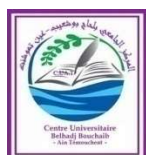


---

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE  
SCIENTIFIQUE  
CENTRE UNIVERSITAIRE BELHADJ BOUCHAIB D'AIN-TEMOUCHENT



Institut des Sciences

Département des Sciences de la Nature et de la Vie

**Mémoire**

Pour l'obtention du Diplôme de Master en Sciences Biologiques

Option: Microbiologie appliquée

Présenté par:

**Melle. MOUSSAOUI Rayhana**

**Melle. MESSAOUDI Khaoula**

---

**RECHERCHE ET CARACTERISATION DE PHYTASES BACTERIENNES A  
INTERET INDUSTRIEL**

---

Encadrant :

M. Sofiane Mourad BENYAMINA

Maitre de Conférences « B » au C.U.B.B.A.T

Soutenu le 03/09/2020

Devant le jury composé de:

---

Président : Dr. Meriem ZERRIOUH (MCB)	CUBBAT
Examinatrice : Dr. Amina OUADAH (MCB)	CUBBAT
Encadrant : Dr. Sofiane Mourad BENYAMINA (MCB)	CUBBAT

---

# *Remerciement*

On voudrait dans un premier temps remercier Dieu tout puissant, de nous avoir donné la force, le courage, la patience, la santé, pour terminer ce travail malgré des circonstances difficiles.

Nous exprimons nos sincères remerciements, notre appréciation et notre grande gratitude à notre encadrant Dr. Sofiane Mourad BENYAMINA pour l'orientation, l'encouragement, le soutien, le temps qu'il a consacré pour bien nous former, pour sa patience.

Notre remerciement est également à Dr. Meriem ZERRIOUH qui nous a fait l'honneur de présider le jury, ainsi qu'à Dr. Amina OUADAH, qui ont accepté d'examiner notre texte, et pour le temps qu'elles nous ont accordé.

On désire aussi remercier Pr. BOUSALEM Smain du laboratoire de Chimie du Centre universitaire Belhadj Bouchaib pour son aide dans la réalisation du test effet chélateur des phytates.

Enfin on adresse nos sincères remerciements à nos parents qui attendaient avec impatience notre succès, on remercie toutes les personnes qui ont participés de près ou de loin à la réalisation de ce travail et les professeurs qui nous ont enseignés au Centre Universitaire Belhadj Bouchaib Ain Temouchent.

**Avec toute notre reconnaissance**

*MOUSSAOUI Rayhana*

*MESSAOUDI Khaoula*

## **Remerciement**

## **Liste d'abréviation**

## **Liste des figures**

## **Liste des tableaux**

## **Introduction générale.....01**

## **Synthèse bibliographique**

### **1. les enzymes.....02**

#### **1.1. Les réactions catalysées par les enzymes.....02**

#### **1.2. Importances des enzymes.....02**

##### **1.2.1. Importances des enzymes au niveau cellulaire.....02**

##### **1.2.2. Importances des enzymes dans le secteur industriel.....03**

#### **1.3. Classification des enzymes.....06**

### **2. Les hydrolases.....08**

#### **2.1. La réaction catalysée par les hydrolases.....08**

#### **2.2. Classification des hydrolases.....08**

#### **2.3. Importances des hydrolases.....09**

##### **2.3.1. Importances des hydrolases au niveau cellulaire.....09**

###### **2.3.1.1. Importances des hydrolases au niveau des cellules végétales.....10**

###### **2.3.1.2. Importances des hydrolases au niveau des cellules animales.....10**

###### **2.3.1.3. Importances des hydrolases au niveau des cellules microbiennes.....11**

##### **2.3.2. Importances des hydrolases dans le secteur industriel.....12**

###### **2.3.2.1. Importances des hydrolases des végétaux dans le secteur industriel.....12**

###### **2.3.2.2. Importances des hydrolases des animaux dans le secteur industriel.....13**

###### **2.3.2.3. Importances des hydrolases des microorganismes dans le secteur industriel.....13**

### **3. Les phytases .....14**

#### **3.1. Mode d'action des phytases.....15**

3.2. Classification des phytases.....	16
3.3. Sources des phytases.....	17
3.4. Importances des phytases au niveau cellulaire, environnemental et industriel.....	17

## **Matériel et méthodes**

1. Détermination des capacités chélatrices de l'acide phytique.....	20
1.1. Le test avec du papier filtre.....	21
1.2. Le test avec les billes d'alginate.....	21
1.3. Le test des capacités chélatrices de l'acide phytique avec le chrome et le cobalt.....	22
2. Isolement et purification, sélection des isolats bactériens possédant la capacité à dégrader l'acide phytique.....	23
2.1. Préparation des milieux de culture.....	23
2.1.1. Préparation de la Gélose nutritive.....	23
2.1.2. Préparation du Bouillon nutritif.....	23
2.2. Isolement et purification .....	24
2.2.1. Isolement des bactéries à partir du sol de la rhizosphère.....	24
2.2.2. Vérification de la pureté des isolats et des souches de la collection de notre laboratoire.....	24
2.2.2.1. Observation macroscopique.....	24
2.2.2.2. Observation microscopique.....	24
3. Récupération de l'extrait brut des bactéries pour la caractérisation de l'activité phytase.....	25
4. Caractérisation de l'activité des phytases des extraits bruts.....	25
4.1. Influence du temps d'incubation sur l'activité des phytases.....	25
4.2. Influence de la température sur l'activité des phytases.....	26
4.3. Influence du pH sur l'activité des phytases.....	26
5. Courbe d'étalonnage du phosphate.....	26

## **Résultats et discussion**

1. Détermination des capacités chélatrices de l'acide phytique.....	27
1.1. Le test avec du papier filtre.....	27
1.2. Le test avec les billes d'alginate.....	27
1.3. Le test des capacités chélatrices de l'acide phytique avec le chrome et le cobalt.....	28
2. Purification, sélection, caractérisation des isolats bactériens possédant la capacité à dégrader l'acide phytique.....	29
2.1. Vérification de la pureté des isolats bactériens.....	29
3. Caractérisation de l'activité phytasique extracellulaire des extraits bruts bactériens.....	29
3.1. La courbe d'étalonnage.....	29
3.2. Influence de la durée d'incubation sur l'activité phytasique extracellulaire.....	31
3.3. Influence de la température sur l'activité phytasique extracellulaire.....	32
3.4. Influence du pH sur l'activité phytasique extracellulaire.....	34
4. Discussion générale.....	37
<b>Conclusion et perspectives.....</b>	<b>39</b>
<b>Références bibliographiques.....</b>	<b>41</b>

## **Résumé**

## LISTE DES ABREVIATIONS

**BN:** Bouillon nutritif

**Co:** Cobalt

**Cr:** Chrome

**CuSO<sub>4</sub>:** Sulfate de Cuivre

**DO:** Densité Optique

**g:** Gramme

**GN:** Gélose nutritive

**h:** heure

**IS:** Isolat

**KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>:** Potassium dihydrogen phosphate

**L:** Litre

**M:** Molaire

**Mg:** Milligramme

**min:** Minute

**mL:** Millilitre

**nm:** Nanomètre

**pH:** Potentiel d'Hydrogène

**rpm:** Rotation Par Minute

**μL:** Microlitre

**%:** pourcentage

**°C:** Degré Celsius

## LISTE DES TABLEAUX

<b>Tableau 1:</b> Exemples d'industries utilisant des enzymes microbiennes (Singh <i>et al.</i> , 2016)..	06
<b>Tableau 2:</b> les différentes classes des enzymes selon le NC-IUBMB.....	07
<b>Tableau 3:</b> La gamme étalon des solutions $\text{KH}_2\text{PO}_4$ .....	26
<b>Tableau 4:</b> Tableau récapitulatif des différents résultats de caractérisation des phytases des différents extraits bruts.....	38

## LISTE DES FIGURES

<b>Figure 1:</b> Structure chimique de l'acide phytique (Carli <i>et al.</i> , 2006 in Silva et Bracarense, 2016).....	15
<b>Figure 2:</b> Réaction catalytique des phytases (Cangussu <i>et al.</i> , 2018).....	16
<b>Figure 3:</b> solutions de CuSO <sub>4</sub> (à gauche) et du phytate (à droite).....	20
<b>Figure 4:</b> Test de la capacité chélatrice de l'acide phytique avec le CuSO <sub>4</sub> sur papier filtre...21	
<b>Figure 5:</b> Test de la capacité chélatrice de l'acide phytique avec le CuSO <sub>4</sub> par les billes d'alginate.....	22
<b>Figure 6:</b> Test de la capacité chélatrice de l'acide phytique avec le Chrome et le Cobalt.....	23
<b>Figure 7:</b> Test des capacités chélatrice de l'acide phytique avec du papier filtre.....	27
<b>Figure 8 :</b> Test des capacités chélatrice de l'acide phytique avec les billes d'alginate.....	28
<b>Figure 9 :</b> Vérification de la pureté des isolats du sol.....	29
<b>Figure 10:</b> La courbe étalon en fonction de la concentration du KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (mM).....	30
<b>Figure 11:</b> Etude de l'influence du temps sur l'hydrolyse de l'acide phytique par les différents extraits bruts. ....	31
<b>Figure 12:</b> Effet de la température sur l'hydrolyse d'acide phytique par les phytases extracellulaires des différents extraits bruts.....	32
<b>Figure 13:</b> Effet du pH sur l'hydrolyse d'acide phytique par les phytases extracellulaires des différents extraits bruts.....	34



# *Introduction générale*

Les enzymes sont des biocatalyseurs qui augmentent la vitesse des réactions de transformation d'un substrat en un produit. Cette conversion biochimique est nécessaire au fonctionnement et à la survie des cellules des différents organismes vivants (Smith, 1997 in Gurung *et al.*, 2013). Ces enzymes sont, aussi, largement utilisées dans diverses industries, comme l'industrie de l'agriculture, du cosmétique, du pharmaceutique et de l'alimentaire (Li *et al.*, 2012).

Le phosphore fait partie des composants essentiels à la production des molécules importantes pour les cellules, telles que l'ADN, l'ARN, l'ATP et d'autres molécules biologiquement actives (Oh *et al.*, 2003; Iqbal *et al.*, 2005).

Bien que, dans des végétaux, consommés par l'homme et les animaux monogastriques (comme le porc) tels que les céréales et les légumineuses, une grande quantité de phosphore est disponible mais cette dernière est stockée, au niveau de ces végétaux, sous forme d'acide phytique (6 molécules de phosphores attachés à une molécule d'inositol) non facilement utilisable (Lolas et Markakis, 1977 in Pasamontes *et al.*, 1997; Cangussu *et al.*, 2018). L'acide phytique est considéré aussi comme un élément antinutritionnel en raison de ses capacités chélatrices des différents minéraux ce qui diminue leur disponibilité pour l'organisme (Nagashima *et al.*, 1999; Cangussu *et al.*, 2018).

Les phytases, sont des hydrolases (sous-famille des phosphatases) (Wyss *et al.*, 1999), qui permettent l'hydrolyse de l'acide phytique et elles permettent, ainsi, de réduire son effet antinutritionnel et améliorer la disponibilité du phosphore (Nagashima *et al.*, 1999). Les phytases sont présentes chez un certain nombre d'espèces des organismes vivants (Lamid *et al.*, 2018; Cangussu *et al.*, 2018; De Angelis *et al.*, 2003), mais celles des bactéries sont les plus importantes et les plus utilisées en industries alimentaires (Kerovuo *et al.*, 1998; Oh *et al.*, 2004 in Guerrero-Olazarán *et al.*, 2010; Jain *et al.*, 2015).

L'objectif de notre travail est de tester les propriétés chélatrices de l'acide phytique pour rechercher et caractériser, après, des phytases extracellulaires à intérêt industriel, chez 4 bactéries : 2 souches de la collection de notre laboratoire *Enterobacter* sp et *Escherichia coli* (*E.coli*) et 2 bactéries isolées à partir de la rhizosphère (Isolat 1 et Isolat 2).

Les résultats obtenus montrent la présence de propriétés chélatrices chez l'acide phytique et d'activités phytasiques, chez les 4 bactéries, avec des activités optimales à des pHs et des températures différents.

# *Synthèse bibliographique*

## **1. Les enzymes**

Les enzymes sont des macromolécules biologiques synthétisées par les différents organismes vivants, elles agissent comme des catalyseurs hautement spécifiques (chaque type d'enzyme ne peut agir que sur un seul type de substrat. Exemple, les protéases ne dégradent que les protéines) qui accélèrent considérablement la vitesse des réactions biochimiques (Li *et al.*, 2012; Gurung *et al.*, 2013; Robinson, 2015).

### **1.1. Les réactions catalysées par les enzymes**

L'action de l'enzyme sur le substrat conduit à sa conversion en un produit, selon la réaction suivante:



(E):Enzyme, (S):Substrat, (ES):complexe Enzyme-Substrat, (P): Produit.

Le complexe ES se forme par la liaison des substrats au niveau d'un site spécifique qui se trouve sur l'enzyme, appelé site actif ou site catalytique. Les sites actifs sont sites spécifiques sur l'enzyme en forme de sillons, et qui vont permettre à l'enzyme de se fixer sur le substrat et le transformer en un produit (Cooper, 2000; Robinson, 2015).

Cette interaction Enzyme-Substrat se fait à l'aide de liaisons non-covalentes (liaisons hydrogènes, liaisons ioniques et des interactions hydrophobes) (Cooper, 2000) ou à l'aide des liaisons covalentes transitoires (Lewis et Stone, 2020). L'interaction Enzyme-Substrat se fait au niveau d'un site spécifique appelé site actif ou catalytique. Une fois le complexe ES est établi, plusieurs mécanismes accélèrent la conversion du substrat en produit (Cooper, 2000).

### **1.2. Importances des enzymes**

Les enzymes sont très importantes et agissent comme des catalyseurs dans les réactions biochimiques très importantes pour la survie des différents organismes. De plus, ces enzymes possèdent une grande importance dans le développement des bioprocédés industriels (Mishra *et al.*, 2016).

#### **1.2.1. Importances des enzymes au niveau cellulaire**

Chez les différents organismes, les enzymes trouvent leur importance et leur implication dans différents processus essentiels à la vie tels que la réplication et la transcription de l'ADN, les réactions métaboliques (anaboliques et cataboliques), (Li *et al.*, 2012; Gurung *et al.*, 2013). Les réactions métaboliques peuvent être classées en trois groupes :

1. celles qui synthétisent des molécules simples ou les polymérisent en macromolécules plus complexes (anabolisme) (De Berardinis et Thompson, 2012), comme par exemple le lactate est synthétisé à partir du pyruvate par l'enzyme lactate déshydrogénase (Buhl et Jackson, 1978; Robinson, 2015) ;
2. celles qui dégradent des molécules pour libérer de l'énergie (catabolisme) (De Berardinis et Thompson, 2012), comme par exemple l'enzyme  $\beta$ -galactosidase qui décompose le lactose en glucose et galactose (Roger, 1976; Robinson, 2015) ou bien la lipase pancréatique humaine, une enzyme qui décompose, au niveau du système digestif humain, les graisses alimentaires en acides gras (Gurung *et al.*, 2013);
3. et celle qui contribuent à éliminer les déchets toxiques produits par les autres classes (élimination des déchets) (De Berardinis et Thompson, 2012), comme par exemple la transformation de l'ammoniaque en urée au niveau des hépatocytes via le cycle de l'urée qui fait intervenir des enzymes telles que le N-acétyl glutamate synthétase; l'argininosuccinate lyase et l'arginase (Kouatchet et Lebas, 2007).

### **1.2.2. Importances des enzymes dans le secteur industriel**

Les enzymes font partie des biomolécules les plus importantes possédant une diversité d'applications dans divers secteurs industriels (Gurung *et al.*, 2013), comme par exemple, le secteur alimentaire, le secteur de la nutrition animale, le secteur du cosmétique, le secteur pharmaceutique...etc (Li *et al.*, 2012) (voir Tableau 1).

Avec l'avènement récent de la biotechnologie, il y a eu un intérêt et une demande croissantes pour des enzymes aux propriétés nouvelles (Umayaparvathi *et al.*, 2013).

Une diversité d'organismes vivants est utilisée pour la production d'enzymes à intérêt commercial. La majorité des enzymes utilisées en industrie proviennent des microorganismes. En effet, plus de la moitié proviennent de champignons et de levures, et plus d'un tiers de ces enzymes proviennent des bactéries. Le reste est réparti entre des sources animales et des sources végétales (Chaplin et Bucke, 1990)

Chez les plantes et les animaux, l'enzyme la plus étudiée est la lipoxigénase cette enzyme catalyse la bioxygénation des acides gras polyinsaturés pour former des acides hydroperoxydiéniques conjugués (Baysal et Demirdöven, 2006). Les lipoxigénases ont des applications en industrie alimentaire par exemple, la fabrication du pain et la production d'arômes (Baysal et Demirdöven, 2006).

Les enzymes microbiennes sont connues pour être utilisées dans divers secteurs industriels, par exemple les secteurs de l'alimentation, de l'agriculture, de la médecine...etc (Li *et al.*, 2012; Choi *et al.*, 2015 in Singh *et al.*, 2016) (Voir tableau 1).

Dans un but de production d'enzymes, un microorganisme est choisi selon sa capacité à produire des enzymes tolérantes aux conditions extrêmes utilisées dans les processus industriels tels que la température, la salinité, le pH,...,etc (Umayaparvathi *et al.* , 2013).

Les enzymes microbiennes sont plus privilégiées par rapport enzymes des plantes et des animaux pour les raisons suivantes :

- Les enzymes microbiennes sont généralement moins chères à produire (Chaplin et Bucke, 1990), plus faciles à extraire et à purifier (Robinson, 2015);
- Les enzymes microbiennes sont plus actives et plus stables que les enzymes végétales et animales (Anbu *et al.*, 2013), elles sont thermostables, ce qui leur permet de fonctionner, lors des réactions industrielles, à des températures élevées et pendant des durées prolongées. Ces températures élevées diminueraient la possibilité de contamination microbienne (Poonam Singh Nigam, 2013; Singh *et al.*, 2019);
- Les microorganismes, contrairement aux tissus des végétaux et des animaux, ne contiennent pas de composés phénoliques, des inhibiteurs d'enzymes endogènes et des protéases (Chaplin et Bucke, 1990). De plus, les microorganismes sont potentiellement plus faciles à être génétiquement manipulés, ce qui peut permettre de produire de nouvelles enzymes, génétiquement modifiées, avec des propriétés nouvelles (Demain et Vaishnav, 2009 ; Bragger *et al.*, 1989; Annison, 1992; Niehaus *et al.*, 1999 in Zhang et Kim, 2010 ; Anbu *et al.*, 2013 ; Robinson, 2015);
- Les microorganismes possèdent une grande diversité biochimique, ils sont facile à cultiver (Bragger *et al.*, 1989; Annison, 1992; Niehaus *et al.*, 1999 in Zhang et Kim, 2010), ne présentent pas de grandes variations de rendement, elles peuvent être disponibles durant toute l'année (condition de culture contrôlée), contrairement aux enzymes d'origine végétal et animal qui ne peuvent être produites qu'à certaines périodes de l'année (Adrio et Demain, 2014 ; Robinson, 2015; Singh *et al.*, 2016).

Les différents microorganismes (bactéries, moisissures, levures...) possèdent des enzymes, utilisées dans différents secteur (voir Tableau 1), et qui présentent des caractéristiques à intérêt industriel. Mais il a été montré qu'au niveau industriel, les enzymes bactériennes telles que les protéases (Rao *et al.*, 1998), lipases (Gurung *et al.*, 2013),

$\alpha$ -amylases (Raveendran *et al.*, 2018), laccase (Chauhan *et al.*, 2017; Yang *et al.*, 2017), sont les plus utilisées comparées aux enzymes d'autres microorganismes (Gopinath *et al.*, 2015).

