

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 عين تموشنت بلحاج بوشعيب
Université –Ain Temouchent- Belhadj Bouchaib
Faculté des Sciences et de Technologie
Département de Biologie



Projet de Fin d'Etudes
Pour l'obtention du diplôme de Master en sciences biologiques
Domaine : Sciences de la nature et de la vie
Filière : Sciences biologiques
Spécialité : Microbiologie appliquée
Thème

**Mise en évidence de la production des amylases par
certaines souches microbiennes**

Présenté Par :

- 1) Melle. AMMARI Cherifa Tahar
- 2) M. ASSAL Abderrazzak
- 3) M. TEOUZGHOU Mohamed Aimen

Devant le jury composé de :

Dr. CHERIF Nadjib	MCA	UAT.B.B	Président
Dr. TAHARI Fatima Zohra	MCB	UAT.B.B	Examineur
Pr. ZIANE Mohamed	Professeur	UAT.B.B	Encadrant

Année Universitaire 2023/2024

Sommaire

Remerciements	i
Dédicace	ii
Liste des figures	vi
Listes des Tableaux	vi
Liste des abréviations	vii
INTRODUCTION	1

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

2.1. Généralités sur les <i>Bacillus</i>	3
2. 1. 1. Caractéristiques générales des <i>Bacillus</i>	4
2. 1. 1. 1. Morphologie cellulaire	4
2. 1. 1. 2. Caractères physiologiques	5
2. 1. 2. Taxonomie et classification des <i>Bacillus</i>	5
2. 1. 2. 1. Taxonomie	5
2. 1. 2. 2. Classification phénotypique	6
2. 1. 2. 3. Classification moléculaire de <i>Bacillus</i> sensu lato	6
2. 1. 3. Distribution dans l'environnement	7
2. 1. 4. Intérêt technologique des <i>Bacillus</i> ssp	7
2. 2. Généralités sur les amylases	8
2. 2. 1. Définition et classification des enzymes	8
2. 2. 1. 2. Généralités sur l'activité enzymatique	8
2. 2. 2. Généralités sur les amylases	11
2. 2. 2. 1. Définition et nomenclature des amylase	11
2. 2. 2. 2. Caractéristiques et propriétés des α - amylases	12
2. 2. 2. 3. Différentes sources et origines des α -amylases	13
2. 2. 2. 4. Mécanisme d'action des amylases	14
2. 2. 2. 5. Utilisation industrielle de l' α -amylase	15

MATERIELS ET METHODES

3. 1. Obtention des souches de <i>Bacillus</i>	17
3. 2. Confirmation de la pureté et l'authentification des souches testées	17
3. 3. Mise en évidence de la production de l'amylase par les <i>Bacillus</i> sur milieu solide	18
3. 4. Production de l'amylase sur milieu liquide	18
3. 5. Etude de l'activités de l'amylase	18
3. 6. Analyse statistique	20

RESULTS AND DISCUSSION

4.1. Confirmation de la pureté et de l'authentification des souches testées	22
4.2. Détection préliminaire de l'activité amylase	22
4.3. Détermination de la cinétique enzymatique	25
Conclusion	

Références bibliographique

Remerciements

*Je remercie notre dieu « الله », le tout puissant, de nous avoir accordé
santé et courage pour accomplir ce travail,*

*Nous tenons à remercier tous ce qui ont contribué de près ou de loin, à
l'élaboration de ce présent projet de fin d'études en particulier :*

*Notre encadrant Prof. Ziane Mohamed, pour sa disponibilité et son
soutien tout au long de la réalisation de ce projet.*

*On remercie également les membres du jury : Dr CHERIF Nadjib et
Dr TAHARI Fatima Zohra, Maitres de conférences à l'université de
Ain Témouchent pour l'honneur
qu'ils nous font jugeant ce travail.*

Aimen, Cherifa, Abderrazzak

Dédicace :

Tout d'abord mes parents. Ma mère, qui a œuvré pour ma réussite, de par son amour, son soutien, tous les sacrifices consentis et ses précieux conseils, pour toute son assistance et sa présence dans ma vie, reçois à travers ce travail à mon père, qui peut être fier et trouver ici le résultat de longues années de sacrifices et de privations pour m'aider à avancer dans la vie. Puisse Dieu faire en sorte que ce travail porte son fruit ;

Merci pour les valeurs nobles, l'éducation et le soutien permanent venu de toi.

Mes chères sœurs : zouaouia ma deuxième mère que je l'aime infiniment et profondément Cherifa ma copine et my bestie l'adorable Nawel qui me soutient et supporte toujours Meriem Chaima Sara pour leur soutien moral et leur conseil précieux tout au long de mes études. Mon chère frère Zakaria que dieu le protège.

Sans oublier notre précieux ange "Idris Mohamed Yassine"

Mes chers grands parents que dieu les préserve sains et saufs inchallah "Boucif, Aicha, Khaira " et bien-sûr "papa Idris " que Dieu bénisse son âme

Ma deuxième famille « l'équipe »

Ouici, Bahaa Eddine, Abdelghani, Aimen, Maroua Khiaoula, mes sœurs d'âme Soundous, Sanaa, Hasnaa, Amira et Sarah, zhor et Aya

A mon encadreur professeur ziane qui nous aidé inormoment pour réaliser se travail que Allah le récompense avec bonté

Mes chers trinômes : Abderrazek et Aimen merci pour votre effort et dévouement à réaliser par succession notre travail

A tous qui nous aidé de près ou Loin

Cherifa

Dédicace

*Dédié à tous ceux qui ont cru en moi, m'ont soutenu et encouragé tout au long de ce projet.
Votre confiance et votre appui inconditionnel ont été les fondations sur lesquelles j'ai pu construire
cette réussite.*

*Je tiens à exprimer ma profonde gratitude envers « ma mère », mon modèle de persévérance
et de détermination, « mon père », mon guide d'intégrité et de dévouement.*

Mes chers frères « Bachir » et « Azhar », Mes chères et adorables sœurs « Wissal » et « Nessrine ».

A mes chères amis « l'équipe ».

A mes meilleures amis « Bahaa eddine », « Mohammed », « Abdelghani », « Riyad », « Youcef » et « Nabil ».

*Et enfin, à mon trinôme, « Cherifa » et « Aimen », Je vous suis extrêmement reconnaissant pour votre
patience, votre disponibilité et votre soutien constant. Votre persévérance, votre expertise et votre
détermination ont été des atouts essentiels pour surmonter les défis rencontrés en chemin.*

*A tous ceux qui ont apporté leur contribution, de quelques manières que ce soit, à la
réalisation de ce travail*

Abderrazzak

Dédicace

Je dédie cet humble travail avec grand amour, sincérité et fierté à : A ma chère mère, A mon cher père. Qui n'ont jamais cessé, de formuler des prières à mon égard, de me soutenir et de m'épauler pour que je puisse atteindre mes objectifs.

A Mes chers Sœurs : Sarra et Rania. (Et à mon petit ange Monsif) pour leur soutien moral et leur conseil précieux tout au long de mes études.

A mes chers trinômes : cherifa, abderrazzek pour leur entente et sympathie.

Mes amis (es) : Riad, Pedro, Taha, Kader, Sarra.

Ma deuxième famille « l'équipe » : Amira, Soundous, Hasnaa Hayam, Sanaa, Cherifa, Marwa Khaula, Abdelghani, Bahaa, Witice et Abderrazak. Pour leurs aides et supports dans les moments difficiles. Et tous les bons moments et souvenir inoubliable.

A mes chers frères : Siyoucef, Youcef, Abdou et Mohammed. Et a Marwa Lyna.

Et un grand dédicace a notre professeur Pr.Ziane que dieu le préserve qui nous à aider et facilité notre études .Et Tous ceux qui m'ont aidé de près ou de loin à réaliser ce travail.

Mohamed Aïméne

Liste des figures

Figures	Titre	Pages
Figure 1 :	Une représentation microscopique et macroscopiques des <i>Bacillus cereus</i>	3
Figure 2 :	Photo représente la morphologie des <i>Bacillus</i>	5
Figure 3 :	Variation des concentrations de l'enzyme (E), de substrat (S), du produit (P)	9
Figure 4 :	Représentation de Michaelis Menten des vitesses en fonction des concentrations des substrat	11
Figure 5 :	Structure tridimensionnelle de l'alpha amylase	12
Figure 6 :	Représentation de résultats de test de recherche de dégradation de l'amylase	
Figure 7 :	Courbe d'étalonnage de sucre réducteur	25
Figure 8 :	Cinétique de l'activité enzymatique de différents essais	26
Figure 9 :	Cinétique de l'activité enzymatique des extraits par la méthode Lineweaver et Burk.	26
Figure 10 :	Cinétique de l'activité enzymatique des extraits par la méthode de Michaëlis Menten	27

Listes des Tableaux

Tableau	Titre	Pages
Tableau 1 :	Classification des enzymes	8
Tableau 2 :	Origine des amylases	14
Tableau 3 :	Utilisation de amylases	15
Tableau 4 :	Description des souches de <i>Bacillus</i> spp testés dans cette étude	17
Tableau 5 :	Mélange réactionnel pour évaluer l'activité d'amylase dans les extraits brutes	19
Tableau 6 :	Milieu réactionnel de dosage de sucres réducteurs par la méthode de Fehling	19
Tableau 7 :	Synthèse de certains souches productrice des amylases	22
Tableau 8 :	Activité amyliasique des souches étudiées dans cette étude	24

Liste des abréviations

% : pourcentage
°C : Degres celcius
Kcal : kilo calories
Kg : kilogramme
mm: millimetre
AA: acide amine
Co : cobalt
ADN : Acide Désoxy-Ribonucleique
ARN : Acide Ribo-Nucleique
Etc : Etcetera
aw : activité en eau
pH : Potentiel d'hydrogenisation
sp : species : espèce non identifiée
spp : plusieurs espèces
kDa : Kilo dalton
ANSES : Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail
OTA : Ochratoxine A
FAO : Organisation des Nations unies pour l'alimentation et l'agriculture
U.V : ultra-violette
Mol : molécule
g : gramme
ZEN : zéaralénone
DL50 : dose létale médiane
AFSSA :Agence française de sécurité sanitaire des aliments
mL : millilitre
µL : micro-litre
CFU: Colony Forming Unit (Unité formant colonie)
PDA: Potatoes Dextrose Agar
Eq : equation
CAM: Coconuts Agar Medium
CCM : chromatographie sur couche mince
YES: Yeast Extract Sucrose
SCE: somme des carrés des résidus

INTRODUCTION

1. Introduction

L'amidon représente la principale source de calories dans l'alimentation humaine. Plus de 600 produits commerciaux sont dérivés de l'amidon pour des applications alimentaires et non alimentaires (Ball et al, 1996).

Sa structure, composée d'unités d' α -D-glucose liées de manière complexe avec des points de ramification en position α 4-1 et 6, nécessite l'action coordonnée d'un groupe spécifique d'enzymes pour sa dégradation, généralement désignées sous le nom d'hydrolases de l'amidon. (S. Janecek 1998)

La demande mondiale en enzymes d'origine microbienne augmente afin d'améliorer certains procédés de fabrications tels que l'industrie du textile (décoloration de jeans par exemple), la papeterie (procédé de blanchiment de la pâte à papier...), dépollution (attaque des substances phénoliques...), industrie alimentaire (boulangerie...) (Dvail et al., 2010).

