches, de ce fait le suivie cinétique de croissance en fonction des différents paramètres été l'objectif de notre recherche.

La croissance sur milieu MRS à différentes sources de carbone permet de savoir que le glucose est la source la plus utilisée directement par ; d'autre part l'amidon présente une autre source de carbone utilisable par les bactéries lactiques qui ont un pouvoir de synthétiser et produire α amylase; cette utilisation peut conduire à des faibles rendements de croissance qui ont été causés par un flux d'énergie dirigé vers d'autres fonctions cellulaires; l' α amylase produites par ces souches caractérisée par une bonne activité à pH acide , mais les souches *Lactobacillus plantarum* 7 et *Lactobacillus* 10 présente une diauxie dans un milieu qui contient 80% d'amidon et 20% de Glucose ; avec un taux de croissance remarquable par rapport aux *Lactobacillus plantarum* 7.

Les taux de croissance spécifique faible avec des temps de doublement supérieurs représentent généralement une croissance respiratoire.

La production d'enzymes amylolytiques par des souches fongiques est largement étudiée car ces derniers sont utilisables dans le domaine industriel, l'optimisation des conditions de production d'alpha amylase a été l'objectif de nombreuses études telles que : *Bacillus subtilis* (Mahmood et al., 1998) et par *Aspergillus niger* (Djekrif-Dakhmouche et al. 2006 ; Mukesh et al., 2010), *Trichoderma reesei* (Momein et al., 2003) et *Aspergillus oryzae* (Raviyan et al., 2003)

Selon nos connaissances ; peu de travaux sur les conditions de production d'alpha amylase cela peut expliquer selon Karkketa et al. ; 2023 que très peu de bactéries lactiques amylolytiques ont actuellement une forte capacité à générer de l'acide lactique à des concentrations élevées en substrat telle que l'amidon.

Les bactéries lactiques avec leur activité amylasique omniprésentes dans les produits alimentaires fermentés peuvent être utiles pour le processus de bio-préservation du fourrage, et qui résistent à conditions défavorables telles que la compétition nutritionnelle et la carence en source de sucres fermentescibles.

PARTIE V. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Conclusion

Un lot des souches lactiques isolées à partir de l'ensilage de sorgho, blé, légumes et conservées dans lait écrémée.

La mise en évidence de l'activité α -amylasique a été effectuée pour déterminer et sélectionner des souches productrices d' α -amylase d'intérêt industriel.

Les souches 7^p , 10^p ont été sélectionnées car, elles ont montrées la meilleure activité α -amylasique.

Une faible activité enzymatique a été mesurée chez les souches : ABP, ABG, 10^G, 4^P, 4^G, 7^G.

Lactobacillus plantarum 7 et *Lactobacillus* 10 ont été thermorésistantes et thermophiles, peuvent croître dans un intervalle de pH (4.5 / 9.6), elles sont capables d'hydrolyser l'arginine.

La souche *Lactobacillus* 7^p a été homofermentaire et la souche *Lactobacillus* 10^p produit le CO_2 à partir de glucose d'où le type fermentaire est hétérofermentaire.

On conclut que : L'optimisation des paramètres chimique et physiologique de la production enzymatique permet de déterminer les conditions optimales de la production : dans le milieu **MRS_{A5}** , aussi dans le milieu **MRS_{A/G (50/50)}**.

Lactobacillus plantarum 7 est plus productrice (performante) que *Lactobacillus* 10 .

PARTIE VI. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques :

- Béal c, marin m, fontaine e, fonseca f et obert j.p, (2008). Production et conservation des ferments lactiques et probiotiques. In : bactéries lactiques, de la génétique aux ferments (corrieu g. Et luquet f.m.). Tec et doc, lavoisier. Paris. 661.
- Belkheir, k. (2017). Caractérisation technologique de nouvelles souches de bactéries lactique isolées du lait de chamelle d’algérie réalisation de ferments lactiques. Génie microbiologique, oran 1 ahmed ben bella. Doctorat 198.
- Hammi, i. (2016). Isolement et caractérisation de bactériocines produites par des souches de bactéries lactique isolées à partir de produits fermenté marocains et de différentes variétés de fromages français. Strasbourg et sidi mohamed ben abdallah. Doctorat: 14
- Ait Kaki A. (2004). Isolement de la moisissure *Rhizopus oryzae* et optimisation d’un milieu à base de lactosérum pour la production de l’ α -amylase. Thèse de magistère. Université Mentouri Constantine.
- Awwioroko, O. J., Anigboro, A. A., Unachukwu, N. N., & Tonukari, N. J. (2018). Isolation, identification and in silico analysis of alpha-amylase gene of *Aspergillus niger* strain CSA35 obtained from cassava undergoing spoilage. *Biochemistry and Biophysics*
- Bennama, r. (2012). *Streptococcus thermophilus* : isolement et recherche systématique de souches indigènes productrices d’exopolysaccharides, oran. Doctorat: 153
- BENREGUIEG Mokhtar .(2015). Propriétés Antibactériennes et Probiotiques de Bactéries Lactiques Isolées à Partir du Lait de Vache, de Chèvre et de Brebis dans la région de l’Ouest Algérien. Biotechnologie Ed. Lavoisier. 344-400
- Bouix M. et Leveau J. Y. (1999). Production des enzymes. In Scriban R (Ed) :

- Bousseboua H. (2002). Eléments de Microbiologie Générale. Programmes de graduation. Editions de l'Université Mentouri. Constantine Algerie p.230-231
- BOUZIANE FADILA CHAOUI BADIRA IMENE (2021). Biopréservation des aliments par les bactéries lactiques à caractère antifongique .
- Chao-Hsun Y. et Wen-Hsuing L. (2004) .Purification and properties of a maltotrioseproducing Alpha amylase from *Thermobifida fusca*, Institute of Microbiology and Biochemistry, National Taiwan University; Enzyme and Microbial Technology. (35):254-59.
- De Souza PM, de Oliveira Magalhães P. Application of microbial α -amylase in industry - A review. Braz J Microbiol. 2010;41(4):850-861. doi:10.1590/S1517-83822010000400004
- Diop, M. B., Destain, J., Tine, E., & Thonart, P. (2010). Les produits de la mer au Sénégal et le potentiel des bactéries lactiques et des bactériocines pour la conservation. *Base*.
- Edima, H. C. (2007). *Carnobacterium maltaromaticum: caractéristiques physiologiques et potentialités en technologie fromagère* (Doctoral dissertation, Institut National Polytechnique de Lorraine). endomycorrhizal fungi and coincidence with vascular land plants. *Nature*. 363: 67-69.
- **Guiraud ,1998** Microbiologie alimentaire. 1e Ed.. Dunod, Paris, 136-144.
- **Guiraud J P, 2003** Microbiologie alimentaire. Tec & doc, dunod. Paris. 90-292.
- Hernandez-Montanez Z., Juarez-Montiel M., Velazquez-Avila M., Cristiani-Urbina E., Hernandez Rodríguez C., Villa-Tanaca L. and Chavez-Camarillo G. (2012). Production and characterization of extracellular α -amylase produced by *Wickerhamia* sp. X-Fep. *Appl Biochem Biotechnol*. 167(7) : 2117-29. isolées à partir de blé fermenté (Doctoral dissertation, Université de Mostaganem-
- Laiche, A. touhami. (2019). *Production d'enzymes amylolytiques chez des souches levuriennes isolées à partir de deux origines (sol saharien et blé) et cultivées sur milieu à base de lactosérum* [Thèse doctorat]. Université Kasdi Merbah.