Les enzymes bactériennes présentent plusieurs avantages comme par exemple : Les protéases alcalines bactériennes comme celles des *Bacillus* sont caractérisées par leur activité élevée à pH alcalin et leur large spécificité de substrat (Rao *et al.*, 1998).

Les lipases bactériennes commercialement importantes, sont généralement extracellulaires, et leur production est facile à réaliser (Gurung *et al.*, 2013).

Les  $\alpha$ -amylases bactériennes comme celles de *Bacillus*, sont hautement thermostables (Raveendran *et al.*, 2018), cette thermostabilité est donc une caractéristique importante du fait que la saccharification de l'amidon, réalisée par les  $\alpha$ -amylases, est effectuée à des températures élevées (100–110°C) (Sundarram et Krishna Murthy, 2014).

Aussi, les laccases (catalysent l'oxydation des composés aromatiques phénoliques et non phénoliques), des bactéries ont plusieurs propriétés, absentes chez les laccases fongiques, telles que la stabilité à des températures et à des pHs élevés, des activités catalytiques dans une large gamme de température et de pH (Chauhan *et al.*, 2017; Yang *et al.*, 2017). Ces laccases sont importantes pour plusieurs secteurs industries tels que le secteur alimentaire, pharmaceutique ou cosmétique (Yang *et al.*, 2017).

**Tableau 1:** Exemples d'industries utilisant des enzymes microbiennes (Singh *et al.*, 2016).

Industrie	Exemples d'enzymes	Fonctions recherchées	Microorganismes producteurs	Références
Alimentaire	Amylase Catalase Phytase	Fabrication du fromage. Amélioration de la farine. Hydrolyse de l'acide phytique.	<i>Aspergillus niger</i> <i>Bacillus</i> sp. <i>Aspergillus</i> sp	(Singh <i>et al.</i> , 2016) (Noone <i>et al.</i> , 2001)
Papier	Protéase Amylase	Élimination du biofilm; amélioration du drainage.	<i>Bacillus subtilis</i> <i>Bacillus licheniformis</i>	(Singh <i>et al.</i> , 2016) (Noone <i>et al.</i> , 2001; Frias <i>et al.</i> , 2003; Rejzek <i>et al.</i> , 2011)
Détergent	Cellulase Lipase	Clarification des couleurs, éliminer les huiles et les graisses.	<i>Aspergillus niger</i> <i>Bacillus</i> sp	(Singh <i>et al.</i> , 2016) (Noone <i>et al.</i> , 2001; Tarantino, 2003; Rejzek <i>et al.</i> , 2011)
Cosmétique	Laccase Lipase	Teinture pour cheveux, Soin de la peau	<i>Bacillus subtilis</i> <i>Aspergillus</i> sp	(Diehl, 2008; Lang et Cotteret, 2004 in Singh <i>et al.</i> , 2016)
Pharmaceutique	Asparaginase Serrapeptase, Streptokinase,	Antitumeur Anti-inflammatoire Anticoagulant	<i>E coli</i> <i>Acinetobacter</i> <i>Lactobacillus-plantarum</i> <i>Streptococci</i> sp	(Roberts <i>et al.</i> , 2007; Devlin, 1986; Sabu., 2003; Vellard, 2003; Kaur et Sekhon, 2012; Maneet Tale, 2015 in Singh <i>et al.</i> , 2016)
Cuir	Protéase neutre Lipase	Épilation Trempage Dégraissage	<i>Aspergillus</i> sp <i>Bacillus subtilis</i>	(Baily, 1992; Sankaran, 1995; Raju <i>et al.</i> , 1996 in Singh <i>et al.</i> , 2016)
Synthèse organique ; La gestion des déchets	Glucose Isomérase Cutinase	Production de sirop de maïs à haute teneur en fructose, Dégradation des plastiques,	<i>Corynebacterium</i> sp <i>Fusarium solani</i>	(Gerhartz, 1990; Gianfreda <i>et al.</i> , 1999; Mai <i>et al.</i> , 2000; Have et Teunissien, 2001; in Singh <i>et al.</i> , 2016)

### 1.3. Classification des enzymes

Selon le NC-IUBMB (Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology), les enzymes sont groupées en 6 classes (voir Tableau 2) correspondant chacune à un type de réaction catalytique différente: les oxydoréductases (EC 1), les transférases (EC 2), les hydrolases (EC3), les lyases (EC 4), les isomères (EC 5) et les ligases (EC 6) (Gurung *et al.*, 2013).



**Tableau 2** : les différentes classes des enzymes selon le NC-IUBMB.

Numéro de commission de l'Enzyme	Classe d'enzyme	Réaction	Exemples d'enzymes
EC1	Oxydoréductases	Les enzymes de cette classe catalysent les réactions d'oxydo-réduction (transfert d'électrons ou d'électrons associés à des protons) $A^- + B \rightarrow A + B^+$	l'alcool déshydrogénases Catalases Glucoseoxidases
EC2	Transférases	Les enzymes de cette classe transfèrent un groupement fonctionnel sur un accepteur $AX + B \rightarrow A + BX$	Les aminotransférases Fructosyltransférases Glucosyltransférases
EC3	Hydrolases	Les enzymes de cette classe catalysent l'hydrolyse, le clivage des substrats par l'eau. $A-X + H_2O \rightarrow A-H + B-OH$	Glycosidases Amylases Cellulases
EC4	Lyases	Les enzymes de cette classe catalysent l'addition des groupes aux doubles liaisons ou la formation des doubles liaisons par l'élimination des groupes. $A-B \rightarrow A+B$	Les pectatélyases  Alpha-acetolactate decarboxylase
EC5	Isomérases	Les enzymes de cette classe catalysent le transfert de groupes d'une position à une autre dans la même molécule. $A \rightarrow B$ (isomère de A)	Glucose isomérases Epimérases Mutases Lyases
EC6	Ligases	Les enzymes de cette classe relient les molécules aux liaisons covalentes. $A+B+NTP \rightarrow A-B+NDP+P$	Glutathione Argininosuccinate

De nombreuses enzymes soient retenues dans les cellules et puissent être situées dans des compartiments subcellulaires spécifiques, d'autre sont libérées dans l'environnement extracellulaire, la majorité des enzymes a usage industriel sont des protéines extracellulaires d'origine microbienne (Robinson, 2015).

La production à grande échelle d'enzymes exogènes combine les disciplines de la microbiologie, de la génétique, de la biochimie et de l'ingénierie avec le principe de base, la fermentation (Sadhu et Maiti, 2013 in Sujani et Seresinhe, 2015), Seul un nombre limité de toutes ces enzymes sont disponibles dans le commerce et encore moins sont utilisées en grande quantité, plus de 75% des enzymes industrielles sont des hydrolases (Leisola *et al.*, 2011).

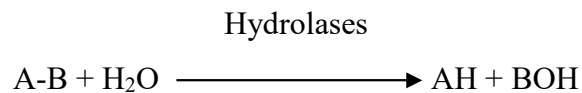
## 2. Les hydrolases

Les hydrolases sont des enzymes qui catalysent la rupture des liaisons chimiques en présence d'une molécule d'eau (Gaber, 2012).

En générale, les hydrolases permettent de décomposer les plus grosses molécules en molécules plus petites (Gurung *et al.*, 2013).

### 2.2. La réaction catalysée par les hydrolases

Les hydrolases sont des enzymes qui catalysent le clivage hydrolytique de différentes liaisons (Boyce *et al.*, 2004), telles que les liaisons peptidiques dans les protéines, les liaisons glycosidiques dans les glucides et les liaisons ester dans les lipides, en présence d'une molécule d'eau, selon la réaction générales suivante (McDonald et Tipton, 2014).



### 2.3. Classification des hydrolases

Selon le NC-IUBMB, les hydrolases sont classées dans la troisième classe (EC3) des enzymes et contiennent 13 sous-classes:

- **EC 3.1** hydrolysent les liaisons esters pour générer un acide et un alcool (Montella *et al.*, 2012);
- **EC 3.2** hydrolysent les liaisons N-glycosidique O-glycosidique et S-glycosidique (Guillot *et al.*, 2019);
- **EC 3.3** hydrolysent les liaisons éthers (Boyce et Tipton, 2001);
- **EC 3.4** hydrolysent les liaisons peptidiques (Hamin Neto *et al.*, 2018);
- **EC 3.5** hydrolysent les liaisons Carbone-azote (Boyce et Tipton, 2001);
- **EC 3.6** hydrolysent les liaisons diphosphates (Boyce et Tipton, 2001);
- **EC 3.7** hydrolysent les liaisons carbone-carbone (Boyce et Tipton, 2001);
- **EC 3.8** hydrolysent les liaisons halogénures (Boyce et Tipton, 2001);
- **EC 3.9** hydrolysent les liaisons phosphore-azote (Boyce et Tipton, 2001);
- **EC 3.10** hydrolysent les liaisons soufre-azote (Boyce et Tipton, 2001);
- **EC 3.11** hydrolysent les liaisons carbone-phosphore (Boyce et Tipton, 2001);
- **EC 3.12** hydrolysent les liaisons soufre-soufre (Boyce et Tipton, 2001);
- **EC 3.13** hydrolysent les liaisons carbone-soufre (Boyce et Tipton, 2001).

Parmi ces sous-classes il y a celles qui sont plus largement étudiées et utilisées en industrie (Boyce et Tipton, 2001 ; Andrew McDonald, 2019) telles que les estérases (exemple: lipase et phosphatase), les glycosylases (exemple: amylase et cellulase), les peptidases (exemple: protéase) (Robinson, 2015).

## **2.4. Importances des hydrolases**

Les hydrolases sont des enzymes qui catalysent l'hydrolyse des diverses liaisons (voir classification) (Mohammed et Guda, 2011) ce qui leur donne une importance dans diverses réactions au niveau cellulaire (Toppan et Dominique, 1982; Martinez *et al.*, 2008; Burgess et Pletschke, 2008; Hodgson, 2009 ; Lee et Huang, 2013) et industriel (Robinson, 2015).

### **2.4.1. Importances des hydrolases au niveau cellulaire**

Les hydrolases sont des enzymes qui jouent un rôle important dans les cellules des différents organismes vivants. Elles peuvent intervenir dans plusieurs réactions telles que le métabolisme, les processus de croissance et les systèmes de défense (Toppan et Dominique, 1982; Martinez *et al.*, 2008; Burgess et Pletschke, 2008; Hodgson, 2009 ; Lee et Huang, 2013).

Par exemple, les protéases peuvent exécuter une grande variété de fonctions physiologiques complexes (par exemple, la coagulation sanguine, la croissance cellulaire...) comme elles sont importantes dans la réalisation des fonctions métaboliques (par exemple, l'hydrolyse des grandes polypeptides en petits peptides et acides aminés, facilitent leur absorption par la cellule) (Rao *et al.*, 1998). Aussi, les lipases, interviennent dans des réactions métaboliques, comme le catabolisme des triglycérides, en acides gras et en glycérol (Fickers *et al.*, 2008). Les lipases interviennent aussi dans la biosynthèse, comme la biosynthèse de transducteur (exemple les oxylipines telles que jasmonates) intervenant dans les mécanismes de défense chez les végétaux (Farmer *et al.*, 1992; Stelmach *et al.*, 2001 in Fickers *et al.*, 2008).

D'autres hydrolases sont aussi impliquées dans différentes réactions, telles que la  $\beta$ -glucosidase qui joue un rôle dans la lignification chez les plantes (Guo WF *et al.*, 1998 in Li *et al.*, 2005; Ketudat Cairns et Esen, 2010; Ahmed *et al.*, 2017), la lactase qui hydrolyse le lactose chez les animaux (Ranciaro *et al.*, 2014), l'amylase qui hydrolyse différents substrats (comme le son de blé) chez les microorganismes (Saranraj et Stella, 2013).

#### **2.4.1.1. Importances des hydrolases au niveau des cellules végétales**

Les hydrolases des plantes, telles que les protéases, les amylases, les lipases et les cellulases, sont des enzymes importantes (Saurabh Bhatia, 2018) peuvent intervenir dans plusieurs réactions telles que le métabolisme ou le système de défense (Toppan et Dominique, 1982; Martinez *et al.*, 2008).

Les enzymes des plantes peuvent intervenir dans des réactions de défense contre les agressions parasites, comme par exemple les réactions localisées au niveau cytoplasmique faisant intervenir des enzymes de défense telles que la chitinase (Pegg et Vessey, 1973; Wargo, 1975 in Toppan et Dominique, 1982; Hamid *et al.*, 2013), qui joue un rôle dans l'hydrolyse des tissus d'agents pathogènes fongiques, constitués principalement de chitine (Sharma *et al.*, 2011).

Les lipases sont largement répandues au sein de la plante mais on les retrouve principalement au niveau des graines où sont stockés les triglycérides (Beisson *et al.*, 2001 in Fickers *et al.*, 2008), qui seront hydrolysés sous l'action des lipases en acides gras qui vont fournir l'énergie nécessaire à la germination de la graine et au développement de la jeune plante (Adlercreutz *et al.*, 1997 in Fickers *et al.*, 2008).

D'autres hydrolases, les  $\beta$ -glucosidases, qui sont largement distribuées dans le règne végétal (Li *et al.*, 2005), elles jouent un rôle essentiel dans la lignification, le catabolisme des oligosaccharides de la paroi cellulaire des plants (Guo WF *et al.*, 1998 in Li *et al.*, 2005; Ketudat Cairns et Esen, 2010; Ahmed *et al.*, 2017).

Les  $\beta$ -glucosidases interviennent aussi dans la défense par hydrolyse des glycosides de défense de la plante tels que les glucosides cyanogéniques et libèrent des composés toxiques, tels que le cyanure et les acides hydroxamiques (Guo WF *et al.*, 1998 in Li *et al.*, 2005; Cairns et Esen, 2010; Ahmed *et al.*, 2017).

Au niveau des racines, les phosphatases jouent un rôle important dans la libération de phosphate à partir des substrats phosphorylés (Lei *et al.*, 2013) qui est indispensable à la croissance des plantes (Ahemad *et al.*, 2009).

#### **2.4.1.2. Importances des hydrolases au niveau des cellules animales**

Les organismes appartenant au règne animal contiennent des hydrolases (Moss *et al.*, 1992), telles que les amylases (Champ et Colonna, 1993), les lipases (Lowe *et al.*, 1989;

Fickers *et al.*, 2008), les  $\beta$ -glucosidases (Ketudat Cairns et Esen, 2010; Ahmed *et al.*, 2017), et les lactases (Ranciaro *et al.*, 2014), qui sont impliquées dans divers réactions métaboliques (Champ et Colonna, 1993; Ranciaro *et al.*, 2014).

Une grande variété d'hydrolases, impliquées dans le catabolisme des macromolécules complexes (glycolipides, glycoprotéines, mucopolysaccharides, mucolipides,...etc.), sont contenues dans les lysosomes (Bellier, 2001).

L' $\alpha$ -amylase salivaire et pancréatique, et plusieurs enzymes glycolytiques sécrétées dans l'intestin chez les monogastriques, assure l'hydrolyse de l'amidon (Champ et Colonna, 1993).

le lactose est hydrolysé par le lactase en glucose et galactose, qui sont rapidement absorbés dans la circulation sanguine (Ranciaro *et al.*, 2014), les  $\beta$ -glucosidases jouent un rôle dans la dégradation des glucosides et des glycolipides (Ketudat Cairns et Esen, 2010; Ahmed *et al.*, 2017), les lipases pancréatiques sont impliquées dans la digestion, l'absorption et la reconstitution efficace des graisses alimentaires (Lowe *et al.*, 1989; Fickers *et al.*, 2008).

#### **2.4.1.3. Importances des hydrolases au niveau des cellules microbiennes**

Les hydrolases interviennent dans divers processus importants tels que la croissance et les réactions métaboliques (Burgess et Pletschke, 2008; Hodgson, 2009 ; Lee et Huang, 2013). Chez les microorganismes, les hydrolases jouent un rôle important dans la croissance, la modification et le renouvellement de la paroi cellulaire des microorganismes (Lee et Huang, 2013).

Par exemple les amylases bactériennes et fongiques sont sécrétées à l'extérieur de la cellule pour effectuer la digestion extracellulaire des substrats telles que le son de blé, le son de riz, son de gramme noir, comme une source de carbone (Saranraj et Stella, 2013).

Les phosphatases des microorganismes minéralisent les phosphates organiques en phosphates inorganiques (Stege *et al.*, 2009; Taylor *et al.*, 2002 in Obidi *et al.*, 2018) pour être utilisés dans des processus importants (Sambuk *et al.*, 2011). Chez les levures les phosphatases jouent un rôle important dans la régulation des nombreuses voies métaboliques telles que le métabolisme des polyphosphates qui sont les réserves de phosphates et jouent un rôle des molécules de haute énergie (Sambuk *et al.*, 2011).

### **2.4.2. Importances des hydrolases dans le secteur industriel**

La majorité des enzymes industrielles actuellement utilisées sont des hydrolases (Gurung *et al.*, 2013). Plus de 75% des enzymes utilisées en industrie sont des hydrolases (Rao *et al.*, 1998; Leisola *et al.*, 2011; Sharada *et al.*, 2014 ).

Ces enzymes hydrolytiques représentent la plus grande part des marchés mondiaux des enzymes (Robinson, 2015), par exemple pour les entreprises Advanced Enzymes Technologies et Novozymes India, plus de 30 et 40 %, respectivement, de leurs productions enzymatiques sont des hydrolases telles que les protéases, les xylanases, les  $\alpha$ -amylases, les glucoamylases, les phytases, les  $\beta$ -mannanases, les  $\alpha$ -galactosidases,..etc (Singh *et al.*, 2016).

Les hydrolases sont largement utilisées dans différents domaines tels que le domaine bioanalytique, biomédical, thérapeutique, pharmaceutique, biotechnologique, alimentaire et biosynthétique (Husain, 2016). L'importance industrielle des hydrolases dépasse celle des autres classes d'enzymes (Adler-Nissen, 1982) en raison de:

- Leurs modes catalytiques (le clivage hydrolytique des différents liaisons) (Papamichael *et al.*, 2019; Boyce et Tipton, 2001) (voir Tableau 2) et leur grande spécificité au substrat ;
- Leur capacité à fonctionner sans les cofacteurs (De Maria *et al.*, 2019);
- Leur grande compatibilité avec les solvants organiques, ce qui explique leur utilisation dans les industries pharmaceutiques et les industries des pesticides (Maštovská et Lehotay, 2004; Shin *et al.*, 2007; Grodowska et Parczewski, 2010; Paul *et al.*, 2018).

#### **2.4.2.1. Importances des hydrolases des végétaux dans le secteur industriel**

Les hydrolases d'origine végétale, sont largement utilisées dans différentes industries telles que l'industrie alimentaire, pharmaceutique, l'industrie des détergents (Eze et Ezema, 2012).

Par exemple en industrie alimentaire, les lipases extraites des graines de végétaux (graines de lin, de tournesol, de céréales,...) sont utilisées pour libérer les acides gras dans les produits alimentaires (Barros *et al.*, 2010). Aussi, les amylases, sont utiles dans la liquéfaction de l'amidon dans les boissons traditionnelles et dans les fabrications boulangères (Tiwari *et al.*, 2015). Les protéases extraites de *Ananas comosus* ou de *Ficus carica* sont utilisées pour l'attendrissement de la viande et la coagulation du lait (Singh *et al.*, 2016; Shah et Mir, 2019). Dans le secteur médical, la papaïne, une protéase isolée de *Carica papaya* a également été utilisée pour la dégradation du gluten (une protéine) dans le cas de son accumulation dans

l'intestin en raison d'une insuffisance des enzymes pancréatiques (Amri et Mamboya, 2012). Dans l'industrie de textile les amylases végétales sont utilisées pour le désencollage des tissus (Tiwari *et al.*, 2015).