Les enzymes produites par des organismes vivants, sont des substances ou des macromolécules biologiques qui accélèrent des réactions biochimiques spécifiques, agissant comme des catalyseurs dans les processus biologiques tant à l'intérieur qu'à l'extérieur des cellules. Elles sont souvent désignées comme des "biocatalyseurs" (Gurung et al., 2013).

Les enzymes microbiennes sont connues pour être des enzymes supérieures obtenues à partir de différents micro-organismes, une de ces micro-organismes est les *Bacillus*. L'utilisation de souches bactériennes spécifiquement du genre *Bacillus* gagne du terrain en raison de leur capacité à résister et à survivre dans des conditions industrielles difficiles. *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis* et *Bacillus pumilus* sont quelques-unes des souches associées à la détérioration des aliments et à un large éventail de conditions cliniques différentes. Cet organisme a été signalé comme produisant certaines des enzymes commerciales les plus importantes, notamment l' α -amylase, la protéase alcaline, la kératinase et la β -mannanase (Ghani et al., 2013).

L'amylase, qui est considéré parmi les enzymes les plus importantes et revêt une grande importance pour la biotechnologie (De Souza et Magalhaes, 2010), est une enzyme qui appartient à la famille des hydrolases et qui est responsable de la dégradation de l'amidon, les amylases sont très demandées en raison de leur large gamme d'application, tels que les industries de liquéfaction de l'amidon, du papier, de l'alimentation, du sucre et pharmaceutique. (Nigam, 2013).

Le présent travail a pour objectif l'exploration de la production d'amylases par des souches bactériennes spécifiques, mettant en lumière leur capacité à synthétiser ces enzymes clés.

Notre travail est composé de deux parties : la première est purement bibliographique, elle comporte deux chapitres dont le premier est généralités sur les *Bacillus* et le second chapitre porte comme titre généralité sur les amylases. La deuxième est expérimentale consacré au matériel utilisée et méthode suivies, un autre chapitre qui interprété les différents résultats obtenus et en fin on est terminé par une conclusion générale.

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

2.1. Généralités sur les *Bacillus*

Le genre *Bacillus* a été proposé en 1872 par Cohn (Ines *et al.*, 2015), il renferme des germes telluriques aérobies stricts ou aéro-anaérobies, sporogènes, se présentant sous forme de bâtonnets à Gram positif généralement mobiles. En dehors de *Bacillus anthracis*, les *Bacillus* sont habituellement considérés comme des germes de l'environnement (Fouad *et al.*, 2017).

Le genre *Bacillus* représente un ensemble très vaste et diversifié de bactéries ayant une caractéristique commune mais distincte : la capacité à former des endospores dormantes de manière aérobie lorsqu'elles sont confrontées à des conditions de croissance défavorables (Zeigler and Perkiens, 2008).

Les *Bacillus* sont des bactéries en forme de bâtonnets qui sporulent dans des conditions aérobies facultatif. Les cellules végétatives mesurent de 0,5 sur 1,2 à 2,5 sur 10 mm et se présentent seules ou en chaînes. La plupart sont mobiles grâce à des flagelles péritriches et produisent de la catalase. La sporulation aérobie et la production de catalase distinguent les membres de ce genre de ceux de *Clostridium*, et produisent des spores centrales à terminales ellipsoïdes ou cylindriques.

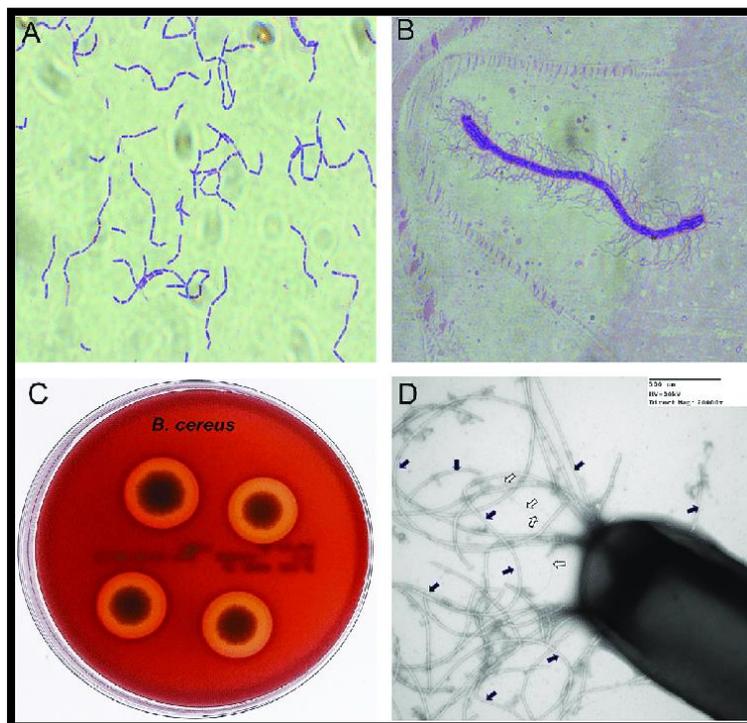


Figure 1 : Une représentation microscopique et macroscopiques des *Bacillus cereus*
(Mursalin *et al.*, 2020)

Les *Bacillus* possèdent des modes de métabolisme énergétique aérobie ou anaérobie facultatif. Les membres du genre survivent dans une grande variété de conditions environnementales grâce à leur capacité à former des endospores, qui résistent à la chaleur, à la déshydratation et à d'autres stress physiques. Les températures optimales de croissance se situent entre 25°C et 38°C, bien que certaines souches psychrotrophes puissent croître à des températures aussi basses que 3°C et que certaines souches thermophiles puissent croître à 75°C. Ils peuvent se développer à des niveaux d'acidité et d'alcalinité extrêmes, allant d'un pH de 2 à un pH de 10.

En raison de cette diversité physiologique, *Bacillus* se trouve dans une grande variété d'habitats, du sol aux sources thermales (Ziane, 2014).

2. 1. 1. Caractéristiques générales des *Bacillus*

2. 1. 1. 1. Morphologie cellulaire

Les espèces du genre *Bacillus* sont des bacilles de forme cylindrique et rectilignes à extrémités carrées ou arrondies, de taille variable (de 0,5 x 1,2 µm jusqu'à 2,5 x 10 µm), sporulés et sont souvent disposés en paires ou en chaînes, à Gram positif ou à Gram variable (fréquemment, la coloration de Gram n'est positive que pour les très jeunes cultures). Généralement mobiles grâce à des flagelles péritriches (*B. anthracis* et *mycoides* sont immobiles et pour les espèces mobiles, la mobilité est variable selon les souches), parfois capsulés (*B. anthracis*, *licheniformis*, *megaterium* et *subtilis* peuvent élaborer une capsule formée d'un polymère d'acide glutamique), , aérobie ou aéro-anaérobie, le plus souvent catalase positive, donnant une réponse variable au test de l'oxydase, les endospores sont ovales, parfois rondes ou cylindriques, déformante ou non déformante, à localisation centrale, para-centrale, sub-terminale ou terminale (Holt *et al.*, 1994).

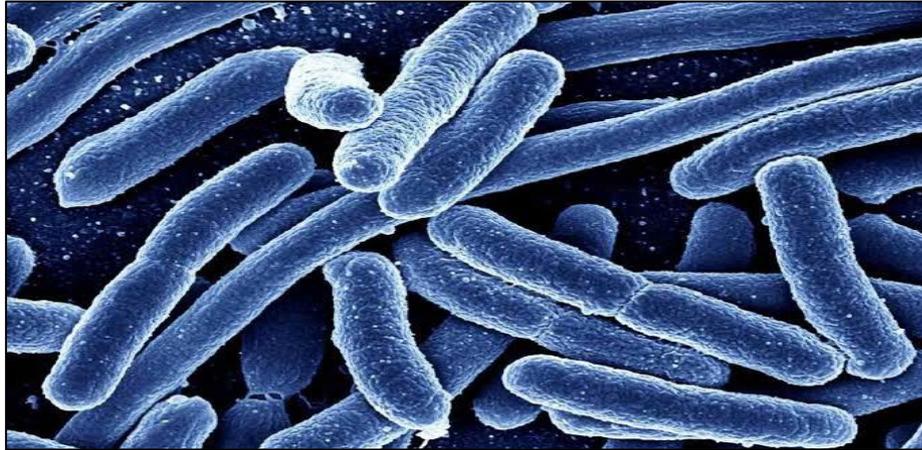


Figure 2 : Photo représente la morphologie des *Bacillus*

2. 1. 1. 2. Caractères physiologiques

Les bactéries de genre *Bacillus* présentent des propriétés physiologiques assez diverses telles que la capacité à dégrader de nombreux substrats provenant de sources végétales et animales, y compris la cellulose, l'amidon, les protéines, l'agar, les hydrocarbures et également les biocarburants. De plus, certaines espèces de *Bacillus* sont des nitrificateurs hétérotrophes, des dénitrificateurs, des fixateurs d'azote, des précipitateurs de fer, des oxydants du sélénium, des oxydants et des réducteurs du manganèse, des chimio-lithotrophes facultatifs, des acidophiles, des alcalophiles, des psychrophiles, des thermophiles et d'autres encore, Cette diversité de propriétés physiologiques, reflétée par la grande diversité des souches de *Bacillus*, a ainsi permis à ces bactéries de coloniser une grande variété d'habitats écologiques. (Abrioul *et al.*, 2010 ; Ines *et al.*, 2015).

2. 1. 2. Taxonomie et classification des *Bacillus*

2. 1. 2. 1. Taxonomie

Le genre *Bacillus* appartient du : (Rooney *et al.*, 2009 ; Eric, 2008)

- Règne : Bacteria
- Embranchement : Firmicutes
- Classe : Bacilli
- Ordre : Bacillales
- Famille : Bacillaceae
- Genre : *Bacillus*

2. 1. 2. 2. Classification phénotypique

La classification taxonomique des espèces appartenant au genre *Bacillus* se fondait sur leurs caractéristiques morphologiques, physiologiques et biochimiques, ainsi que sur leur aptitude à former des spores aboutit à la division de genre *Bacillus* en trois grands groupes, en fonction de la morphologie de la spore et du sporangiome (Smith *et al.*, 1952).

- Le premier groupe des bactéries du genre *Bacillus* est divisé en deux sous-groupes :
 - le premier sous-groupe comprend des bactéries à grande cellule, en forme de bacilles, supérieure ou égale à 1 µm, à coloration de Gram positive, avec des spores ellipsoïdes ou cylindriques, centrales ou terminales, ne dilatent pas les sporanges et des d'inclusions protoplasmiques de poly-béta-hydroxybutyrate, *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus cereus var mycoides* (devenu *Bacillus mycoides*), *Bacillus megaterium* et *Bacillus thuringiensis*, Actuellement, Il faut y rajouter *Bacillus pseudomycoides* et *Bacillus weihenstephanensis*. (Drobniewski, 1993)
 - Le deuxième sous-groupe comprend des Bactéries à petites cellules, inférieur à 1 µm, dépourvues d'inclusions protoplasmiques de poly-béta-hydroxybutyrate, il comporte : *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus coagulans*, et *Bacillus firmus* (Drobniewski, 1993).
- Dans le deuxième groupe, les bacilles à coloration de Gram variable, avec des spores ellipsoïdes centrales ou terminales, ce groupe contient principalement *Bacillus alvei*, *Bacillus brevis*, *Bacillus circulans*, *Bacillus larvae*, *Bacillus lentimorbus*, *Bacillus macerans*, *Bacillus polymyxa*, *Bacillus popilliae* et *Bacillus stearothermophilus*.
- Le troisième groupe est dominé par des espèces hétérogènes, à coloration de Gram variable, avec des spores sphériques terminales ou subterminales, il comporte : *Bacillus sphaericus*, *Bacillus globisporus*, et *Bacillus insolitus*. (Eric, 2008).