- Larpent G .M et Sanglier J. J. (1992). Biotechnologies. Principes et méthodes. P : 574-581.
- Leveau j.y. Et bouix m., 1993. Microbiologie industrielle : les microorganismes d'intérêt industriel. Tec & doc, lavoisier. Paris. 85-87. Abdelhamid Ibn Badis), p26.
- Leveau J.Y., Boiux M. et De Roissart H.B., (1993). La flore lactique : technique d'analyse et de contrôle dans les industries agro alimentaires. 2e Ed., Tec & Doc, Lavoisier. Paris. 3 : 2-40.
- MAKHLOUFI, K. M. (2012). Caractérisation d'une bactériocine produite par une bactérie lactique *leuconostoc pseudomesenteroides* isolée du boza, pierre et marie curie – paris. Doctorat: 229
- Maktouf, S., Moulis, C., Kamoun, A., Chaari, F., Ellouz Chaabouni, S., Remaud-Simeon M.2013.A laundry detergent compatible lichenase: Statistical optimization for production under solid state fermentation on crude millet Industrial Crops and Products, 43, 349-354
- MATAMOROS, S. (2008). Caractérisation de bactéries lactiques psychrotrophes en vue de leur utilisation dans la biopréservation des aliments. Étude physiologique et moléculaire des mécanismes d'adaptation au froid, NANTES. Doctorat: 189.
- MC Tigue, Kelley C.T., Doyle E.M.et Fogarty W.M. (1995). The alkaline amylase of the alkalophilic *Bacillus* sp. IMD 370. Enzyme and Microbial Technology. (17):570-573.
- McMahan E .M., Kelly C.T. et FogartyW.M. (1999). High maltose producing amylolytic system of a *Streptomyces* species. Biotechnology Letters. 21, p: 23-26.
- Milner J.A., Martin D.J.et Smith A. (1997). Two-stage inoculate for the production of alphaamylase by *Bacillus amyloliquefaciens*. Enzyme and Microbial Technology. (21):382–386.

-
- Monnet v., latrille e., beal c. Et corrieu g., 2008. Croissance et propriétés fonctionnelles des bactéries lactiques. In : bactéries lactiques de la génétique aux ferments (corrieu g. Et luquet f.m.). Tec & doc, lavoisier. Paris. 512-592.
 - Nadirman H. et 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.
 - Nielsen, P. K., Bønsager, B. C., Fukuda, K., & Svensson, B. (2004). Barley α -amylase/subtilisin inhibitor : Structure, biophysics and protein engineering. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1696(2), 157- 164.
 - Nouadri, tahar. (2011). *L' α -amylase de *Penicillium camemberti* PL21: Production, Purification, Caractérisation et Immobilisation* [Thèse doctorat]. Université Frères Mentouri-constantine1
 - Orla-Jensen S., (1919). *The Lactic Acid Bacteria*. Dairy Bacteriology, Fred Host and Son, Copenhagen, Daenmark
 - P. Petrova, K. Petrov, Direct starch conversion into L (+) lactic acid by a novel amyolytic strain of *Lactobacillus paracasei* B41, *Starch*, 64, 1, 2012, 10-17.
 - Panchal C.J. (1990). Yeats strain selection. Marcel Dekker (ed) USA, p: 189.
 - Remi SAUREL Dr. Nadia OULAHAL Le 14 novembre 2013 Evaluation du potentiel bioprotecteur de bacteries lactiques confineees dans une matrice polymerique
 - S. Bhanwar, A. Ganguli, Amylase and galactosidase production on potato starch waste by *Lactococcus lactis* subsp. *lactic* isolated from pickled yam, *J. Sci. Ind Res.* 73, 2014, 324-330.
 - Sadeghian Motahar, S. F., Ariaeenejad, S., Salami, M., Emam-Djomeh, Z., & Sheykh Abdollahzadeh Mamaghani, A. (2021). Improving the quality of gluten-free bread by a novel acidic thermostable α -amylase from metagenomics data. *Food Chemistry*, 352, 129307.