#### **2.4.2.2. Importances des hydrolases des animaux dans le secteur industriel**

Les hydrolases d'origine animale sont utilisées dans différents secteurs industriels tels que le secteur de l'industrie alimentaire, médicale (Guerrand, 2017) et de l'agriculture (Harrison et Bonning, 2010).

Par exemple dans le secteur alimentaire, les lipases animales sont utilisées pour donner des différentes saveurs aux fromages (Guerrand, 2017). Dans le secteur médical, les lipases du pancréas du porc sont utilisées comme un traitement pour les patients déficients en lipase (Lowe et Whitcomb, 2015; Guerrand, 2017).

Dans le secteur thérapeutique, des protéases (la trypsine, la chymotrypsine, la pepsine) de mammifère sont utilisées dans les suppléments pancréatiques dans le traitement des patients atteints de mucoviscidose (une inflammation associée à un déséquilibre de la balance protéase/antiprotéase) (Gauthier *et al.*, 2006 ; Stewart *et al.*, 2013).

Dans le secteur agricole, les protéases des insectes sont utilisées comme agent insecticide, grâce à leur capacité à détruire les protéines et les tissus essentiels de l'insecte (Harrison et Bonning, 2010).

#### **2.4.2.3. Importances des hydrolases des microorganismes dans le secteur industriel**

La plupart des enzymes microbiennes d'importance industrielle appartiennent à la classe des hydrolases (Singh *et al.*, 2019). Les hydrolases sont utilisées dans plusieurs secteurs industriels telles que l'industrie du textile dont des hydrolases microbiennes sont utilisées pour le désencollage des tissus comme par exemple le désencollage de l'amidon par amylase (Gurung *et al.*, 2013), l'industrie des détergents dont les lipases et les amylases microbiennes sont présentes dans 90% des détergents liquides (Gurung *et al.*, 2013).

Aussi, les hydrolases des microorganismes sont utilisées dans l'industrie alimentaire dont les protéases sont utilisées pour modifier les propriétés des aliments en améliorent la valeur nutritionnelle, la solubilité, la digestibilité, la saveur,...etc (Gupta *et al.*, 2002; Tavano, 2013 in Singh *et al.*, 2016). Par exemple, les peptidases des bactéries lactiques telles que *Lactobacillus helveticus*, ou des champignons telles que *Aspergillus oryzae*, permettent

l'hydrolyse des protéines, jouent un rôle très important dans le développement des arômes des fromages et leurs maturation (El Soda et Demazea, 1982; Kilcawley *et al.*, 2002). L' $\alpha$ -amylase fongique et la glucoamylase sont utilisées pour produire un «sirop de maïs à haute teneur en fructose» à partir d'amidon (Adrio et Demain, 2014).

Aussi, les cellulases microbiennes sont utilisées dans les industries alimentaires pour l'extraction et la clarification des jus de fruits et légumes (Saranraj *et al.*, 2012). Les lactases telles que celles d'*Aspergillus niger* catalysent la décomposition du lactose qui se trouve dans le lait en sucres simples comme le glucose et le galactose qui augmentent la douceur du lait et aide à la fabrication de crème glacée et de préparation de yaourt (Al-Maqtari *et al.*, 2019).

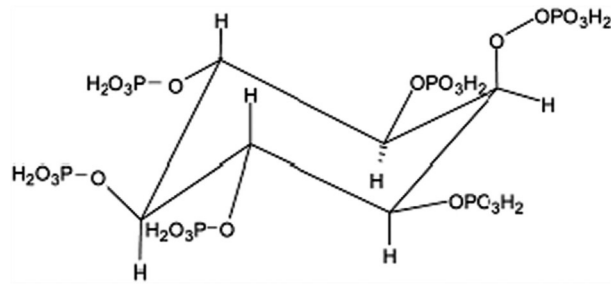
Les phytases (phosphatases), utilisées pour l'hydrolyse de l'acide phytique (la principale forme de stockage du phosphate dans les céréales, les légumineuses et les graines oléagineuses) (Nagashima *et al.*, 1999), ce qui permet de libérer le phosphate inorganique et le rendre disponible pour l'organisme (Singh et Satyanarayana, 2013).

### **3. Les phytases**

Les enzymes phytases, ou myo-inositol-hexakisphosphate phosphohydrolases, appartiennent à la sous-famille des phosphatases acides à histidine (Lolas et Markakis, 1977 in Pasamontes *et al.*, 1997; Wyss *et al.*, 1999; Lei et Poreess, 2003; Lamid *et al.*, 2018). Ces enzymes ont été découvertes pour la première fois par l'équipe de Suzuki en 1907 (Powar et Jagannathan, 1982 ; Wang *et al.*, 2004; Lei *et al.*, 2013).

Ces phytases hydrolysent l'acide phytique ou le myo-inositol 1,2,3,4,5,6-hexakisphosphate (voir Figure 1) (Laboure *et al.*, 1993; Lolos et Markakis, 1977 in Pasamontes *et al.*, 1997; Kerovuo *et al.*, 1998; Greiner et Konietzny, 2006; Guerrero-Olazarán *et al.*, 2010; Parra, 2001; Angel *et al.*, 2002 in Mellef *et al.*, 2010; Tran *et al.*, 2011a; Adeola et Cowieson, 2011; Tamayo-Ramos *et al.*, 2012; Lamid *et al.*, 2018; Mullaney *et al.*, 2000 in Ajith *et al.*, 2019) qui se trouve naturellement sous forme des sels appelés phytates (Laboure *et al.*, 1993; Kerovuo *et al.*, 1998; Lei et Poreess, 2003; Dersjant-Li *et al.*, 2015; Plaami, 1997 in Silva et Bracarense, 2016).





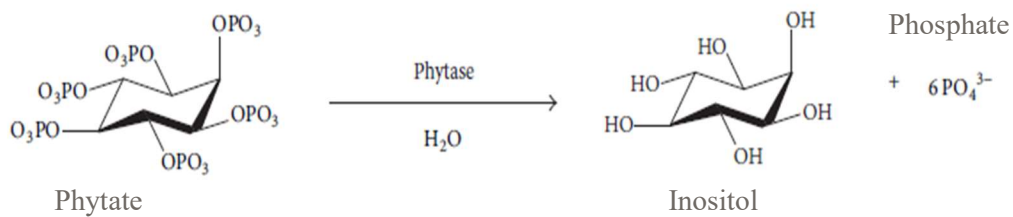
**Figure 1:** Structure chimique de l'acide phytique (Carli *et al.*, 2006 in Silva et Bracarense, 2016).

Les végétaux contiennent 1 à 5% d'acide phytique (Laboure *et al.*, 1993; Lei et Poress, 2003; Silva et Bracarense, 2016) qui est considéré comme la principale forme de stockage du phosphate (60 à 90% du phosphate total) (Lolas et Markakis, 1977 in Pasamontes *et al.*, 1997; Kerovuo *et al.*, 1998; Wyss *et al.*, 1998; Reddy *et al.*, 1982 in Lei et Poress, 2003; F. Loewus, 2002 in Greiner et Konietzny, 2006; Huang *et al.*, 2009; Beckers et Piron, 2009; Guerrero-Olazarán *et al.*, 2010; Lei *et al.*, 2013; Dersjant-Li *et al.*, 2015; Silva et Bracarense, 2016; Lamid *et al.*, 2018; Cangussu *et al.*, 2018) on le trouve dans les céréales, le pollen, les légumineuses, les graines oléagineuses et les noix (Gibson et Ullah, 1990 in Laboure *et al.*, 1993; Nagashima *et al.*, 1999; Honke *et al.*, 1998 in Lei et Porres, 2003; Lamid *et al.*, 2018).

L'acide phytique, en raison de ses capacités chélatrices est considéré comme un facteur antinutritionnel diminuant ainsi la biodisponibilité des minéraux, présentant une importance nutritionnelle comme le phosphore, le magnésium, le manganèse, le fer, le zinc et le calcium (Nagashima *et al.*, 1999; De Angelis *et al.*, 2003; Lopez *et al.*, 2002; Swick et Ivey, 1992 in Mellef *et al.*, 2010; Guerrero-Olazarán *et al.*, 2010; Dersjant-Li *et al.*, 2015; Suleimanova *et al.*, 2015; Lamid *et al.*, 2018; Cangussu *et al.*, 2018).

### 3.1. Mode d'action des phytases

Les phytases sont des enzymes qui permettent l'hydrolyse de l'acide phytique en inositol et acide orthophosphorique libre (Figure 2) (Nagashima *et al.*, 1999; Lei et Poress, 2003; Wang *et al.*, 2004; Huang *et al.*, 2009; Lamid *et al.*, 2018; Kłosowski *et al.*, 2018; Cangussu *et al.*, 2018) selon la réaction suivante:



**Figure 2 :** Réaction catalytique des phytases (Cangussu *et al.*, 2018).

Les phytases sont des enzymes phosphohydrolytiques qui permettent la libération progressive du phosphate inorganique qui se trouve dans les phytates, produisant de l'acide phosphorique, du phosphate d'inositol ou de l'inositol (Pasamontes *et al.*, 1997; Wyss *et al.*, 1999; Lei *et al.*, 2013).

### 3.2. Classification des phytases

Les phytases sont une sous-famille des phosphatases acides à histidine de haut poids moléculaire (Wyss *et al.*, 1999). En fonction de la position du premier groupe phosphate des phytates hydrolysés par l'enzyme (Greiner et Konietzny, 2006; Jorquera *et al.*, 2008; Guerrero-Olazarán *et al.*, 2010; Parra, 2001 in Mellef *et al.*, 2010; Yao *et al.*, 2012; Lei *et al.*, 2013; Suleimanova *et al.*, 2015), les phytases peuvent être classées en trois classes:

Les 3-phytases (EC 3.1.3.8), commencent la déphosphorylation de l'acide phytique à la position 3' de la molécule cyclique de l'inositol (Lei et Poress, 2003; Parra, 2001 in Mellef *et al.*, 2010; Guerrero-Olazarán *et al.*, 2010; Dersjant-Li *et al.*, 2015; Suleimanova *et al.*, 2015).

Les 4/6-phytases (EC 3.1.3.26), commencent la déphosphorylation de l'acide phytique à la position 6' de la molécule cyclique de l'inositol et peuvent déphosphoryliser aussi à la position 4' (Lei et Poress, 2003; Parra, 2001 in Mellef *et al.*, 2010; Guerrero-Olazarán *et al.*, 2010; Dersjant-Li *et al.*, 2015; Suleimanova *et al.*, 2015).

Les 5-phytases (EC 3.1.3.72), commencent la déphosphorylation de l'acide phytique à la position 5' de la molécule cyclique de l'inositol (Guerrero-Olazarán *et al.*, 2010; Suleimanova *et al.*, 2015; Spier *et al.*, 2018).

Les 3-phytases sont trouvées généralement chez les microorganismes, les 4/6-phytases sont souvent trouvées chez les plantes (Lei *et al.*, 2007), et les 5-phytases ont été isolées des légumineuses et de la bactérie du rumen *Selenomonas ruminantium* (Chu *et al.*, 2004 in Suleimanova *et al.*, 2015).

### **3.3. Sources des phytases**

Les phytases sont omniprésentes et elles ont été isolées d'un certain nombre d'espèces animales, végétales et microbiennes (Pointillart, 1994; Wodzinski et Ullah, 1996 in Wyss *et al.*, 1999; Lei et Pores, 2003; Greiner et Konietzny, 2006; Lei *et al.*, 2007; Jorquera *et al.*, 2008; Beckers et Piron, 2009; Mellef *et al.*, 2010; Dersjant-Li *et al.*, 2015; Lamid *et al.*, 2018).

Chez les animaux, des activités phytasiques ont été détectées, par exemple, au niveau des intestins des ruminants (Bae *et al.*, 1999), des volailles (Lei *et al.*, 2007) et des rats (Jongbloed *et al.*, 1992 in Pointillart, 1994). Aussi, des activités phytasiques ont été détectées dans le sang des poissons, des tortues de mer et des reptiles (Meyer et Rasmussen, 2008; Gupta *et al.*, 2015 in Cangussu *et al.*, 2018).

Chez les plantes, les phytases ont été isolées et caractérisées à partir des différentes sources telles que le blé, l'orge, les pois, le soja, le maïs, le riz et les épinards...etc (Courtois, 1947 in Pointillart, 1994; Cangussu *et al.*, 2018).

Chez les microorganismes, les phytases sont été isolées à partir des moisissures (*Aspergillus*, *Penicillium* et *Rhizopus*) (Mayer *et al.*, 1999; Lei *et al.*, 2007; Schneider *et al.*, 2012 in Cangussu *et al.*, 2018) des levures (*Pichia*) (Lei *et al.*, 2007 ; Nakamura *et al.*, 2000), des bactéries (*Escherichia*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Lactobacillus*) (Mayer *et al.*, 1999; Lei *et al.*, 2007; Schneider *et al.*, 2012 in Cangussu *et al.*, 2018) et des protozoaires (*Paramecium tetraurelia*) (Freund *et al.*, 1992 in Lei *et al.*, 2007).

### **3.4. Importances des phytases au niveau cellulaire, environnemental et industriel**

Le rôle des phytases dans chacun de ces organismes est différent. Chez les plantes, les phytases sont responsables de la libération de phosphore inorganique (Pi) pendant la germination des semences (Hatzack *et al.*, 2001 in Parra, 2001), ainsi que la production du myo-inositol libre (non phosphaté) qui est un important facteur de croissance, Chez les microorganismes, les phytases sont plutôt synthétisées comme réponse à une manque de phosphate; ainsi la déphosphorylation du phytate devient une source riche en phosphore inorganique (Parra, 2001).

Comme on l'a vu précédemment, l'acide phytique est considéré comme un antinutritionnel du fait qu'il empêche les oligoéléments importants d'être absorbés par l'organisme (Lei *et al.*, 2007). L'ajout de phytase permet d'améliorer la qualité des aliments et

la biodisponibilité des oligoéléments (Guimaraes *et al.*, 2006; Adrio et Demain, 2014 in Cangussu *et al.*, 2018), par hydrolyse de l'acide phytique (Kłosowski *et al.*, 2018).

L'acide phytique peut aussi causer des impacts environnementaux en raison de l'accumulation de phosphore inorganique dans l'environnement ce qui rend les phytases importantes pour diminuer cette accumulation (Brinch-Pedersen *et al.*, 2002; Dionisio *et al.*, 2011; Tan *et al.*, 2014 in Cangussu *et al.*, 2018).

Aujourd'hui, le marché mondial des enzymes alimentaires est dominé par l'enzymes phytase qui est environ de 60%, et les non phytases tels que la carbohydrase 40% (Adeola et Cowieson, 2011; Lei *et al.*, 2013; Guerrand, 2018).

Les phytases microbiennes sont souvent utilisées comme additifs, dans l'alimentation des animaux tels que le porc et les volailles, afin de résoudre les problèmes associés aux phytates-phosphore (Konietzny et Greiner, 2006; Selle *et al.*, 2007 in Jorquera *et al.*, 2008; Lei *et al.*, 2013; Dersjant-Li *et al.*, 2015). Cette hydrolyse des phytates, les phytases microbiennes, permet d'augmenter l'efficacité et la digestibilité des aliments, ce qui joue un rôle important dans l'utilisation de l'énergie et les performances de croissance (Yu et al, 2007; Khan *et al.*, 2013 in Lamid *et al.*, 2018).

Les bactéries et les champignons sont les principales sources de phytases (Farias *et al.*, 2018). Cependant, les phytases bactériennes sont devenues une alternative aux phytases fongiques utilisées, par exemple, dans les industries de l'alimentation humaine et animale (Kerovuo *et al.*, 1998; Oh *et al.*, 2004 in Guerrero-Olazarán *et al.*, 2010; Jain *et al.*, 2015). En effet, les phytases bactériennes présentent une plus grande spécificité au substrat, ce qui assure une bonne dégradation des phytates, de leur forte stabilité à des pHs acides (stables à pH 2) (Konietzny et Greiner 2004; Konietzny et Greiner, 1993 in Jorquera *et al.*, 2008 ), une stabilité thermique élevée, et une résistance à la protéolyse, exemple les phytases d'*E.coli* et de *Citrobacter* sont plus résistantes à la pepsine (protéase du suc digestif) que celles d'*Aspergillus niger* disponible dans le commerce (Kerovuo *et al.*, 1998; Kim *et al.*, 2002; Konietzny et Greiner, 2004; Lei *et al.*, 2007; Oh *et al.*, 2004 in Guerrero-Olazarán *et al.*, 2010). Les phytases des bactéries, ont une masse moléculaire entre 37 et 55 kDa et sont généralement actives dans les zones de pH de 4,5 à 8,5 et de température de 25°C à 70°C (Jain *et al.*, 2015).

Vu l'importance des phytases, L'objectif de notre travail est de tester les propriétés chélatrices de l'acide phytique pour rechercher et caractériser, après, des phytases

## *Synthèse bibliographique*

extracellulaires à intérêt industriel, chez 4 bactéries : 2 souches de la collection de notre laboratoire *Enterobacter* sp et *E.coli* et 2 bactéries isolées à partir de la rhizosphère (IS1 et IS 2).

# ***M**atériel et méthodes*

Ce travail a été réalisé au niveau du Laboratoire de Microbiologie du Centre Universitaire Belhadj Bouchaib- Ain Temouchent (CUBBAT) durant le second semestre du Master 2 de l'année universitaire 2019/2020.

L'objectif de ce travail est de tester les propriétés chélatrices de l'acide phytique pour rechercher et caractériser, après, des phytases extracellulaires à intérêt industriel, chez 4 bactéries : 2 souches de la collection de notre laboratoire *Enterobacter* sp et *E.coli* et 2 bactéries isolées à partir de la rhizosphère (IS 1 et IS 2).

### **1. Détermination des capacités chélatrices de l'acide phytique**

Ce test des capacités chélatrices de l'acide phytique a été effectué selon les indications du Pr. BOUSALEM Smain du Laboratoire de Chimie du Centre Universitaire Belhadj Bouchaib- Ain Temouchent (CUBBAT). Deux solutions, dans l'Eau distillée, ont été préparées séparément afin d'observer les capacités chélatrices de l'acide phytique (phytate).

La première solution contient 2% de phytate de sodium, la deuxième solution est colorimétrique contenant du Sulfate de Cuivre ( $\text{CuSO}_4$ ). Cette deuxième solution a été préparée en ajoutant à l'Eau distillée du  $\text{CuSO}_4$  jusqu'à ce que la couleur bleue devienne bien visible.



**Figure 3** : Solutions de  $\text{CuSO}_4$  (à gauche) et du phytate (à droite).

La solution de  $\text{CuSO}_4$  est utilisée pour tester les capacités chélatrices de l'acide phytique.