2. 1. 2. 3. Classification moléculaire de *Bacillus sensu lato*

Le séquençage de l'ARNr 16S a permis de classer les espèces de *Bacillus* en cinq groupes distincts : *B. subtilis*, *B. megaterium*, *B. cereus*, *B. anthracis*, *B. thuringiensis*, ainsi que de nombreuses autres espèces, réunies dans ce qui peut être désigné comme le *Bacillus sensu stricto*. Ces groupes ont été caractérisés par les traits classiques des bacilles aérobies Gram-positifs formateurs de spores. Depuis les années 1990, le groupe *Bacillus cereus*

comprend actuellement neuf espèces de *Bacillus*, à savoir *B. anthracis*, *B. cereus*, *B. mycoides*, *B. pseudomycoides*, *B. thuringiensis*, *B. weihenstephanensis*, *B. cytotoxicus*, *B. bombysepticus*, et le membre le plus récemment classé du groupe, *B. toyonensis*. Le groupe *B. cereus* est souvent appelé *B. cereus sensu lato*, et l'espèce *B. cereus* est appelée *B. cereus sensu stricto*. (National pesticide télécommunication network, 2000).

2. 1. 3. Distribution dans l'environnement

Les espèces du genre *Bacillus* sont omniprésentes dans la nature, ubiquitaires, Elles se trouvent dans des environnements divers tels que le sol, les argiles, les roches, la poussière, les milieux aquatiques, la végétation, les aliments et le tube digestif de divers insectes et animaux (Abrioul *et al.*, 2010). Cette capacité à survivre et à se développer dans des écosystèmes aussi différents repose sur la production de leurs robustes endospores (Ines *et al.*, 2015).

2. 1. 4. Intérêt technologique des *Bacillus* ssp

Le genre *Bacillus* est d'une importance primordiale en biotechnologie. Les bactéries de ce genre sont réputées pour leur capacité à produire des molécules aux multiples applications industrielles, notamment dans la production d'enzymes. En effet, plus de deux tiers des enzymes fabriquées industriellement par des bactéries proviennent des *Bacillus*. (Devine, 1995)

Le genre *Bacillus* est bien connu et célèbre pour la production d'alpha-amylase, et plusieurs souches de *Bacillus* telles que *B. stearothermophilus*, *B. subtilis*, *B. cereus*, *B. licheniformis* et *B. amyloliquefaciens* sont isolées et sélectionnées pour la production d'amylase (Sivaramakrishnan *et al.*, 2006).

Pour leur large éventail de caractéristiques physiologiques et leur capacité à produire une multitude d'enzymes, d'antibiotiques et de métabolites, les espèces de *Bacillus* sont utilisées dans de nombreux processus médicaux, pharmaceutiques, agricoles et industriels. Différentes espèces produisent des compléments alimentaires tels que des vitamines (par exemple, la riboflavine, la cobalamine et l'inositol) et des caroténoïdes et ont été utilisées pour la synthèse de plusieurs compléments alimentaires pour la consommation humaine. De plus, les spores de *Bacillus* ont une longue histoire de consommation et d'utilisation sûre en tant que probiotiques, des micro-organismes vivants qui, lorsqu'ils sont administrés en quantités adéquates, confèrent un bénéfice pour la santé de l'hôte. Les produits probiotiques contenant des spores à usage humain ou animal sont commercialisés dans plusieurs pays, étant largement répandus en Australie, en Asie, aux États-Unis, en Amérique du Sud et en Europe (Francesco *et al.*, 2019).

2. 2. Généralités sur les amylases

2. 2. 1. Définition et classification des enzymes

Une enzyme est une protéine composée d'acides aminés qui agit comme un catalyseur, accélérant des réactions chimiques spécifiques. Contrairement aux substrats, l'enzyme n'est pas modifiée ou dégradée pendant la réaction. Chaque enzyme possède un site actif spécifique qui reconnaît et se lie à des substrats particuliers, garantissant ainsi la spécificité de la réaction catalysée. Ce site actif contient des acides aminés qui participent directement à la transformation chimique du substrat. Les enzymes fonctionnent de manière optimale dans des conditions physico-chimiques spécifiques, telles que la température et le pH. La plupart des enzymes, étant des protéines, sont sensibles à des températures élevées et tendent à se dénaturer au-delà de 41°C. De plus, les inhibiteurs enzymatiques peuvent ralentir ou stopper l'activité enzymatique en se liant à l'enzyme et en bloquant son site actif. Les enzymes peuvent être classés en plusieurs classes (Tableau 01).

Tableau 01: Classification des enzymes (Weil et al., 2009)

E.C (class)	Classification	Type de réaction catalysée
EC 1	Oxydoréductases	oxydo-réductions
EC2	Transférases	Transfert de groupements fonctionnels
EC3	Hydrolase	Hydrolyse
EC4	Lyases	Elimination de groupement et formation de double liaisons
EC5	Isomérases	Isomérisation
EC6	Ligases	Formation de liaisons couplées à l'hydrolyse de l'ATP
EC7	Translocases	Catalysent le mouvement des ions ou des molécules à travers les membranes ou leur séparation au sein des membranes

2. 2. 1. 2. Généralités sur l'activité enzymatique

Lorsque les enzymes sont utilisées dans des processus industriels et des procédures analytiques, l'évaluation précise de l'activité enzymatique devient importante. L'activité enzymatique est dépendante de plusieurs facteurs telles que :

- la quantité d'enzyme nécessaire pour réaliser correctement le processus ;
- la durée de la réaction ;
- la quantité de substrat à convertir ;
- les conditions dans lesquelles la réaction se produit.

La réaction enzymatique peut se diviser en trois phases (Figure 3)

- Phase 1 (début de la réaction) : il y a accumulation du complexe enzyme-substrat (ES) sans formation de produit et sans consommation significative du substrat ;
- Phase 2 : durant cette phase la concentration de ES atteint une valeur maximale, restant constante pendant un certain temps. La durée de l'état stable concernant la concentration de ES dépend des concentrations relatives entre l'enzyme et le substrat. Pendant la phase II, le substrat est consommé et le produit s'accumule dans le milieu réactionnel ;
- Phase (3) : lorsque la concentration de ES n'est plus constante -, la consommation du substrat et la formation du produit se produisent lentement (Vitolo, 2020).

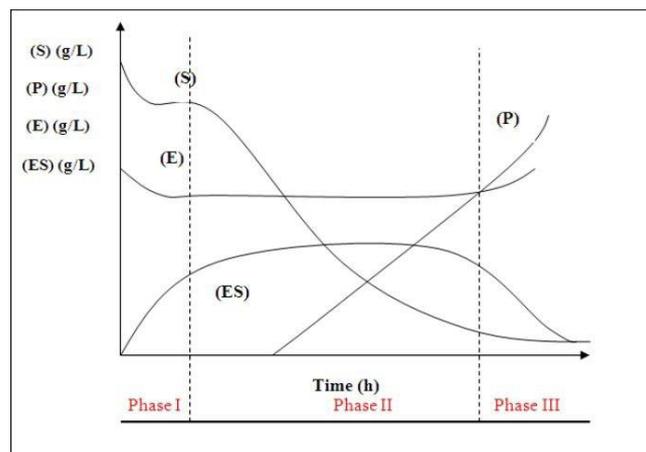


Figure 3 : Variation des concentrations de l'enzyme (E), de substrat (S), du produit (P) et du complexe enzyme-substrat (ES) en fonction du temps du réaction (Vitolo, 2020).

La vitesse d'une réaction enzymatique est une mesure de la rapidité avec laquelle la concentration des réactifs et des produits change au cours du temps. Pendant la réaction, la concentration du substrat [S] diminue tandis que celle du produit augmente [P]. La progression de cette réaction peut être représentée par une vitesse (V), qui peut être la vitesse de disparition du substrat (S) ou l'apparition du produit (P). Ainsi, pour déterminer la vitesse de la réaction à un moment donné, on mesure la quantité de produit formé (ou la disparition du substrat) à cet instant t, puis on calcule la vitesse de réaction avec l'équation 1, 2 et 3 suivante :

$$V = -\frac{d[S]}{dt} = +\frac{d[P]}{dt} \quad (1)$$

D'après la loi d'action des masses on a :

$$V_1 = K_1 [E][S]$$

$$V_2 = K_2 [ES]$$

La vitesse d'apparition des produits des réactions :

$$\frac{d[P]}{dt} = V_3 = K_3 [ES] \quad (2)$$

Et

$$\frac{d[P]}{dt} = -\frac{d[S]}{dt} \quad \text{donc } V_1 - V_2 = V_3 \rightarrow V_1 = V_2 + V_3$$

$$K_1[E][S] = K_2 [ES] + K_3 [ES]$$

$$K_1[E][S] = [ES] [K_2 + K_3]$$

$$\frac{[E][S]}{[ES]} = \frac{K_2 + K_3}{K_1} = Km \quad (3)$$

Km : Constante de dissociation du Complexe [ES]. Elle est appelée également la **constante de Michaelis Menten** : qui représente la concentration du substrat à laquelle la vitesse de réaction d'un enzyme est égale à la moitié de sa vitesse maximale, en autre termes, elle quantifie l'affinité d'une enzyme pour son substrat, plus la valeur de Km est faible, plus l'enzyme a une forte affinité pour son substrat.