- Salminen S., Wright A.V., Ouwehand A. (2004). Lactic acid bacteria. Microbiological and functional aspects. Marcel Dekker. Inc., U.S.A International Journal of Food Microbiology, 36, 1-29.
 - SAVADOGO, A. (2004). Caractérisation biochimique et moléculaire des bactéries lactique productrice d'exopolysaccharide isolée à partir d'échantillons de lait fermenté du Burkina Faso, Ouagadougou. Doctorat: 143
 - Schomburg D and Salzmann M. (1991). Enzyme Hand book 4. Classe 3: Hydrolases
 - Serhan m, cailliez-grimal c, borges f, revol-junelles a.m, hosri c et fanni j. (2009). Bacterial diversity of darfiyeh, a lebanese artisanal raw goat's milk cheese. Food microbiol. 26
 - Sicard P. (1982). Applications industrielles des enzymes . In : Les enzymes production et
 - Simon L., Bousquet J., Levesque R.C., Lalonde M. (1993). Origin and diversification of Springer-Verlag (ed). Berlin Heidelberg. Germany. p: 1-12.
- Studies on the production of alkaline α -amylase from *Bacillus subtilis* CB-18. Nwokoro O, Anthonia O. Acta Sci Pol Technol Aliment. 2015 Jan-Mar;14(1):71-75. doi: 10.17306/J.AFS.2015.1.8.PMID: 28068022
- Tahlaiti, H. Étude des propriétés technologiques et inhibitrices de bactéries lactiques
 - Tailliez, P. (2001). Mini-revue : les bactéries lactiques, ces êtres vivants apparus il y a près de 3 milliards d'années. *Le Lait*, 81(1-2), 1-11.
- utilisations industrielles . Durand G., Monson P. Editions Gauthier – Villars, Paris.p:121-164.
- Yiannikouris A. et Jouany J.P.(2002). Mycotoxins in feeds for ruminants ; fate and effects on animals. *Institue National de la Recherche Agronomique*. 15: 3-16.

PARTIE VII. ANNEXES

VII.1. Annexe 1

1. Généralité

1.1 Définition :

L' α -amylase est largement présent dans les plantes, les tissus des mammifères et les Microorganismes. C'est une macromolécule appartenant à la classe des protéines globulaires De type Endoglucanase de la classe des hydrolases dont la masse moléculaire est comprise entre 50 et 60 kda (Feillet, 2000).(Ait Kaki et al., 2012). C'est une glycosidase (E.C.3.2.1.1) qui dégrade des liaisons osidiques α -1,4 des polysaccharides (amidon et glycogène) en libérant du glucose, du maltose et des Maltodextrinessolubles de taille variable (Elleuche et Antranikian, 2013). Le substrat classique de l' α -amylase est l'amidon, Constitué de l'amylose et l'amylopectine :

L'amyloseest un polymère linéaire constitué d'un maximum de 6000 unités de glucose Avec des liaisons glycosidiques α -1,4. (Figure 11)

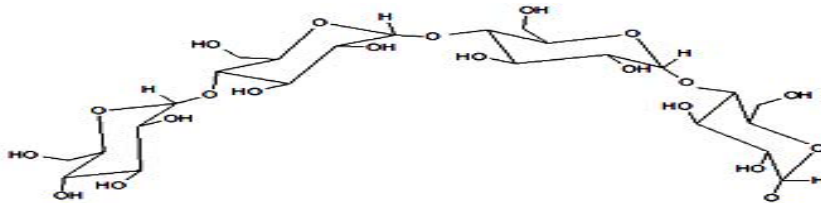
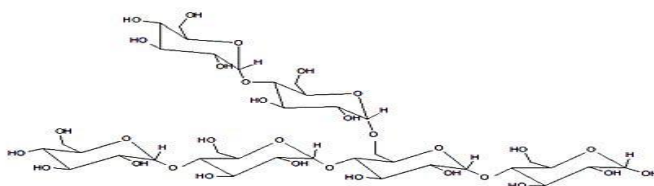


Figure 11 : Structure de l'amylose (Malumbaet *al.*, 2011)

L'amylopectine est composée de courtes chaînes linéaires de 10 à 60 unités de glucose Liées par α -1,4 et liées par α -1,6 à des chaînes latérales avec 15 à 45 unités de Glucose. (Figure 12)



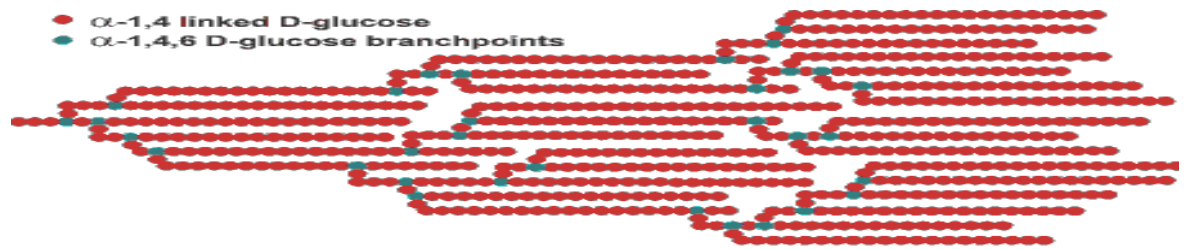


Figure 12 : Structure de l'amylopectine(Parada, 2012)