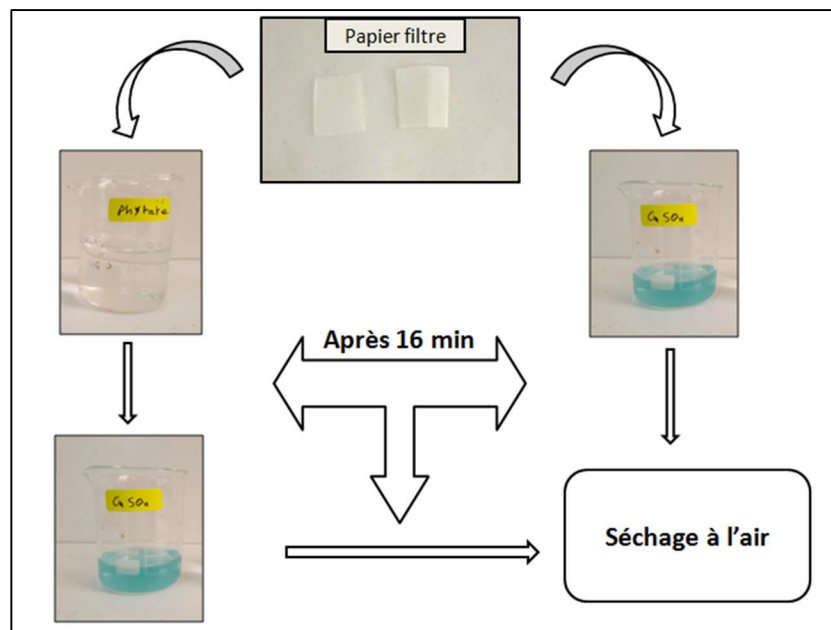
### 1.1. Le test avec du papier filtre

Du papier filtre est immergé, séparément, dans chacune des deux solutions (acide phytique et  $\text{CuSO}_4$ ) pendant 16 minutes, les deux papiers sont, ensuite, récupérés et laissés sécher à l'air libre.

Le papier filtre immergé dans la solution du  $\text{CuSO}_4$  est laissé tel qu'il est sera utilisé comme contrôle négatif.

Le papier filtre immergé dans la solution de phytate, est immergé par la suite dans la solution de  $\text{CuSO}_4$  pendant 16 min puis récupéré et séché à l'air libre.

La capacité chélatrice de l'acide phytique au  $\text{CuSO}_4$  sera traduite par une coloration au bleue (couleur du  $\text{CuSO}_4$ ) du papier filtre immergé dans l'acide phytique puis dans la solution du  $\text{CuSO}_4$ , alors que le papier filtre immergé directement dans la solution  $\text{CuSO}_4$  ne retiendra pas la couleur bleue.



**Figure 4 :** Test de la capacité chélatrice de l'acide phytique avec le  $\text{CuSO}_4$  sur papier filtre.

### 1.2. Le test avec les billes d'alginate

Les billes d'alginate ont des caractéristiques d'adsorption des composés minéraux (Djebri *et al.*, 2018)



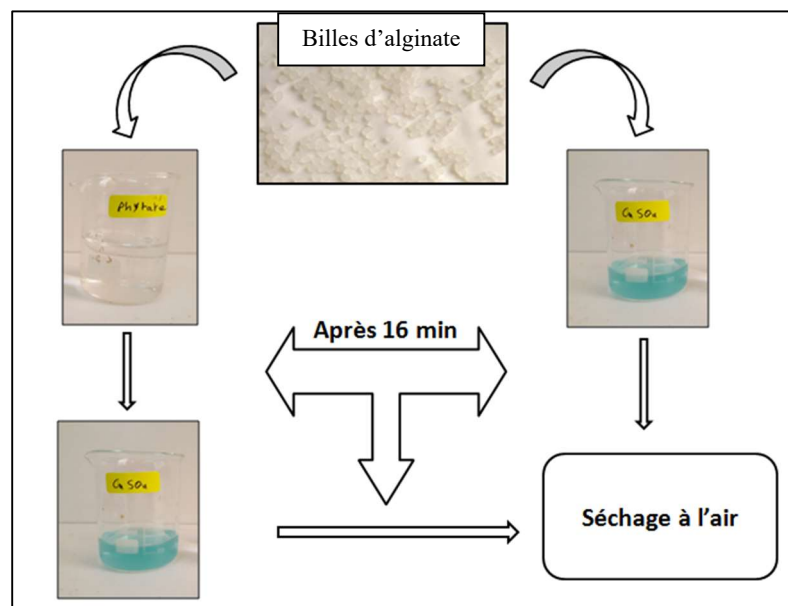
20g des billes d'alginate sont immergées, séparément, dans la solution de phytate et la solution du  $\text{CuSO}_4$  pendant 16 min. Les billes sont, ensuite, récupérées et laissés sécher à l'air libre.

Les billes d'alginate immergées dans la solution du  $\text{CuSO}_4$  sont laissées telles qu'elles sont et sera utilisé comme contrôle négatif.

Les billes d'alginate immergées dans la solution de phytate, sont immergées par la suite dans la solution de  $\text{CuSO}_4$  pendant 16 min puis récupéré et séché à l'air libre.

Les billes d'alginate immergées directement dans la solution du  $\text{CuSO}_4$  auront une couleur bleue foncée en raison de leur capacité à former un complexe avec le  $\text{CuSO}_4$ .

Les billes d'alginate immergées dans un premier temps dans la solution de phytate puis dans la solution du  $\text{CuSO}_4$  auront une couleur bleue claire en raison de leur incapacité à former un complexe avec le  $\text{CuSO}_4$  du fait qu'elles ont déjà formé un complexe avec les phytates. Ceci signifie que le phytate possède des capacités chélatrices avec les billes d'alginate.



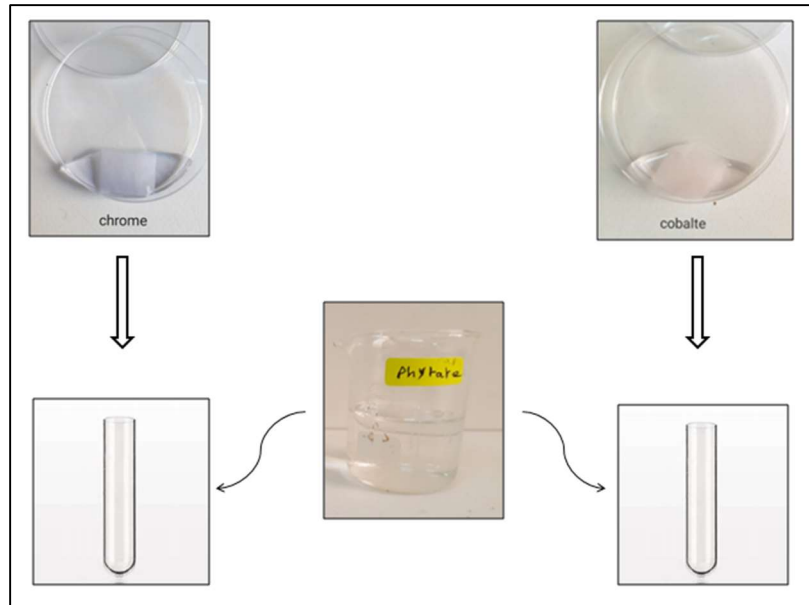
**Figure 5 :** Test de la capacité chélatrice de l'acide phytique avec le  $\text{CuSO}_4$  par les billes d'alginate.

### **1.3. Le test des capacités chélatrices de l'acide phytique avec le chrome et le cobalt**

Une solution de phytate de sodium à 2%, et deux solutions de Chrome (Cr) et de Cobalt (Co) ont été utilisées pour ce test. Les deux solutions, Chrome et Cobalt, sont préparées par

ajout à l'Eau distillée ces deux éléments jusqu'à apparition d'une teinte violette claire pour la solution de Chrome et une teinte rose claire pour la solution de Cobalt (voir figure 6).

Ensuite, la solution de phytate est ajoutée doucement dans chacune des deux solutions. La présence ou l'absence d'un trouble dans les solutions de Chrome et de Cobalt, indique la présence ou l'absence de capacité chélatrice des phytates vis-à-vis du Chrome et du Cobalt.



**Figure 6:** Test de la capacité chélatrice de l'acide phytique avec le Chrome et le Cobalt

## **2. Isolement et purification, sélection des isolats bactériens possédant la capacité à dégrader l'acide phytique**

### **2.1. Préparation des milieux de culture**

#### **2.1.1. Préparation de la Gélose nutritive**

Pour préparer la gélose nutritive (GN), 23g de la poudre de ce milieu (Conda Nutrient Agar) sont dissoutes dans 1L d'Eau distillée.

#### **2.1.2. Préparation du Bouillon nutritif**

Pour préparer du Bouillon nutritif (BN), 8g de la poudre de ce milieu (Conda Nutrient Broth) sont dissoutes dans 1L d'Eau distillée.

## **2.2. Isolement et purification**

La recherche des isolats producteurs des phytases extracellulaires a été effectuée sur des bactéries isolées sur GN à partir d'un échantillon du sol d'une rhizosphère. La purification des isolats est effectuée par des repiquages successifs des colonies sur GN.

Les souches de la collection de notre laboratoire *E.coli* (ATCC), et *Enterobacter* sp fournit par le Laboratoire de Microbiologie du Centre Universitaire Belhadj Bouchaib-Ain Temouchent (CUBBAT) ont été aussi testées pour leur activité de phytase.

### **2.2.1. Isolement des bactéries à partir du sol de la rhizosphère**

L'échantillon du sol de la rhizosphère a été prélevé à partir d'un site situé au niveau du CUBBAT, la récolte de l'échantillon du sol est effectuée à environ 5 cm de profondeur. Le sol recueillies, ensuite, placés dans une boîte de Pétri stérile.

Dés l'arrivé au laboratoire, l'isolement des bactéries, est effectué selon la méthode décrite par Rappilly (1968). Afin de faciliter l'isolement des bactéries, une série de dilution est effectuée à partir d'une solution mère.

0,1g de sol est mélangé avec 10 mL d'Eau distillée stérile (solution mère). A partir de cette solution, une série de dilution ( $10^{-1}$  à  $10^{-5}$ ) est réalisée dans des tubes à essai contenant de l'Eau distillée stérile.

100  $\mu$ L de chacune des dilutions de  $10^{-4}$  et  $10^{-5}$  sont étalés à la surface de la gélose nutritive.

Les boîtes de Pétriensemencées sont incubées à 30°C pendant 24 à 48 h. La purification des isolats est effectuée par des repiquages successifs des colonies sur GN.

### **2.2.2. Vérification de la pureté des isolats et des souches de la collection de notre laboratoire**

#### **2.2.2.1. Observation macroscopique**

Après un isolement et une purification des différents isolats sur le milieu GN, une observation macroscopique a été réalisée pour déterminer la couleur, la taille, la forme, la coupe et le contour des différentes colonies ainsi que la pureté des isolats.

#### **2.2.2.2. Observation microscopique**

Après coloration de Gram, une observation microscopique a été réalisée afin de déterminer le Gram, la morphologie et la pureté des différents isolats.

### **3. Récupération de l'extrait brut des bactéries pour la caractérisation de l'activité phytase**

A partir d'une, 25mL de BN sontensemencés avec une pré-culture de 24h de sorte à avoir une DO à 600nm de 0,1, puis incubé à 30/37°C pendant 24h.

Après 24h d'incubation, les cultures sont centrifugées à 6000rpm pendant 10min. Le surnageant est récupéré et conservé à 4°C et sera utilisé comme extrait brut.

### **4. Caractérisation de l'activité des phytases des extraits bruts**

L'activité des phytases est mesurée selon la méthode de Sajidan *et al* (2015), le mélange réactionnel est constitué de 125µL de tampon ammonium d'acétate 0,1M (pH 5,0) contenant 5 mM de phytate de sodium, et 25µL de l'extrait brut de chaque isolat et souche. Le milieu réactionnel est incubé à 30°C pour les extraits bruts des isolats récupérés du sol et à 37°C pour les extraits bruts des souches de la collection de notre laboratoire *E. coli* et *Enterobacter* sp.

Le Pi libéré est mesuré selon la technique adaptée de Heinonen et Lahti (1981) in Sajidan *et al* (2015). La réaction enzymatique est stoppée par l'addition de 750µL d'une solution fraîchement préparée constituée d'acétone, d'acide sulfurique 2,5M et de molybdate d'ammonium 10mM (2: 1: 1 v / v). Ensuite, 100µL d'acide ascorbique 1M ont été ajoutés. Après 10min à température ambiante, l'absorbance est mesurée à 820nm contre un blanc incubé dans les mêmes conditions sauf que l'enzyme est ajoutée après que la réaction soit stoppée (Wyss *et al.*, 1999).

La caractérisation de l'activité des phytases a été effectuée par l'étude de l'influence du temps d'incubation, du pH, de la température et du CaCl<sub>2</sub> sur l'activité de ces enzymes.

#### **4.1. Influence du temps d'incubation sur l'activité des phytases**

Pour déterminer l'influence du temps sur l'activité des phytases, le milieu réactionnel (décrit précédemment) est incubé à 30°C ou 37°C à différent temps 0, 5, 10, 15 et 20min (Wyss *et al.*, 1999; Sajidan *et al.*, 2004).

La mesure du Pi libéré par l'action des phytases, sous ses conditions, est effectuée de la même manière que précédemment.

#### **4.2. Influence de la température sur l'activité des phytases**

Pour déterminer l'effet de la température sur l'activité des phytases, le milieu réactionnel (décrit précédemment) est incubé pendant 20min à différentes températures 4, 20, 30 ou 37 et 45°C.

La mesure du Pi libéré par l'action des phytases, sous ses conditions, est effectuée de la même manière que précédemment.

#### **4.3. Influence du pH sur l'activité des phytases**

Pour déterminer l'influence du pH sur l'activité des phytases, le tampon ammonium d'acétate 0,1M (pH 5) du milieu réactionnel (décrit précédemment) est remplacé par un tampon phosphate à 0,1M et pH 7 (acide) et du tampon glycine NaOH à 0,1M et pH 9 (basique).

La mesure du Pi libéré par l'action des phytases, sous ses conditions, est effectuée de la même manière que précédemment.

### **5. Courbe d'étalonnage du phosphate**

Afin d'établir la courbe étalon  $DO=f([\text{phosphate}])$  et déterminer la quantité de Pi libéré par les phytases des bactéries le  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  est utilisé comme standard (Wyss *et al.*, 1999). Pour cela, une gamme des solutions étalon (0,2 à 1mM) est préparée à partir d'une solution mère de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  à une concentration de 1mM.

**Tableau 3:** La gamme étalon des solutions  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ .

$[\text{KH}_2\text{PO}_4]$ (mM)	0	0,2	0,4	0,6	0,8	1
Solution $\text{KH}_2\text{PO}_4$ (mL) de 1mM	0	0,2	0,4	0,6	0,8	1
Eau distillée (mL)	1	0,8	0,6	0,4	0,2	0

La DO de chacune des solutions de la gamme étalon, correspondant aux différentes concentrations de phosphate, est mesurée à 820nm de la même façon que pour la mesure de l'activité des phytases décrite précédemment.

# ***R**ésultats et discussion*

## **1. Détermination des capacités chélatrices de l'acide phytique**

Les capacités chélatrices de l'acide phytique complexé avec du sodium (phytate) ont été déterminées avec du papier filtre, des billes d'alginate, des solutions de chrome et de cobalt.

### **1.1. Le test avec du papier filtre**

Pour ce test, les capacités chélatrices de l'acide phytique au  $\text{CuSO}_4$  sont révélées par une coloration bleue (couleur du  $\text{CuSO}_4$ ) du papier filtre (Figure 7) immergé dans l'acide phytique complexé avec du sodium ( $\text{C}_6\text{H}_{18}\text{O}_{24}\text{P}_6 \times \text{Na}^+$ ), puis dans la solution du  $\text{CuSO}_4$ , alors que le papier filtre immergé directement dans la solution  $\text{CuSO}_4$  ne retiendra pas la couleur bleue.

Comme montre la Figure 7, le papier filtre immergé directement dans la solution  $\text{CuSO}_4$  ne prend pas une couleur bleue contrairement au papier filtre immergé dans la solution d'acide phytique complexé avec du sodium puis dans la solution du  $\text{CuSO}_4$  qui prend une couleur bleue ce qui signifie que l'acide phytique chélate avec le  $\text{CuSO}_4$ .



**Figure 7:** Test des capacités chélatrices de l'acide phytique avec du papier filtre.

(1) : papier filtre immergé directement dans la solution  $\text{CuSO}_4$ ; (2) papier filtre immergé dans la solution d'acide phytique complexé avec du sodium puis dans la solution du  $\text{CuSO}_4$ .

### **1.2. Le test avec les billes d'alginate**

Pour ce test, les capacités chélatrices de l'acide phytique au  $\text{CuSO}_4$  sont révélées par une coloration bleue claire pour les billes d'alginate immergées dans un premier temps dans la solution d'acide phytique complexé avec du sodium ( $\text{C}_6\text{H}_{18}\text{O}_{24}\text{P}_6 \times \text{Na}^+$ ), puis dans la solution du  $\text{CuSO}_4$  en raison de leur incapacité à former un complexe avec le  $\text{CuSO}_4$  du fait qu'elles

ont déjà formé un complexe avec l'acide phytique, alors que les billes d'alginate immergés directement dans la solution  $\text{CuSO}_4$  auront une couleur bleues foncées.

Comme le montre Figure 8, les billes d'alginate (1) immergées directement dans la solution  $\text{CuSO}_4$  ont une couleur bleue foncée que celles (2) immergés dans la solution d'acide phytique complexé avec du sodium puis dans la solution du  $\text{CuSO}_4$  ont une couleur bleue plus claire, ce qui signifie que l'acide phytique chélate avec les billes d'alginate.



**Figure 8:** Test des capacités chélatrices de l'acide phytique avec les billes d'alginate.

(1) : billes d'alginate immergé directement dans la solution  $\text{CuSO}_4$ ; (2) billes d'alginate immergé dans la solution d'acide phytique puis dans la solution du  $\text{CuSO}_4$ .

### **1.3. Le test des capacités chélatrices de l'acide phytique avec le chrome et le cobalt.**

Pour ce test, les capacités chélatrices de l'acide phytique au Chrome et de Cobalt sont révélées par l'apparition des troubles dans les deux solutions de Chrome et de Cobalt après l'ajout de la solution de l'acide phytique complexé avec du sodium ( $\text{C}_6\text{H}_{18}\text{O}_{24}\text{P}_6 \times \text{Na}^+$ ).

Le résultat obtenu montre des troubles au niveau de ces deux solutions, ce qui montre les capacités chélatrices de l'acide phytique vis-à-vis du Chrome et du Cobalt.

Les résultats obtenus de ces trois tests montrent les capacités chélatrices de l'acide phytique vis-à-vis des différents minéraux, comme il a été montré par Nagashima *et al* (1999) et Cangussu *et al* (2018). En raison de ses capacités chélatrices, l'acide phytique, est considérée comme un facteur antinutritionnel diminuant ainsi la biodisponibilité des minéraux présentant une importance nutritionnelle. Dans ce travail, les phytases, enzymes qui



permettent l'hydrolyse de l'acide phytique (Laboure *et al.*, 1993; Ajith *et al.*, 2019) ont été recherchées et caractérisées chez des bactéries.

## **2. Purification, sélection, caractérisation des isolats bactériens possédant la capacité à dégrader l'acide phytique**

### **2.1. Vérification de la pureté des isolats bactériens**

L'observation des colonies des isolats à partir des échantillons de la rhizosphère sur Gélose Nutritive (GN) après incubation confirme la pureté des isolats: les colonies présentent un aspect, une couleur, une taille, une forme, une coupe et un contour homogènes (Figure 9).