Equation du Michaelis Menten

L'enzyme est soit sous forme libre E, soit complexe au substrat ES :

$$[Et] = [E] + [ES]$$

[Et] étant la concentration totale de l'enzyme

$$\text{Donc : } Km = \frac{([Et] - [ES])[S]}{[ES]} = \frac{[Et] - [S]}{[ES] - [S]}$$

$$[ES] = \frac{[Et][ES]}{K_m + [S]}$$

La vitesse de la réaction V_o est égale à V_3

$$V_o = V_3 = K_3[ES]$$

$$\text{D'où } V_o = K_3 \frac{[Et][ES]}{K_m + [S]}$$

Le terme $K_3 [Et]$ représente en réalité V_{max} , la vitesse maximale, donc l'équation 4 final devient :

$$V_o = \frac{V_{max}[S]}{K_m + [S]} \quad \text{Eq. 4}$$

C'est l'équation de Michaelis Menten (Robinson, 2015)

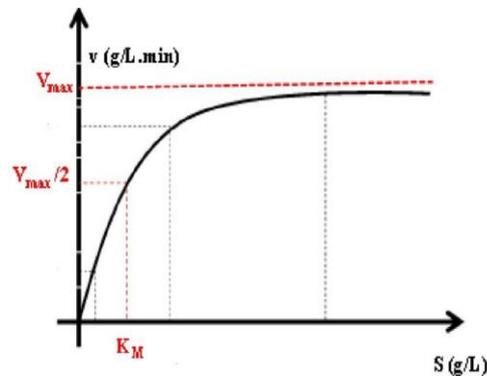


Figure 4 : Représentation de Michaelis Menten des vitesses en fonction des concentrations des substrat (Vitolo, 2020)

K_m : Se définir comme la concentration du substrat pour laquelle la vitesse est la moitié de **V_{max}**

2. 2. 2. Généralités sur les amylases

2. 2. 2. 1. Définition et nomenclature des amylase

Elle appartient à la famille des glycosides hydrolases nommée GH13 ; regroupant maintenant plus de 1700 enzymes (Coutinho et Henrissat, 1999). Elle hydrolyse, les liaisons osidiques de l'amylose, de l'amylopectine, de l'amidon, du glycogène et d'autres polysaccharides contenant plus de trois liaisons α (1,4) D-Glucose (Franco et al., 2000). Parmi les amylase, alpha amylase est le plus / La figure 2 illustre la structure tridimensionnelle de alpha-amylase.

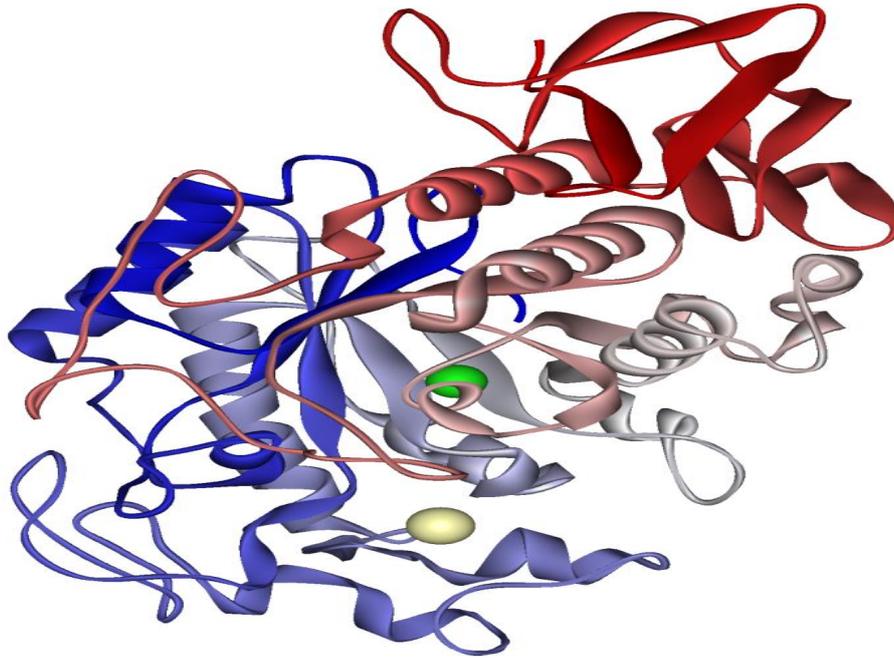


Figure 5 : Structure tridimensionnelle de l'alpha amylase (Weil et al., 2009)

Le code EC 3.2.1.1 correspond à l'enzyme alpha-amylase, également appelée glycogénase, endoamylase, Taka-amylase A ou maxilase. Son nom systématique est 1,4-alpha-D-glucane4-glucanohydrolase (Schamburg et Slzmann, 1991; Dauter et al., 1999).

2. 2. 2. 2. Caractéristiques et propriétés des α - amylases

Poids moléculaire

Le poids moléculaire des α -amylases peut varier selon leur origine et leur espèce,. Les α -amylases provenant de levures ont un poids moléculaire compris entre 40 000 et 70 000 daltons (Panchal, 1990). Quant à celle d'origine bactérienne ont un fourchette générale allant de 40 000 à 90 000 daltons.

Température optimale

Les températures optimales des α -amylases varient selon leur origine et leur espèce, généralement situées entre 40°C et 90°C (Schombury et Salzman, 1991). L'alpha-amylase bactérienne est bien connue pour sa grande stabilité thermique. Par exemple, celle de *Bacillus amyloliquefaciens* présente une plage allant de 70°C à 90°C, selon les besoins spécifiques des

applications. En revanche, l'alpha-amylase fongique présente une température située entre 50°C et 70°C (Sicard, 1982 ; Panchal, 1990).

pH optimum

Le choix du pH optimum est crucial dans la production de l'alpha-amylase (McMahon et al., 1999). L'optimum d'activité des α -amylases peut être atteint dans une plage de pH allant de 4 à 8. Les α -amylases bactériennes montrent un optimum d'activité généralement supérieur à la neutralité, tandis que celles d'origine fongique ont des pH optimaux situés entre 4 et 6 (Larpen et al., 1992).

Effecteurs

Pour préserver leur intégrité et leur stabilité structurale, les α -amylases nécessitent la liaison à au moins un ion calcium (Vallee et al., 1959, Steer et Levitzki, 1973). Toutefois, à des concentrations dépassant 20 mM, le calcium agit comme un inhibiteur (Boel et al., 1990).

Spécificité du substrat

Les amylases sont des enzymes essentielles qui hydrolysent les liaisons glycosidiques internes de l'amidon et produisent comme produits primaires des dextrans et des oligosaccharides (Suriya et al., 2016). Au sein de la molécule d'amidon, les unités de glucose sont liées par des liaisons osidiques α (1-4), formant ainsi des chaînes hélicoïdales d'amylose. En parallèle, de courtes chaînes de même composition se ramifient sur ces chaînes par des liaisons osidiques α (1-6) (Mercier, 1985).

2. 2. 2. 3. Différentes sources et origines des α -amylases

Les amylases sont parmi les enzymes les plus cruciales et jouent un rôle de premier plan dans la biotechnologie contemporaine. Bien qu'elles puissent être dérivées de diverses sources, telles que les plantes, les animaux et les micro-organismes, les enzymes d'origine microbienne sont particulièrement significatives.

Tableau 2 : Origine des amylases.

Source	Origine	Référence
Végétale	Blé, Malt d'orge, Seigle, Riz	Mercier (1985)
Animale	Salive et du pancréas des mammifères	French (1975)
Microbienne		
Moisissure	<i>Penicillium fellutanum</i> <i>Penicillium chrysogenum</i> <i>Rhizopus oryzae</i> <i>Aspergillus niger</i>	Kathiresan et Mannivanan (2006) Ertan et Balkan (2007) Akbache et Bariout (2007) Mama (2009) Açourène et Ammouche (2011)
Levures	<i>Saccharmyces cerevisiae</i> <i>Canadida Pichia</i> <i>Endomycopsis Lipomyces</i>	Ruohonen et al. (1991) Wang et Kuo (2001) Bouix et Leveau (1999)
Bactéries	<i>Bacillus licheniformis</i> <i>Bacillus steorothermophilus</i> <i>Bacillus circulans</i> <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> <i>Bacills coagulans</i> <i>Thermomonospora fuska</i> <i>Alteromonas haloplinktis</i> <i>Termus filiformis</i> <i>Streptomyces rimosus</i>	Kandra et al. (2002) Dauter et al. (1999) Dey et al. (2002) Uiger et çurakoglu (2001) Babu et Satyanaray (1993) Bush et Stutzenberger (1997) Feller et al. (1992) Egas et al. (1998) Vukelié et al. (1992)

2. 2. 2. 4. Mécanisme d'action des amylases

Le rôle principal des amylases est de briser les liaisons glycosidiques au sein des polysaccharides tels que l'amidon et glycogène, transformant ainsi les glucides complexes en sucres plus simples (Zakowski JJ, Bruns 1985). Elle hydrolyse les liaisons α , 1 à 4 glucosidiques de l'amidon et des substrats associés de manière endo, produisant des oligosaccharides, notamment le maltose, le glucose et la limite alpha dextrine (Çalik et Özdamar, 2001). Son mode d'action comprend plusieurs méthodes :

- Une attaque aléatoire, où elle coupe les liaisons (α -1,4) à partir de l'extrémité non réductrice. Cela conduit principalement à la formation de glucose, de maltose, et surtout d' α -dextrines (Scriban, 1999) ;
- Mécanisme en une seule chaîne, l' α -amylase dégrade une chaîne avant de passer à la suivante. Ce processus est facilité par la formation d'un complexe actif avec le premier substrat. L'enzyme catalyse la réaction et ne forme pas de nouveaux complexes actifs avant d'avoir achevé la dégradation de la première chaîne. (Berry et Paterson, 1990) ;

- Mécanisme multi-chaîne, la dégradation des chaînes est simultanée (Pazur et Marchetti, 1992) ;
- Attaque multiple ou répétitive, l'enzyme se déplace le long de la chaîne, ce qui entraîne plusieurs hydrolyses successives avant que le complexe enzyme-substrat ne se dissocie. (Nakatani, 1996 ; Kandra et al., 1997).

2. 2. 2. 5. Utilisation industrielle de l' α -amylase

En raison de leur productivité et de leur capacité à résister à la chaleur, les α -amylases microbiennes sont largement employées dans divers secteurs industriels en dehors de l'alimentation, tels que la pharmacie, l'industrie textile, la papeterie et la fabrication de détergents (Burhan et al., 2003) (Tableau 3)

Tableau 3 : Utilisation de amylases.

Industrie	Application
Glucoserie	Solubilisation de l'amidon, accompagnée d'une chute importante de la viscosité (liquéfaction)
Sucrierie.	Réduction de la viscosité des sirops de cannes à sucre, en hydrolysant les contaminants amylicés pour réussir le processus de cristallisation
Biscuiterie et Panification.	Amélioration de la propriété rhéologique et fermentaires de la pâte, ainsi que la coloration de la croûte
Industrie textile	Le désencollage textile, qui permet d'éliminer la colle d'amidon qui enduit les fibres et les protège au cours du tissage
Papeterie	Liquéfaction de l'amidon pour préparer des sauces découchage, permettant d'éliminer les irrégularités superficielles de la feuille
Détergents	Dégradation des taches à base d'amidon. Les oligosaccharides et les dextrines libérés de l'action hydrolytique sont solubles, par conséquent, la tâche est physiquement découpée
Industrie Pharmaceutique	Agent anti-inflammatoire Traitement du diabète et de l'obésité.

MATERIELS ET METHODES

Ce travail a été réalisé au niveau du Laboratoire pédagogique de Microbiologie, département de Biologie, faculté des Sciences et de Technologie, Université de Belhadj Bouchaïb, Ain Témouchent (UBBAT).

3. 1. Obtention des souches de *Bacillus*

Les souches bactériennes testées dans cette étude ont déjà été identifiées par Ziane et al. (2014, 2016) (Tableau 4). Elles étaient isolées à partir des échantillons de la semoule de couscous commercialisé en Algérie ainsi que de lait de femelle dromadaire.

Tableau 4 : Description des souches de *Bacillus* spp testés dans cette étude.