1.2 Caractéristiques et propriétés des alpha- amylases :

I. Poids moléculaire :

Le poids moléculaire des α - amylases varie d'une origine à l'autre et d'une espèce à l'autre. Il est compris entre 40.000 et 90.000 daltons (Schombury et Salzmann, 1991). Celui des α - amylases levuriennes, s'échelonne entre 40.000 et 70.000 daltons (Panchal, 1990).

II. Température optimum :

Selon l'origine et les espèces, les alpha-amylases ont des températures optimales comprises entre 40°C et 90°C (Schombury et Salzmann, 1991). En effet, l'alpha-Amylase bactérienne est réputé pour sa grande thermostabilité, celle de *Bacillus Amyloliquefaciens* est caractérisée par un optimum de température qui, selon les Applications va de 70°C à 90°C, alors que l'optimum de l'alpha-amylase fongiques se situe entre 50°C et 70°C (Sicard, 1982 ; Panchal, 1990).

III. pH optimum :

L'alpha-amylase est très sensible au pH. Par conséquent, le choix du pH optimum est très essentiel pour la production de cette enzyme (mcmahon et al., 1999). Selon kindle, (1983), l'optimum d'activité peut être obtenu à des pH compris entre 4 et 8. Les α -amylases bactériennes, ont un optimum supérieur à la neutralité, alors que les Fongiques, ont des pH optimum compris entre 4 et 6 (Larpen et al., 1992). Pour les Levures, l'enzyme requiert selon les espèces des pH entre 4 et 6 (Panchal, 1990 Awwioroko, 2015).

1.3 Nomenclature :

Nom systématique : α -(1-4) D-glucaneglucanohydrolase.

Nom codifié : E.C .3.2.1.1

Nom recommandé : Alpha-amylase.

Synonymes: glycogenase, endoamylase, maxilase, taka-amylase A, takatherm, Thermolase, amylotherm, clarase, amylopsin, spitase CP1, G995, kleistase L1, THC 250, Maxamy, ptyalin (Laiche et Siboukeur, 2018)

VII.2. Annexe 2

Milieux de culture :

Milieu M16 BCP (Thomas, 1973)

Extrait de levure 2,5 g

Extrait de viande 5 g

Lactose 2 g

Biopolytone 5 g

Peptone papainique de soja 5g

Acide ascorbique 0,5 g

Acétate de sodium 1,8 g

L-Arginine 4 g

Pourprede bromocrésol 0.05 g

Agar 10 g

Eau distillée 1000 ml

pH 6,5

Autoclavage : 120 °C pendent 15 min

Lait écrémée

Lait écrémée 100 g

Extrait de levure 3 g

Eau distillée 1000 ml

PH = 7

Autoclavage : 110 °C pendent 10 minutes

MRS

Extrait de levure 5 g

Extrait de viande 10 g

Peptone 10 g

Acétate de sodium 5 g

Citrate de sodium 2 g

Lactose 10 g

KH₂PO₄ 2 G

MgSO₄ 0,25 g

MnSO₄ 0.05 g

Eau distillée 1000 ml

pH = 6,2

Autoclavage : 121 °C pendent 15 min

Milieu MRS Glucose

Extrait de levure 5 g

Peptone 10 g

Acétate de sodium 5 g

Citrate de sodium 2 g

Glucose 20 g

KH₂PO₄ 2 G

MgSO₄ 0,25 g

MnSO₄ 0.05 g

Eau distillée 1000 ml

pH = 6,2

Autoclavage : 121 °C pendent 15 min

Milieu MRS Amidon

Extrait de levure 5 g

Peptone 10 g

Acétate de sodium 5 g

Citrate de sodium 2 g

Amidon 15 g

KH₂PO₄ 2 G
MgSO₄ 0,25 g
MnSO₄ 0.05 g
Eau distillée 1000 ml
pH = 6,2
Autoclavage : 121 °C pendant 15 min