**Figure 9:** Vérification de la pureté des isolats du sol.

## **3. Caractérisation de l'activité phytasique extracellulaire des extraits bruts bactériens**

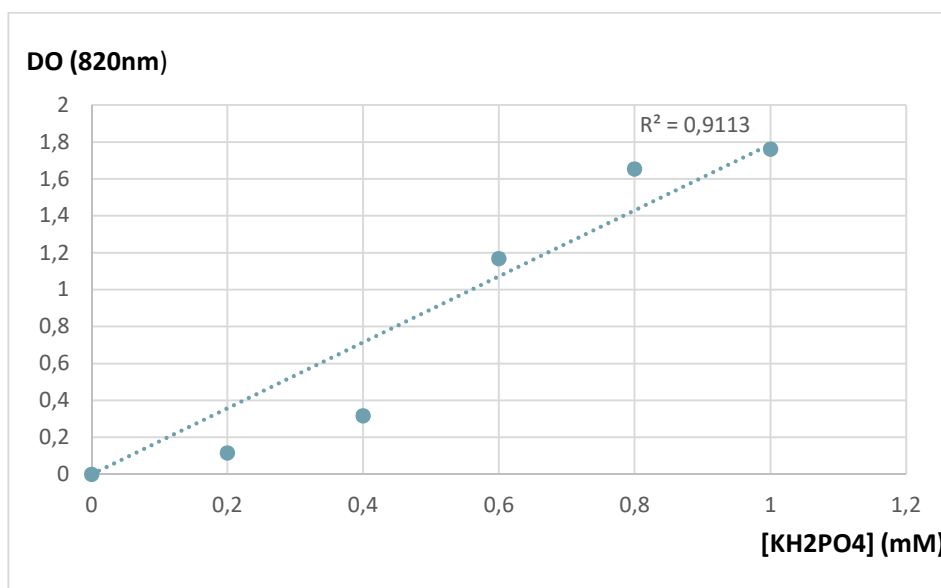
Les extraits bruts des souches de la collection de notre laboratoire (*E.coli* et *Enterobacter* sp) et des isolats du sol (IS1 et IS2) ont été récupérés à partir d'une culture de 24h. Ces extraits ont été testés pour leur capacité à hydrolyser l'acide phytique au niveau extracellulaire, et à libérer du phosphate, en fonction du temps, du pH et de la température.

Les résultats présentés dans cette partie correspondent à la moyenne des répétitions effectuées pour chaque test.

### **3.1. La courbe d'étalonnage**

Comme décrit dans la partie matériel et méthodes, afin de déterminer la quantité de Pi libéré suite à la dégradation de l'acide phytique par les phytases extracellulaires, le  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , à

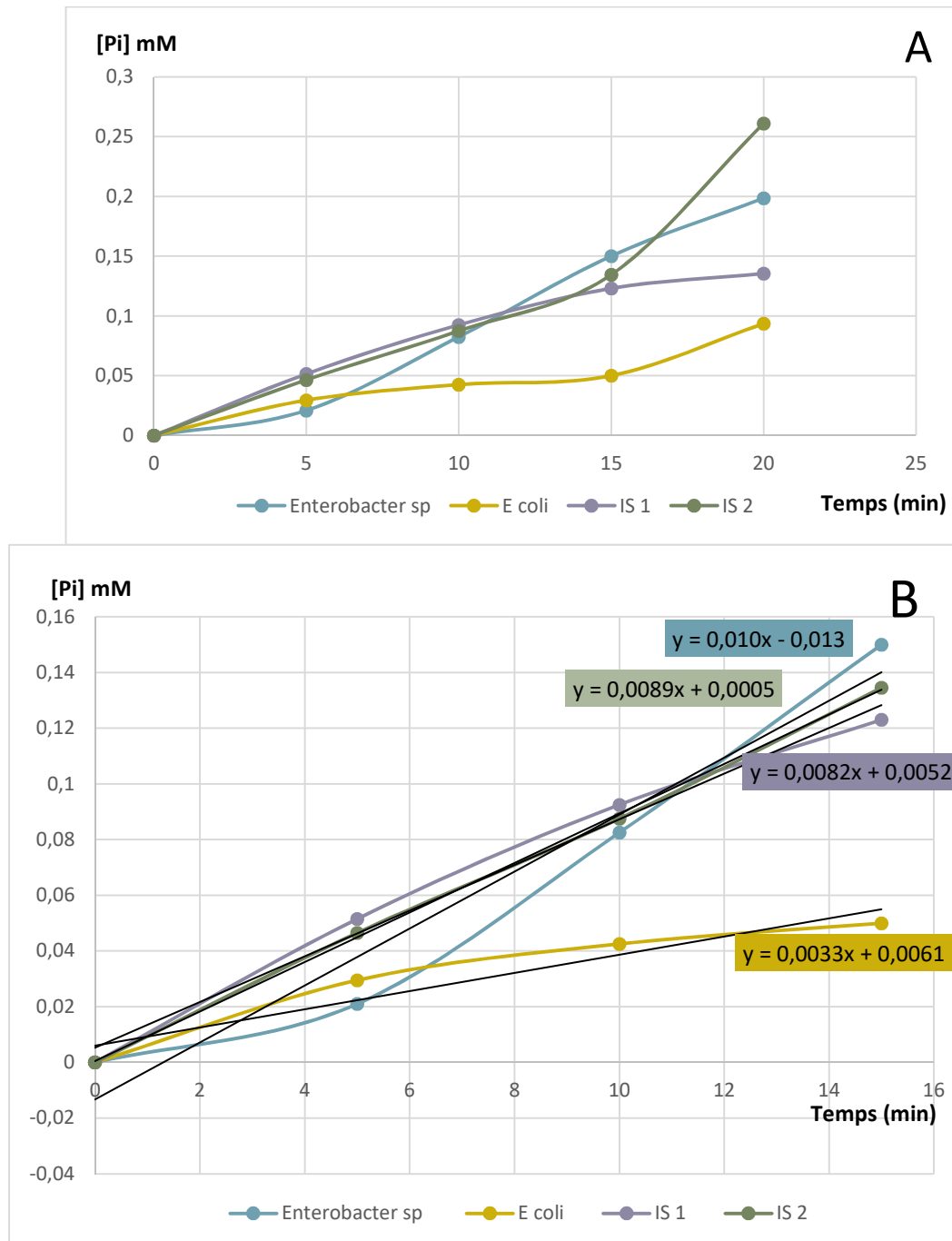
différentes concentrations, a été utilisé comme standard (Figure 10). Les DO mesurées à 820nm ont été ajustées.



**Figure 10:** La courbe étalon en fonction de la concentration du KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (mM).

### 3.2. Influence de la durée d'incubation sur l'activité phytasique extracellulaire

Pour ce test, l'activité phytasique extracellulaire des différents extraits bruts, a été quantifiée à différents temps d'incubation (5, 10, 15 et 20 min).



**Figure 11** : Etude de l'influence du temps sur l'hydrolyse de l'acide phytique par les différents extraits bruts. **A**: Cinétique de l'hydrolyse d'acide phytique par les phytases extracellulaires des différents extraits bruts. **B**: la vitesse initiale de l'hydrolyse d'acide phytique par les phytases extracellulaires des différents extraits bruts.

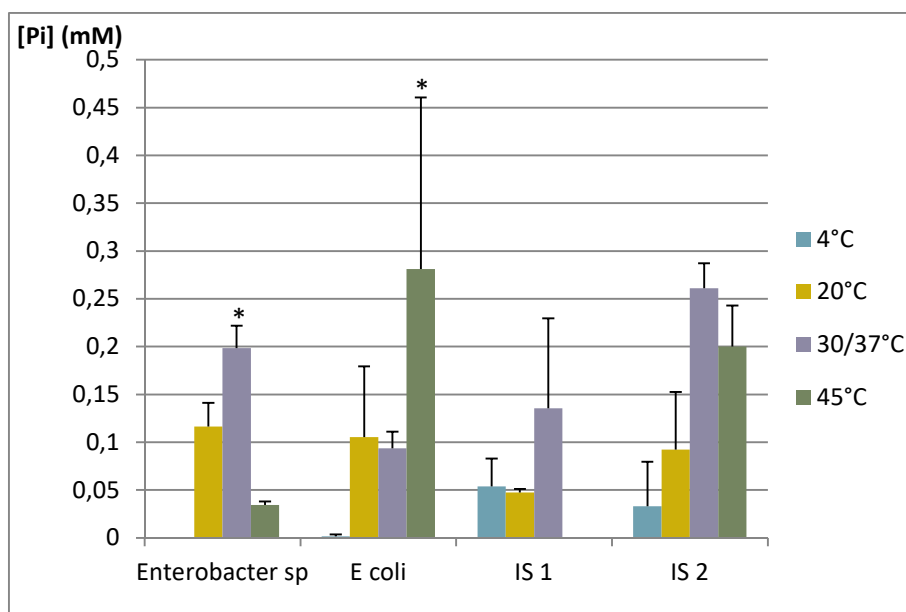
Les résultats obtenus de ce test, ont permis de révéler la présence d'activité phytasique chez les différents extraits bruts testés (Figure 11 A). On remarque que la quantité de phosphate libérée, par hydrolyse de l'acide phytique, augmente avec le temps d'incubation.

Le temps d'incubation de 20 min a été retenu pour les différents tests de caractérisation de l'activité phytasique des extraits bruts des différentes souches.

Le calcul des vitesses initiales, de cette hydrolyse par les phytases des différents extraits bruts, montre que les phytases de la souche de la collection de notre laboratoire *Enterobacter* sp est la plus rapide avec une vitesse initiale de 0,01 mM/min, suivie, respectivement, des phytases des deux isolats IS1 et IS2 qui ont une vitesse initiale identique de 0,008 mM/min, et de la souche de la collection de notre laboratoire *E.coli* qui a une vitesse initial de 0,003 mM/min. (Figure 11 B).

### 3.3. Influence de la température sur l'activité phytasique extracellulaire

Pour ce test, l'activité phytasique extracellulaire des différents extraits bruts a été quantifiée après l'incubation du mélange réactionnel, pendant 20 min, à différentes températures (4 °C, 20°C, 30/37°C et 45°C).



**Figure12:** Effet de la température sur l'hydrolyse d'acide phytique par les phytases extracellulaires des différents extraits bruts.

L'astérisque indique une différence significative ( $p < 0,05$ ) avec le test student.

Les résultats de ce test (Figure 12) montrent que les extraits bruts IS1 et IS2 présentent une activité phytasique optimale aux températures d'incubation de 30 °C et les extraits bruts des souches de la collection de notre laboratoire présentent une activité optimale à 37°C pour *Enterobacter* sp et à 45°C pour *E.coli* (Figure 12).

Pour les extraits bruts de l'isolat IS1, IS2 et de la souche de la collection de notre laboratoire *Enterobacter* sp, on remarque que leur température optimale de l'activité phytasique est identique à leur température optimale de croissance bactérienne. En effet, la température optimale de croissance des *Enterobacille* est de 37°C (Bowman *et al.*, 1967) et celle des bactéries de la rhizosphère est de 30°C (Imamuddin *et al.*, 2015). Des résultats similaires ont montré que les températures optimales d'activité phytasique et de croissance étaient identiques. Suleimanova *et al* (2015) ont montré que la température optimale de l'activité phytasique, qui est de 37°C, est la même que la température optimale de croissance de *Bacterium pantoaea* sp (Suleimanova *et al.*, 2015; Acioly *et al.*, 2017), d'autres résultats, ont montré que 30°C est la température optimale de l'activité phytasiques chez *Aspergillus niger* (Gunashree et Venkateswarana, 2015) qui est aussi sa température optimale de sa croissance (Romsdahle *et al.*, 2018).

Par contre, pour la souche de la collection de notre laboratoire *E.coli*, notre résultat montre que la température optimale de son activité phytasique (45°C) (Figure 12), n'est pas la même que sa température optimale de croissance (37°C) (Lupindu, 2017). Aussi chez d'autres bactéries tels que *Bacillus pumilus*, *Bacillus vallimortis* et *Actinobacillus* sp, les températures optimales de l'activité phytasique 40°C, 45°C, 50°C, respectivement (Lamid *et al.*, 2018), ne sont pas les mêmes que leur température optimale de croissance qui est de 37°C (Macinnes et lally, 2006; Cazorla *et al.*, 2007 in Foyosal et Lisa, 2018).

Pour la température de 45°C, contrairement, aux extraits bruts de l'isolat IS1 et de la souche de la collection de notre laboratoire *Enterobacter* sp qui présentent, respectivement, une activité phytasique presque nulle et relativement faible, les extraits bruts de l'isolat IS2 et de la souche de la collection de notre laboratoire *E.coli* (température optimale de l'activité phytasique), présentent une bonne activité phytasique à 45°C. Des résultats similaires ont été trouvés pour les phytases d'*E.coli*, qui présentaient leur optimum d'activité à 45°C (Mogal *et al.*, 2017).

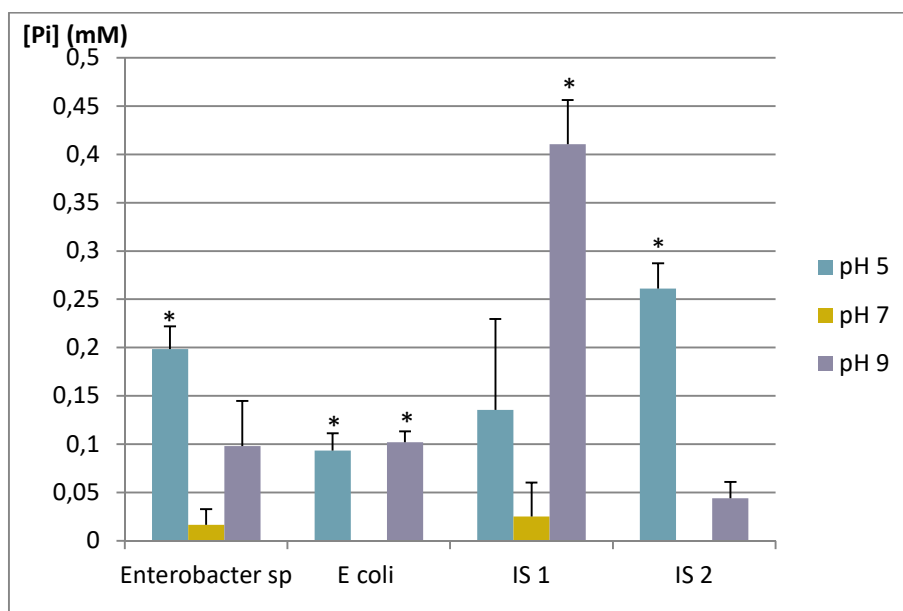
Des travaux ont montré que les phytases sont actives à des températures entre 25°C à 70°C (Jain *et al.*, 2015), d'autres travaux, ont montré qu'elles sont actives entre 45 et 77°C

(Liu *et al.*, 1997; Vats, 2004; Mogal *et al.*, 2017). Par contre, d'autre part certaines phytases peuvent perdre leur activité à des températures comprises entre 40 et 60°C, par exemple, la phytase purifiée d'*Aspergillus niger* a perdu 50% de son activité à 50°C (Gunashree et Venkateswarana, 2015), celle de *Bacillus subtilis* a considérablement, diminuée à 40°C (Rocky-Salmi *et al.*, 2016). Ce qui a été trouvé pour les extraits bruts de la souche de la collection de notre laboratoire *Enterobacter* sp et de l'isolat IS1, qui présentaient, respectivement, des activités phytasiques fortement réduite et nulle à 45°C (Figure 12).

Pour la température 4°C, les extraits bruts des deux souches de la collection de notre laboratoire *Enterobacter* sp et *E. coli*, ne présentent aucune activité phytasique, contrairement aux extraits bruts d'IS1 et d'IS2 qui présentent une activité enzymatique relativement faible. Des études ont montré, aussi, la présence d'une activité phytasique faible à des basses températures. En effet, il a été montré qu'une phytase purifiée d'*Aspergillus niger* ne perdait pas son activité à 5°C mais elle était relativement faible (Gunashree et Venkateswarana, 2015).

### 3.4. Influence du pH sur l'activité phytasique extracellulaire

Pour ce test, l'influence du pH sur l'activité phytasique extracellulaire a été testée à pH acide (pH 5), pH neutre (pH 7) et pH basique (pH 9).



**Figure 13:** Effet du pH sur l'hydrolyse d'acide phytique par les phytases extracellulaires des différents extraits bruts.

L'astérisque indique une différence significative ( $p < 0,05$ ) avec le test student.

Les résultats obtenus (Figure 13), montrent que les différents extraits bruts présentent une activité phytasique à pH 5 et à pH 9, par contre pour le pH 7, les extraits bruts des isolats IS1, IS2 et la souche de la collection de notre laboratoire *E.coli* ne présentent aucune activité phytasique et l'extrait brut de la souche de la collection de notre laboratoire *Enterobacter* sp présente une activité phytasique très faible.

Le pH 5 est le pH optimal pour l'activité phytasique de l'isolat IS 2 et des souches de la collection de notre laboratoire *Enterobacter* sp et *E.coli*, et le pH 9 est le pH optimal de l'activité phytasique de l'isolat IS 1 et de la souche de la collection de notre laboratoire *E.coli*.

Des activités phytasiques optimales à pH 5, comme c'est le cas des activités phytasiques de l'isolat IS 2 et des souches de la collection de notre laboratoire *Enterobacter* sp et *E.coli*, ont été trouvées chez des bactéries telles que *Lactobacillus coryniformis* (Demir *et al.*, 2018) et *Bacillus subtilis* (El-Toukhy *et al.*, 2016). Chez *E.coli*, il a été montré que l'activité phytasique est optimale à pH 4,5 (Körfer *et al.*, 2018), d'autres études ont montré que le pH optimal pour l'activité phytasique chez *E.coli* est de pH 3,5 à pH 5 et que cette activité est réduite à des pHs entre 5 et 7 (Mogal *et al.*, 2017), ce qui est en corrélation avec le résultat du pH qu'on a testé (pH 5) et auquel l'activité phytasique était optimale. Certaines phytases d'autres bactéries peuvent avoir leur activité optimale à des pHs plus acide que celui qu'on a testé, comme par exemple les phytases d'*Actinomycètes* qui a un pH optimal de 2,5 (Puppala *et al.*, 2019). Aussi les phytases de certains champignons peuvent avoir leur activité optimale à des pHs plus acides que celui qu'on a testé, par exemple, les phytases d'*Aspergillus* ont un pH optimal de 2,5 (Soni *et al.*, 2010; Körfer *et al.*, 2018).

Comme on l'a vu précédemment, au pH 9, les différents extraits présentent une activité phytasique et c'est le pH optimal pour l'activité phytasique de l'isolat IS1 et de la souche de la collection de notre laboratoire *E.coli*.

Des activités optimales des phytases à des pHs alcalins ont été trouvées chez d'autres bactéries, en effet il a été montré que la phytase purifiée de *Bacillus laevolacticus*, isolée à partir du sol, présente un pH optimal de 8 (Gulati *et al.*, 2007), de même que pour les phytases d'*Alcaligenes* sp qui présentent un pH optimal d'activité de 8 (Vijayaraghvan *et al.*, 2013).

Le phytate peut exister sous une forme libre sans métal et dans ce cas il sera appelé acide phytique. Le phytate (complexé à un métal), est généralement solubles à des pHs acides où la protonation des groupements phosphates du phytate, génère la forme exempte de métal, par

contre, ce phytate est presque insoluble à des pHs alcalins (Cheryan, 1980; Maenz *et al.*, 1999 in Oh *et al.*, 2003).