Souches	Espèces	Origine	Références
S1	<i>Bacillus licheniformis</i>	Semoule de couscous	Ziane et al. (2014)
S3	<i>Bacillus licheniformis</i>	Semoule de couscous	
S4	<i>Bacillus licheniformis</i>	Semoule de couscous	
S5	<i>Bacillus cereus</i> groupe IV	Semoule de couscous	
S6	<i>Bacillus cereus</i> groupe IV	Semoule de couscous	
S7	<i>Bacillus cereus</i> groupe IV	Semoule de couscous	
S9	<i>Bacillus licheniformis</i>	Semoule de couscous	
S10	<i>Bacillus cereus</i> groupe IV	Semoule de couscous	
S11	<i>Bacillus cereus</i> groupe IV	Semoule de couscous	
S12	<i>Bacillus subtilis</i>	Semoule de couscous	
ES1	<i>Bacillus cereus</i> groupe III	Lait de femelle dromadaire	Ziane et al. (2016)
ES2	<i>Bacillus licheniformis</i>	Lait de femelle dromadaire	
ES3	<i>Bacillus licheniformis</i>	Lait de femelle dromadaire	
ES4	<i>Bacillus pumilis</i>	Lait de femelle dromadaire	

3. 2. Confirmation de la pureté et l'authentification des souches testées

Les colonies bactériennes obtenues ont subi une purification, en réalisant des repiquages sur milieu nutritive gélosé coulées des boîtes de Pétri de 90 mm puis incubé à 30°C pendant 24h. Les cultures pures étaient testées pour la production de catalase (Annexe 1), puis une coloration de Gram (Annexe 2).

3. 3. Mise en évidence de la production de l'amylase par les *Bacillus* sur milieu solide

Les essais de détermination de la production et l'activité de l'amylase ont été effectués selon Anduaem (2014). L'ensemble de souches figurait dans le tableau ? Les cultures de *Bacillus* ont été préparée partir de milieu de purification par l'ensemencement d'un ose sur milieu d'amidon gélosé (1 % d'amidon, 0,5 % de peptone, 1,5 % d'extrait de levure et 15 g d'Agar à pH 7,0). Les cultures ont été ensuite incubées à 30°C pendant 24h.

Après incubation, un volume de solution de Lugol (1%) était versé sur la culture. La production de l'amylase était révélée par un halo clair non coloré par violet.

3. 4. Production de l'amylase sur milieu liquide

La production de l'amylase dans le milieu liquide a été testée pour les souches productrices de l'amylase sur milieu solide. Des précultures de ces souches ont été préparée partir de milieu bouillon a 1% d'amidon (0,5 % de peptone et 1,5 % d'extrait de levure à pH 7,0). Les cultures ont été incubées à 30°C pendant 24h.

Après incubation, les cultures ont été centrifugé à 5000g pendant 15 minutes. Ensuite, les surnageant ont été récupéré puis filtré dans des tubes stériles et dans les conditions aseptiques.

Les filtrats stériles récupérés ont été testés sur milieu gélosé à 1% d'amidon par la méthode des puits (Anduaem, 2014). Un volume de 10µl de filtrat était déposé dans les puits crée dans la gélose par la Cloch de durham stérile. Les boites ont été incubées à 30°C pendant 24h.

Après incubation, un volume de Lugol à 1% a été versé sur la surface des boites. Un halo clair non coloré révèle une dégradation de l'amylase.

3. 5. Etude de l'activités de l'amylase

Ce volet consiste une étape de simulation basé sur les résultats empirique in vitro.

Etape 1 : étude de la cinétique de la réaction *in vitro*

L'étude de la cinétique enzymatique de l'extrait brute a été réalisé seulement pour deux souches.

Préparation d'enzymes brutes

Les extraits enzymatiques brutes produites par les deux souches de *Bacillus* ont été préparées fraîchement avant les tests. Un ose de chaque souche a été repiqué dans un bouillon à 1% d'amidon puis incubé à 30°C pendant 24h. Ensuite les cultures ont été centrifugé à 5000g

pendant 15 minutes. Les surnageants étaient récupérés puis stérilisés par filtration. Les surnageants ont été gardés dans la glace jusqu'à l'utilisation.

Evaluation de l'activité d'amylase

Pour tester l'activité d'amylase présente dans les extraits brutes obtenus précédemment, le plan d'expérience suivi est illustré sur le Tableau 5. Le mélange réactionnel de Tableau 5 est incubé à 37°C. La réaction est suivie durant 10 minutes. La concentration de produit formé est estimée par la méthode spectrophotométrique de Fehling.

Le dosage des sucres réducteurs a été réalisé comme montré le Tableau 6. Les mélanges réactionnels étaient incubés ensuite à 100°C pendant 15 minutes. Après incubation la lecture de densité optique a été réalisée à 540nm. La concentration de produit formé est déduite à partir de la courbe d'étalonnage tracée de l'absorbance de la gamme étalon du glucose en fonction de leur concentration (g /L).

Tableau 5 : Mélange réactionnel pour évaluer l'activité d'amylase dans les extraits brutes.

Réactifs (mL)	Volume de mélange (mL)			
	Blanc	Control négatif	Control positif	Échantillons
Tampon	3	2	1	1
Maxilase 5000 UI	0	0	1	0
Extrait brut	0	0	0	1
Amidon	0	1	1	1
Volume total			3	

Quatre mélanges ont été préparés, un blanc qui contient seulement tampon a été utilisé, un contrôle négatif qui contient seulement l'amidon et tampon, un contrôle positif qui contient l'enzyme pure, l'amidon et de tampon et enfin l'échantillon qui contient l'extrait brute, le substrat et le tampon.

Tableau 6 : milieu réactionnel de dosage de sucres réducteurs par la méthode de Fehling.

Volume (mL)	Témoin/blanc	Concentration du glucose (g/L)				
		5	2,5	1,25	0,625	0,312
H ₂ O	1			0		
Fehling A			2			
Fehling B			2			
Glucose	0			1		
Volume total			5			

Etape 1 : Détermination graphique de la constante de Michaelis KM et de v_{max}

La détermination des constantes KM et v_{max} consiste une étude cinétique de la réaction de l'amylase. Elle consiste à tracer le graphique représentant les vitesses initiales (vi) versus la concentration en substrat [S] utilisé. Pour améliorer la précision de la détermination graphique de ces deux constantes, il existe des représentations graphiques qui linéarisent les résultats, permettant des extrapolations plus précises.

La méthode la plus connue est celle de Lineweaver et Burk dans laquelle on représente $1/v_i = f(1/[S])$. Cette représentation est obéie l'équation : $1/v_i = a \times (1/[S]) + b$ avec : $a = KM / v_{max}$ et $b = 1/v_{max}$.

Deuxième méthode consiste à estimer les deux paramètres qui était linéarisé par la première méthode. Elle consiste d'estimer les deux paramètres KM et Vmax par l'ajustement de l'équation de Menten :

$$v_i = V_{max} \cdot [S] / ([S] + K_m) \quad \text{equation 7}$$

Les valeurs de Vmax et KM ont été estimé par l'ajustement des équations à l'aide de la méthode de moindre au carrée su Excel.

3. 6. Analyse statistique

Les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide open accès logiciel de Excel Microsoft 2021. Quant à l'analyse de variance (ANOVA) suivi du test post hoc de Duncan à $P \leq 0,05$ a été réalisé par Minitab.

RESULTS AND DISCUSSION

4. 1. Confirmation de la pureté et de l'authentification des souches testées

L'ensemble des souches testées ont été pure et appartiennent au genres *Bacillus* comme était mentionné par Ziane et al. (2014, 2016). Selon Ziane et al. (2014, 2016), ces souches ont été identifiées par séquençage de gènes rRNA 16S. Toutes les souches interagissent positivement avec les colorants de coloration de Gram et de l'eau oxygénée (catalase positive), de forme bacillaire avec une endospores.

Les souches étudiées ont été isolées à partir de la semoule de couscous (Ziane et al., 2014) et du lait de femelle dromadaire (Ziane et al., 2016). Les espèces testées sont *B. cereus* groupe IV et III, *B. licheniformis*, *B. subtilis*, *B. pumulis*. Ces espèces sont connus de leur pouvoir producteur des amylases. En effet, plusieurs chercheurs ont montré la production des amylases par les espèces étudiées comme montre le Tableau 7.

Les espèces de *Bacillus* sont considérées comme les sources les plus importantes d'alpha-amylase. Plusieurs auteurs (Tableau 7) ont utilisé ces espèces pour la production des enzymes et en particulier l'amylase.

Tableau 7: Synthèse de certains souches productrice des amylases.

Genres/espèce	Produit	Références
<i>Bacillus cereus</i>	Vermicompost	Sivakumar et al. (2012)
<i>Bacillus cereus</i>	Produits amyliacés	Vijayabaskar et al (2012)
<i>Bacillus pumulis</i> , <i>Subtilis</i> , <i>licheniformis</i>		Raplong et al. (2014)
		Aurelio et Estibaliz Sansinenea (2022)

4.2. Détection préliminaire de l'activité amylase

Quatorze souches bactériennes ont été criblées pour la production d'amylase. Les analyses sur milieu gélosé ont révélé que 8 souches, sur 14 souches, ont dégradé l'amidon traduit par la formation de zones de clarification (zone d'hydrolyse) sur milieu gélosé à 1% de l'amidon à 30°C (Figure 6 et Tableau 8). Le tableau 1 montre les souches ont même pouvoir dégradant de l'amidons sur milieu. Les zones de d'hydrolyse des souches positives à l'amylase variaient de 2 à 3 cm de diamètre sur solide. Pas de différences significatives n'était observées.

Ces souches dégradant de l'amidon ont été sélectionnées pour le test de caractérisation enzymatique plus approfondi par la méthode des puits. Les résultats révèlent que 7 souches, sur 8 souches, ont dégradé de l'amidon. La souche S1 et S3 a montré une meilleure dégradation par rapport aux autres souches. Cependant le surnageant issu de la souche 3 a donné la zone la plus faible. Au terme de cette partie, les résultats ont montré que l'activité d'amylase est hétérogène et dépendante de la souche. Les mêmes résultats ont été reporté par Kim et al. (2016).

Dans cette étude, le pouvoir de dégradation de l'amidon dépend de la souche et ne pas de la source de la souche, c'est-à-dire les souches issues de lait de femelle dromadaire ont montré une meilleure production de l'amylase par rapport aux souches identifiées à partir de la semoule de couscous. Ces résultats sont en accord avec les résultats de Miłek et Lamkiewicz (2022), Zhang et al. (2017). Ces auteurs ont montré que trois isolats doués de production de l'amylase était provenu à partir de sources alimentaires pauvre en glucides, tandis que les isolats provenant de sources alimentaires riches en glucides n'ont pas montré de niveau élevé d'activité de l'amylase.



Figure 6 : Représentation de résultats de test de recherche de dégradation de l'amylase.

Tableau 8: Activité amylasique des souches étudiés dans cette étude.