Milieu MRS Glucose Amidon

Extrait de levure 5 g
Extrait de viande 10 g
Peptone 10 g
Acétate de sodium 5 g
Citrate de sodium 2 g
Glucose 2 %
Amidon 3 %
KH₂PO₄ 2 G
MgSO₄ 0,25 g
MnSO₄ 0.05 g
Eau distillée 1000 ml
pH = 6,2
Autoclavage : 121 °C pendant 15 min

Lugol

20 g d'iodure de potassium
10 g d'iode bisublimé
Eau distillée 1000 ml

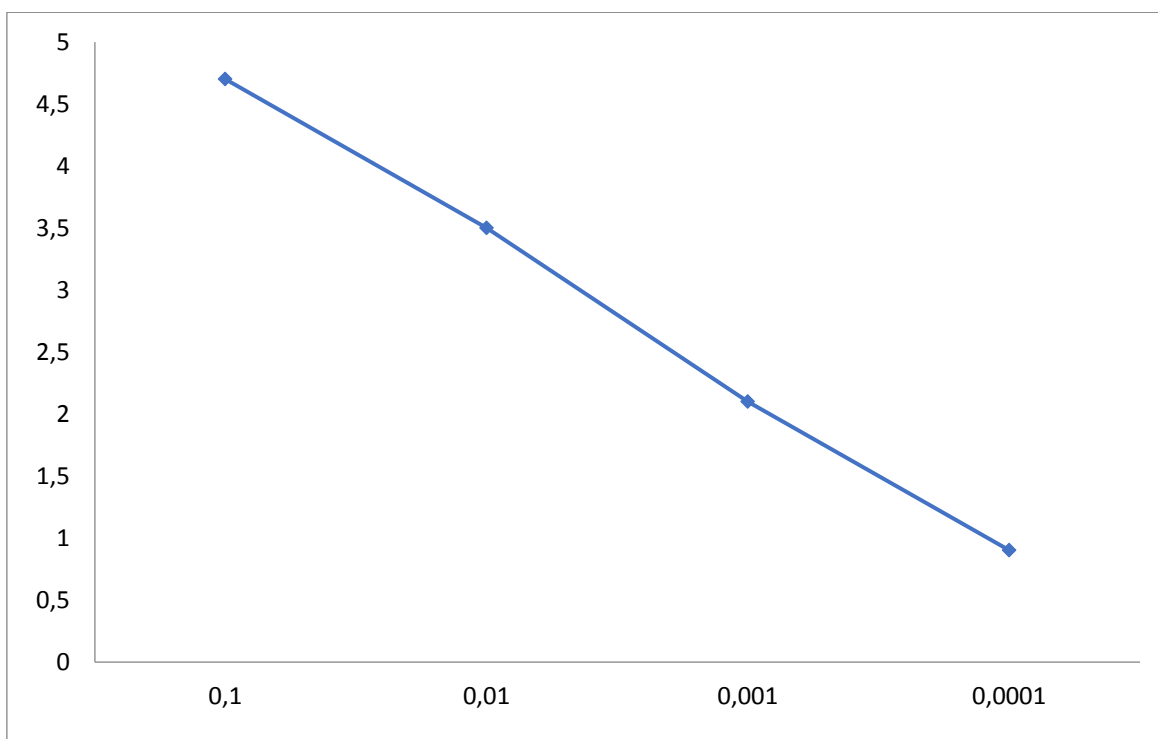
Dosage de l'amidon résiduel :

Avant le dosage de l'amidon une gamme étalonne est effectuée ; on utilise une solution d'amidon et une solution de lugol diluée de ¼.

Pour la détermination de l'amidon résiduelle , 1 ml de surnageant de la culture a été ajouté à 2,4 ml d'une solution d'iode et sa densité optique a été lue à 600 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (FOSSI et TAVEA , 2013).

- La lecture de la DO :
 - ✓ le tableau de dilution de $f=5$:

Concentration décimale g/ml $\cdot 10^{-2}$	0,1	0,01	0,001	0,0001
DO	4,7	3,5	2,1	0,9



La courbe de la DO au fonction de la concentration (g/ml $\cdot 10^{-2}$)