Les phytases acides, qui ont des sites actifs chargés positivement, n'agissent que sur l'acide phytique (Oh *et al.*, 2003; Tran *et al.*, 2011b) et à pH acide, le phytate qu'on a utilisé perd ces ions de sodium et devient acide phytique (Cheryan, 1980; Maenz *et al.*, 1999 in Oh *et al.*, 2003), ce qui permet aux phytases acides de le dégrader.

Par contre, les phytases alcalines (qui ont des sites actifs chargés négativement) permettent de déphosphoryler le phytate complexé avec des ions (Cheryan, 1980; Maenz *et al.*, 1999 in Oh *et al.*, 2003). À pH basique, le phytate qu'on a utilisé est complexé avec des ions de sodium, et il ne peut être dégradé que par les phytases alcalines.

Les résultats obtenus montrent que les extraits bruts des différents isolats possèdent les deux types des phytases, acides et alcalines, du fait qu'il y a libération du phosphate à pH acide et à pH alcalin (Figure 13).

Comme on l'a vu précédemment, au pH 7, l'activité phytasique chez tous les extraits bruts est faible à presque nulle. Des études ont montré que l'activité phytasique chez *E.coli*, *Mitsuokella jalaludinii*, *Aspergillus* et *Klebsiella* étaient relativement faible à pH 7 (Elkhalil *et al.*, 2007; Lan *et al.*, 2011). Dokuzparmak *et al* (2017) ont montré que l'activité de phytase chez *Geobacillus* sp est faible à des pHs entre 7 et 9 (Lan *et al.*, 2011). Aussi, selon Shedova *et al* (2008), une activité phytasique chez une souche de *Serratia plymuthica* isolée de la rhizosphère, a complètement disparu à pH 7.

L'étude de Tanaka et Yada (2001), a montré que la pepsine de porc a été rapidement inactivée à pH 7,5, et cette inactivation a été causée par une dénaturation irréversible du domaine N-terminal (à cause du réarrangement des liaisons hydrogène et/ou des interactions électrostatiques) à pH neutre.

D'autres études, au contraire, ont montré que les phytases chez *Bacillus* sont actives à des pHs optimale de 7 et 7,5 (Elkhalil *et al.*, 2007), et celles de *Bacillus subtilis* sont actives à des pHs neutres entre 6,5 et 7,5 (Kumar et Sinha, 2018), aussi Kalsi *et al* (2016) ont montré que les phytases d'*Enterobacter*, présentent leur activité maximale à pH7.

Chaplin et Bucke (1990) ont montré que le pH de l'environnement affecte la charge totale des enzymes principalement dans les groupements acides et basiques situés dans la surface d'enzyme, ces changements des charges affectent l'activité enzymatique.



La plupart des phytases utilisées comme additifs pour l'alimentation animale ont un pH acide optimal (Körfer *et al.*, 2018), elles sont importantes dans les industries alimentaires en raison de leur forte stabilité (Konietzny et Greiner, 2004; Konietzny et Greiner, 1993 in Jorquera *et al.*, 2008) et de leur pH optimale (acide) proche de pH d'estomac, ce qui leur donne une bonne capacité à digérer les phytates chez les animaux (Ugwuanyi, 2016).

### 4. Discussion générale

Comme il a été mentionné dans la partie synthèse bibliographique, les phytases présentent une grande importance dans le marché mondial des enzymes alimentaires, en raison de leur grande utilisation dans l'alimentation humaine et animale (Jorquera *et al.*, 2008; Lamid *et al.*, 2018).

Les résultats de notre études ont montré que les phytases extracellulaire des bactéries testées (les souches de la collection de notre laboratoire *Enterobacter* sp et *E.coli* et les isolats IS1 et IS2), et en attendant d'autres tests, peuvent être utilisées dans les industries alimentaires en raison de leur bonne activité à des pHs acides (pH 5) proche du pH de l'estomac (Ugwuanyi, 2016).

Pour les phytases extracellulaires des extraits bruts des souches de la collection de notre laboratoire *Enterobacter* sp et *E.coli*, les conditions optimales de leur activités phytasiques sont différentes, les phytases d'*Enterobacter* sp atteignent leurs optimums à une température de 37°C et à pH 5, tandis que pour les phytases d'*E.coli*, ils atteignent leurs optimums à une température de 45°C et aux pH 5 et 9.

Pour les phytases extracellulaires des extraits bruts des isolats IS1 et IS2, la température optimale de leurs activités phytasiques est la même (30°C) et les pHs optimaux sont différents, IS1 présente une activité optimale à un pH 9 et IS2 à pH 5.

Les principales sources des phytases sont les bactéries et les champignons (Farias *et al.*, 2018), mais les phytases bactériennes sont les plus utilisé dans le domaine alimentaire à cause de leur grande spécificité au substrat, leur forte stabilité à des pHs acides (Konietzny et Greiner, 2004; Konietzny et Greiner, 1993 in Jorquera *et al.*, 2008 ), leur stabilité thermique élevée, et une résistance à la protéolyse (Guerrero-Olazarán *et al.*, 2010). Ce qui le rend important leurs utilisations au niveau des industries alimentaires.

Pour compléter cette étude de recherche et caractérisation des phytases extracellulaires, à intérêt industriel de nos bactéries (les souches de la collection de notre laboratoire *Enterobacter* sp et *E.coli* et les isolats IS1 et IS2), des tests complémentaires ont été programmés mais en raison du confinement, ils n'ont pu être réalisés. Ces tests consistent en une étude de la capacité des phytases extracellulaires de nos bactéries à résister aux conditions extrêmes utilisées en industrie, par des traitements à des températures élevées, à des pHs extrêmes et en présence de CaCl<sub>2</sub>. L'activité résiduelle restante, détermine si nos phytases peuvent être utilisées ou pas en industrie.

La stabilité des enzymes est une propriété de grande importance industrielle (Eijsink *et al.*, 2005). Les phytases thermostables seront d'excellentes enzymes utilisées comme compléments alimentaires (Kalsi *et al.*, 2016) du fait que la transformation et la préparation des aliments impliquent généralement une exposition à des hautes températures (Greiner et Konietzny, 2006).

D'autre part, comme l'estomac est le site fonctionnel principal dans l'alimentation et du fait que l'estomac sécrète l'acide chlorhydrique et la pepsine pour la digestion des aliments (Heda *et al.*, 2020), une enzyme avec une grande stabilité à des conditions de pH acide et une résistance élevée à la pepsine est certainement souhaitable (Greiner et Konietzny, 2006).

**Tableau 4:** Tableau récapitulatif des différents résultats de caractérisation des phytases des différents extraits bruts.

Les extraits	Le temps d'augmentation d'activité phytasique (min)	Activité phytasique	
		Température optimal (°C)	pH optimal
<i>Enterobacter</i> sp	Après 20	37	5
<i>E.coli</i>	Après 20	45	5 et 9
IS1	Après 20	30	9
IS2	Après 20	30	5

# *Conclusion et perspectives*

## *Conclusion et perspectives*

Les résultats obtenus à partir des trois tests (du papier filtre, les billes d'alginate, de cobalt et de chrome), ont confirmé les capacités chélatrices de l'acide phytique vis-à-vis des différents minéraux.

L'activité phytasique extracellulaire a été recherchée et caractérisée chez des souches de la collection de notre laboratoire (*Enterobacter* sp et *Escherichia coli*), et chez deux bactéries isolées à partir de la rhizosphère (IS1 et IS2).

Les résultats de l'étude de l'influence du temps sur la dégradation de l'acide phytique a révélé la présence d'activité phytasique chez les extraits bruts des 4 bactéries testées. Le calcul des vitesses initiales de cette dégradation a révélé que les phytases de la souche de la collection de notre laboratoire *Enterobacter* sp est la plus rapide avec une vitesse initiale de 0,01mM/min, suivie, respectivement, des phytases des deux l'isolat IS1 et IS2 qui ont une vitesse initiale identique de 0,008 mM/min, et de la souche de la collection de notre laboratoire *E.coli* avec une vitesse initiale, la plus faible, de 0,003mM/min.

Les résultats obtenus sur l'influence de la température sur l'activité phytasique ont révélé que cette dernière est optimale à 30°C pour les IS1 et IS2, à 37°C pour la souche de la collection de notre laboratoire *Enterobacter* sp et à 45°C pour la souche de la collection de notre laboratoire *E.coli*. Tous les extraits bruts présentent une activité phytasique à 20°C, par contre, à 4°C l'activité phytasique était faible pour les extraits bruts d'IS1 et d'IS2, et presque nulle pour les extraits bruts des deux souches de la collection de notre laboratoire *Enterobacter* sp et *E.coli*.

D'autre part, les résultats de l'influence du pH sur l'activité phytasique, ont révélé que les phytases extracellulaire ont une activité optimale à pH 5 pour l'isolat IS2 et la souche de la collection de notre laboratoire *Enterobacter* sp, et une activité optimale à pH 9 pour l'isolat IS1, tandis que, la souche de la collection de notre laboratoire *E.coli* a une activité phytasique optimal à pH 5 et pH 9. Par contre, pour le pH 7 les extraits bruts de la souche de la collection de notre laboratoire *E.coli* et des isolats IS1 et IS2 ont une activité phytasique nulle, et seulement la souche de la collection de notre laboratoire *Enterobacter* sp qui présente une activité phytasique très faible.

Afin de mieux caractériser ces phytases et voir si potentiellement elles peuvent être utilisées en industrie, des tests supplémentaires doivent être réalisés. La stabilité de ces enzymes à des températures élevées, à des pHs extrêmes, à des concentrations élevées de sels,

## *Conclusion et perspectives*

et à la protéolyse doivent être testées par mesure de l'activité résiduelle après traitement par ces diverses conditions.

Ensuite, les gènes codant pour ces phytases à intérêt industriel seront isolés, et afin de les améliorer pour les rendre plus actives et efficaces aux conditions industrielles et aux conditions des systèmes digestifs, des modifications génétiques seront réalisées sur ces gènes.

Ensuite, des protocoles seront adaptés pour permettre la production de ces phytases à l'échelle industrielle.

# ***Références bibliographiques***

1. **Acioly, L. M. L., Carlos, V. J., da Silveira, A. B., Gomes de Almeida, F. C., de Lima e Silva, T. A., et de Campos-Takaki, G. M. (2017).** Isolation, Identification, Characterization and Enzymatic Profile of the New Strain of *Pantoea agglomerans*. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 6(11), 4152-4163.
2. **Adeola, O., et Cowieson, A. J. (2011).** Opportunities and challenges in using exogenous enzyme to improve nonruminant animal production. *Journal of Animal Science*, 89(10), 3189.
3. **Adler-Nissen, J. (1982).** Limited enzymic degradation of proteins: A new approach in the industrial application of hydrolases. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 32(1), 138-156.
4. **Adrio, J. L., et Demain, A. L. (2014).** Microbial enzymes: tools for biotechnological processes. *Biomolecules*, 4(1), 117–139.
5. **Ahemad, M., Zaidi, A., Khan, M. S., et Oves, M. (2009).** Biological importance of phosphorus and phosphate solubilizing microbes- An overview. *Phosphate Solubilising Microbes for Crop Improvement*, 1-14.
6. **Ahmed, A., Nasim, F. U., Batool, K., et Bibi, A. (2017).** Microbial  $\beta$ -Glucosidase: Sources, Production and Applications. *Journal of Applied & Environmental Microbiology*, 5(1), 31-46.
7. **Ajith, S., Ghosh, J., Shet, D., ShreeVidhya, S., Punith, B. D., et Elangovan, A. V.(2019).** Partial purification and characterization of phytase from *Aspergillus foetidus* MTCC 11682. *AMB Expr*, 9(3).
8. **Al-Maqtari, Q. A., AL-Ansi, M. et Ali Mahdi,A. (2019).** Microbial enzymes produced by fermentation and their applications in the food industry -A review. *International Journal of Agriculture Innovations and Research*, 8(1), 62-82.
9. **Amri, E., et Mamboya, F. (2012).** Papain, a plant enzyme of biological importance: A Review. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*, 8 (2), 99-104.
10. **Anbu, P., Gopinath, S. C. B., Cihan, A. C., et Chaulagain, B. P. (2013).** Microbial Enzymes and Their Applications in Industries and Medicine. *BioMed Research International*, 2.
11. **Anbu, P., Gopinath, S. C., Chaulagain, B. P., Tang, T. H., et Citartan, M. (2015).** Microbial Enzymes and Their Applications in Industries and Medicine 2014. *BioMed research international*, 3.

12. **Aumaitre, A., et Vaissade, P. (1971).** Le développement des enzymes dans le tube digestif du jeune porcelet : Importance pour le serage et signification nutritionnelle. *Ann.Zootech*, 20(4), 551-575.
13. **Bae, H. D., Yanke, L. J., Cheng, K. J., et Selinger, L. B. (1999).** A novel staining method for detecting phytase activity. *Journal of microbiological methods*, 39(1), 17–22.
14. **Barros, M., Fleuri, L. F., et Macedo, G. A. (2010).** Seed lipases: Sources, Applications and Proprieties – A Review. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 27(01), 15-29.
15. **Baysal, T., et Demirdöven, A. (2006).** Lipoxygenase in fruits and vegetables: A review. *Enzyme and Microbial Technology*, 40(4), 491–496.
16. **Beckers, Y., et Piron, F.(2009).** Utilisation des enzymes exogènes en alimentation porcine et avicole. *9ème Journée Productions porcines et avicoles*.
17. **BELLIER, S. (2001).** Les maladies lysosomales de l'homme et des animaux domestiques. *Revue de Médecine Vétérinaire*, 152(6), 435-446.
18. **Benhamou, N. et Rey, P. (2012).** Stimulateurs des défenses naturelles des plantes : une nouvelle stratégie phytosanitaire dans un contexte d'écoproduction durable. II. Intérêt des SDN en protection des cultures. *Phytoprotection*, 92 (1), 24–35.
19. **Bertucci, M., Calusinska, M., Goux, X., Rouland-Lefèvre,C., Untereiner,B., Ferrer, P., Gerin,P. A., et Delfosse, P. (2019).** Carbohydrate Hydrolytic Potential and Redundancy of an Anaerobic Digestion Microbiome Exposed to Acidosis, as Uncovered by Metagenomics. *Applied and Environmental Microbiology*, 85.
20. **Bhatia, S. (2018).** Introduction to enzymes and their applications. *Introduction to Pharmaceutical Biotechnology*, 2, 1-29.
21. **Bowman, J. E., Brubaker, R. R., Frischer, H., et Carson, P. E. (1967).** Characterization of enterobacteria by starch-gel electrophoresis of glucose-6-phosphate dehydrogenase and phosphogluconate dehydrogenase. *Journal of bacteriology*, 94(3), 544–551.
22. **Boyce, S., et Tipton, K. F. (2001).** Enzyme Classification and Nomenclature. *Encyclopedia of life science*.
23. **Boyce, A., Casey, A., et Walsh, G. (2004).** A Phytase Enzyme-based Biochemistry Practical Particularly Suited to Students Undertaking Courses in Biotechnology and Environmental Science. *Biochemistry and Molecular Biology Education*, 32(5), 336–340.



24. **Buhl, S. N., et Jackson, K. Y. (1978).** Optimal conditions and comparison of lactate dehydrogenase catalysis of the lactate-to-pyruvate and pyruvate-to-lactate reactions in human serum at 25, 30, and 37 degrees C. *Clinical chemistry*, 24(5), 828–831.
25. **Burgess, J. E., et Pletschke, B. (2008).** Hydrolytic Enzymes in Sewage Sludge Treatment: A Mini-Review. *Water SA*. 34(3).
26. **Buttin, G. (1963).** Mecanismes Regulateurs dans la Biosynthese des Enzymes du Metabolisme du Galactose chez *Escherichia coli* K12. *J. Mol. Biol.*,7, 183-205.
27. **Campbell, G. L., et Bedford, M. R. (1992).** Enzyme applications for monogastric feeds: A review. *Canadian journal of animal science*, 72: 449-466.
28. **Cangussu, A., Aires Almeida, D., Aguiar, R., Bordignon-Junior, S. E., Viana, K. F., Barbosa, L., . . . et Lima, W. (2018).** Characterization of the Catalytic Structure of Plant Phytase, Protein Tyrosine Phosphatase-Like Phytase, and Histidine Acid Phytases and Their Biotechnological Applications. *Enzyme research*.
29. **Champ, M., et Colonna, P. (1993).** Importance de l'endommagement de l'amidon dans les aliments pour animaux. *INRA Productions Animales*, 6 (3), 185-198.
30. **Chaplin, M., et Bucke, C. (1990).** Fundamentals of enzyme kinetics. *Enzyme Technology*.
31. **Chauhan, P. S., Goradia, B., et Saxena, A. (2017).** Bacterial laccase: recent update on production, properties and industrial applications. *3 Biotech*, 7(5), 323.
32. **Chevalet, C., Corpet, F., Gillois, M., et Micali, A. (1983).** Modélisation dynamique de systèmes génétiques de régulation I. L'induction de l'operon lactose d'*Escherichia coli*: élaboration d'un modèle. *Genetique, selection, evolution*, 15(1), 1–30.
33. **Classification and Nomenclature of Enzymes by the Reactions they Catalyze.** NC-IUBMB.
34. **Cooper, G. M. (2000).** The Central Role of Enzymes as Biological Catalysts. *The Cell: A Molecular Approach. 2nd edition*.
35. **Daood, H. G.(2003).** CHLOROPHYL. *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition (Second Edition)*, 1196-1205.
36. **De Angelis, M., Gallo, G., Corbo, M. R., McSweeney, P. L., Faccia, M., Giovine, M., et Gobbetti, M. (2003).** Phytase activity in sourdough lactic acid bacteria: purification and characterization of a phytase from *Lactobacillus sanfranciscensis* CB1. *International journal of food microbiology*, 87(3), 259–270.
37. **De Berardinis, R. J., et Thompson, C. B. (2012).** Cellular metabolism and disease: what do metabolic outliers teach us?. *Cell*, 148(6), 1132–1144.