Souches	Espèces	Origine	Diamètres de zone de dégradation sur milieu solide à 1% d'amidon		Activité enzymatique			
					Equation de Michaëlis Menten		Lineweaver et Burk	
			Cellules	Surnageant	V _{max}	KM	V _{max}	KM
S1	<i>Bacillus licheniformis</i>	Semoule de couscous	+	+	41	2	8	0,05
S3	<i>Bacillus licheniformis</i>		+	+				
S4	<i>Bacillus licheniformis</i>		-					
S5	<i>Bacillus cereus</i> groupe IV		-					
S6	<i>Bacillus cereus</i> groupe IV		+	+				
S7	<i>Bacillus cereus</i> groupe IV		-					
S9	<i>Bacillus licheniformis</i>		-					
S10	<i>Bacillus cereus</i> groupe IV		-					
S11	<i>Bacillus cereus</i> groupe IV		-					
S12	<i>Bacillus subtilis</i>		+	+	20	0.5	6	0,01
ES1	<i>Bacillus cereus</i> groupe III	Lait de femelle dromadaire	+	-				
ES2	<i>Bacillus licheniformis</i>		+	+				
ES3	<i>Bacillus licheniformis</i>		+	+				
ES4	<i>Bacillus pumilis</i>		+	+				

NB : non déterminé

4. 3. Détermination de la cinétique enzymatique

Selon Berg, Tymoczko et Stryer (2002), les enzymes sont importantes pour améliorer le taux de réactions biochimiques. La V_{max} est la vitesse de réaction maximale atteinte par une enzyme et peut être utilisée pour indiquer la capacité maximale d'une enzyme à effectuer des réactions enzymatiques en présence d'une quantité suffisante de substrats. Par ailleurs, le K_m définit l'affinité de l'enzyme pour son substrat, plus K_m est faible plus l'affinité de l'enzyme pour son substrat est grande. Les valeurs de V_{max} et K_m obtenues sont illustrées dans le tableau 8.

Les résultats de simulation par la méthode Lineweaver et Burk et de Michaëlis Menten (Figure 7, 8 et 9) montrent que K_m et le V_{max} des souches testées S1 et S12 ont été calculés en traçant des graphiques comme le montrent les figures 4. Les valeurs de K_m et de V_{max} sont plus faibles par rapport aux valeurs estimées par la méthode de Michaëlis Menten. Cependant, les valeurs de V_{max} et K_m de maxilase sont comprises entre les deux valeurs. Ces valeurs de l'activité enzymatique sont dépendantes des conditions expérimentales de la concentration de substrat, de l'enzyme et la méthode de détection de produit formé.

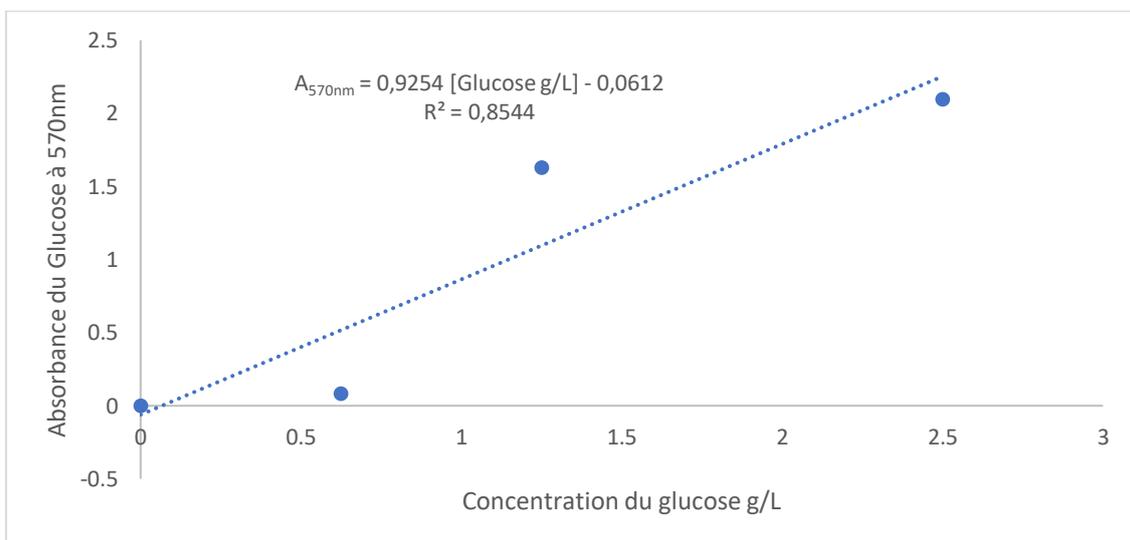


Figure 7 : Courbe d'étalonnage de sucre réducteur.

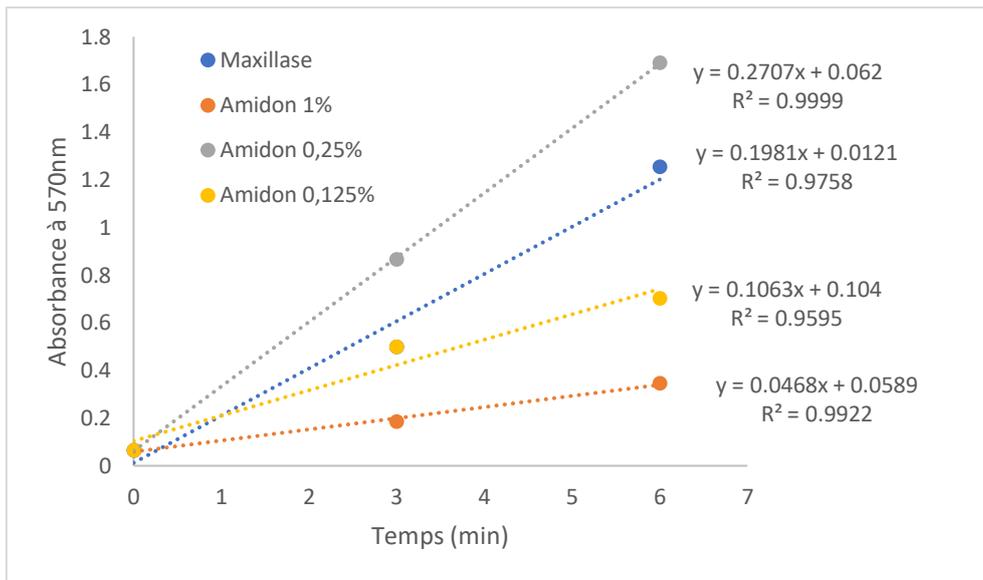


Figure 8 : Cinétique de l'activité enzymatique de différents essais.

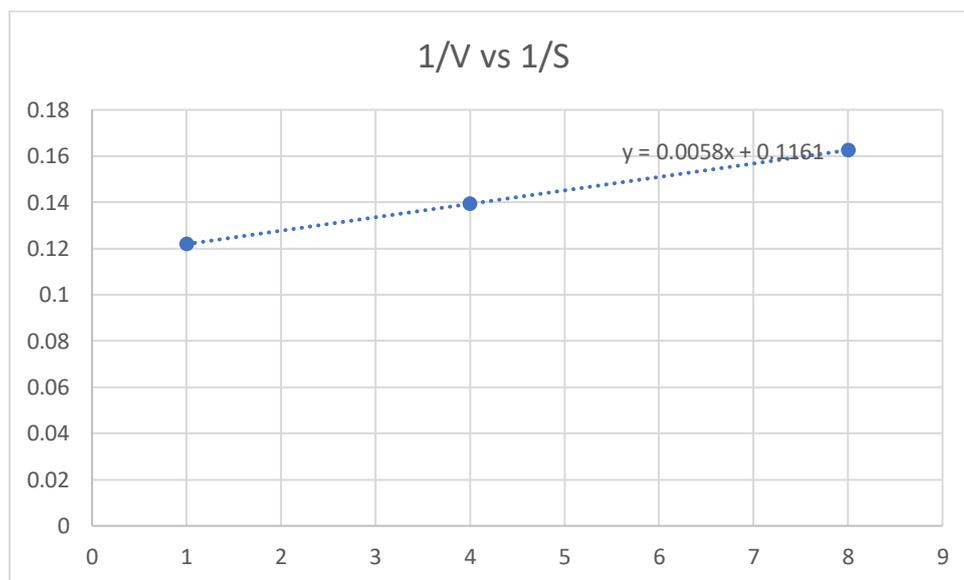


Figure 9 : Cinétique de l'activité enzymatique des extraits par la méthode Lineweaver et Burk.

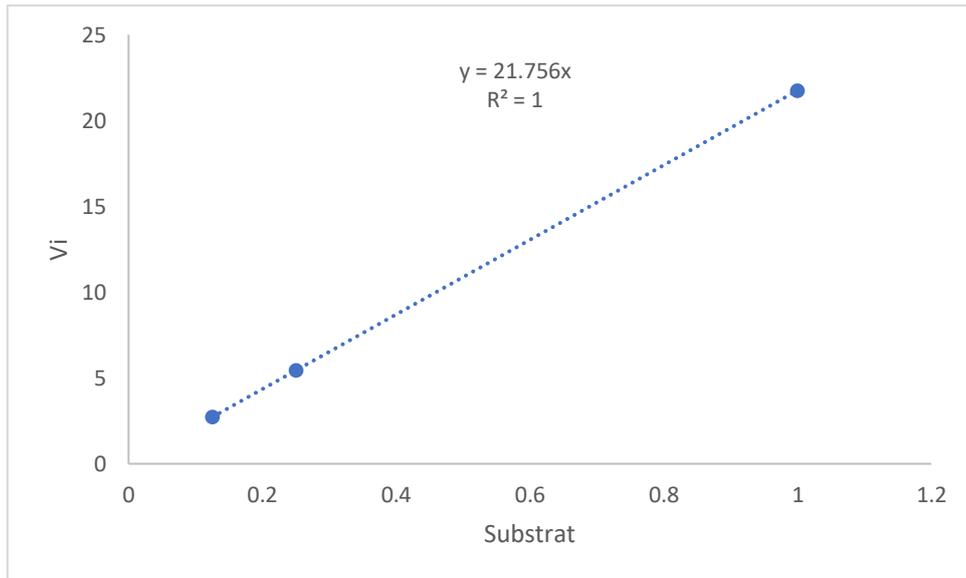


Figure 10 : Cinétique de l'activité enzymatique des extraits par la méthode de Michaëlis Menten.

CONCLUSION

Conclusion

Les enzymes revêtent une grande importance dans divers domaines technologiques, médicales...etc. En effet, l'utilisation des enzymes est en augmentation croissante. Parmi ces enzymes se trouve l'amylase qui présente plusieurs intérêts technologiques et thérapeutiques. Dans cette étude préliminaire, la production des amylases par les souches de *Bacillus* identifiées à partir de la semoule de couscous et du lait de femelle dromadaire a été exploré.

Les résultats ont montré une variabilité de dégradation de l'amidon. Cette dégradation est dépendante des souches et elle n'a pas de relation entre les origines des souches.

Quant à l'activité enzymatique des extraits de deux souches productrices des amylases, les valeurs de K_M et V_{max} , déterminées par la méthode de Michaëlis-Menten, est élevées par rapport au control (Maxilase) et celles déterminées par la méthode de Lineweaver et Burk.

Au terme de ce travail, les résultats de cette étude nécessitent une étude moléculaire pour purifier l'enzyme ainsi que déterminer les paramètres de la cinétique enzymatique plus précisément.