38. De María, P. D., Gonzalo, G. D., et Alcántara, A. R. (2019). Biocatalysis as Useful Tool in Asymmetric Synthesis: An Assessment of Recently Granted Patents (2014–2019). *Catalysts*, 9, 802.
39. De Miguel Bouzas, T., Barros-Velázquez, J., et Villa, T. G. (2006). Industrial applications of hyperthermophilic enzymes: a review. *Protein and peptide letters*, 13(7), 645–651.
40. Demain, A. L., et Vaishnav, P. (2009). Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. *Biotechnology advances*, 27(3), 297–306.
41. Demir, Y., Dikbaş, N., et Beydemir, Ş. (2018). Purification and Biochemical Characterization of Phytase Enzyme from *Lactobacillus coryniformis* (MH121153). *Molecular biotechnology*, 60(11), 783–790.
42. Dersjant-Li, Y., Awati, A., Schulze, H., et Partridge, G. (2015). Phytase in non ruminant animal nutrition: a critical review on phytase activities in the gastrointestinal tract and influencing factors. *Journal of the science of food and agriculture*, 95(5), 878–896.
43. Dersjant-Li, Y., Awati, A., Schulze, H., et Partridge, G. (2015). Phytase in non ruminant animal nutrition: a critical review on phytase activities in the gastrointestinal tract and influencing factors. *Journal of the science of food and agriculture*, 95(5), 878–896.
44. Djebri, N., Boukhalfa, N., et Boutahala, M. (2018). Les alginates et leurs applications en ingenierie : Application a la construction d'un biomateriau. *Algerian journal of arid environment*, 8(1), 65-71.
45. Dokuzparmak, E., Sirin, Y., Cakmak, U., et Saglam Ertunga, N. (2017). Purification and characterization of a novelthermostable phytase from the *Thermophilic Geobacillus* sp. TF16. *International journal of food properties*, 20(5), 1104–1116.
46. Dreyfus, L. A., et Iglewski, B. H. (1986). Purification and characterization of an extracellular protease of *Legionella pneumophila*. *Infection and immunity*, 51(3), 736-743.
47. Eijsink, V. G., Gåseidnes, S., Borchert, T. V., et van den Burg, B. (2005). Directed evolution of enzyme stability. *Biomolecular engineering*, 22(1-3), 21–30.
48. El Soda, M., et Desmazeaud, M. J. (1982). Les peptide-hydrolases des lactobacilles du groupe *Thermobacterium*. I. Mise en Evidence de ces activites chez *Lactobacillus*

## Références bibliographiques

- helveticus*, *L. acidophilus*, *L. lactis* et *L. bulgaricus*. *Canadian Journal of Microbiology*, 28(10), 1181-1188.
49. **Elkhalil, E. A. I., Manner, K., Borriss, R., et Simon, O. (2007).** In vitro and in vivo characteristics of bacterial phytases and their efficacy in broiler chickens. *British Poultry Science*, 48(1), 64-70
50. **El-Toukhy, N. M. K., Youssef, A. S., et Mikhail, M. G. M. (2016).** Isolation, purification and characterization of phytase from *Bacillus subtilis* MJA. *African Journal of Biotechnology*, 12(20), 2957- 2967.
51. **Eze, S.O.O., et Ezema, B.O. (2012).** Purification and Characterization of Lipase (EC 3.1.1.3) from the Seeds of *Cucumeropsis manni* (White Melon). *Thai Journal of Agricultural Science*, 45(2), 115-120.
52. **Farias, N., Almeida, I., et Meneses, C. (2018).** New Bacterial Phytase through Metagenomic Prospection. *Molecules*, 23, 448.
53. **Farrokh, P., Yakhchali, B., et Karkhane, A. A. (2014).** Cloning and characterization of newly isolated lipase from *Enterobacter* sp. *Brazilian journal of microbiology*, 45(2), 677 687.
54. **Fickers, P., Destain, J., et Thonart. P. (2008).** Les lipases sont des hydrolases atypiques: principales caractéristiques et applications. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*, 12 (2), 119-130.
55. **Foysal, M.J., et Lisa, A.K. (2018).** Isolation and characterization of *Bacillus* sp. Strain BC01 from soil displaying potent antagonistic activity against plant and fish pathogenic fungi and bacteria. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 16(2), 387-392.
56. **Frias J., Doblado R., Antezana J. R., et Vidal-Valverde C. (2003).** Inositol phosphate degradation by the action of phytase enzyme in legume seeds. *Food Chemistry*, 81(2), 233-239.
57. **Gaber, Y. (2012).** Hydrolases as Catalysts for Green Chemistry and Industrial Applications - Esterase, Lipase and Phytase. *Lund University, Biotechnology Department*.
58. **Gauthier, A., Attucci, S., et Gauthier, F. (2006).** Répartition de l'activité des protéases à sérine du polynucléaire neutrophile dans les expectorations de patients atteints de mucoviscidose. *Revue des maladies respiratoires*, 23(5-1), 556-556.

59. Gopinath, S. C. B., Anbu, P., Lakshmipriya, T., Tang, T. H., Chen, H., Hashim, U., . . . et Arshad, M. K. Md. (2015). Biotechnological Aspects and Perspective of Microbial Keratinase Production. *BioMed Research International*.
60. Greiner, R., et Konietzny, U. (2006). Phytase for Food Application. *Food Technol. Biotechnol.* 44 (2) 125–140.
61. Grodowska, K., et Parczewski, A. (2010). Organic solvents in the pharmaceutical industry. *Acta poloniae pharmaceutica*, 67(1), 3–12.
62. Guerrand, D. (2017). Lipases industrial applications: focus on food and agroindustries. *Oilseeds and fats Crops and Lipids*, 24(4), 7 pages.
63. Guerrand, D. (2018). Economics of food and feed enzymes: Status and prospective. *Enzymes in Human and Animal Nutrition*, 487-514.
64. Guerrero-Olazarán, M., Rodríguez-Blanco, L., Carreón-Treviño, G., Gallegos López, J. A., et Viader-Salvado, M. (2010). Expression of a *Bacillus* Phytase C Gene in *Pichia pastoris* and Properties of the Recombinant Enzyme. *Applied and Environmental Microbiology*, 76 (16), 5601–5608.
65. Guillotin, L., Assaf, Z., Pistorio, G. S., Lafite, P. Demchenko, A. V., et Daniellou, R. (2019). Hydrolysis of Glycosyl Thioimidates by Glycoside Hydrolase Requires Remote Activation for Efficient Activity. *Catalysts*, 9(10), 826-837.
66. Gulati, H. K., Chadha, B. S., et Saini, H. S. (2007). Production and characterization of thermostable alkaline phytase from *Bacillus laevolacticus* isolated from rhizosphere soil. *Journal of industrial microbiology and biotechnology*, 34(1), 91–98.
67. Gunashree, B. S., et Venkateswaran, G. (2015). Extracellular phytase from *Aspergillus niger* CFR 335: purification and characterization. *Journal of food science and technology*, 52(7), 4558–4564.
68. Gurung, N., Ray, S., Bose, S., et Rai, V. (2013). A Broader View: Microbial Enzymes and Their Relevance in Industries, Medicine, and Beyond. *BioMed Research International*, 10, 1155.
69. Guyer, L., Hofstetter, S. S., Christ, B., Lira, B. S., Rossi, M., et Hörtensteiner, S. (2010). Different Mechanisms Are Responsible for Chlorophyll Dephytylation during Fruit Ripening and Leaf Senescence in Tomato. *Plant Physiology*, 166, 44–56.
70. Hamid, R., Khan, M.A., Ahmad, M., Ahmad, M.M., Abdin, M.Z., Musarrat, J., et Javed, S. (2013). Chitinases: An update. *Journal of Pharmacy and BioAllied Sciences*, 5, 21-9.

71. Hamin Neto, Y., da Rosa Garzon, N. G., Pedezzi, R., et Cabral, H. (2018). Specificity of peptidases secreted by filamentous fungi. *Bioengineered*, 9(1), 30–37.
72. Harrison, R. L., et Bonning, B. C. (2010). Proteases as insecticidal agents. *Toxins*, 2(5), 935–953.
73. Hasan, F., Shah, A.A., et Hameed, A. (2009). Methods for detection and characterization of lipases: A comprehensive review. *Biotechnology Advances*, 27, 782–798.
74. Heda, R., Toro, F., et Tombazzi, C. R. (2020). Physiology, Pepsin. *StatPearls Publishing*.
75. Hodgson, E. (2009). Introduction to Biotransformation (Metabolism). *Hayes' Handbook of Pesticide Toxicology (Third Edition)*, 865-875.
76. Huang, H., Luo, H., Yang, P., Meng, K., Wang, Y., Yuan, T., ... et Yao, B. (2006). A novel phytase with preferable characteristics from *Yersinia intermedia*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 350, 884–889.
77. Huang, H., Shi, P., Wang, Y., Luo, H., Shao, N., Wang, G., Yang, P., et Yao, B. (2009). Diversity of Beta-Propeller Phytase Genes in the Intestinal Contents of Grass Carp Provides Insight into the Release of Major Phosphorus from Phytate in Nature. *Applied and Environmental Microbiology*, 75 (6), 1508–1516.
78. Husain, Q. (2016). Magnetic nanoparticles as a tool for the immobilization / stabilization of hydrolases and their applications: An overview. *Biointerface Research in Applied Chemistry*, 6(6), 1585 – 1606.
79. Imamuddin, H., Dewi, T. K., et Antonius, S. (2015). Isolation and screening of rhizobacteria from soil in Ngawi, East Java, as candidates of agent for liquid organic fertilizer production. *Nusantara Bioscience*, 7(2), 107-111.
80. Iqbal, M. U., Bilal, Q., Muhammed, G., et Sajid, M.S. (2005). Review Absorption, Availability, Metabolism and Excretion of Phosphorus in Ruminants. *International Journal of Agriculture & Biology*, 7, 4.
81. Jain, J., Sapna, et Singh, B. (2015). Characteristics and biotechnological applications of bacterial phytases. *Process Biochemistry*, 51(2), 159-169.
82. Jorquera, M., Martínez, O., Maruyama, F., Marschner, P., & de la Luz Mora, M. (2008). Current and future biotechnological applications of bacterial phytases and phytase-producing bacteria. *Microbes and environments*, 23(3), 182–191.

- 83. Kalsi, H. K., Singh, R., Dhaliwal, H. S., et Kumar, V. (2016).** Phytases from *Enterobacter* and *Serratia* species with desirable characteristics for food and feed applications. *3 Biotech*, 6(1), 64.
- 84. Karigar, C. S., et Rao, S. S. (2011).** Role of microbial enzymes in the bioremediation of pollutants: a review. *Enzyme research*.
- 85. Kerovuo, J., Lauraeus, M., Nurminen, P., Kalkkinen, N., et Apajalahti, J. (1998).** Isolation, characterization, molecular gene cloning, and sequencing of a novel phytase from *Bacillus subtilis*. *Applied and environmental microbiology*, 64(6), 2079–2085.
- 86. Ketudat Cairns, J. R., et Esen, A. (2010).**  $\beta$ -Glucosidases. *Cellular and molecular life sciences: CMLS*, 67(20), 3389–3405.
- 87. Kilcawley, K.N., Wilkinson, M.G., Fox, P.F. (2002).** Determination of key enzyme activities in commercial peptidase and lipase preparations from microbial or animal sources. *Enzyme and Microbial Technology*, 31, 310–320.
- 88. Kim, Y. -H., Gwon, M. -N., Yang, S., Park, T. -K., Kim, C. G., Kim, C. W., et Song, M. D. (2002).** Isolation of Phytase-Producing *Pseudomonas* sp. and Optimization of its Phytase Production. *J. Microbiol. Biotechnol.* , 12(2), 279–285.
- 89. Klosowski, G., Mikulski, D., et Jankowiak, O. (2018).** Extracellular Phytase Production by the Wine Yeast *S. cerevisiae* (Finarome Strain) during Submerged Fermentation. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 23(4), 848.
- 90. Konietzny, U., et Greiner, R. (2004).** Bacterial phytase: potential application, *in vivo* function and regulation of its synthesis. *Brazilian Journal of Microbiology*, 35(1) (2), 11–18.
- 91. Körfer, G., Novoa, C., Kern, J., Balla, E., Grütering, C., Davari, M. D., ... et Schwaneberg, U. (2018).** Directed evolution of an acid *Yersinia mollaretii* phytase for broadened activity at neutral pH. *Applied microbiology and biotechnology*, 102(22), 9607–9620.
- 92. Kouatchet, A., et Lebas, E. (2007).** Hyperammoniemic encephalopathy due to urea cycle disorders. *Réanimation*, 302–309.
- 93. Kuddus, M., et Ramteke, P. W.(2012).** Recent developments in production and biotechnological applications of cold-active microbial proteases. *Critical Reviews in Microbiology*,38(4),330–338.
- 94. Kumar, V., et Sinha, A.K. (2018).** General aspects of phytases. *Enzymes in Human and Animal Nutrition*, 53-72.

95. Laboure, A. M., Gagnon, J., et Lescure, A. M. (1993). Purification and characterization of a phytase (myo-inositol-hexakisphosphate phosphohydrolase) accumulated in maize (*Zea mays*) seedlings during germination. *The Biochemical journal*, 295 (Pt 2)(Pt 2), 413–419.
96. Lamid, M., Al-Arif, A., Asmarani, O., et Warsito, S. H. (2018). Characterization of phytase enzymes as feed additive for poultry and feed. *Earth and Environmental Science*, 137.
97. Lan, G. Q., Abdullah, N., Jalaludin, S., et Ho, Y. W. (2011). Purification and characterization of a phytase from *Mitsuokella jalaludinii*, a bovine rumen bacterium. *African Journal of Biotechnology*, 10(59), 12796-12806.
98. Lee, T. K., et Huang, K. C. (2013). The role of hydrolases in bacterial cell-wall growth. *Current opinion in microbiology*, 16(6), 760–766.
99. Lei X. G., Porres J. M., Mullaney E. J., et Brinch-Pedersen H. (2007). Phytase: Source, Structure and Application. *Industrial Enzymes*, 505-529.
100. Lei, X. G., et Porres, J. M. (2003). Phytase enzymology, applications, and biotechnology. *Biotechnology letters*, 25(21), 1787–1794.
101. Lei, X. G., Weaver, J. D., Mullaney, E., Ullah, A-H., et Azain, M. J. (2013). Phytase, a New Life for an “Old” Enzyme. *Annu. Rev. Anim. Biosci*, 1, 283–309.
102. Leisola, M. S. A., Jokela, J., Pastinen, O. A., Turunen, O., et Schoemaker, H. E. (2011). Industrial use of Enzymes. *Physiology and maintenance*, 2.
103. Lewis, T., et Stone, W. L. (2020). Biochemistry, Proteins Enzymes. *StatPearls Publishing*.
104. Li, S., Yang, X., Yang, S., Zhu, M., et Wang, X. (2012). Technology prospecting on enzymes: application, marketing and engineering. *Computational and structural biotechnology journal*, 2.
105. Li, Y-Y., Jiang, C-J., Wan, X-C., Zhang, Z-Z., et Li, D-X. (2005). Purification and Partial Characterization of  $\beta$ -Glucosidase from Fresh Leaves of Tea Plants (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze). *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 37(6), 363–370.
106. Liu, B.-L., Rafiq, A., Tzeng, Y.-M., et Rob, A. (1999). The Induction and Characterization of Phytase and Beyond. *Enzyme and Microbial Technology*, 22(5), 415 424.
107. Loewus, F. A., et Murthy, P. P. N. (2000). *myo*-Inositol metabolism in plants. *Plant Science*, 150, 1–19.

108. **Lowe, M. E., et Whitcomb, D. C. (2015).** Next Generation of Pancreatic Enzyme Replacement Therapy: Recombinant Microbial Enzymes and Finding the Perfect Lipase. *Gastroenterology*, 149(7), 1678–1681.
109. **Lowe, M. E., Rosenblum, J. L., et Strauss, A. W. (1989).** Cloning and characterization of human pancreatic lipase cDNA. *The Journal of biological chemistry*, 264(33), 20042-20048.
110. **Lupindu, A. M. (2017).** Isolation and Characterization of *Escherichia coli* from Animals, Humans, and Environment. *Escherichia coli - Recent Advances on Physiology, Pathogenesis and Biotechnological Applications*, 187-206.
111. **Macinnes J.I., et Lally E.T. (2006).** The Genus *Actinobacillus*. *The Prokaryotes*, 1094-1118.
112. **Martinez, D.E., Costa, M.L., Gomez, F.M., Otegui, M.S. et Guiamet, J.J. (2008).** Senescence-associated vacuoles are involved in the degradation of chloroplast proteins in tobacco leaves. *The Plant Journal*, 56, 196–206.
113. **Maštovská, K., et Lehotay, S.J. (2004).** Evaluation of common organic solvents for gas chromatographic analysis and stability of multiclass pesticide residues. *Journal of Chromatography A*, 1040, 259–272.
114. **Masum Akond, A., Crawford, H., Berthold, J., Talukder, Z. I., et Hossain, K. (2011).** Minerals (Zn, Fe, Ca and Mg) and Antinutrient (Phytic Acid) Constituents in Common Bean. *American journal of food technology*, 6(3), 235–243.
115. **McDonald, A. G., et Tipton, K. F. (2014).** Fifty-five years of enzyme classification: advances and difficulties. *The FEBS journal*, 281(2), 583–592.
116. **McDonald, A., (2019).** The Enzyme List Class 3 — Hydrolases. IUBMB.
117. **Mellef, J., Dridi, A., El -Bahri, L., et Belhaj, O. (2010).** Revue des effets de l'ajout de phytase microbienne sur la biodisponibilité du phosphore et les performances des volailles. *Revue Méd. Vét.*, 161(7), 342-352.
118. **Mishra, S. S., Ray, R. C., et Rosell, C. M. (2016).** Microbial Enzymes in Food Applications: History of Progress: History of Progress. *Microbial Enzymes in Food Applications*.
119. **Mogal, C., Singh, D., Mehta, A., Ahmad, T., et Suthar, K. (2017).** Isolation and biochemical characterization of phytase from different sources. *Applied Biotechnology and Bioengineering*, 2(4), 152-155.



120. **Mohammed, A., et Guda, C. (2011).** Computational Approaches for Automated Classification of Enzyme Sequences. *Journal of proteomics & bioinformatics*, 4, 147–152.
121. **Montella, I. R., Schama, R., & Valle, D. (2012).** The classification of esterases: an important gene family involved in insecticide resistance--a review. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 107(4), 437–449.
122. **Morant, A. V., Jørgensen, K., Jørgensen, C., Paquette, S. M., Sánchez-Pérez, R., Møller, B. L., et Bak, S. (2008).** beta-Glucosidases as detonators of plant chemical defense. *Phytochemistry*, 69(9), 1795–1813.
123. **Mort, J. S., Recklies, A. D., et Poole, A. R. (1984).** Extracellular presence of the lysosomal proteinase cathepsin B in *rheumatoid synovium* and its activity at neutral pH. *Arthritis and rheumatism*, 27(5), 509–515.
124. **Moss, J., Stanley, S. J., Nightingale, M. S., Murtagh, J. J. Jr., Monaco, L., Mishima, K., . . . et Tsai, S. C. (1992).** Molecular and immunological characterization of ADP ribosylarginine hydrolases. *The Journal of biological chemistry*, 267(15), 10481–10488.
125. **Nagashima, T., Tange, T., et Anazawa, H. (1999).** Dephosphorylation of Phytate by Using the *Aspergillus niger* Phytase with a High Affinity for Phytate. *Applied and Environmental Microbiology*, 65 (10), 4682–4684.
126. **Nakamura, Y., Fukuhara, H., et Sano, K. (2000).** Secreted phytase activities of yeasts. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 64(4), 841–844.
127. **Nannipieri, P., Giagnoni, L., Landi, L., et Renella, G. (2001).** Role of Phosphatase Enzymes in Soil. *Springer-Verlag Berlin Heidelberg*. Phosphorus in Action, Soil Biology, 26.
128. **Nigam, P. S. (2013).** Microbial enzymes with special characteristics for biotechnological applications. *Biomolecules*, 3(3), 597–611.
129. **Noone, P. G., Zhou, Z., Silverman, L. M., Jowell, P. S., Knowles, M. R., et Cohn, J. A. (2001).** Cystic fibrosis gene mutations and pancreatitis risk: relation to epithelial ion transport and trypsin inhibitor gene mutations. *Gastroenterology*, 121(6), 1310–1319.
130. **Obidi, O. F., Awe, O. O., Igwo-Ezikpe, M. N., et Okekunjo, F. O. (2018).** Production of phosphatase by microorganisms isolated from discolored painted walls in a typical tropical environment: a Non-Parametric analysis. *Arab journal of basic and applied sciences*, 25(3), 111–121.

131. Oh, B.-C., Choi, W.-C., Park, S., Kim, Y.-O., et Oh, T.-K. (2003). Biochemical properties and substrate specificities of alkaline and histidine acid phytases. *Appl Microbiol Biotechnol*, 63, 362–372.
132. Papamichael, E.M., Stamatis, H., Stergiou, P.-Y., Foukis, A., Gkini, O.A. (2019). Enzyme Kinetics and Modeling of Enzymatic Systems. *ScienceDirect*, 71-104.
133. Parra, M. A. M. (2001). Les phytases : structure, caractérisation et applications. *123 bio.net. Biologie et Recherche*.
134. Pasamontes, L., Haiker, M., Wyss, M., Tessier, M., Loon, A. P. G. M. V. (1997). Gene Cloning, Purification, and Characterization of a Heat-Stable Phytase from the Fungus *Aspergillus fumigatus*. *Applied and environmental microbiology*, 63(5), 1696–1700.
135. Paul, P.E.V., Sangeetha, V., et Deepika, R.G. (2018). Emerging Trends in the Industrial Production of Chemical Products by Microorganisms. *Recent Developments in Applied Microbiology and Biochemistry*, 107-125.
136. Pointillart, A. (2007). Phytates, phytases: leur importance dans l'alimentation des monogastriques. *Inra Production Animales*, 7 (1), 29-39.
137. Porter, C. T., Bartlett, G. J., et Thornton, J. M. (2004). The Catalytic Site Atlas: a resource of catalytic sites and residues identified in enzymes using structural data. *Nucleic acids research*, 32(Database issue), D129–D133.
138. Powar, V. K., et Jagganathan, V. (1982). Purification and Properties of Phytate-Specific Phosphatase from *Bacillus subtilis*. *Journal of bacteriology*, 151 (3), 1102-1108.
139. Puppala, K.R., Bhavsar, K., Sonalkar, V.V., Khire, J. M., et Dharne, M. S., (2019). Characterization of novel acidic and thermostable phytase secreting *Streptomyces* sp (NCIM 5533) for plant growth promoting characteristics. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 18, 101020.
140. Rabetafika, H. N., Paquot, M., et Dubois, P. (2006). Les polymères issus du végétal : matériaux à propriétés spécifiques pour des applications ciblées en industrie plastique. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*, 10 (3), 185 – 196.
141. Ranciaro, A., Campbell, M. C., Hirbo, J. B., Ko, W. Y., Froment, A., Anagnostou, P., . . . et Tishkoff, S. A. (2014). Genetic Origins of Lactase Persistence and the Spread of Pastoralism in Africa. *The American Journal of Human Genetics*, 94, 496–510.

142. Rao, M. B., Tanksale, A. M., Ghatge, M. S., et Deshpande, V. V. (1998). Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and molecular biology reviews: MMBR*, 62(3), 597–635.
143. Rapilly, F. (1968). Les techniques de mycologie en pathologie végétale. *Institut national de la recherche agronomique*, 19.
144. Raveendran, S., Parameswaran, B., Ummalyma, S. B., Abraham, A., Mathew, A. K., Madhavan, A., . . . et Pandey, A. (2018). Applications of Microbial Enzymes in Food Industry. *Food technology and biotechnology*, 56(1), 16–30.
145. Rejzek, M., Stevenson, C. E., Southard, A. M., Stanley, D., Denyer, K., Smith, A. M., Naldrett, M. J., . . . et Field, R. A. (2011). Chemical genetics and cereal starch metabolism: structural basis of the non-covalent and covalent inhibition of barley  $\beta$ -amylase. *MolecularBioSystems*, 7(3), 718–730.
146. Robinson, P. K., (2015). Enzymes: principles and biotechnological applications. *Essays Biochem*, 59, 1–41.
147. Rocky-Salimi, K., Hashemi, M., Safari, M., et Mousivand, M. (2016). A novel phytase characterized by thermostability and high pH tolerance from rice phyllosphere isolated *Bacillus subtilis* B.S.46. *Journal of advanced research*, 7(3), 381–390.
148. Roger, L., Thapon, J. L., Maubois, J. L., et Brule, G. (1976). Hydrolyse du lactose contenu dans l'ultrafiltrat de lait ou de lactosérum en réacteur enzymatique à membrane. *Le Lait, INRA Editions*, 56 (551\_552), 56-75.
149. Romsdahl J., Blachowicz A., Chiang, A. J., Singh N., Stajich, J. E., Kalkum M., . . . et Wang, C. C. C. (2018). Characterization of *Aspergillus niger* Isolated from the International Space Station. *Molecular Biology and Physiology*, 3(5).
150. Sajidan, A., Farouk, A., Greiner, R., Jungblut, P., Müller, E-C., et Borriss, R. (2004). Molecular and physiological characterisation of a 3-phytase from soil *Bacterium Klebsiella* sp. ASR1. *Appl Microbiol Biotechnol*, 65,110–118.
151. Sajidan, Wulandari, R., Sari, E. N., Ratriyanto, A., Weldekiros, H. et Greiner, R. (2015). Phytase-Producing Bacteria from Extreme Regions in Indonesia. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 58(5), 711-717.
152. Sambuk, E. V., Fizikova, A. Y., Savinov, V. A., et Padkina, M. V. (2011). Acid phosphatases of budding yeast as a model of choice for transcription regulation research. *Enzyme research*, 356093.

153. Saranraj, P., et Stella, D. (2013). Fungal Amylase - A Review. *International Journal of Microbiological Research*, 4 (2), 203-211.
154. Saranraj, P., Stella, D., et Reetha, D. (2012). Microbial cellulases and its application: A Review. *International Journal of Biochemistry & Biotech Science*, 1, 1-12.
155. Shah, M.A., et Mir, S.A. (2019). Plant Proteases in Food Processing. *Reference Series in Phytochemistry*, 443-464.
156. Sharadan, R., Venkateswarlu, G., Venkateswar, S., et AnandRao, M. (2014). Application of cellulases – Review. *International journal of pharmaceutical, chemical and biological sciences*, 4(2), 424-437.
157. Sharma, N., Sharma, K.P., Gaur, R.K. et Gupta, V.K. (2011). Role of Chitinase in Plant Defense. *Asian Journal of Biochemistry*, 6(1), 29-37.
158. Shedova, E., Lipasova, V., Velikodvorskaya, G., Ovadis, M., Chernin, L. et Khme, I. (2008). Phytase activity and its regulation in a rhizospheric strain of *Serratia plymuthica*. *Folia Microbiol*, 53(110).
159. Shin, H.D., Guo, X., et Chen, R. R. (2007). Biocatalysis for Chiral Synthesis. *Bioprocessing for Value-Added Products from Renewable Resources*, 351-371.
160. Silva, E. O., et Bracarense, A. P. (2016). Phytic Acid: From Antinutritional to Multiple Protection Factor of Organic Systems. *Journal of food science*, 81(6).
161. Singh, B., Satyanarayana, T. (2013). Phytases and Phosphatases of Thermophilic Microbes: Production, Characteristics and Multifarious Biotechnological Applications. *Thermophilic Microbes in Environmental and Industrial Biotechnology*, 671-687.
162. Singh, R., Kumar, M., Mittal, A., et Mehta, P. K.(2016). Microbial enzymes: industrial progress in 21st century. *3 Biotech* , 6(174).
163. Singh, R.S., Singh, T., et Pandey, A. (2019). Microbial Enzymes—An Overview. *Advances in Enzyme Technology*.
164. Soni, S.K., Magdum, A. et Khire, J.M. (2010). Purification and characterization of two distinct acidic phytases with broad pH stability from *Aspergillus niger* NCIM 563. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26, 2009–2018.
165. Span, P. N., Benraad ThJ, Sweep, C. G., et Smals, A. G. (1996). Kinetic analysis of steroid 5 alpha-reductase activity at neutral pH in benign prostatic hyperplastic tissue: evidence for type I isozyme activity in the human prostate. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 57(1-2), 103–108.

166. Spier, M.R., Rodrigues, M., Paludo, L., et Cerutti, M.L.M.N. (2018). Chapter 5 Perspectives of phytases in nutrition, biocatalysis, and soil stabilization. *Enzymes in Human and Animal Nutrition*, 89-104.
167. Stewart, G.A., Richardson, J.P., Zheng, J., Robinson, C. (2013). 26 - The Structure and Function of Allergens. *Middleton's Allergy (Eighth Edition)*, 1, 398-429.
168. Sujani, S., et Seresinhe, R. T. (2015). Exogenous Enzymes in Ruminant Nutrition: A Review. *Asian Journal of Animal Sciences*, 9 (3), 85-99.
169. Suleimanova, A. D., Toymentseva, A. A., Boulygina, E. A., Kazakov, S. V., Mardanova, A. M., Balaban, N. P., et Sharipova, M. R. (2015). High-quality draft genome sequence of a new phytase-producing microorganism *Pantoea* sp. 3.5.1. *Standards in genomic sciences*, 10, 95.
170. Suleimanova, A. D., Beinhauer, A., Valeeva, L. R., Chastukhina, I. B., Balaban, N. P., Shakirov, E. V., ... et Sharipova, M. R. (2015). Novel Glucose-1-Phosphatase with High Phytase Activity and Unusual Metal Ion Activation from Soil Bacterium *Pantoea* sp. Strain 3.5.1. *Applied and Environmental Microbiology*, 81 (19).
171. Sundarram, A., et Murthy, T. P. K. (2014).  $\alpha$ -Amylase Production and Applications: A Review. *Journal of Applied & Environmental Microbiology*, 2, (4), 166-175.
172. Tamayo-Ramos, J. A., Sanz-Penella, J. M., Yebra, M. J., Monedero, V., et Harosa, M. (2012). Novel Phytases from *Bifidobacterium pseudocatenulatum* ATCC 27919 and *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* ATCC 15697. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(14), 5013–5015.
173. Tanaka, T., et Yada, R. Y. (2001). N-terminal portion acts as an initiator of the inactivation of pepsin at neutral pH. *Protein engineering*, 14(9), 669–674.
174. Tiwari, S. P., Srivastava, R., Singh, C.S., Shukla, K., Singh, R.K., Singh, P., . . . Sharma, R. (2015). Amylases: An Overview with special reference to alpha amylase. *Journal of Global Biosciences*, 4(1), 1886-1901.
175. Toppan, A., et Dominique, R. (1982). Activité chitinasique de plantes de melon infectées par *Colletotrichum lagenarium* ou traitées par l'éthylène. *Agronomie*, 2 (9), 829-834.
176. Tran, T. T., Hatti-Kaul, R., Dalsgaard, S., et Yu, S. (2011) a. A simple and fast kinetic assay for phytases using phytic acid–protein complex as substrate. *Analytical Biochemistry*, 410, 177–184.

177. **Tran, T.T., Hashim, S.O., Gaber, Y., Mamo, G., Mattiasson, B., et Hatti-Kaul, R. (2011) b.** Thermostable alkaline phytase from *Bacillus* sp. MD2: Effect of divalent metals on activity and stability. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 105(7), 1000-1007.
178. **Tsuchiya , T., Ohta, H., Okawa, K., Iwamatsu, A., Shimada, H., Masuda, T., et Takamiya, K-i. (1999).** Cloning of chlorophyllase, the key enzyme in chlorophyll degradation: Finding of a lipase motif and the induction by methyl jasmonate. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(26), 15363.
179. **Ugwuanyi, J. O. (2016).** Enzymes for Nutritional Enrichment of Agro-Residues as Livestock Feed. *Agro-Industrial Wastes as Feedstock for Enzyme Production*, 233-260.
180. **Umayaparvathi, S., Meenakshi,S., Arumugam, M., et Balasubramanian, T. (2013).** Purification and characterization of protease from *Bacillus cereus* SU12 isolated from oyster *Saccostrea cucullata*. *African Journal of Biotechnology*, 12(40), 5897-5908.
181. **Vats, P., et Banerjee, U.C. (2004).** Production studies and catalytic properties of phytases (*myo*-inositolhexakisphosphate phosphohydrolases): an overview. *Enzyme and Microbial Technology*, 35(1), 3-14.
182. **Vijayaraghavan, P., Primiya, R. R., et Prakash Vincent, S. G. (2013).** Thermostable Alkaline Phytase from *Alcaligenes* sp. in Improving Bioavailability of Phosphorus in Animal Feed: In Vitro Analysis. *ISRN biotechnology*, 2013, 394305.
183. **Vlugt-Bergmans, C. J. B. V-D., Meeuwsen, P.J.A., Voragen, A. G. J., et Vanooyen, A. J. J.(2000).** Endo-Xylogalacturonan Hydrolase, a Novel Pectinolytic Enzyme. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(1), 36–41.
184. **Wang,X., Upatham,S., Panbangred,W., Isarankul,D., Summpunn,P., Wiyakrutta,S., et Meevootisom, V. (2004).** Purification, Characterization, Gene Cloning and Sequence Analysis of a Phytase from *Klebsiella pneumoniae* sub sp. *pneumoniae* XY 5. *Science Asia*, 30, 383-390.
185. **Watanabe, N., Ota,Y., Minoda, Y., et Yamada, K. (1977).** Isolation and Identification of Alkaline Lipase Producing Microorganisms, Cultural Conditions and Some Properties of Crude Enzymes. *Agricultural and Biological Chemistry*, 41 (8), 1353-1358

186. Wyss, M., Brugger, R., Kronenberger, A., Remy, R., Fimbel, R., Oesterhelt, G., et Lehmann, M. (1999). Biochemical Characterization of Fungal Phytases (*myo*-Inositol Hexakisphosphate Phosphohydrolases): Catalytic Properties. *Applied and Environmental Microbiology*, 65 (2), 367–373.
187. Wyss, M., Pasamontes, L., Rémy, R., Kohler, J., Kusznir, E., Gadiant, M., et Müller, F. (1998). Comparison of the Thermostability Properties of Three Acid Phosphatases from Molds: *Aspergillus fumigatus* Phytase, *A. niger* Phytase, and *A. niger* pH 2,5 Acid Phosphatase. *Applied and environmental microbiology*, 64(11), 4446–4451.
188. Yang, J., Li, W., Ng, T. B., Deng, X., Lin, J., et Ye, X. (2017). Laccases: Production, Expression Regulation, and Applications in Pharmaceutical Biodegradation. *Frontiers in microbiology*, 8, 832.
189. Yao, M. Z., Zhang, Y. H., Lu, W. L., Hu, M. Q., Wang, W., et Liang, A. H. (2012). Phytases: crystal structures, protein engineering and potential biotechnological applications. *Journal of applied microbiology*, 112(1), 1–14.
190. Zamudio, M., González, A., et Medina, J. A. (2001). *Lactobacillus plantarum* phytase activity is due to non-specific acid phosphatase. *Letters in Applied Microbiology*, 32, 181-184.
191. Zhang, C., et Kim, S-K. (2010). Research and Application of Marine Microbial Enzymes: Status and Prospects. *Mar. Drugs*, 8, 1920-1934.
192. Zhang, W., Mullaney, E. J., et Lei, X. G. (2007). Adopting selected hydrogen bonding and ionic interactions from *Aspergillus fumigatus* phytase structure improves the thermostability of *Aspergillus niger* PhyA phytase. *Applied and environmental microbiology*, 73(9), 3069–307

## Résumé

Le phosphore fait partie des composants essentiels à la production des molécules importantes pour les cellules, telles que l'ADN, l'ARN et l'ATP. Chez les végétaux consommés par l'homme et les animaux, l'acide phytique est considéré, comme la principale forme de stockage du phosphore, mais cette forme de stockage diminue la biodisponibilité phosphore et le rend non facilement utilisable par l'homme et les animaux. Les phytases sont des enzymes de la famille des hydrolases, qui hydrolysent l'acide phytique permettant, ainsi, la libération des phosphores. Ces phytases se trouvent chez un certain nombre d'espèces animales, végétales et microbiennes, cependant, les phytases bactériennes sont les plus importantes et les plus utilisées dans les industries des aliments destinés à la consommation humaine et animale. L'objectif de notre travail est de tester les propriétés chélatrices de l'acide phytique pour rechercher et caractériser, après, des phytases extracellulaires à intérêt industriel, chez 4 bactéries : 2 souches de la collection de notre laboratoire *Enterobacter* sp et *Escherichia coli* et 2 bactéries isolées à partir de la rhizosphère (IS1 et IS2). Les résultats obtenus montrent que l'activité optimale des phytases d'*Enterobacter* sp est à 37°C et à pH 5, tandis que l'activité optimale des phytases d'*E.coli*, est à 45°C et aux pH 5 et 9. Pour les isolats IS1 et IS2, leurs activités optimales sont à 30°C, et à pH9 et pH5, respectivement, pour les phytases de l'isolat IS1 et l'isolat IS2.

**Mots-clés :** enzymes, acide phytique, phosphore, phytases, bactéries, caractérisation des phytases.

## Abstract

Phosphorus is one of the essential components for the production of molecules important for cells, such as DNA, RNA and ATP. In plants consumed by humans and animals, phytic acid is considered, as the main form of storage of phosphorus, but this form of storage decreases the bioavailability of phosphorus and makes it not easily usable by humans and animals. Phytases are enzymes of the hydrolase family, which hydrolyze phytic acid, thereby releasing phosphorus. These phytases are found in a number of animal, plant and microbial species, however, bacterial phytases are the most important and used in the food industries for human and animal consumption. The objective of our work is to test the chelating properties of phytic acid to search for and characterize, afterwards, extracellular phytases of industrial interest, in 4 bacteria: 2 strains from the collection of our laboratory *Enterobacter* sp and *Escherichia coli* and 2 bacteria isolated from the rhizosphere (IS 1 and IS 2).. The results obtained show that the optimal phytase activity of *Enterobacter* sp is at 37 ° C and at pH 5, while the optimal activity of *E.coli* phytases is at 45 ° C and at pH 5 and 9. For isolates IS1 and IS2, their optimal activities are at 30 ° C, and at pH9 and pH5, respectively, for the phytases of isolate IS 1 and isolate IS 2.

**Keywords:** enzymes, phytic acid, phosphorus, phytases, bacteria, characterization of phytases.

## ملخص

يعد الفوسفور أحد المكونات الأساسية لإنتاج الجزيئات المهمة للخلايا، مثل ADN و ARN و ATP. في النباتات التي يستهلكها الإنسان والحيوان، يعتبر حمض الفايثيك الشكل الرئيسي لتخزين الفوسفور، ولكن هذا الشكل من التخزين يقلل من التوافر الحيوي للفوسفور ويجعله غير قابل للاستخدام بسهولة من قبل البشر والحيوانات. الفيتازات هي إنزيمات من عائلة الهيدرولاز، التي تحلل حمض الفايثيك، وبالتالي تطلق الفوسفور، وتوجد هذه الفيتازات في عدد من الأنواع الحيوانية والنباتية والميكروبية، ومع ذلك، فإن الفيتازات البكتيرية هي الأكثر أهمية وتستخدم في الصناعات الغذائية للاستهلاك البشري والحيوانية. الهدف من عملنا هو اختبار الخصائص المخيلية لحمض الفايثيك للبحث عن الفيتازات المطروحة خارج الخلية ذات الأهمية الصناعية وتمييزها في 4 بكتيريا: سلالتان من مجموعة مختبرنا *Enterobacter* sp و *Escherichia coli* و 2 بكتيريا معزولة من التربة المحيطة بجذور النباتات IS 1 و IS 2. أظهرت النتائج التي تم الحصول عليها أن نشاط إنزيم الفيتاز الأمثل، هو الخاص ببكتيريا *Enterobacter* sp هو عند حرارة 37 درجة مئوية وفي درجة الحموضة 5، في حين أن النشاط الأمثل لأنزيم فيتاز *E.coli* يكون عند 45 درجة مئوية وعند درجة الحموضة 5 و 9. بالنسبة للعزلات IS1 و IS2، تكون أنشطتها المثلى عند حرارة 30 درجة مئوية، وفي درجتي الحموضة 9 و 5، على التوالي للفيتازات المعزولة من IS 1 و IS 2.

**الكلمات المفتاحية:** إنزيمات، حمض فيثيك، فسفور، فيتاز، بكتيريا، توصيف الفيتاز.