Références

- Abriouel, H., Franz, C. M., Omar, N. B., et Gálvez, A.** (2010). Diversity and applications of Bacillus bacteriocins. *FEMS Microbiol Rev* 35 201–232
- Ait kaki- El-Hadef El-Okki A., Leghlimi H., Dakhmouche S., Bennamoun L. et Meraihi Z.** (2012). Utilisation de la planification expérimentale pour l'optimisation de la production de l' α amylase par *Rhizopus oryzae*. *Rev. Microbiol. Ind. San et Environn.* Vol 6, (1), pp. 1-17.
- Akbache. N et Bariout. S.** (2007). Utilisation de planification expérimentale pour l'optimisation d'un milieu de culture à base de farine de dattes déclassées pour la production d' α -amylase de *Rhizopus oryzae*. Mémoire d'ingénieur, INATAA, université Mentouri, Constantine, P: 42.
- Babu K. R. et Satyanarayana T.** (1993). Extracellular calcium inhibited α -amylase of *Bacillus coagulans* B49. *Enzyme Microbiol. Technol.* 15,1066-1069
- Baldwin P., Van E. C., Istasse L. et Bienfait J.M.** (1986). Fermentation en silos de laboratoire de pulpes de betteraves sucrières. *Belgian Journal of Food Chemistry and biotechnology.* (98), pp.792-797
- Ball. S., H.P. Guan., M. James., A. Myers., P. Keeling., G. Mouille., A. Buléon., P. Colonna., J. Preiss** *Cellule*, 86 (1996) , pages 349 à 352 . *Cell*, Vol. 86, 349–352, August 9, 1996, Copyright © 1996 by Cell Press From Glycogen to Amylopectin: Minireview A Model for the Biogenesis of the Plant Starch Granule)
- BECHKRI S.** Maitre de Conférences catégorie A Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie Université Frères Mentouri Constantine 1.2023/24
- Berry D. R and Paterson A.** (1990). Enzymes in food industry In: Sucking C.J. (éd.), *Enzyme chemistry impact and application.* Editions chapman and hall London, 2nd edition. P: 306-351.
- Bertrand Tatsinkou Fossi., Frédéric Tavea., Robert Ndouenkeu.** (2005), Production et caractérisation partielle d'une amylase thermostable à partir d'une souche de levure ascomycète isolée de sols amylicés. *Journal Africain de Biotechnologie* Vol.4(1).

- Boel E ., Brady L ., Brzozwski A ., Derewenda Z ., Dodson G ., Jensen V., Petersen. S., Swift H., Thim L .et Woldike., H.** (1990). Calcium binding in α -amylases: an X-ray diffraction study at 2.1-Å resolution of two enzymes from *Aspergillus*. *Biochemistry*; 29, p :6244–6249.
- Bouatenin Koffi Maïzan Jean-Paul, Djéni N'dédé Théodore, Kakou Abodjo Célah., Menan Eby Hervé., DjeKoffi Marcellin.** (2016) Optimisation De La Production De L' α -Amylase Par Les Microorganismes Isolés Des Ferments Traditionnels De Manioc Provenant De Trois Zones De Production De L'attiéké En Côte d'Ivoire *European Scientific Journal* , edition vol.12, No.9 ISSN: 1857 – 7881 (Print) e - ISSN 1857- 7431
- Bouix M. et Leveau J. Y.** (1999). Production des enzymes. In Scriban R (Ed) : *Biotechnologie* Ed. Lavoisier. 344-400.
- Burhan A., Nisa U., Gokhan C., Omer C., Ashabil A and Osman G.** (2003). Enzymatic properties of a novel thermostable, thermophilic, alkaline and chelator resistant amylase from an alkaliphilic *Bacillus* Sp. Isolate ANT-6. *Process Biochem.* 38, P: 1397-1403.
- Çalik. P., Özdamar T.H,** (2001) Les sources de carbone affectent les capacités métaboliques des espèces de *Bacillus* pour la production d'enzymes industrielles. *Biochimie. Ing. J.*; 8 (1):61-81
- Cuveillier G. F.** (1999). Réacteurs enzymatiques à enzymes libres. In Scriban R. (Ed): *Biotechnologie*. Ed. Lavoisier. 401
- Dauter. Z., Dauter. M., Brzozowski .A.M., Christensen .S. Borchert T.V., Beier .L., Wilson K.S.et Davies G.J.**(1999). X-ray structure of Novamyl, the five-domain "maltogenic" alphaamylase from *Bacillus stearothermophilus*: maltose and acarbose complexes at 1.7Å resolution. *Biochem.* (38) : 8385-8392.
- De Souza, P, M . ; Magalhaes, P, O.** « Application of microbial alphaa-amylases in industry – A Review ». *Brazilian journal of microbiology* (2010) 41 : 850-861.
- Devine, K.M.,** 1995. The *Bacillus subtilis* genome project: aims and progress. *Tibtech*, 13 : 210-216
- Dey G., Palit S., Banerjee R. et Maiti B.** (2002). Purification and characterization of maltooligosaccharides forming amylase from *Bacillus circulans* GR 9313. *Ind. Microbiol.biotechnol.* 4,193-200.

DROBNIIEWSKI F.A, *Bacillus cereus* and Related Species (1993), Public Health Laboratory Service, Dulwich Hospital, East Dulwich Grove, London SE22 8QF, United Kingdom, CLINICAL MICROBIOLOGY REVIEWS, p. 324-338

Dvail, S., Grety, J. Et Lenzini, M. (2010). Les actinomycetes, source de biomolécules d'interet industriel. Haute École de la province de liège.

Egas M. C., Da Cota M. S., Cowman D. A. et Pieres E. M. (1998). Extracellular α -amylase from *Thermus Filiformis* ork A2 : purification and biochemical characterization. *Extremophiles*. 2(1) : 23-32.

Elnaz Aledavood, Alessia Forte, Carolina Estarellas, F. Javier Luque. University of Barcelona (2021) - Computational and structural biotechnolo...(Research Network of Computational and Structural Biotechnology (RNCSB))- Vol. 19, pp 3394-3406

Eric, D. (2008). *Bacillus cereus*, Collection « Monographies de microbiologie » dirigée par Jean-Paul Larpant. LAVOISIER_2008, ISBN : 978-2-7430-0073-7 ISSN : 1625-9329

Errington, J. (1993) 'Bacillus subtilis sporulation: Regulation of gene expression and control of morphogenesis', *Microbiological Reviews*, 57(1), pp. 1–33. doi: 10.1128/mmbr.57.1.1-33.1993.

Ertan. F et Balkan. B. (2007). Production of α -Amylase from *Penicillium chrysogenum* under Solid-State Fermentation by Using Some Agricultural By-Products. *Food Technol. Biotechnol.*45 (4), P: 439-442.

Fang Wang, Yuchen Liu, Chang Du and Renjun Gao .Key Laboratory for Molecular Enzymology and Engineering, The Ministry of Education, School of Life Science, Jilin University, Changchun 130021, China;

Feller G., Lonhienne T., Deroanne C., Libiouille C., Van beeumen J. et Gerday C. (1992). Purification, Characterisation and nucleotide sequence of the thermolabile α -amylase from the Antarctic psychrotroph *Alternomomonas haloplanctis* A23. *J. Biol. Chem.* 267(8): 5217-5221.

Fouad M. F. Elshaghabee , Namita Rokana, Rohini D. Gulhane , Chetan Sharma and Harsh Panwar, *Bacillus* As Potential Probiotics: Status, Concerns, and Future Perspectives, 10 August 2017 doi: 10.3389/fmicb.2017.01490

- Francesco, C. Alessandra, V. Alice, C. Diletta, M. Antonella, L. and Emilia, G.** (2016) Identification of *Bacillus* species: Implication on the quality of probiotic formulations (site pub Med centrale)
- Gauvry, E. Mathot, A-G, Leguériel, Couvert, O. Postollec, F. Brousolle, V. Coroller, L.** (2017) 'Knowledge of the physiology of spore-forming bacteria can explain the origin of spores in the food environment', *Research in Microbiology*, 168(4), pp. 369–378. doi: 10.1016/j.resmic.2016.10.006.
- Ghani, M ; Ansari, A ; Aman, A ; Rachida, R, Z ; Siddiqui, N, N Et Qader, S, A.** « Isolation and characterization of different strains of *Bacillus licheniformis* for the production of commercially significant enzymes ». *Pak. J. Pharm.Sci.*, Vol.26. No.4, July 2013, pp.691-697.
- Gurung, N ; ray, S ; bose, S Et Rai, V.** « A broader view : Microbial enzymes and their relevance in industries,medecine and beyond. *BioMed research International*, Volum (2013), 329121, 18 pages.
- Haki. G.D., Rakshit S.K.** Bioprocess Technology Program, Asian Institute of Technology (AIT), P.O. Box 4, Klong Luang, Pathumthani 12120, (2003)
- Holt, J.G., N.R. Krieg, P.H.A. Sneath, J.T. Staley et S.T. Williams** (1994). *Bergey`s Manual of Determinative Bacteriology*. P :559 9th Edn., Williams and Wilkins, Baltimore.
- Ines, M.M, Polonca, S, et Jan Dirk, V.E.** *Ecology of bacillaceae*, *Microbiology Spectrum* · (2015), University of Groningen, Linneausborg, Nijenborgh 7, 9747AG Groningen, Netherlands
- Janeček. S, Svensson. B, MacGregor. F. A.** - *Sciences de la vie cellulaire et moléculaire*, 2014 vol .71. 1149-1170p
- Kathiresan. K et Manivannan. S.** (2006). α -amylase production by *Penicillium fellutanum* isolated from mangrove rhizosphere soil. *African Journal of Biotechnology* Vol. 5 (10), P: 829-832
- Kofi Kwegyir Essel , Yaa Dufié Osei** - *Enquête sur certaines propriétés cinétiques de l'invertase commerciale de la levure* (2014) - *Chimie et recherche des produits naturels*
- Larpent G .M et Sanglier J. J.** (1992). *Biotechnologies : Principes et méthodes*. ISBN :2-7040-0689-X. P : 574- 581.

- Leslie D., Gottlieb, N. F.** (1981) Correlation between subcellular location and phosphoglucose isomerase variability. *Weeden University of California, Davis Evolution* (John Wiley & Sons, Ltd (10.1111))- Vol. 35, Iss: 5, pp 1019-1022
- Leveau J.Y. et Bouix M.** (1993). Les moisissures. In : Florent J. Ed. *Microbiologie industrielle. Les micro-organismes d'intérêt industriel*. Edition Tec et Doc .Lavoisier. Apria, pp.110-170.
- Mark R. Stam., Etienne G. J. Danchin, Corinne Rancurel, Pedro M. Coutinho and Bernard Henrissa .** (2006) Protein Engineering, Dividing the large glycoside hydrolase family 13 into subfamilies: towards improved functional annotations of α -amylase-related proteins *Design & Selection* vol. 19 no. 12 pp. 555–562.
- Mcmahon E.M, Kelly C.T et Fogarty W.M.** (1999). High maltose producing amylyolytic system of a *Streptomyces* species. *Biotechnology Letters*. 21, p: 23-26.
- Mecier C.** (1985). Les enzymes amylolytiques. In Mauranche A et Costes C. (Ed): *Hydrolases et polymérasés*. Ed. Gauthier Villars. Pp, 109-142.
- Mercier C.** (1985). Les enzymes amylolytiques. In : Mouranche A. Coste C. *hydrolases et dépolymérasés*. Ed Gauthier-Villars., pp.110-140.
- Moffitt, A.E., JR Dixon, FC Phipps, SEM Stokinger –** (1972) . L'effet du benzpyrène, du phénobarbital et du tétrachlorure de carbone sur la distribution subcellulaire des métaux et l'activité des enzymes microsomaux.
- Nakatani H.** (1996). Rontecarlo stimulation of multiple attack mechanism of α - amylase. *Biopolymers*.39 (5), P: 665-669.
- Niehaus F., Bertoldo C., Kahler M. et Antranikian G.** (1999). Extremophiles as a source of novel enzymes for industrial application. *Applied Microbiology and Biotechnology* . (50),pp.711-729.
- Nigam, P, S.** Microbial enzymes with special characteristics for biotechnological applications. *Biomolecules* (2013), 3, 597-611 ; doi : 10.3390/biom3030597.
- Olga D. L.** *Enzyme Inhibitors and Activators*. (2017) doi : 10.5772_67248
- Panchal. C,** (1990). *Yeast strain selection*. Marcel Dekker. Ed. USA, New York .189p.

- Pandey. A, Nigam P , Soccol CR , Soccol VT , Singh D , Mohan R.** Advances in microbial amylases. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, (2000). (2):135-52.
Doi:10.1042_ba19990073.
- Pauline Loison** (2013) Etude de la spore de *Bacillus subtilis* : caractérisation des structures impliquées dans sa résistance. *Biotechnologies*. Université de Bourgogne,. Français. ffNNT : 2013DIJOS078ff. fftel-01124213f
- Pazur J. H and Marchetti N.T.** (1992). Action patterns of amylolytic enzymes as determined by the [1-14 C] malto-oligosaccharides mapping method. *Carbohydr. Res.* 227, P: 215-225. *Process Biochem.*, 40, P: 2931-2944.
- Peter Robinson.** (2015), Collège des sciences et technologies, Université de Central Lancashire, Preston PR1 2HE, Royaume-Uni
- Rooney, A. P., Price, N. P., Ehrhardt, C., Swezey, J. L., et Bannan, J. D.** (2009). Phylogeny and molecular taxonomy of the *Bacillus subtilis* species complex and description of *Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum* subsp. nov. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 59(10), 2429-2436.
- Ruohonen L., Penttilä M. et Keränen S.** (1991). Optimisation of *Bacillus* α amylase production by *Saccharomyces Cerevisiae*. *Biotechnol.* 7(4) : 337-346.
- Schomburg. D and Salzmann. M** (1991). *Enzyme Hand book 4. Classe 3: Hydrolases* Springer-Verlag (ed). Berlin Heidelberg. Germany. p: 1-12.
- Scriban R.** (1993). *Trichoderma reesei* exhibit true reversion and a high exchange rate on crystalline cellulose. *Biotechnologie*. P : 32-690, 4^{ème} édition.
- Scriban R.** (1999). *Biotechnologie*. 5^{ème} édition. Techniques et Documentation – Lavoisier (éd.). P: 401-409.
- Setlow, P.** (2014) ‘Germination of spores of *Bacillus* species: What we know and do not know’, *Journal of Bacteriology*, 196(7), pp. 1297–1305. doi: 10.1128/JB.01455-13.
- Sicard. P,** (1982). Applications industrielles des enzymes ; In : *Les enzymes, production et utilisation industrielles*. Durand G., Monson P. Editions Gauthier. Villars, Paris.p.110-180.
- Sicard. P,** (1982). Applications industrielles des enzymes. In : *Les enzymes production et utilisations industrielles*. Durand G., Monson P. Editions Gauthier – Villars, Paris.p:121-164

- Sivaramakrishnan. S, D. Gangadharan, K. M. Nampoothiri, C. R. Soccol, and A. Pandey** :a-Amylases from Microbial Sources, Food Technol. Biotechnol. 44 (2) 173–184 (2006)
- Smith, N. R., R. E. Gordon, and F. E. Clark.** (1952). Aerobic spore-forming bacteria. U.S. Department of Agriculture Monograph 16. U.S. Government Printing Office, Washington, D.C.
- Suriya J, Bharathiraja S, Krishnan M, Manivasagan P, Kim SK.** Extremozymes from Marine Actinobacteria, Adv Food Nutr Res. 2016 ;79 : 161-177. est ce que je: 10.1016/bs.afnr.2016.07.001. (2016).
- Tayefi-Nasrabadi. H., Gh. Moghaddam, Zolfaghar Rajabi.** University of Tabriz (2008) - Pakistan Journal of Biological Sciences (Pak J Biol Sci)- Vol. 11, Iss: 22, pp 2589-2593
- Theresa Reinersmann , Michel Herré, Bernd Marschner, Stéfanie Heinze.** (2023), Réponse de l'activité enzymatique du sol aux ajouts de substrat et de nutriments sur des échantillons de sous-sol forestier non perturbés.
- Untung Susilo , Farida Nur Rachmawati, Eko Setio Wibowo, Ristianandani R. Pradhyaningrum, Koni Okthalina, Muthiara NA Mulyani** - Activités des enzymes digestives chez la loche barrée (*Nemacheilus fasciatus*, Val., 1846.) : effet du pH et de la température (2022) - Molekul : Jurnal Ilmiah Kimia.
- Vallee B. L., Stein E. A., Summer W.N et Fisher E.H.** (1959). Metal content of a-amylases of various origins. J Biol Chem. 234, p:2901-2929.
- Wen, J. Pasma, R. Manders, M.M.E. Setlow, P. Brul, S.** (2019) ‘Visualization of germinosomes and the inner membrane in bacillus subtilis spores’, Journal of Visualized Experiments, 2019(146), pp. 1–9. doi: 10.3791/59388
- Xiangying Guan., Alok Upadhyaya, and Raj Chakrabarti.** Mechanism-based enzyme activating compound Division of Fundamental Research, Chakrabarti Advanced Technology, 1288 Route 73, Mount Laurel, NJ 08054, USA (21.05.2020)
- Xing, Y. and Harper, W. F.** (2020) ‘Bacillus spore awakening: recent discoveries and technological 196 developments’, Current Opinion in Biotechnology. Elsevier Ltd, 64, pp. 110–115. doi: 10.1016/j.copbio.2019.12.024.
- Zaki FG .**(1977)- Annals of Clinical and Laboratory Science... (Ann Clin Lab Sci)- Vol. 7, Iss: 3, pp 222-230

Zakowski JJ, Bruns DE. (1985), Biochemistry of human alpha amylase isoenzymes. Crit Rev Clin Lab Sci. ;21(4):283-322

Zeigler, D. R., et Perkins, J. B. (2008) 24 The Genus Bacillus. Practical Handbook of microbiology, second Edition, 309.

Annexes

Annexe (1):

- Prenez une lame du microscope ou un tube à essai propre
- Préparez une solution de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2)
- Avec une boucle stérile, prélevez une petite quantité de culture bactérienne
- Déposez la culture sur la lame
- Ajoutez une ou deux gouttes de H_2O_2
- Observez immédiatement pour voir si des bulles se forment
- Des bulles indiquent un résultat positif

Annexe (2):

- Déposez une goutte d'eau en plein centre de la lame
- Prenez une colonie isolée, déposez-la dans la goutte d'eau et étendez sur la plus grande surface
- Fixez la lame à la chaleur, répétez le flambage jusqu'à ce que la lame soit sèche
- Violet de gentiane → laissez 1 min puis rincez avec l'eau
- Lugol → laissez 1 min puis rincez avec l'eau
- Alcool acétone → laissez 10 sec puis rincez avec l'eau
- Fushing → laissez 1 min rincez avec de l'eau

Résumé :

Les enzymes revêtent une grande importance dans divers domaines technologiques, médicales...etc. En effet, l'utilisation des enzymes est en augmentation croissante. Parmi ces enzymes se trouve l'amylase qui présente plusieurs intérêts technologiques et thérapeutiques. Dans cette étude préliminaire, la production des amylases par les souches de *B. cereus* identifiées à partir de la semoule de couscous et du lait de femelle dromadaire a été exploré. La recherche de l'activité amylasique a été réalisé sur milieu solide a 1% d'amidon. Les résultats permettent à sélectionner 8 souches dégradant l'amidon. Parmi ces souches 7 souches ont pu sécréter l'enzyme extracellulaire. Cette activité a été révélé sur milieu solide par la méthode de puits. L'activité enzymatique des extraits de deux souches productrices des amylases montre des valeurs de KM et Vmax, déterminées par la méthode de Michaëlis-Menten, plus élevées par rapport au control (Maxilase) et celles déterminées par la méthode de Lineweaver et Burk. Ces résultats présentent un intérêt technologique intéressant et peuvent être exploité.

Mots clés : *Bacillus*, Amylase, biotechnologie, application industrielle.

Abstract :

Enzymes are of great importance in various technological, medical, etc. fields. Indeed, the use of enzymes is increasingly increasing. Among these enzymes is amylase which presents several technological and therapeutic interests. In this preliminary study, the production of amylases by *B. cereus* strains identified from couscous semolina and female dromedary milk was explored. The search for amylase activity was carried out on a solid medium containing 1% starch. The results made it possible to select 8 starch-degrading strains. Among these strains, 7 strains were able to secrete the extracellular enzyme. This activity was revealed on solid medium by the well method. The enzymatic activity of extracts from two amylase-producing strains shows values of KM and Vmax, determined by the Michaëlis-Menten method, higher compared to the control (Maxilase) and those determined by the Lineweaver and Burk method. These results are of interesting technological interest and can be exploited.

Key words: *Bacillus*, Amylase, biotechnology, industrial application.

الملخص

إنزيمات أهمية كبيرة في مختلف المجالات التكنولوجية والطبية وغيرها. وفي الواقع، فإن استخدام الإنزيمات يتزايد بشكل متزايد. ومن بين هذه الإنزيمات الأميليز الذي يقدم العديد من الفوائد التكنولوجية والعلاجية. في هذه الدراسة الأولية، تم استكشاف إنتاج الأميليز بواسطة سلالات *B. cereus* التي تم تحديدها من سميد الكسكس وحليب أنثى الجمل العربي. تم إجراء البحث عن نشاط الأميليز على وسط صلب يحتوي على 1% نشا. أتاحت النتائج اختيار 8 سلالات قادرة على تحلل النشا. ومن بين هذه السلالات، تمكنت 7 سلالات من إفراز الإنزيم خارج الخلية. تم الكشف عن هذا النشاط على وسط صلب بطريقة البئر. يظهر النشاط الأنزيمي للمستخلصات من سلالتين منتجتين للأميليز قيم KM و Vmax المحددة بطريقة Michaëlis-Menten، وهي أعلى مقارنة بالتحكم (Maxilase) وتلك التي تحددها طريقة Lineweaver و Burk. هذه النتائج ذات أهمية تكنولوجية مثيرة للاهتمام ويمكن استغلالها.

الكلمات المفتاحية: الكائنات الحية الدقيقة العصوية، الأميليز، التكنولوجيا الحيوية، التطبيقات الصناعية